

УДК 591.1: 615.849.11

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

Чуян Е.Н., Махонина М.М., Богданова О.Д.

Показано, что применение морфометрического анализа изображений клеток крови позволяет получить целый спектр признаков: оптическую плотность, площадь активной цитоплазмы, количественный показатель содержания, построить гистограммы распределения активности того или иного включения. Это позволяет значительно повысить эффективность использования методов цитохимического анализа, в том числе кислой фосфатазы в нейтрофилах крови, и получать не только качественные, но и количественные результаты исследования.

Ключевые слова: морфометрический анализ, нейтрофилы, кислая фосфатаза.

ВВЕДЕНИЕ

Исследование медико-биологических объектов требует высокой надёжности, точности и достоверности результатов. В биологии и медицине все чаще и эффективнее используются количественные и математические методы. Применение современных методов является актуальным и для анализа цитологических препаратов. Ранее такие объекты изучались, в основном, с помощью цитохимических полуколичественных методов исследования, так как методы количественного цитохимического исследования или цитоспектрофотометрии, основанные на фотометрии, требуют применения соответствующих приборов, которые достаточно сложны в использовании и дороги.

Использование критерия L.S. Karlow [1] для оценки цитохимических реакций позволяет вычислить цитохимический показатель содержания (ЦПС) того или иного включения в нейтрофилах крови. В свою очередь, этот метод имеет определенные недостатки, связанные, во-первых, с большой трудоемкостью количественной оценки результатов. Во-вторых, он является полуколичественным, следовательно, для него характерна большая погрешность измерения из-за значительной доли субъективизма исследователя. В-третьих, критерий L.S. Karlow позволяет определить только ЦПС выявляемого включения в клетке, тогда как большое значение для определения функциональной активности клетки могут иметь и другие показатели.

Поэтому важным является применение более точной, автоматизированной обработки цитохимических препаратов.

В связи с этим целью данной работы явилось применение метода морфометрического анализа при исследовании цитохимических препаратов на примере выявления содержания кислой фосфатазы (КФ) в нейтрофилах периферической крови крыс.

МАТЕРИАЛЫ 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, содержащиеся 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), создаваемой 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” ($\lambda=7,1$ мм, плотность потока мощности $0,1$ мВт/см²) на затылочно-воротниковую область по 30 мин ежедневно в течение девяти дней.

Забор крови осуществлялся путем пункции хвостовой вены крыс всех экспериментальных групп до воздействия и на девятые сутки эксперимента. Для выявления содержания КФ в нейтрофилах мазки крови окрашивали по методу Н. Goldberg и J. Barka [4] и исследовали при помощи системы морфометрического анализа. Для этого использовали комплекс, состоящий из стандартного биологического микроскопа светлого поля Zeiss Ergaval, оснащенного цифровой фотокамерой Olympus C5060Z с матрицей прибора с зарядовой связью размерностью 5 Мпс. Эргономичность работы обеспечивал режим управления съемкой с клавиатуры компьютера благодаря подключению аппарата к порту USB и использованию программного модуля Cam2Com. Для обработки полученных изображений использовался пакет проблемно-ориентированного программного обеспечения - морфометр «Image – Pro» (рис. 1).

В каждой мазке исследовалось 45-50 нейтрофилов.

