

## ОЦЕНКА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК ПО ИХ МОРФОМЕТРИЧЕСКИМ ПАРАМЕТРАМ НА ПРИМЕРЕ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ФИБРОБЛАСТОВ

© *И. Г. Герасимов,<sup>1</sup> А. Г. Попандопуло<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> *Научно-исследовательский институт медицинских проблем семьи  
Донецкого государственного медицинского университета и*

<sup>2</sup> *Научно-исследовательский институт неотложной и восстановительной хирургии, Донецк, Украина;  
электронный адрес: IGGerasim@mail.ru*

Жизнеспособность культивируемых фетальных фибробластов оценивали цитохимически, по системе экспертных оценок и посредством энтропийного эквивалента (ЭЭ), сформированного на основании положений теории термодинамики неравновесных процессов. ЭЭ представляет собой суперпозицию элементов трансформированной корреляционной матрицы, которые в данном случае рассчитывали по морфометрическим параметрам проекций клеток, используя периметр, площадь, компактность, центральные моменты первого и третьего порядков, их разность и дескриптор Фурье. Определили морфометрические параметры клеток, которые являются наиболее эффективными для оценки жизнеспособности с помощью ЭЭ. Показали, что цитохимические показатели и экспертные оценки жизнеспособности хорошо коррелируют с величиной ЭЭ, которая в соответствии с термодинамическими представлениями возрастает в процессе искусственной гибели культуры и при ухудшении ее качества.

Ключевые слова: фибробласты, жизнеспособность, размеры и форма клетки, энтропийный эквивалент, экспертная оценка, цитохимия.

Принятые сокращения: АО — акридиновый оранжевый, МС — метиленовый синий, ТС — трипановый синий, ЭБ — этидиум бромид, ЭЭ — энтропийный эквивалент.

В современной цитологии для решения прикладных и теоретических задач требуется оценка комплекса параметров клеток, которые в совокупности определяют жизнеспособность их популяций. Под этим следует понимать не только способность клеток, составляющих данную популяцию, поддерживать состояние, необходимое для выполнения ими специфических функций, но и возможность реализации митотического потенциала клетками, склонными к делению. Оценка жизнеспособности оказывается необходимой как для выяснения эффективности функционирования клеток *in vivo*, так и при их культивировании *in vitro* с целью последующего использования клеточных культур в лечебных или иных мероприятиях. Обычно жизнеспособность клеток оценивается посредством набора специфических (зачастую методически сложных и дорогих) тестов, характеризующих, как правило, лишь один из аспектов клеточного функционирования.

Разумеется, изображения клеток содержат различную информацию, в том числе о внутриклеточной структуре и содержании в клетках разных веществ. Однако извлечение такой информации требует специальных приемов, таких, например, как обработка клетки химическими красителями или маркирование специфических рецепторов с помощью селективных биохимических соединений. В то же время намечены подходы к неспецифической оценке жизнеспособности, основанные на распознавании образов клеток по их размерам и форме

(Luginbuhl et al., 1989; Погорелов и др., 1995, 1997; Медовый и др., 1997; Grenander, 1997) или после их специфического окрашивания (Погорелов и др., 1995, 1997; Медовый и др., 1997; Grenander, 1997). При этом данные получают путем микрофотографирования, что не представляет технических трудностей. К сожалению, работы, начатые в указанном направлении 15—20 лет назад получают развитие только в последнее время (Russ, 2000; Магакян, 2002).

В решении задач подобного рода намечены два подхода, один из которых предполагает оценку жизнеспособности существенного числа клеток в популяции (Магакян, 2002), а другой предусматривает исследование небольшого числа из совокупности клеток, принадлежность которых к данной популяции заведомо определена, и последующую интегральную оценку жизнеспособности всей совокупности. При этом размеры и форма клеток могут оказаться важными факторами, параметры которых отражают их функциональное состояние. Так, в работах Харриса и соавторов (Harris et al., 1980, 1981, 1984) с использованием вязкоэластичной полимерной подложки показано, что переход клеток в митоз изменяет рельеф межклеточного пространства на десятки клеточных диаметров и эти изменения, достигая других клеток, оказывают тем самым влияние на них.

