

УДК 612.112.9

МОРФОЛОГИЯ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА В ПРОЦЕССЕ ИХ ФАГОЦИТОЗА IN VITRO*И.Г.Герасимов, Т.М.Гальбурт,**НИИ медицинских проблем семьи Донецкого национального медицинского университета им.М.Горького***Введение**

Одним из важных аспектов функционирования клеток, обеспечивающих защитные свойства организма, является фагоцитоз. Акт фагоцитоза состоит из нескольких стадий [1, 2]: хемотаксис (приближение клетки к объекту фагоцитоза), адсорбция (физико-химическое взаимодействие клетки с объектом фагоцитоза), инвагинация (поглощение объекта фагоцитоза клеточной фagosомой, сформированной в результате образования и исчезновения псевдоподий, и ее слияние с лизосомой), лизис (расщепление компонентов объекта фагоцитоза ферментами фаголизосомы). Помимо специализированных макрофагов, способностью к фагоцитозу обладают и другие клетки эпителия и крови, в частности нейтрофилы. Фагоцитоз протекает во времени, однако в настоящее время исследуют, как правило, не собственно процесс, а его результат: долю фагоцитирующих клеток, количество поглощенных клеткой частиц, степень завершенности фагоцитоза и др., – и кинетику фагоцитоза исследуют, исходя из определения этих интегральных показателей [3 – 5]. Таким образом, удается изучить процесс фагоцитоза в популяции клеток. Описанный подход, однако, не дает информации о поведении каждой отдельной клетки в акте фагоцитоза.

В то же время, изучение кинетики последовательных актов фагоцитоза индивидуальных клеток представляет несомненный интерес, поскольку позволяет судить не только и не столько о количестве фагоцитирующих клеток и поглощенных ими частиц, но и о качестве протекания процесса. Исследование кинетики фагоцитоза 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 морфологических исследований подобного рода естественным образом формируются при измерении и расчете морфометрических показателей клетки, например, ее периметра, площади, компактности. 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 фагоцитоза клеток на примере фагоцитоза *in vitro* нейтрофилов периферической крови человека.

Материалы и методы исследования

Исследовали 8 нейтрофилов в 4-х образцах гепаринизированной (5 мкл/мл) капиллярной крови в процессе их фагоцитоза при комнатной температуре. Кровь брали у здоровых добровольцев (4 мужчин, 1 женщина, возраст 19 – 20 лет). Объектом фагоцитоза служили бактерии, попавшие естественным образом из внешней среды в кровь после ее забора. Оцифрованные изображения проекций нейтрофилов на плоскость получали путем микрофотографирования под иммерсией. Использовали микроскоп ЛЮМАМ-РЗ («ЛЮМО») 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 компактность ($C = P^2/4\pi S$) – морфометрические показатели (M). Параметры кинетических уравнений находили 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 P и S не превышал $\pm 10\%$.

Результаты и обсуждение

Типичные изображения неоконтуренного и оконтуренного нейтрофила в процессе фагоцитоза приведены на рис. 1. Как видно из рисунка, в процессе прикрепления морфология нейтрофила изменяется. Вначале клетка имеет форму близкую к шарообразной, а ее проекция – к округлой (рис. 1 а, г). Затем, в процессе поглощения клеткой инородной частицы и образования псевдоподий, нейтрофил принимает весьма произвольную форму, а площадь и периметр его проекции увеличиваются (рис. 1 б, д). Наконец, в результате поглощения клеткой бактерии и исчезновения псевдоподий форма клетки вновь приближается к шарообразной (проекция – к округлой) округлой (рис. 1 в, е), а морфометрические показатели ее проекции, очевидно, приближаются к исходным величинам. После завершения акта фагоцитоза и округления клетка вновь готова к поглощению следующей частицы, в процессе которого ее морфометрические показатели опять будут соответственно изменяться.