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

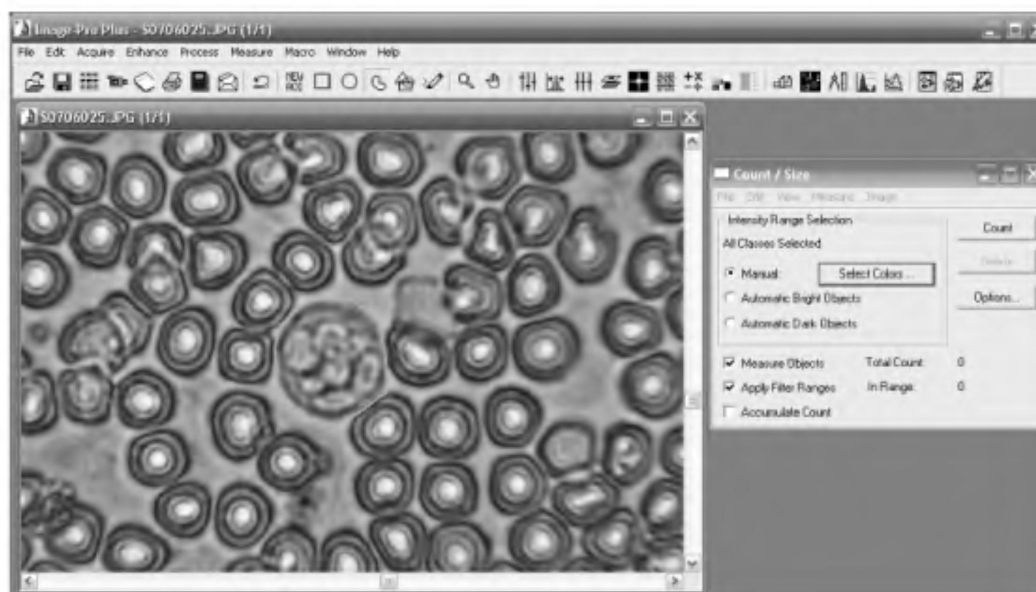


Рис.1. Интерфейс программы для распознавания и анализа объектов - морфометр «Image-Pro».

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

$$QIC = OD * Sa / S$$

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 проверки данных на нормальность распределения использовался критерий Шапиро-Уилка, 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 «Oregon Pro 7» [7].

Крыс содержали в условиях вивария при температуре 18 – 22°C 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

Различий между значениями QIC КФ до экспериментальных воздействий не обнаружено. Достоверных различий между размерами нейтрофилов у животных различных экспериментальных групп на девятые сутки наблюдения выявлено не было ($p>0,05$), что согласуется с нашими предыдущими исследованиями [9].

При анализе гистограмм распределения клеток по значениям QIC КФ в контрольной группе крыс и группах животных, подвергнутым экспериментальным воздействиям (рис. 2) выявлено, что у контрольных животных распределение было симметричным и соответствовало нормальному ($p>0,05$).

Вместе с тем при различных экспериментальных воздействиях были зафиксированы изменения показателей оптической плотности (OD) и площади активной цитоплазмы (Sa).

Так, у крыс второй экспериментальной группы (КВЧ) наблюдалась тенденция к увеличению QIC КФ относительно значений у интактных животных ($p>0,05$), произошедшая за счет незначительного роста OD (на 4,93%, $p>0,05$) (табл. 1, рис.2).

Анализ гистограмм распределения клеток по значениям QIC КФ в группе животных, подвергнутым экспериментальному КВЧ-воздействию, распределение было симметричным и соответствовало нормальному ($p>0,05$), при этом не наблюдалось значительных отличий от такового у интактных крыс.

В ходе эксперимента были зафиксированы достоверные различия между показателями QIC КФ первой (контроль) и третьей (ГК) группами. У животных, находящихся в условиях ограниченной подвижности, QIC КФ был выше на 42,31% ($p<0,001$), что связано с увеличением площади активной цитоплазмы нейтрофилов крови у гипокинезированных животных на 53,71% ($p<0,01$) относительно интактных животных. В то же время достоверных отличий OD не наблюдалось ($p>0,05$).

В то же время у животных, находящихся в условиях изолированной гипокинезии гистограмма распределения QIC КФ была асимметричной, носила отличный от нормального характер, что так же подтверждается критерием Шапиро-Уилка.

Ранее было показано, что при ограничении двигательной активности крыс обнаруживается прогрессирующее снижение активности бактерицидных систем [9, 10]. В случае, когда падает активность основных бактерицидных систем нейтрофилов, активность фагоцитированных бактерий если и подавляется, то значительно меньше, чем у интактных животных.

