Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского
Серия «Биология, химия». Том 20 (59). 2007. № 2. С. 54-61.

УДК 591.1: 615.849.11

ПРИМЕНЕНИЕ МОРФОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ИЗОБРАЖЕНИЙ КЛЕТОК ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ СОДЕРЖАНИЯ ПЕРОКСИДАЗЫ В НЕЙТРОФИЛАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ КРЫС

Махонина М.М., Чуян Е.Н., Журавлева Л.В.

Показано, что применение морфометрического анализа изображений клеток крови позволяет получить целый спектр признаков: оптическую плотность, площадь активной цитоплазмы, количественный показатель содержания, показатели формы клеток, построить гистограммы распределения активности того или иного включения. Тогда как использование критерия L.S. Kaplow позволяет вычислить цитохимический показатель содержания пероксидазы в нейтрофилах крови, который сопоставим только с площадью активной цитоплазмы, однако изменение функциональной активности клеток периферической крови, при различных экспериментальных воздействиях, зависит, в том числе, от оптической плотности. Таким образом, морфометрический анализ изображений клеток периферической крови позволяет значительно повысить эффективность использования методов цитохимического анализа и получать не только качественные, но и количественные результаты исследования.

Ключевые слова: морфометрический анализ, нейтрофилы, пероксидаза

ВВЕДЕНИЕ

Медико-биологические объекты характеризуются большой сложностью и многофакторностью, что обуславливает высокие требования к надежности, точности и достоверности результатов.

Развитие современных биологических исследований базируется на совершенствовании методических подходов. Последние десятилетия развития биологии и медицины характеризуются расширением применения принципов и методов смежных наук, широко использующих математические и количественные методы исследований.

Наиболее адекватными в оценке функционального состояния форменных элементов крови являются цитохимические методы, поскольку биохимическое исследование периферической крови весьма затруднено в связи со сложностью выделения клеток из крови. Методы количественного цитохимического исследования или цитоспектрофотометрии, основанные, на фотометрии требуют применения соответствующих приборов, которые достаточно сложны в использовании и дороги.

Однако цитохимические методы имеют определенные недостатки, связанные, во-первых, с большой трудоемкостью количественной оценки результатов. Во-

вторых, эти методы являются полуколичественными, следовательно, для них характерна большая погрешность измерения из-за значительной доли субъективизма исследователя. В-третьих, они позволяют определить только цитохимический показатель содержания (ЦПС) выявляемого включения в клетке [1], тогда как большое значение для определения функциональной активности клетки могут иметь и другие показатели.

Поэтому значительный интерес представляет автоматизированная обработка результатов цитохимических реакций.

В связи с этим целью данной работы явилось обоснование метода обработки результатов цитохимических реакций на примере выявления содержания пероксидазы (ПО) в нейтрофилах периферической крови крыс путем применения морфометрического анализа при исследовании цитологических препаратов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования выполнены на 60 беспородных белых крысах-самцах массой 120–150 г. В настоящем исследовании использовали крыс только со средним уровнем двигательной активности и низкой эмоциональностью. Это связано с тем, что, согласно нашим и литературным данным [2, 3], такие животные являются преобладающими в популяции. Поэтому можно считать, что у животных этой группы развивается типичная реакция на воздействия различной природы и интенсивности.

Предварительно отобранные животные были разделены на четыре группы по 15 особей в каждой. К первой группе были отнесены животные, содержавшиеся в обычных условиях вивария (биологический контроль, К). Животные второй группы подвергались изолированному воздействию ЭМИ КВЧ (КВЧ). Третью группу составили крысы, находящиеся в условиях ограничения подвижности (гипокинезия, ГК), создавалемое помещением крыс в специальные пеналы из оргстекла, в которых они находились в течение девяти дней эксперимента по 22 часа в сутки. В четвертую группу вошли животные, находившиеся в условиях ГК и одновременно подвергавшиеся воздействию ЭМИ КВЧ (КВЧ+ГК).

Воздействие ЭМИ КВЧ осуществлялось в течение девяти суток с помощью генератора "Луч. КВЧ-071" (λ=7,1 мм, плотность потока мощности 0,1 мВт/см^2) на затылочно-воротниковую область по 30 мин ежедневно в течение девяти дней

Рассмотрим применение морфометрического метода исследований препаратов крови на примере определения пероксидазной активности нейтрофилов.