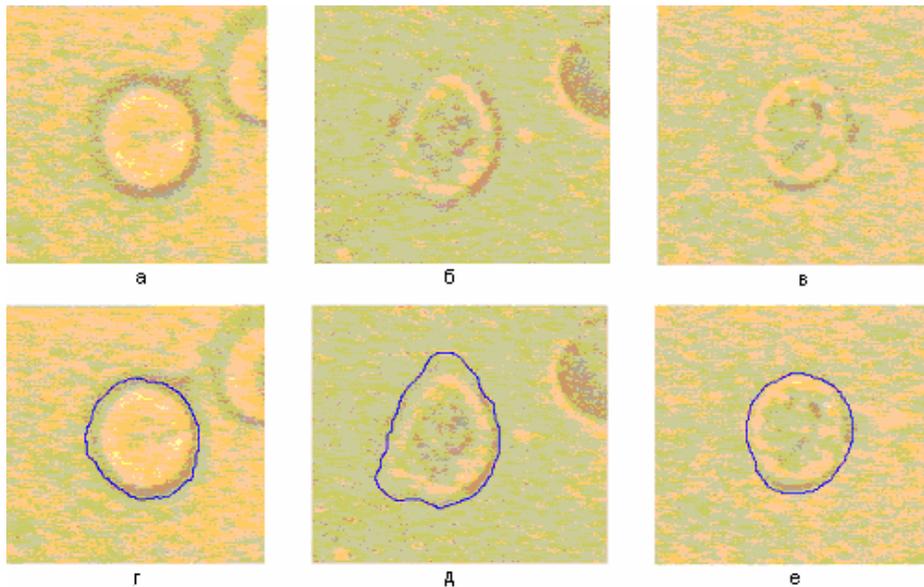


Рис.1. Изображения неоконтурного (а – в) и оконтурного (г – е) нейтрофила в процессе фагоцитоза в момент времени $t = 0$ (а, г), $t = 540$ (б, д) и $t = 1500$ с (в, е)

Таким образом, изменение морфологии нейтрофила в процессе фагоцитоза имеет циклический характер и состоит из ряда последовательных актов поглощения бактерий. Кроме того, в общем случае поглощение следующей частицы при их высокой концентрации в среде может начаться до завершения округления клетки, то есть единичного акта фагоцитоза. По таким причинам, описание кинетики фагоцитоза ограничили одним его актом, причем рассматривали периметр и площадь нейтрофила исключительно в процессе их увеличения (рис. 1, а, б и г, д). Подобные изменения соответствуют поглощению клеткой бактерии вплоть до ее захвата псевдоподиями и ограничены временем их исчезновения. В исследованных условиях (комнатная температура) и в условиях лаборатории, чем определяется концентрация бактерий в пробе крови, время этого явления не превышает 20 мин (1200 с).

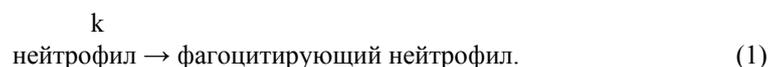
Типичные зависимости морфометрических показателей от времени (t) приведены на рис. 2.

Как видно из рис. 2 (а, б), периметр и площадь нейтрофила закономерно возрастают в процессе акта фагоцитоза. При этом на ранних временах выявляется 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.

Понятно, что в процессе поглощения клеткой объекта фагоцитоза, прежде всего, происходит контакт элементов клеточной мембраны клеток с элементами мембраны бактерии, а затем – образование псевдоподий. Из рис. 2 (а, б) видно, что вначале процесс их образования происходит медленно, затем его скорость возрастает и в дальнейшем, и постепенно замедляется (s -образная кривая). Поглощение частицы можно считать завершенным, когда периметр и площадь достигают наибольших значений.

Моменту завершения поглощения нейтрофилом фагоцитируемой частицы соответствует время процесса, которое обозначили как t_{∞} . Индекс ∞ указывает на то, что практически момент завершения образования псевдоподий максимальной величины и начало их исчезновения практически определить затруднительно, и оно может быть получено только расчетным путем.