Оба упомянутых подхода могут быть реализованы исключительно с использованием современных компьютерных технологий. Однако, несмотря на все более ши-

рокое их применение, оценка жизнеспособности клеток продолжает оставаться актуальной задачей. Ее решение требует ответа как минимум на два основных вопроса: 1) определение необходимого и достаточного числа параметров для интегральной оценки жизнеспособности клеток и популяции в целом и 2) формирование решающего правила, позволяющего отнести клеточную популяцию к тому или иному качественному уровню функционирования. Еще один вопрос, ответ на который в принципе получен, в том числе при исследовании клеточных размеров (Герасимов, Калуцкая, 1996), состоит в определении необходимого и достаточного числа клеток, по анализу которых можно охарактеризовать всю популяцию в целом. Однако в каждом конкретном случае необходимо специально уточнять количество клеток, необходимых для оценки состояния их популяции.

В настоящей работе с учетом поставленных вопросов предпринята попытка дальнейшего развития подхода к интегральной оценке жизнеспособности клеточной популяции на примере культивируемых фетальных фибробластов человека.

### Материал и методика

Фетальные фибробласты человека выделяли из abortивного материала, полученного в ходе плановых операций по прерыванию беременности при сроках гестации до 12 нед. Фрагменты кожно-мышечной ткани эмбриона обрабатывали раствором трипсина (0.25 %) при 37 °C (15 мин). Трипсин инактивировали добавлением сыворотки (10 %, 2 мин) эмбрионов крупного рогатого скота. Фибробласты культивировали на среде Игла с добавлением той же сыворотки (10 %) в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> при 37 °C. При пассировании клетки обрабатывали смесью растворов трипсина (0.25 %) и Версена (0.06 %) в соотношении 1 : 5.

Проводили две серии экспериментов. В первой из них вызывали гибель фибробластов, термостатируя их при 37 °C в культуральном флаконе (Kostor, полистирол) в отсутствие в атмосфере CO<sub>2</sub>, который необходим для их нормального функционирования. Анализировали 6 культур гибнущих таким образом фибробластов. Из каждого флакона отбирали две параллельные пробы, суспендировали клетки в фосфатном буфере (рН 7.2, 10<sup>4</sup> кл./см<sup>3</sup>) и окрашивали их раствором метиленового синего (0.2 %), или трипанового синего (0.4 %) (Stolarek et al., 1998), или смесью акридинового оранжевого (0.5 %) и этидиума бромид (1 %) (1 : 1) в течение 10 мин. Среди 100 клеток под световым микроскопом (об. 40×, ок. 7×) подсчитывали долю мертвых фибробластов с относительными погрешностями не более 8 и 12 % при окрашивании соответственно метиленовым синим или трипановым синим. Используя люминесцентный микроскоп (Люмам-Р3, об. 90×, ок. 7×; светофильтры: пропускающие — СЗС24, УФС4, запирающий — БС8), подсчитывали долю живых, некротических и апоптотических фибробластов с относительными погрешностями не более 10, 10 и 17 % соответственно. Живыми считали неокруглившиеся клетки, флуоресцирующие зеленым, некротическими — большие округлые клетки, флуоресцирующие красным, апоптотические — округлые клетки с фрагментированными ядрами, флуоресцирующие зеленым (Соловьева и др., 1998).

Использовали следующие реактивы: трипсин, среду Игла, раствор Версена (Институт полиомелитов и вирусных энцефалитов, Россия); сыворотку эмбрионов крупного рогатого скота («Биолот», Россия); метиленовый синий (МС), трипановый синий (ТС), акридиновый оранжевый (АО) (ч. д. а., «Реахим», Россия); этидиум бромид (ЭБ, Sigma, США).

Во второй серии экспериментов для оценки жизнеспособности фибробластов применяли систему экспертных оценок (Шиган, 1986), которая заключалась в следующем. Два квалифицированных эксперта, прошедших стажировку в НИИ биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН (Россия) и имеющих опыт работы 3—5 лет, независимо оценивали качество культур фибробластов, находящихся непосредственно в культуральном флаконе, по следующим характеристикам.

1. Вакуолизация (Cardenas-Aguayo Mdel et al., 2003). Отсутствие клеток с вакуолями оценивали в 5 баллов, наличие единичных или множества вакуолизованных клеток — соответственно в 4 и 3 балла;

2. Адгезия (Кузнецов, Пугачев, 2004). Культуру, в которой все клетки распластаны, т. е. имели вытянутую удлиненную форму с длинными псевдоподиями, оценивали в 5 баллов, наличие плохо прикрепившихся клеток полукруглой формы и(или) клеток с короткими псевдоподиями — в 4 балла, культуру, в которой большинство клеток полукруглые и(или) с короткими псевдоподиями, — в 3 балла.