Забор крови осуществлялся путем пункции хвостовой вены крыс всех экспериментальных групп на девятые сутки эксперимента. Для выявления содержания ПО в нейтрофилах мазки крови окрашивали по методу G.S. Gracham [4] и исследовали при помощи системы морфометрического анализа. Для этого использовали комплекс, состоящий из микроскопа «Zeiss», ПЗС-видеокамеры (SK-2046), платы видеозахвата (разрешение 640x480), персональный компьютер и пакет проблемно-ориентированного программного обеспечения - морфометр «Image – Pro» (рис. 1). В каждом мазке исследовалось 45-50 нейтрофилов.

Изображение окрашенной клетки вводилось в компьютер и подвергалось цифровой обработке с помощью системы фильтров, результатом чего является

новое изображение с отсутствием искажений и помех. Затем проводилось выделение объектов и необходимые измерения. Определялись следующие показатели: площадь клетки (S), площадь активной (окрашенной) цитоплазмы (Sa), ее оптическая плотность (OD). Оптическая плотность окрашенной части цитоплазмы соответствует степени окраски, измеряется в условных единицах и находится в диапазоне значений от 0 до 1 усл. ед.

Результирующим шагом является определение количественного показателя содержания ПО в нейтрофилах периферической крови крыс (QIC – quantity indicator of the contents):

$$QIC = OD*Sa/SIC$$

QIC является интегральным показателем, зависящим не только от размеров и интенсивности окрашенной части цитоплазмы, но и от размеров самой клетки, что не возможно учесть при других типах исследований.

При таком построении эксперимента возможно вычисление следующих числовых характеристик QIC: максимального и минимального значений, среднего арифметического, среднего квадратичного отклонения, значений моды, медианы, построение гистограммы распределения клеток.

Для выявления корреляционных зависимостей использовался анализ по Пирсону [5]. Расчеты и графическое оформление полученных в работе данных проводились с использованием программ Microsoft Excell [6] и «Oregen Pro 7» [7].

Крыс содержали в условиях вивария при температуре 18 – 22оС на стандартном пищевом рационе и в стандартных условиях освещения (12 часов темнота: 12 часов свет). Световая фаза начиналась в 7.00 утра. Эксперименты проводились с соблюдением принципов «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 2000), постановления первого национального конгресса по биоэтике (Киев, 2001), закона Украины №3447-IV «Про захист тварин від жорстокого походження» от 21.02.2006 [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе работы показано, что достоверных различий между размерами нейтрофилов (S) у животных различных экспериментальных групп не наблюдалось (табл. 1). Вместе с тем QIC ПО нейтрофилов изменялся разнонаправлено при различных воздействиях, поскольку S одинаковая, то выявленые изменения могут быть связаны только с изменением Sa и OD.

Воздействие ЭМИ КВЧ на интактных крыс привело к тому, что QIC ПО у животных этой группы был выше на 40,14% ($p<0,01$) относительной значений, зафиксированных у животных контрольной группы. Увеличение QIC ПО произошло за счет повышения Sa на 33,96% ($p<0,001$) и OD на 10,99% ($p<0,05$), что свидетельствует о повышении функциональной активности нейтрофилов. Увеличение QIC согласуется с результатами наших предыдущих исследований об увеличении активности бактерицидных систем нейтрофилов под действием изучаемого фактора [9-11].