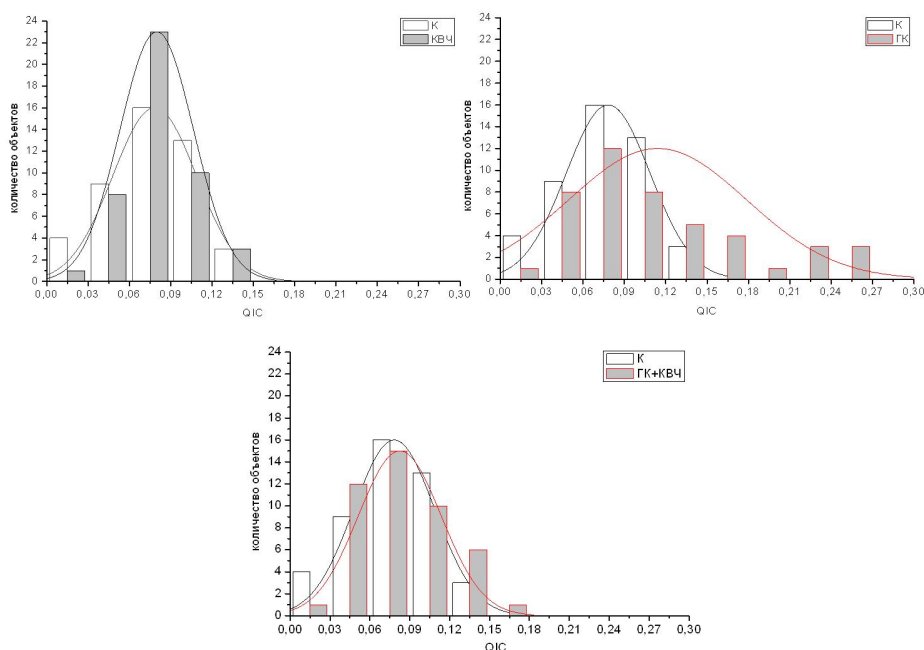


Рис. 2. Гистограммы распределения значений количественного показателя содержания кислой фосфатазы сегментоядерных нейтрофилов крови у животных контрольной группы (К) и при воздействиях ЭМИ KBЧ (KBЧ), гипокинезии (ГК), их комбинации (ГК+KBЧ) на девятые сутки эксперимента.

Таблица 1.
Значения отношений площади активной цитоплазмы (Sa) к площади всей клетки (S), оптическая плотность (Od) и количественный показатель содержания (QIC) кислой фосфатазы в нейтрофилах крови контрольной группы (К) и при воздействиях ЭМИ KBЧ (KBЧ), гипокинезии (ГК) и их комбинации (ГК+KBЧ) ($\bar{x} \pm S\bar{x}$)

Группы	№ группы	Показатели		
		Sa/S усл.ед.	OD усл.ед.	QIC усл.ед.
К (n=15)	1	0,079±0,012	0,649±0,023	0,052±0,009
KBЧ (n=15)	2	0,080±0,005	0,681±0,011	0,054±0,003
ГК (n=15)	3	0,116±0,004 $p_{1,3}<0,01$ $p_{2,3}<0,001$	0,637±0,010 $p_{2,3}<0,01$	0,074±0,002 $p_{1,3}<0,05$ $p_{2,3}<0,001$
ГК+KBЧ (n=15)	4	0,080±0,002 $p_{3,4}<0,001$	0,684±0,019 $p_{3,4}<0,05$	0,054±0,003 $p_{3,4}<0,001$

Примечание. P_{1-4} достоверность различий при сравнении с данными групп, обозначенными в таблице 1-4 соответственно по критерию Стьюдента.

Очевидно, что такие бактерии не могут быть доступны действию гидролитических ферментов, которые способны расщеплять в фаголизосоме нейтрофила только те бактерии, которые были умерщвлены бактерицидными системами [11]. Следовательно, повышение активности гидролитических ферментов может привести к развитию цитолитического процесса, а, следовательно, повреждению ткани [12].

В процессе исследования обнаружено, что ЭМИ КВЧ способно ингибировать повышение гидролитической активности нейтрофилов крови, вызванное ГК. Так, значения QIC КФ при комбинированном действии ГК и ЭМИ КВЧ достоверно не отличались от значений в контрольной группе ($p > 0,05$) и были ниже этих показателей в группе крыс, подвергнутых изолированной ГК на 23,03% ($p < 0,001$), что связано с уменьшением площади активной цитоплазмы нейтрофилов крови при одновременном действии ГК и ЭМИ КВЧ на 36,46% ($p < 0,001$). В то же время в четвертой (ГК+КВЧ) группе наблюдалось незначительное увеличение OD на 4,93% ($p > 0,05$) (рис.2, табл. 1.).