3. Качество монослоя (конфлюентность) (Hayes et al., 2005). Формирование монослоя на 3—4-й сут после пассирования оценивали в 5 баллов, формирование на 4—5-е сут — в 4 балла, на 6—7-е сут — в 3 балла.

Для каждой из культур усредняли оценки, выставленные экспертами, после чего находили общую среднюю величину каждого параметра культуры, округленную до целого значения. Культуру, состояние которой имело оценку 5 баллов, считали отличной, 4 балла — удовлетворительной, 3 балла — неудовлетворительной. Всего оценивали качество (жизнеспособность) 12 культур фибробластов дважды в течение времени культивирования. Из них 10 культур прошли от 2 до 25 пассажей с периодичностью пассирования 5—7 сут; для 2 культур периодичность пассирования не соблюдала. Использовали микроскоп марки DM IL (Leica, Германия) с фазовым контрастом и об. 40×, ок. 10× при оценке конфлюентности, а при оценке степени адгезии или вакуолизации — об. 90×, ок. 10×.

Кроме того, в обеих сериях экспериментов для оценки жизнеспособности фибробластов использовали сформированный на основании положений теории термодинамики неравновесных процессов (Пригожин, 1985) энтропийный эквивалент (ЭЭ), хорошо зарекомендовавший себя в интегральной оценке функционального состояния организма человека, в частности в процессах роста, развития и старения (Герасимов, 1998). ЭЭ представляет собой свертку трансформированной корреляционной матрицы, внедиагональные члены которой, согласно Пригожину (1985), имеют смысл корреляций (структуры), а диагональные члены — вероятностей (информации). Снимки клеток при указанном увеличении получали посредством видеосистемы, включающей в себя микроскоп и видеокамеру марки JVC ТК-С1380Е (Leica, Германия) с разрешением 470 тыс. пикселей, соединенную с персональным компьютером, оснащенным стандартной программой для записи видеоизображений (ASUS live).

Получали черно-белое оцифрованное изображение, компьютерной мышью выделяли контур проекции клетки и находили следующие морфометрические параметры, которые использовали для расчета ЭЭ: периметр ( $P$ , мкм), площадь ( $S$ , мкм<sup>2</sup>) и, согласно Шен и соавторам (Shen et al., 1994), компактность  $C$  ( $C = P^2/S$ ), центральные моменты ( $F_i$ , отн. ед.) первого ( $F_1$ ) и третьего ( $F_3$ ) порядков, разность между  $F_3$  и  $F_1$ , а также нормированный дескриптор Фурье ( $FF$ ) контура проекции клетки, используемый для решения задач цитологической классификации (Погорелов и др., 1997). При этом  $i$ -тый момент определяется как (Shen et al., 1994)

$$F_k = \frac{(M_{k+1})^{\frac{1}{k+1}}}{m_1} = \frac{\left[ \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (z_i - m_1)^{k+1} \right]^{\frac{1}{k+1}}}{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N z_i}, \quad (1)$$

где  $M_p$  —  $p$ -тый главный центральный момент:

$$M_p = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (z_i - m_1)^p, \quad (2)$$

$m_p$  —  $p$ -тый момент, рассчитываемый как

$$m_p = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N Z_i^p, \quad (3)$$

где  $Z_i$  — расстояние от  $i$ -той точки контура до геометрического центра объекта, имеющего координаты  $(\bar{x}, \bar{y})$ ,  $N$  — число точек в контуре. Интегральный дескриптор  $FF$  является характеристикой формы, рассчитываемой по множеству нормированных дескрипторов Фурье:

$$FF = \frac{\sum_{k=-N/2+1}^{N/2} \|NFD(k)\| / |k|}{\sum_{k=-N/2+1}^{N/2} \|NFD(k)\|}, \quad (4)$$

где  $NFD(k)$  — нормированные дескрипторы Фурье, не зависящие от местоположения и размера контура, а также от положения стартовой точки и направления обхода:

$$NFD(k) = \begin{cases} 0, & \text{если } K = 0 \\ A(k)/A(l), & \text{если } k = 1, 2, \dots, N/2 \\ A(k+N)/A(l), & \text{если } k = -1, -2, \dots, -N/2+1 \end{cases}; \quad (5)$$

ЭЭ рассчитывали по формуле (Герасимов, 1996)

$$\text{ЭЭ}_r = \sum_{i=j}^n \left[ \left( \sum_{i=1}^n |r_{i(i)}| \right) / \left( \sum_{i \neq j}^n |r_{ij}| \right) \right]^2 + \sum_{i \neq j}^n (|r_{ij}|)^2, \quad (6)$$

где  $r_{ij}$  — коэффициенты корреляции между параметрами,  $n$  — размерность квадратной корреляционной матрицы.