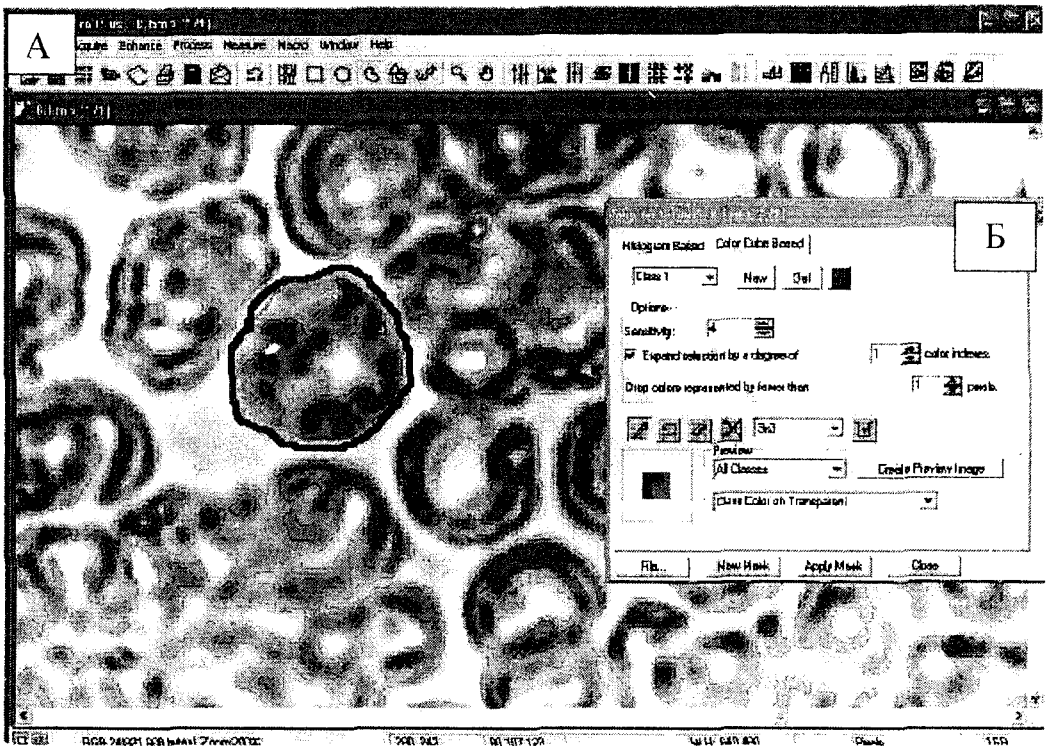

Рис.1. А – интерфейс программы «Image-Pro»; Б – процедура выделения фермента.

Таблица 1.

Значения количественного показателя содержания (QIC), оптической плотности (OD), площади активной цитоплазмы (Sa) пероксидазы сегментоядерных нейтрофилов периферической крови крыс контрольной группы (К) и при воздействиях ЭМИ КВЧ (КВЧ), гипокинезии (ГК), их комбинации (ГК+КВЧ) на девятые сутки эксперимента ($\bar{x} \pm S\bar{x}$)

Группа	№ группы	S, мкм^2	Sa, мкм^2	OD, усл. ед	QIC, усл.ед.
К (n=15)	1	373,00±26,54	165,94±5,99	0,53±0,02	0,24±0,01
КВЧ (n=15)	2	394,25±16,59	222,29±4,39 $p_{1,2}$<0,001	0,58±0,02 $p_{1,2}$<0,05	0,33±0,03 $p_{1,2}$<0,01
ГК (n=15)	3	369,89±35,30	130,69±3,23 $p_{1,3}$<0,001 $p_{2,3}$<0,001	0,47±0,02 $p_{1,3}$<0,05 $p_{2,3}$<0,001	0,17±0,02 $p_{1,3}$<0,01 $p_{2,3}$<0,001
ГК+КВЧ (n=15)	4	346,77±33,83	146,66±5,91 $p_{1,4}$<0,05 $p_{2,4}$<0,001 $p_{3,4}$<0,05	0,53±0,01 $p_{2,4}$<0,01 $p_{3,4}$<0,01	0,23±0,01 $p_{2,4}$<0,001 $p_{3,4}$<0,01

Примечание: $p_{1,4}$ - достоверность различий при сравнении с данными групп, обозначенными в таблице 1-4 соответственно

Известно, что система ПО в нейтрофилах образует мощную антибактериальную систему, эффект которой по силе значительно превышает соответствующий эффект составляющих ее компонентов [12]. ПО вместе со своим субстратом перекисью водорода формирует фермент-субстратный комплекс, который окисляет ионы галогена (йод, хлор, бром) и образует агенты, обладающие высокой реакционной способностью [13]. Эта система высокоактивна против грибков, вирусов, микоплазм. Таким образом, под влиянием ЭМИ КВЧ увеличивается активность одной из важгнейших бактерицидных систем нейтрофилов, которая обеспечивают подавление активности фагоцитированных бактерий, подготавливая их к дальнейшему расщеплению [14].

При анализе гистограмм распределения клеток по значениям QIC в контрольной группе крыс и группах животных с экспериментальными воздействиями (рис. 2) выявлено, что у контрольных животных и у животных, подвергнутых КВЧ-воздействию, гистограммы были многомодальные, причем, у животных, находящихся под влиянием ЭМИ КВЧ наблюдался сдвиг гистограммы в сторону увеличения абсолютных значений QIC.