Вид кривых $P(t)$ и $S(t)$ (рис. 2 а, б) указывает на то, что изменение морфометрических параметров (P и S) во времени может подчиняться закономерностям формальной химической кинетики реакций первого порядка, для которых скорость реакции зависит от концентрации только одного из реагирующих веществ. В такой ситуации, 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 обсуждаемом процессе роль вещества, которым определяется скорость процесса, безусловно, следует приписать нейтрофилам, и реакция может формально быть представлена, как реакция псевдопервого порядка по концентрации нейтрофилов. В случае поглощения нейтрофилами бактерий схема необратимой реакции псевдопервого порядка представляется следующим образом:



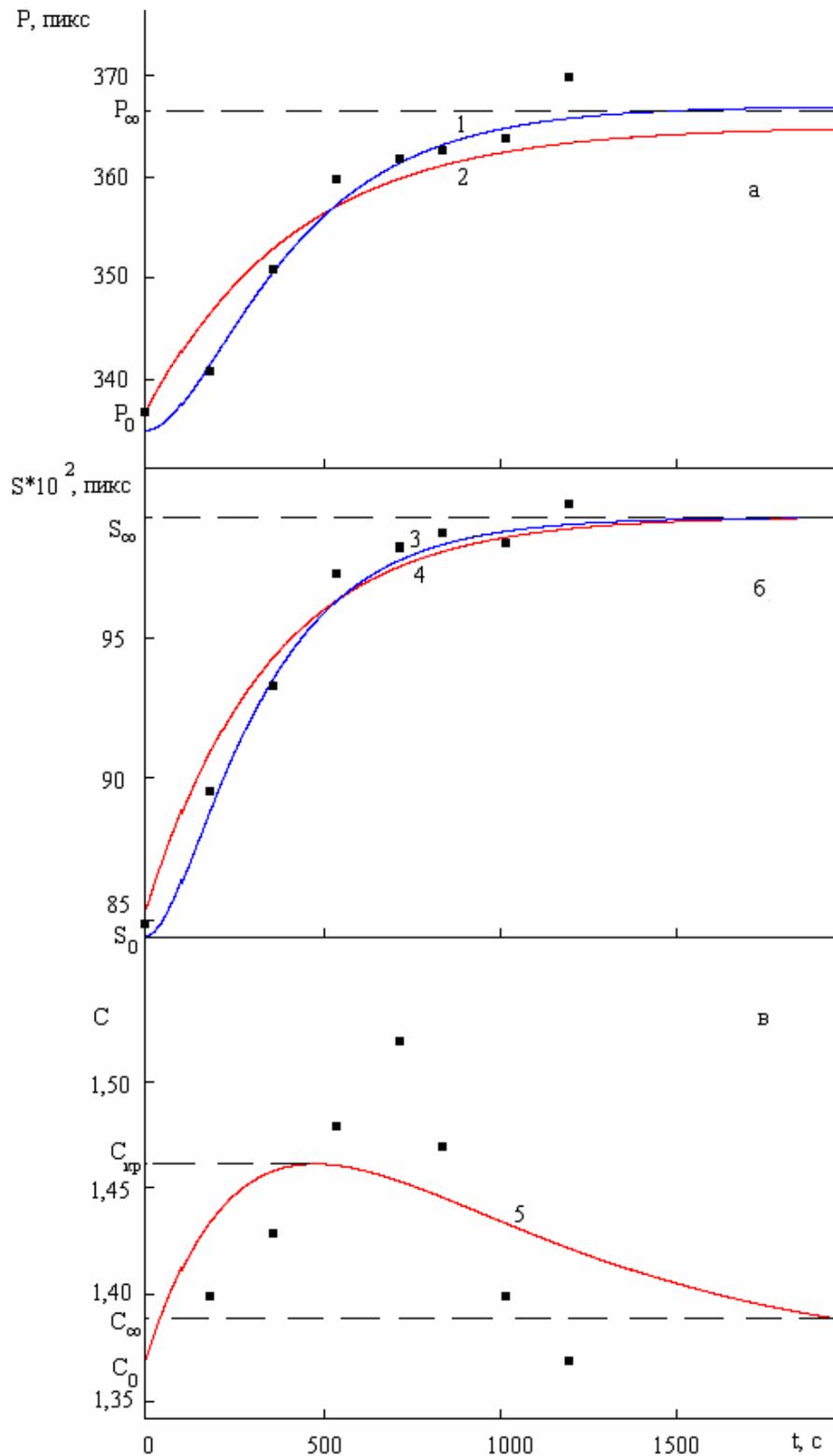


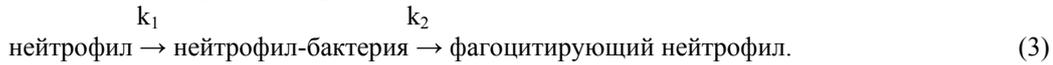
Рис. 2. Зависимости P (а), S (б), C (в) в процессе фагоцитоза нейтрофила от времени (точки) и их описание (кривые) по уравнениям (2) (1, 3), (4) (2, 4), 5 (5). Пояснения в тексте

При этом зависимость морфометрических показателей (M), таких как площадь и периметр, от времени может быть описана уравнением, аналогичным кинетическому уравнению необратимой реакции первого (псевдопервого) порядка [7], которое представим в следующем виде:

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

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

Наблюдаемая s-образность кривых зависимостей периметра и площади от времени поглощения нейтрофилом бактерии (рис. 2 а, б) может указывать на то, что этот процесс протекает через промежуточную стадию. Иными словами, нейтрофил, прежде чем образовать псевдоподии, контактирует с объектом фагоцитоза (промежуточное вещество в формализме химической кинетики), после чего начинается образование псевдоподий и происходит собственно поглощение фагоцитируемой частицы. В том случае, когда концентрация одного из веществ (нейтрофилы) оказывается в недостатке, а другого (бактерии) – в избытке, реакция приобретает псевдопервый порядок по концентрации нейтрофилов. Схема такого процесса представляется следующим образом:



В последнем случае 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], например, в следующем виде:

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

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

С другой стороны, вид зависимости компактности от времени поглощения нейтрофилом бактерии (рис. 2 в), близок к кинетическому формализму накопления и расходования промежуточного вещества в реакции, протекающей через стадию его образования. Согласно схеме (3), эта стадия может быть описана кинетическим уравнением, аналогичным уравнению для последовательной реакции первого (псевдопервого) порядка для промежуточного продукта:

$$C_t = C_0 + (C_\infty - C_0) \times \left(\frac{k_1 e^{-k_1 t}}{k_2 - k_1} - \frac{k_1 e^{-k_2 t}}{k_2 - k_1} \right), \quad (5)$$

где $C_t, C_0, C_\infty - C$ при $t, t = 0, t \rightarrow \infty$,

k_1, k_2 – константы скорости первой и второй стадий реакции, c^{-1} .

Рассчитали параметры уравнений (2), (4), (5) которые, наряду с коэффициентом детерминации (r^2), приведены в таблице. Как видно из таблицы, полученные значения периметров и площадей фагоцитирующих нейтрофилов (P_0, S_0 и P_∞, S_∞) не зависят от вида использованного уравнения.

Таблица. Параметры и коэффициенты детерминации уравнений (2), (4), (5) процесса фагоцитоза нейтрофилов

Морфометрический показатель	Уравнение								
	(2)				(4) или (5)				
	$M_0, \text{мкм}$	$M_\infty, \text{мкм}$	$k * 10^3, c^{-1}$	r^2	$M_0, \text{мкм}$	$M_\infty, \text{мкм}$	$k_1 * 10^3, c^{-1}$	$k_2 * 10^3, c^{-1}$	r^2
P (2, 4)	38±5,9	42±5,6	2,4±0,48	0,97	37±6,2	44±5,8	1,5±0,16	3,0±0,33	0,98
S (2, 4)	81±2,6	130±28	0,96±0,048	0,98	83±2,6	130±26	0,81±0,081	1,6±0,37	0,99
C (5)	–	–	–	–	1,37±0,09	1,39±0,17	1,7±0,22	2,5±0,63	0,90