Расчет ЭЭ с относительной погрешностью не более 7 % проводили с помощью разработанной специалистами кафедры автоматизированных систем управления Донецкого национального технического университета компьютерной программы для IBM PC. Расчет среднего

и его доверительного интервала ( $M \pm m$ ), кластерный и корреляционный анализы проводили, используя пакт программ Statistica for Windows.

## Результаты и обсуждение

Фибробласты, распластанные в монослое, в результате лишения их  $\text{CO}_2$  в концентрации, необходимой для нормального функционирования, утрачивают контакт друг с другом, округляются и погибают путем некроза или апоптоза. В отсутствие  $\text{CO}_2$  на 5-е сут гибнет 100 % клеток, так что начиная с этого времени говорить об их жизнеспособности не приходится. С другой стороны, часть клеток (до 10 %) погибает в течение 1-х сут после их удаления из среды, содержащей  $\text{CO}_2$ , причем во времени доля (и количество) мертвых клеток увеличивается экспоненциально. Однако исследование кинетики искусственной гибели фибробластов не было задачей настоящей работы. Следует лишь обратить внимание на то, что на 4-е сут  $72 \pm 8$  % фибробластов оказываются погибшими при определении с помощью окрашивания МС. В то же время окрашивание ТС или АО в сочетании с ЭБ определяет долю погибших клеток в 65—80 % их числа, найденного при окрашивании МС, что в среднем составляет  $53 \pm 12$  %. Полученный результат указывает на то, что ТС в использованных концентрациях оказывается менее жестким красителем, чем МС. Тем не менее это не означает, что использование ТС или АО в сочетании с ЭБ выявляет клетки, находящиеся на одной и той же стадии гибели, поскольку второй способ окрашивания является витальным (Соловьева и др., 1998). Можно предположить, что в данных условиях МС окрашивает как некротические клетки, так и клетки, вставшие на путь апоптоза, тогда как ТС — преимущественно некротические клетки. При этом доля только апоптотических клеток, определенных с помощью АО и ЭБ, составляет  $26 \pm 13$  %. Последнее число хорошо объясняется сделанным предположением: в сумме доля погибших и гибнущих клеток, определяемая при окрашивании АО и ЭБ или ТС ( $26 + 53 = 79 \pm 19$  %), в пределах погрешности не отличается ( $P > 0.1$ ) от таковой, полученной посредством окрашивания МС ( $72 \pm 8$  %). Вместе с тем число клеток, определяемых каждым из примененных способов окрашивания, попарно хорошо коррелирует между собой ( $r > 0.95$ ,  $P < 0.01$ ), и это означает, что не имеет принципиального значения, с каким из них сопоставлять результаты, полученные в дальнейшем.

Следует заметить, что такие морфометрические параметры, как  $P$  и  $S$ , хотя и могут в первом приближении отражать функциональное состояние клетки, трактовка их с позиций оценки жизнеспособности клеточных культур весьма затруднительна. Например, как уменьшение, так и увеличение  $P$  или  $S$  ничего не говорит о форме клетки. С другой стороны, параметры  $C$ ,  $F_1$ ,  $F_3$  и  $(F_3 - F_1)$ , определенным образом отражая форму клетки, не дают информации о ее размерах. По этим причинам для решения поставленной задачи может быть целесообразным использование интегрального показателя, каковым является ЭЭ. Кроме того, показатель ЭЭ отражает термодинамическое состояние объекта и его изменения в терминах термодинамики неравновесных процессов трактуются однозначно: увеличение ЭЭ в известных пределах (которые и необходимо определить для каждой конкретной системы) свидетельствует о росте энтропии системы



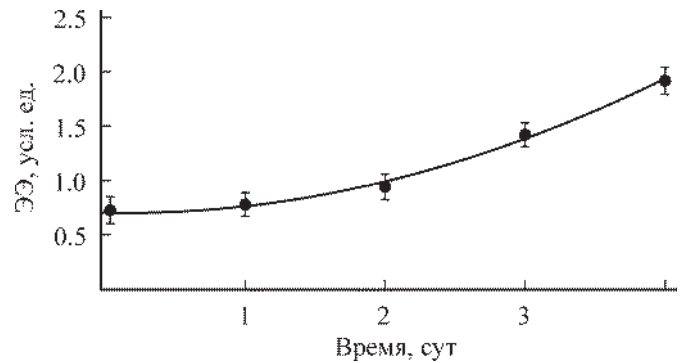
и ухудшении функционального состояния (Герасимов, 1998).