Ограничение двигательной активности крыс привело к снижению QIC ПО на 28,88% ($p<0,01$), что связано со снижением как Sa на 21,25% ($p<0,001$), так и OD на 11,28% ($p<0,05$) относительно значений, зарегистрированных в первой группе крыс (К) (табл. 1).

Полученные результаты согласуются с нашими и литературными данными об изменении ЦПС ПО в нейтрофилах под влиянием экспериментальной вызванной стресс-реакции [9-11].

В случае, когда падает активность основной бактерицидной системы нейтрофилов, активность фагоцитированных бактерий если и подавляется, то значительно меньше, чем у интактных животных. Очевидно, что такие бактерии не могут быть доступны действию протеаз, которые способны расщеплять в фаголизосоме нейтрофила только те бактерии, которые были умерщвлены системой ПО, неферментными катионными, лизоцимом, лактоферрином и не влияют на живые, жизнеспособные структуры [14].

У животных, находящихся в условиях изолированного ограничения подвижности, наблюдалось мономодальное распределение QIC ПО, а сдвиг гистограммы распределения в сторону уменьшения абсолютных значений был явно выражен.

Повышение QIC ПО при действии ЭМИ КВЧ на гипокинезированных животных согласуется с изменением ЦПС ПО при тех же экспериментальных воздействиях [9-11]. У животных, подвергавшихся комбинированному действию ЭМИ КВЧ и ГК, не выявлено изменений изученных показателей, характерных для ГК стресса, что свидетельствует о нормализации изученного показателя. Уровень QIC ПО достоверно отличался от значений у гипокинезированных животных (133,24%, $p<0,01$). Рост этого показателя связан с увеличением Sa на 11,46% ($p<0,05$) и OD на 12,89% ($p<0,01$) относительно значений у крыс третьей группы (ГК).