По данным, приведенным в таблице (P_0, S_0), в предположении, что проекция клетки на плоскость представляет собой круг, а ее периметр, соответственно, – окружность, рассчитали диаметр нейтрофилов. Полученные результаты хорошо согласуются с размерами (морфологией) этих клеток в капле крови или в мазке (6 – 8 мкм или 10 – 12 мкм, соответственно) [10, 11]. Следует заметить, что в процессе фагоцитоза 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 (таблица). 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), высоки ($r^2 \geq 0,97$) (таблица).

Следовательно, с помощью любого из уравнений (2) или (4) можно описать процесс поглощения нейтрофилом инородной частицы, 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 обсуждаемый этап фагоцитоза нейтрофилов (таблица). Это связано с тем, что времени начала непосредственно поглощения бактерии предшествует время, в течение которого клетка входит в контакт с объектом фаго-

цитоза и когда ее периметр и площадь изменяются менее существенно, чем на следующей стадии 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).

Из рис. 2 (а, б) и из таблицы видно, что периметр и площадь нейтрофилов после поглощения ими бактерии больше, чем в исходном состоянии (P_0 и S_0 соответственно меньше, чем P_∞ и S_∞). Соотношение между периметром и площадью можно оценить посредством компактности [8]. Следует заметить, что величина, характеризующая компактность (степень приближения периметра проекции клетки к окружности или площади – к кругу), по смыслу отличается от величин, предложенных с аналогичной целью в [8, 9]: при приближении формы проекции клетки к округлой $C \rightarrow 1$. Типичная кривая изменения компактности во времени в процессе поглощения нейтрофилом бактерии приведена на рис. 2 (в). Как видно из рисунка, C вначале увеличивается, а после достижения максимального значения – уменьшается. Зависимость $C(t)$ описана уравнением (5) и найдены его параметры (табл.). Величина коэффициента детерминации $r^2 = 0,90$ указывает на то, что процесс поглощения клеткой частицы действительно может быть описан с помощью использованного уравнения, однако такое описание хуже, чем в случае площади или периметра. По такой причине, необходим поиск других уравнений, посредством которых изменение компактности в процессе фагоцитоза можно описать более качественно. Из рис. 2 (в) из данных таблицы, видно, что компактность также, как и другие исследованные морфометрические показатели, больше по завершении процесса поглощения нейтрофилом бактерии (C_∞ больше, чем C_0) по сравнению с исходным состоянием. Однако, численно значение C существенно выше, в какой-то момент времени ($t_{кр}$), когда соответствующая величина $C_{кр} = 1,47 \pm 0,23$. Последняя величина соответствует максимальному удалению клетки от округлой формы, а время $t_{кр}$ – максимальной скорости изменения периметра и площади. Численные значения обоих параметров $C_{кр}$ и $t_{кр}$ легко найти по данным таблицы путем дифференцирования параметризованного уравнения (5) (максимум первой производной). Эти параметры, как и другие морфологические константы, являются важными характеристиками процесса фагоцитоза.

Таким образом, использованные уравнения формальной химической кинетики позволяют хорошо описывать поглощение нейтрофилом бактерии в процессе фагоцитоза. Кинетические параметры этих уравнений имеют ясный физический смысл и каждое из них применимо для нахождения численных характеристик процесса фагоцитоза индивидуальных нейтрофилов. Разработанный на примере фагоцитирующих нейтрофилов подход, основанный на кинетическом анализе изменения клеточной морфологии, может быть использован для описания аналогичных процессов с участием других клеток, любых инородных частиц и в отличных от указанных в работе условиях. Полученные в дальнейшем результаты, несомненно, окажутся интересны с точки зрения теоретической цитологии (описание и выяснения физиологических механизмов фагоцитоза) и практической медицины (диагностика патологических экстремальных состояний).