Для расчета ЭЭ в соответствии с теоретическими представлениями (Герасимов, 1998) предпочтение следует отдавать 3—4 не сильно коррелирующим между собой показателям. В случае искусственной гибели фибробластов параметры  $P$ ,  $S$  и  $C$ , а также  $F_1$ ,  $F_3$  и  $(F_3 - F_1)$  попарно коррелируют между собой сильно ( $r > 0.75$ ) и существенно ( $P < 0.1$ ), тогда как корреляции между  $FF$  и каждым из них — слабые ( $r < 0.3$ ) и малозначимые ( $P > 0.5$ ). В то же время параметр  $C$  является интегральной величиной параметров  $P$  и  $S$ , а разница  $(F_3 - F_1) - F_1$  и  $F_3$ . По этим причинам для расчета ЭЭ наиболее существенными оказываются параметры  $C$ ,  $(F_3 - F_1)$  и  $FF$ , из которых составили соответствующую корреляционную матрицу размером  $3 \times 3$ . Далее рассчитали ЭЭ и установили что в одной культуре с увеличением числа клеток, используемых для вычисления ЭЭ, средние значения показателя перестают изменяться в пределах погрешности его расчета начиная с  $20 \pm 3$  клеток. Вместе с тем относительная погрешность ( $m_i/M$ ) остается постоянной после расчета ЭЭ по параметрам, найденным не менее чем для  $30 \pm 2$  клеток. Последняя величина является необходимым и достаточным числом клеток, которое требуется для характеристики их популяции данным методом. Полученное число хорошо согласуется с найденным ранее для слизистой оболочки полости рта (Герасимов, Калущкая, 1996) числом клеток, необходимым для определения средних размеров их проекций. Тем не менее далее рассчитывали ЭЭ по параметрам, найденным у 50 клеток, учитывая, что использование вдвое большего числа клеток при компьютерной обработке их изображений принципиально не увеличивает время исследования.

Зависимость величины ЭЭ от времени после лишения фибробластов  $CO_2$  в необходимой концентрации приведена на рисунке. Как видно на рисунке, ЭЭ закономерно возрастает в течение всего времени наблюдения. При этом на 3-и и 4-е сут значения показателя достоверно ( $P < 0.01$  и  $P < 0.001$  соответственно) выше, чем в предыдущий период, и, кроме того, эти величины различаются между собой ( $P < 0.01$ ). Динамика ЭЭ в процессе искусственной гибели фибробластов согласуется с таковой, оцененной цитохимическими методами, причем между ЭЭ, с одной стороны, и числом погибших или гибнущих клеток (определенных с помощью МС, или ТС, или АО совместно с ЭБ) — с другой — имеются тесные корреляции ( $r > 0.95$ ,  $P < 0.05$ ). Найденная зависимость ЭЭ находится в полном соответствии с термодинамическими представлениями, согласно которым в процессе гибели биосистемы ее энтропия возрастает вследствие усиления в ней корреляций между параметрами состояния системы (Пригожин, 1985), что характерно также для процессов старения (Герасимов, 1996).

Следовательно, величина ЭЭ позволяет характеризовать жизнеспособность фибробластов, давая возможность оценить качество (жизнеспособность) культуры без привлечения цитохимических методов.

Согласно экспертной оценке, среди исследованных культур 7 имели отличное качество, 2 — удовлетворительное и 3 — неудовлетворительное. Удовлетворительную оценку получили культуры фибробластов, пассирование которых проводили без соблюдения равномерной периодичности пересевов, неудовлетворительную оценку получили 2 культуры, пассирование которых прервали после 2-го и 3-го пассажей, и 1 культура, прошедшая



Изменение энтропийного эквивалента (ЭЭ) в процессе искусственной гибели фибробластов.