Таким образом, действие ГК приводит к увеличению площади активной цитоплазмы нейтрофилов крови, а действие ЭМИ КВЧ нормализует этот показатель при действии на гипокинезированных животных. Кроме того, при действии ЭМИ КВЧ наблюдается тенденция к увеличению оптической плотности, как в норме, так и в условиях стресса. Из полученных результатов видно, что в определении QIC КФ у животных, находящихся в условиях изолированного и комбинированного с ЭМИ КВЧ ограничения подвижности, некоторую роль играло изменение OD, тогда как при вычислении ЦПС КФ по принципу L.S. Karlow [1] учитывается только значение Sa, а изменение OD не регистрируется. При этом QIC КФ с высокой степенью достоверности коррелирует с ЦПС КФ изученного показателя ($r = 0,94$, $p < 0,05$).

В большинстве случаев на разницу QIC КФ между группами животных, подвергнутых различным воздействиям, влияли изменение и Sa, и OD, следовательно, диапазон изменений QIC был несколько шире, 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. В ходе работы не выявлено значительных изменений количественного показателя содержания кислой фосфатазы в нейтрофилах крови крыс под действием изолированного действия миллиметрового излучения.
3. Под влиянием девятисуточной гипокинезии произошло увеличение количественного показателя содержания кислой фосфатазы на 42% ($p < 0,001$) относительно значений этого показателя в контрольной группе, что связано

преимущественно с увеличением площади активной цитоплазмы у гипокинезированных животных на 54% ($p < 0,01$).

4. Воздействие ЭМИ КВЧ на гипокинезированных животных вызвало достоверное снижение количественного показателя содержания кислой фосфатазы относительно такового у животных, также находившихся в условиях гипокинезии, но дополнительно не подвергавшихся действию ЭМИ КВЧ на 23% ($p < 0,001$), что связано с уменьшением площади активной цитоплазмы при одновременном действии ГК и ЭМИ КВЧ на 37% ($p < 0,001$).

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. – 40 с.
4. Клиническая цитохимия / Под ред. А.В.Ягоды, Н.А.Локтева. – 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. Махоніна М.М. Біологічна дія електромагнітного випромінювання надвисокої частоти в умовах блокади опіоїдних рецепторів: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.02 / ТНУ. – Симферополь, 2007. – 24 с.
10. Чуян Е.Н. Нейроімуноендокринні механізми адаптації до дії низько інтенсивного електромагнітного випромінювання надто високої частоти // Автореф. дис. ... докт. биол. наук. – Київ, 2004. – 40 с.
11. 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.
12. Панин Л.Е. Биохимические механизмы стресса. – Новосибирск: Наука, 1983. – 232 с.

Чуян О.М., Махоніна М.М., Богданова О.В. Застосування морфометричного аналізу зображень клітин для кількісної характеристики вмісту кислої фосфатази в нейтрофілах периферичної крові щурів // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2007. – Т. 20 (59). – № 4. – С. 130-137.

Показано, що застосування морфометричного аналізу зображень клітин крові дозволяє отримати цілий спектр ознак: оптичну щільність, площу активної цитоплазми, кількісний показник вмісту, побудувати гістограми розподілу активності того або іншого включення. Це дозволяє значно підвищити ефективність використання методів цитохімічного аналізу, зокрема кислої фосфатази в нейтрофілах крові, отримувати не лише якісні, але й кількісні результати дослідження.

Ключові слова: морфометричний аналіз, нейтрофіли, кисла фосфатаза.

Chyan E.N., Makhonina M.M., Bogdanova O.V. Morphometrical analysis application of blood cells images to quantify characteristics of contents sour fosfataza in peripheral blood neutrophiles // Uchenye

ПРИМЕНЕНИЕ МОРФОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ИЗОБРАЖЕНИЙ

zapiski Tavricheskogo Natsionalnogo Universiteta im. V.I. Vernadskogo. Series «Biology, chemistry». – 2007. – V.20 (59). – № 4. – P.130-137.

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, to construct activity distribution of inclusion histograms. This allows to raise considerably efficiency of cytochemical analysis methods use, including sour fosfataza, and to receive not only qualitative, but also quantitative results of research.

Keywords: morphometrical analysis, neutrophiles, sour fosfataza.

Поступила в редакцию 12.11.2007 г.