Выводы

1. Изменение морфометрических показателей (периметра, площади компактности) в процессе фагоцитоза нейтрофилов крови человека *in vitro* при комнатной температуре описано уравнениями, аналогичными формальным кинетическим уравнениям необратимой реакции первого порядка без участия промежуточного продукта или с таковым.

2. Найдены морфологические параметры уравнений и константы скоростей процесса фагоцитоза нейтрофилов.

3. На основании анализа параметров кинетических уравнений проанализировано изменение морфологии нейтрофилов в процессе поглощения ими бактерий из внешней среды в условиях *in vitro* при комнатной температуре.

РЕЗЮМЕ

Кінетика морфометричних показників (периметр, площа, компактність) нейтрофілів крові людини у процесі їх фагоцитозу *in vitro* описана рівняннями, що аналогічні кінетичним рівнянням необоротних реакцій першого порядку. Розраховані морфологічні параметри рівнянь та константи скоростей процесу фагоцитозу і проаналізовано змінення морфології нейтрофілів в процесі поглинення ними бактерій.

SUMMARY

The kinetic of morphometrics parameters (perimeter, square, compactness) human blood neutrophils in the processes of them phagocytosis *in vitro* described by the equations similar to the kinetic equations of irreversible reactions of the first order. The morphological parameters of the equations and constant speeds of processes phagocytosis were calculated, and morphology change of neutrophils in the processes of absorption of bacteria by them were analysed.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Микробиология и иммунология. – М.: Медицина, 2005. – 495 с.
2. Возрастная гистология. – Ростов н/Д.: Феникс; Красноярск: Издательские проекты, 2006. – 176 с.
3. Al-Robaity S., Knauer J., Straubinger R. K. *Borrelia burgdorferi* organisms lacking plasmids 25 and 28-1 are internalized by human blood phagocytes at a rate identical to that of the wild-type strain // *Infect. Immun.* – 2005. – V. 73, № 9. – P. 5547–5553.
4. Bergin D., Reeves E.P., Renwick J., Wientjes F.B., Kavanagh K. Superoxide production in *Galleria mellonella* hemocytes: identification of proteins homologous to the NADPH oxidase complex of human neutrophils // *Infect. Immun.* – 2005. – V.73, № 7. – P. 4161–4170.
5. Cortez K.J., Lyman C.A., Kottlil S., Kim H.S., Roilides E., Yang J., Fullmer B., Lempicki R., Walsh T.J. Functional genomics of innate host defense molecules in normal human monocytes in response to *Aspergillus fumigatus* // *Infect. Immun.* – 2006. – V. 74, № 4. – P. 2353–2365.
6. Герасимов И.Г., Попандопуло А.Г. Оценка жизнеспособности клеток по их морфометрическим параметрам на примере культивируемых фибробластов // *Цитология.* – 2007. – Т. 49, N 3. – С. 204-209.
7. Курский М.Д., Костерин С.А., Рыбальченко В.К. Биохимическая кинетика. – Киев: Вища школа, 1977. – 264 с.
8. Shen L., Renngyuan R. M., Desautels J. E. L. Application of shape analysis to mammographic calcifications // *IEEE Trans. Med. Imag.* – 1994. – V. 13, № 3. – P. 263–274.
9. Богатырев В.Н. Использование проточной цитофлуориметрии и компьютерной морфометрии для цитологической диагностики, лечения и прогноза при раке молочной железы // *Диагностика рака молочной железы.* – М.: Мед. информ. агентство, 2005. – С.161–205.
10. Афанасьев Ю.И., Кузнецов С.Л., Юрина Н.А., Котовский Е.Ф. Гистология, цитология и эмбриология. – М.: Медицина, 2004. – 768 с.
11. Кузнецов С.Л., Пугачев М.К. Лекции по гистологии, цитологии и эмбриологии. – М.: Мед. информ. агентство, 2004. – 432 с.

Надійшла до редакції 05.02.2009 р.