По оси абсцисс — время после лишения клеток  $CO_2$ , сут; по оси ординат — ЭЭ, усл. ед.

25 пассажей. Последнее число близко к половине среднего (40—60), принципиально возможного количества пересевов фибробластов человека, ограниченного лимитом Хейфлика (Hayflick, 1998; Martin et al., 1970).

Следует заметить, что изменение размеров и формы клеток происходит еще и в результате их взаимодействия с субстратом, что, в свою очередь, вызывает изменения геометрических характеристик подложки или межклеточного матрикса (Harris et al., 1980, 1981, 1984; Васильев, Гельфанд, 1981). Из-за взаимовлияния клеток, находящихся в одном культуральном флаконе, это обстоятельство неминуемо приведет к возникновению корреляций между их морфометрическими параметрами. Поэтому применение ЭЭ, сформированного на основании трансформированной корреляционной матрицы (6), может оказаться целесообразным для оценки уровня жизнеспособности клеток.

Как оказалось, в случае культивируемых фибробластов параметры  $S$  и  $C$  коррелируют между собой так же, как и  $F_1$  и  $F_3$ , с одной стороны, и  $(F_3 - F_1)$  — с другой ( $r > 0.75$ ,  $P < 0.1$ ). При этом парные корреляции между периметром и любым другим из исследованных параметров слабые ( $r < 0.3$ ,  $P > 0.5$ ). Полученный результат объясняется тем, что среди фибробластов практически отсутствуют округлые клетки, для которых  $S$  и  $C$  тесно взаимосвязаны. По этим причинам для расчета ЭЭ и оценки жизнеспособности фибробластов наиболее существенными оказываются параметры  $P$ ,  $C$ ,  $(F_3 - F_1)$  и  $FF$ , из которых составили соответствующую корреляционную матрицу размером  $4 \times 4$ . При этом количество клеток, которое необходимо и достаточно для того, чтобы относительная погрешность определения показателя ( $m_i/M$ ) не зависела от их числа, составило  $31 \pm 3$ , что не отличается от значения, полученного ранее ( $P < 0.001$ ). Тем не менее и в данном случае для расчета ЭЭ использовали параметры, найденные у 50 клеток.

Кластеризация культур по величинам ЭЭ в точности совпала с оценкой экспертов: культуры, оцененные ими в 5 баллов (7 культур, 14 наблюдений), составили один кластер, в 4 балла (2 и 4 соответственно) — другой и в 3 балла (3 и 6 соответственно) — третий кластер. Следовательно, по величине ЭЭ действительно можно оценить качество (жизнеспособность) культивируемых фибробластов.

Результаты расчета ЭЭ для культур фибробластов разного качества приведены в таблице. Как видно из

**Энтропийный эквивалент (ЭЭ) и его доверительный интервал ( $M \pm m_t$ ) при  $P = 0.95$  в культурах фибробластов разного качества**

Качество культуры	ЭЭ, усл. ед.	$(M + m_t) - (M - m_t)$
Отличное	1.7	1.6—1.8
Хорошее	2.2	1.9—2.5
Удовлетворительное	2.8	2.6—3.1
Неудовлетворительное	3.8	3.2—4.4

данных таблицы, в культурах отличного качества ЭЭ минимален и увеличивается по мере ухудшения качества. Такая динамика показателя согласуется с термодинамическими представлениями (Пригожин, 1985; Герасимов, 1996) и с приведенными ранее результатами, полученными при исследовании искусственной гибели фибробластов. В обсуждаемом случае увеличение ЭЭ по мере ухудшения качества на основании термодинамических соображений (Пригожин, 1985) можно интерпретировать как старение культуры. По сравнению с культурами, оцененными в 4 балла (удовлетворительное качество), культуры, оцененные в 5 баллов (отличное качество) или в 3 балла (неудовлетворительное качество), имеют соответственно более низкое ( $P < 0.001$ ) или соответственно более высокое ( $P < 0.02$ ) значение ЭЭ. Следовательно, жизнеспособность культур культивируемых фибробластов, оцененная по величине ЭЭ, рассчитанного по морфометрическим параметрам клеток, согласуется с результатами экспертной оценки качества. Предлагаемый подход позволяет оценить жизнеспособность клеток непосредственно величиной ЭЭ, для чего не требуется согласования оценок экспертов и вообще их участия.