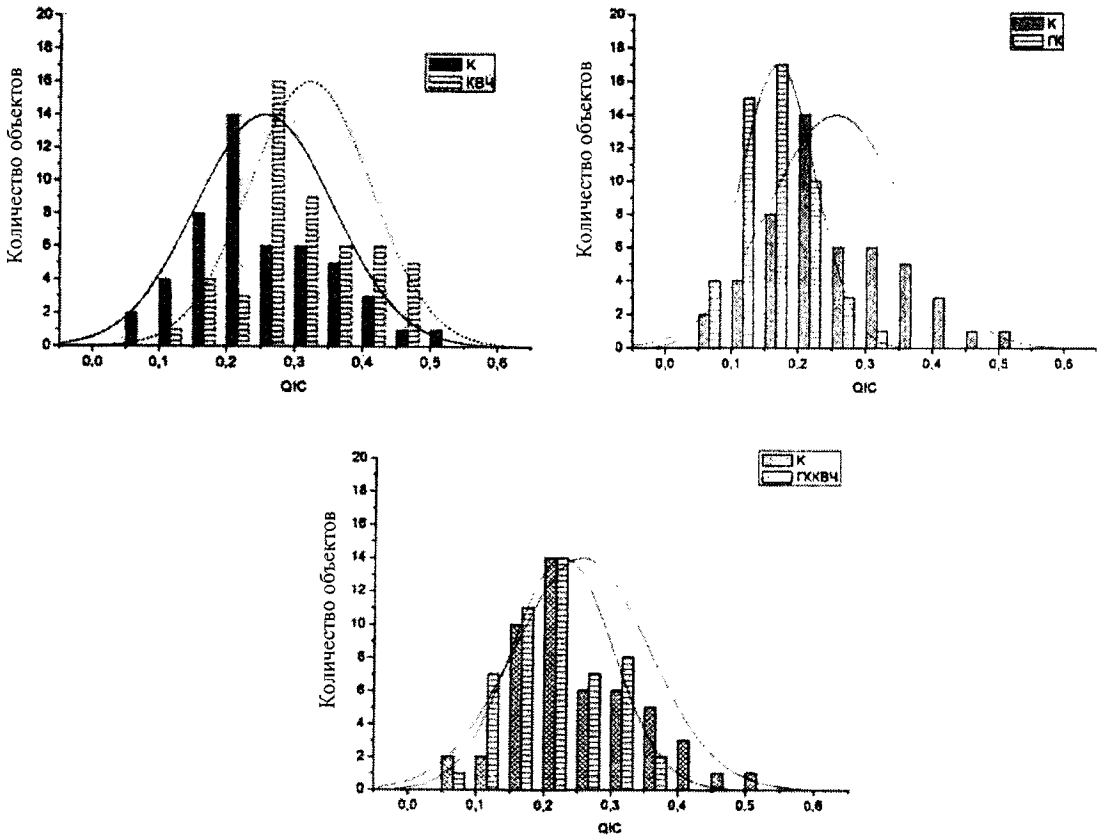

Рис. 2. Гистограммы распределения значений количественного показателя содержания пероксидазы сегментоядерных нейтрофилов крови у животных контрольной группы (К) и при воздействиях ЭМИ КВЧ (КВЧ), гипокинезии (ГК), их комбинации (ГК+КВЧ) на девятые сутки эксперимента.

В группах животных, находящихся в условиях комбинированного с ЭМИ КВЧ экспериментально вызванной ГК, гистограммы были многомодальными, а сдвига гистограммы, характерного для гипокинетического стресса, не наблюдалось и присутствовало лишь некоторое ее уширение.

Одномодальность гистограмм распределения количественного показателя содержания ПО при действии ГК может быть неблагоприятным прогностическим признаком [15].

Таким образом, как изолированное, так и комбинированное с ГК действие ЭМИ КВЧ привело к увеличению функциональной активности нейтрофилов крови крыс. Из полученных результатов видно, что в определении QIC у животных, находящихся в условиях изолированного и комбинированного с ЭМИ КВЧ ограничения подвижности, значительную роль играло изменение OD, тогда как при вычислении ЦПС по принципу L.S. Kaplow учитывается только значение Sa, а

изменение OD не регистрируется. При этом QIC ПО с высокой степенью достоверности коррелирует с ЦПС ПО изученного показателя ($r=0,97$, $p<0,05$).

В большинстве случаев на разницу QIC между группами животных, подвергнутых различным воздействиям влияли изменение и Sa, и OD, следовательно, диапазон изменений QIC был более широким, чем при определении ЦПС изучаемого показателя. Следовательно при помощи морфометрического анализа есть возможность фиксировать более тонкие изменения показателей функциональной активности лейкоцитов, что немаловажно при изучении влияния низкоинтенсивных факторов.

ВЫВОДЫ

1. Способ морфометрического анализа изображений клеток периферической крови позволяет значительно повысить эффективность использования методов цитохимического анализа и получать не только качественные, но и количественные результаты исследования.
2. Изолированное действие ЭМИ КВЧ на интактных животных проявилось в достоверном увеличении количественного показателя содержания ПО на 40% ($p<0,05$) относительно значений этого показателя в контрольной группе животных, что свидетельствует о повышении бактерицидной активности нейтрофилов.
3. Под влиянием девятисуточной ГК произошло уменьшение количественного показателя содержания ПО на 29% ($p<0,02$) относительно значений этого показателя в контрольной группе. Уменьшение этого параметра происходило в большей степени за счет снижения оптической плотности окрашенной части цитоплазмы нейтрофилов.
4. Комбинированное воздействие ЭМИ КВЧ и гипокинезии вызвало достоверное повышение количественного показателя содержания пероксидазы относительно такового у животных, также находившихся в условиях гипокинезии, но дополнительно не подвергавшихся действию ЭМИ КВЧ на 33% ($p<0,05$).

Список литературы

1. Kaplow L.S. Cytochemistry of leukocyte alkaline phosphatase: use of complex naphthol AS phosphate in aza dye coupling technics // Am. J. Clin. Pathol. – 1963. – Vol. 39. – P. 439-449.
2. Сантана Вега Л. Роль индивидуальных особенностей двигательной активности в развитии гипокинетического стресса у крыс.: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.13 / СГУ. – Симферополь, 1991. – 21 с.
3. Чуян Е.Н. Влияние миллиметровых волн нетепловой интенсивности на развитие гипокинетического стресса у крыс с различными индивидуальными особенностями: Автореф. дис...канд. биол. наук: 03.00.13 / СГУ. – Симферополь, 1992. – 25 с.
4. Клиническая цитохимия / под ред. А.В.Ягоды, Н.А.Локтева; Ставропольская государственная мед. академия. – Ставрополь: СтГМА, 2005. – 485 с.
5. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica. М.: МедиаСфера, 2006. – 312 с.
6. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – К.: Модмон, 2000. – 319 с.