Приведенные в таблице диапазоны ЭЭ указывают на то, что между культурами, оцененными в 4 и 5 баллов, существуют фибробласты, ЭЭ которых превосходит последние, но меньше первых и находится в диапазоне 1.9—2.5. Такие культуры могут быть оценены в 4.5 балла и классифицированы как культуры хорошего качества. Действительно, среди 7 культур, оцененных в 5 баллов, имело место 1 культура с ЭЭ = 2.0—2.2, которая при задании соответствующих начальных условий может быть выделена в отдельный кластер. Следовательно, применение ЭЭ, помимо прочего, позволяет повысить точность оценки жизнеспособности культур культивируемых фибробластов.

Для того чтобы попытаться сопоставить результаты, полученные в обеих сериях экспериментов (расчетах ЭЭ по 3 или 4 морфометрическим параметрам), интересно сравнить значения ЭЭ относительно их максимальных величин ( $ЭЭ_{\max}$ ). Как следует из теоретических положений (Герасимов, 1998),  $ЭЭ_{\max}$  соответствует состоянию, в котором система полностью детерминирована, т. е. в ней все  $r = 1$  и соответственно все внедиагональные члены корреляционной матрицы (структурные элементы), используемые для ее расчета (второй член правой части уравнения (6)), равны 1. При этом сумма диагональных членов корреляционной матрицы (первый член правой части уравнения (3)) — информационные элементы — также равна 1. Использование для расчета ЭЭ трех параметров и корреляционной матрицы  $3 \times 3$  дает  $ЭЭ_{\max} = 7$  усл. ед., а в случае четырех параметров и корреляционной матрицы  $4 \times 4$  приводит к  $ЭЭ_{\max} = 13$  усл. ед. Тогда исходные культуры получают такую оценку: в первой

серии  $ЭЭ / ЭЭ_{\max} = 0.090 \pm 0.021$ , во второй  $0.130 \pm 0.011$  ( $P < 0.2$ ). С другой стороны, на 4-е сут после лишения фибробластов  $CO_2$  отношение  $ЭЭ / ЭЭ_{\max} = 0.270 \pm 0.023$ , а для клеточных культур неудовлетворительного качества  $ЭЭ / ЭЭ_{\max} = 0.290 \pm 0.031$  ( $P < 0.001$ ). Полученный результат указывает на то, что по своему термодинамическому состоянию культуры наихудшего качества (вторая серия) сопоставимы с весьма маложизнеспособными культурами (первая серия). Среди последних более половины клеток погибли, а большинство остальных находятся на пути к гибели, и такое соотношение и соответствие между результатами, полученными в двух сериях, делает оценку жизнеспособности посредством ЭЭ более убедительной.

Таким образом, на примере фибробластов и оценки жизнеспособности их культур показана перспективность применения ЭЭ, сформированного на основании положений неравновесной термодинамики с использованием морфометрических параметров клетки.

### Список литературы

- Васильев Ю. М., Гельфанд И. М. 1981. Взаимодействие нормальных и неопластических клеток со средой. М.: Наука. 220 с.
- Герасимов И. Г. 1996. Использование энтропийных характеристик для оценки биологического возраста и функционального состояния организма. Пробл. старения и долголетия. 6 (1—2): 32—35.
- Герасимов И. Г. 1998. Энтропия биологических систем. Пробл. старения и долголетия. 7 (2): 119—126.
- Герасимов И. Г., Калуцкая О. А. 1996. Динамика некоторых параметров клеток буккального эпителия в течение менструального цикла у женщин. Цитология. 38 (11): 1152—1157.
- Кузнецов С. Л., Пугачев М. К. 2004. Лекции по гистологии, цитологии и эмбриологии. М.: Мед. информ. агентство. 432 с.
- Магакян Ю. А. 2002. Распознавание образов клеток и перспективы его использования в аналитической микроскопии. Цитология. 44 (2): 213—217.
- Медовый В. С., Балабуткин В. А., Верденская Н. В., Гусев А. А., Иванова И. А., Козинец Г. И., Погорелов В. М., Пятницкий А. М., Стоянов М. С., Соколинский Б. З., Теохаров А. Н. 1997. Автоматизированные цитометрические тесты мазков крови для общей клиники и скрининговых обследований населения. Клинич. лаб. диагн. 10: 6—8.
- Пригожин И. 1985. От существующего к возникающему: время и сложность в физических науках. М.: Наука. 326 с.
- Погорелов В. М., Медовый В. С., Балабуткин В. А., Соколинский Б. З., Пятницкий А. М., Козинец Г. И. 1997. Методы компьютерной цитологии в гематологических исследованиях. Клинич. лаб. диагн. 11: 40—42.
- Погорелов В. М., Медовый В. С., Хазем Г. М., Козинец Г. И. 1995. Анализ клеточного изображения. Клинич. лаб. диагн. 3: 40—43.
- Соловьева М. Е., Лещенко В. В., Кудрявцев А. А., Акатов В. С. 1998. Роль внутриклеточного pH в регуляции роста и гибели клеток миеломы MS/O. Цитология. 40 (6): 549—557.
- Шуган Е. Н. 1986. Методы прогнозирования и моделирования в социально-гигиенических исследованиях. М.: Медицина. 208 с.
- Cardenas-Aguayo Mdel C., Santa-Olalla J., Baizabal J. M., Salgado L. M., Covarrubias L. 2003. Growth factor deprivation induces an alternative non-apoptotic death mechanism that is inhibited by Bc12 in cells derived from neural precursor cells. J. Hematother. Stem Cell Res. 12: 735—748.
- Grenander U. 1997. Geometrics of knowledge. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 94: 783—789.
- Harris A. K., Stopak D., Warner P. 1984. Generation of spatially periodic patterns by a mechanical instability: a mechanical al-

ternative to the Turing model. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 80 : 1—20.

Harris A. K., Stopak D., Wild P. 1981. Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis. *Nature.* 290 : 249—251.

Harris A. K., Wild P., Stopak D. 1980. Silicone rubber substrate: a new wrinkle in the study of cell locomotion. *Science.* 208 : 177—179.

Hayes O., Ramos B., Rodriguez L. L., Aguilar A., Badia T., Castro F. O. 2005. Cell confluency is as efficient as serum starvation for inducing arrest in the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase of the cell cycle in granulosa and fibroblast cells of cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 87 : 181—192.

Hayflick L. 1998. How and why we age. *Exp. Gerontol.* 33 : 639—653.

Luginbuhl J. M., Pond K. R., Burns J. C., Russ J. C. 1989. Effects of ingestive mastication on particle dimensions and weight

distribution of coastal bermudagrass hay fed to steers at four levels. *J. Anim. Sci.* 67 : 538—546.

Martin G. M., Sprague C. A., Epstein C. J. 1970. Replicative life-span of cultivated human cells; effect of donor's age, tissue and genotype. *Lab. Invest.* 23 : 86—92.

Russ J. C. 2000. Stereo pair displays of surface range images. *J. Microsc.* 199 : 87—89.

Shen L., Rangayyan R. M., Desautels J. E. L. 1994. Application of shape analysis to mammographic calcifications. *IEEE Transact. Med. Imag.* 13 : 263—274.

Stolarek R., Kulf P., Kurmanowska Z., Nowak D. 1998. Effect of various agonists on nitric oxid generation by human polymorphonuclear leukocytes. *Int. Clin. Lab. Res.* 28 : 104—109.

Поступила 10 VII 2006

#### ESTIMATION OF CELL VIABILITY USING THEIR GEOMETRICAL PARAMETERS BY THE EXAMPLE OF CULTIVATED FIBROBLASTS

I. G. Gerasimov,<sup>1</sup> A. G. Popandopulo<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of Family Medical Problems of Donetsk State Medical University, and

<sup>2</sup> Research Institute of Urgent and Reconstructin Surgery, Donetsk, Ukraine;  
e-mail: IGGerasim@mail.ru

The viability of cultivated fetal fibroblasts has been estimate cytochemically, by system of expert estimations and by entropy equivalent (EE) generate, on the basis of the thermodynamic theory of nonequilibrium processes. The EE is the superposition of the transformed correlation matrix elements which are calculated by geometrical parameters of cell projections, using perimeter, the area, the compactness, and the central moments of the first and third orders, their difference and Fourier Description. Geometrical parameters of cells, which are the most effective for the estimation of viability by EE, and also necessary and sufficient for such estimation of cell number, are determined. It was shown, that cytochemical and expert estimations of viability well correlate with value of EE, which, according to thermodynamic representations, grows during artificial destruction of culture and at deterioration of its quality.

Key words: fetal fibroblasts, cell viability, cell size, cell form, entropy equivalent, expert estimation, cytochemistry.