7. Полулях С.Н., Пакеты прикладных программ в физике. Симферополь. Пирамида-Крым, 1998, 104 с.
8. Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21.02.2006 № 3447-IV // Відомості Верховної Ради України. – 2006. – № 27. – С. 990.
9. Чуян Е.Н. Нейроімуноендокринні механізми адаптації до дії низько інтенсивного електромагнітного випромінювання надто високої частоти // Автореф. дис... докт. біол. наук. – Київ, 2004. – 40 с.
10. Верко Н.П. Функциональная активность нейтрофилов крови крыс при развитии адаптационных реакций различного типа Автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.13 / ТНУ – Симферополь, 2003. – 20 с.
11. Махонина М.М. Биологическое действие электромагнитного излучения крайне высокой частоты в условиях блокады опиоидных рецепторов. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.02 / ТНУ – Симферополь, 2007. – 24 с.
12. Пигаревский В.Е. Зернистые лейкоциты и их свойства. – М.: Медицина, 1978. – 128 с.
13. Бахов И.И., Александрова Л.З., Титов В.Н. Роль нейтрофилов в регуляции метаболизма тканей (обзор литературы) // Лабораторное дело. – 1988. – № 6. – С. 3-12.
14. Прийма О.Б. Зміна вмісту неферментних катіонних білків та ступеня пошкодження лейкоцитів у кролів при кровотраті // Фізіол. журн. – 2001. – Т. 47, № 6. – С. 50-54.
15. Макулова Т.Г. Анализ активности пероксидазы сегментоядерных нейтрофилов на ЭВМ с цифровой обработкой изображений // Кл. лаб. диагностика. – 1994. - № 4. – С. 21-25.

Махоніна М.М., Чуян О.М., Журавлева Л.В. **Застосування морфометричного аналізу зображень клітин для кількісної характеристики змісту пероксидази в нейтрофілах периферичної крові щурів** // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського . Серія „Біологія, хімія". – 2007. – Т. 20 (59). – № 2. – С. 54-61.

Показане, що застосування морфометричного аналізу зображень клітин крові дозволяє одержати цілий спектр ознак: оптичну щільність, площу активної цитоплазми, кількісний показник змісту, показники форми клітин, побудувати гістограми розподілу активності того або іншого включення. Тоді як використання критерію L.S. Kaplow дозволяє обчислити цитохімічний показник змісту пероксидази в нейтрофілах крові, який зіставимо тільки із площею активної цитоплазми, однак зміна функціональної активності клітин периферичної крові, при різних експериментальних впливах, залежить, у тому числі, від оптичної щільності.

Таким чином, морфометричній аналіз зображень клітин периферичної крові дозволяє значно підвищити ефективність використання методів цитохімічного аналізу й одержувати не тільки якісні, але й кількісні результати дослідження.

Ключові слова: морфометричній аналіз, нейтрофіли, пероксидаза

Makhonina M.M., Chuyan E.N., Juravleva L.V. **Morphometrical analysis application of blood cells images to quantity characteristics of contents peroxidase in peripheral blood neutrophiles** // Uchenye zapiski Tavricheskogo Natsionalnogo Universiteta im. V. I. Vernadskogo. Series «Biology, chemistry». – 2007. – V.20 (59). – № 2. – P. 54-61.

It is shown, that application morphometrical analysis of blood cells images allows to receive the whole spectrum of attributes: optical density, the area of active cytoplasm, a quantity indicator of contents, form parameters of cells, to construct histograms of activity distribution of inclusion. Whereas use of criterion L.S. Kaplow allows to calculate cytochemical parameter of the contents peroxidase in blood neutrophiles which is comparable only to the area of active cytoplasm, however change of functional activity of peripheral blood cells, at various experimental influences, depends, including, from optical density.

Thus, morphometrical analysis of peripheral blood cells images allows to raise considerably efficiency of use of cytochemical analysis methods and to receive not only qualitative, but also quantitative results of research.

Keywords: morphometrical analysis, neutrophiles, peroxidase

Поступила в редакцию 12.07.2007 г.