УДК 612+576+ 57.086.2+57.04+57.018+57.043

С.М. ВИШНЕВСКАЯ

КОЛИЧЕСТВЕННО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ ПЕРЕСТРОЕК ХРОМАТИНА ЛЕЙКОЦИТОВ В НОРМЕ И ПРИ ЭКСТРЕМАЛЬНО ПОВЫШЕННОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ

Микроструктурные особенности хроматина мононуклеарных и полиморфонуклеарных лейкоцитов цельной крови здоровых доноров, окрашенных на ДНК, исследовались методом анализа изображений по 12 количественно-морфологическим параметрам. Проведен последовательный анализ этих параметров с точки зрения их дифференциально-диагностических возможностей. В результате показаны достоверные изменения средней оптической плотности и контраста хроматина в зависимости от типа лейкоцитов, а также от времени инкубации in vitro при +37°С и в условиях теплового шока, что позволяет считать их информативными критериями оценки перестроек хроматина.

Введение

Диагностика состояния хроматина клеток в микропрепаратах, окрашенных на ДНК, успешно используется как чувствительный тест в биологических исследованиях и медицинской практике. Являясь комплексом ДНК и различных белков, хроматин характеризуется значительной изменчивостью состава и пространственной организации в зависимости от стадии клеточного цикла, паттерна экспрессии интерфазной клетки или влияния деструктивных факторов. Одним из методов исследования хроматина является анализ цифровых изображений гистологических микропрепаратов, где хроматин визуализирован тем или иным методом. Окрашенный хроматин и его компоненты на цифровом изображении выступают в качестве объектов, которые могут быть выделены на гистограмме распределения точек по яркости путем пороговой сегментации. При характеристике хроматина с точки зрения количественной морфологии могут использоваться его функциональные компоненты (гранулярный гетерохроматин, диффузный эухроматин и переходный хроматин [1; 2; 3]), а также общие статистические характеристики гистограммы области изображения, занимаемой хроматином, и характеристики этой области с точки зрения границ (форма, площадь и др.).

Поскольку исследования микроструктуры хроматина сохраняют свою актуальность, необходима разработка новых подходов, уточнение характеристик хроматина различных типов клеток, в том числе для случаев патологии и функциональных нагрузок. Кровь является удобным объектом, который часто используется при оценке состояния здоровья человека. В последнее время цельную кровь все чаще используют при тестировании лекарственных препаратов, изучении воздействия физических факторов. Тем не менее, основным подходом, применяемым в отечественной медицине, до сих пор остается подсчет количества клеток крови без учета их цитологических особенностей, в том числе морфологии хроматина, что обусловлено слабой разработанностью вопроса об этих особенностях в условиях нормы и физиологических отклонений. Цель данной работы – обосновать критерии оценки состояния хроматина мононуклеарных (MNL) и полиморфонуклеарных (PMNL) лейкоцитов периферической крови здоровых доноров в норме и при функциональных нагрузках с использованием методов обработки изображений и математической статистики.

Могилевский государственный университет имени А.А. Кулешова

Материалы и методы исследования

Цельную кровь 14 здоровых доноров Могилевской областной станции переливания крови (8 мужского и 6 женского пола) получали из локтевой вены через толстую иглу в количестве 10 мл в пластиковую пробирку с антикоагулянтом. Антикоагулянтом служил гепарин конечной концентрацией 20 ед/мл крови. Данное вещество обычно используется при функциональных исследованиях клеток крови [4], так как в малых концентрациях воздействует на клеточную поверхность, эффективно предотвращая агрегацию, существенно не влияя при этом на состав и основные свойства клеток. Из взятой крови готовили мазки. Их высушивали на воздухе, фиксировали, обрабатывали раствором РНКазы и окрашивали стехиометрическим комплексным красителем на нуклеиновые кислоты галлоцианин-хромовые квасцы. РНКаза позволяет впоследствии отделить на изображении ядро от цитоплазмы, содержащей РНК, а также корректно выделять участки плотного и диффузного хроматина на изображении ядра клетки.

Кровь троих доноров разделяли на аликвоты по 1 мл и параллельно инкубировали в пластиковых пробирках при различных температурных условиях (37° и 42°С) в течение 90 мин. (по одной аликвоте на каждую временную точку при разных температурных условиях: итого 36 аликвот). Перед экспериментом кровь исследовали на гемоанализаторе Abacus (Diatron, Австрия). Через 15, 30, 60 и 90 мин. одну аликвоту крови каждого донора извлекали из экспериментальных условий и использовали для изготовления гематологических мазков, которые обрабатывали описанным выше способом.

Готовые препараты исследовали под микроскопом (AxioImager Carl Zeiss ×1000/NA 1.3, программа AxioVision, камера AxioCam). На их основе создавали архив цифровых 8-битных изображений хроматина лейкоцитов в оттенках серого (по 10-14 клеток каждого типа с каждого препарата, размер 256×256 пикселей, масштаб 9250000 пикселей на метр, формат tif). При создании архива руководствовались общими признаками ядер лейкоцитов (MNL – ядро диаметром менее 10 мкм, округлой или бобовидной формы; PMNL – ядро состоит из 3-5 сегментов, соединенных перетяжками в 3 раза тоньше сегмента). Обработку изображений и измерение морфологических параметров хроматина проводили с помощью программы ImageJ 1.39p, National Institutes of Health, USA (условные обозначения параметров хроматина далее в тексте согласно табл. 1). Хроматин выделяли пороговой сегментацией на гистограмме оттенков серого (от 2,71 до 0 в единицах оптической плотности, согласно калибровочной кривой зависимости оптической плотности от яркости пикселя). Для оценки достоверности различий использовали непараметрический критерий Манна-Уитни, степени корреляции признаков – коэффициент корреляции Спирмена. При изучении зависимости параметров хроматина каждого донора от условий эксперимента (времени, температуры) и типа клеток использовали дисперсионный анализ (ANOVA повторных измерений, программа STATISTICA, StatSoft, USA) [5].

Результаты и их обсуждение

Структура данного исследования включала 3 этапа. На первом этапе производилась характеристика морфологии хроматина MNL и PMNL периферической крови здоровых доноров по 12 параметрам. Целью являлся отбор статистически независимых параметров (коэффициент корреляции по модулю меньше 51), по которым клетки двух типов различаются сильнее всего, и которые при этом демонстрируют статистическую связь с клеточным составом крови. Последнее

Могилевский государственный университет имени А.А.Кулешова

может указывать на информативность параметров при оценке влияния межклеточных взаимодействий на хроматин лейкоцитов. На втором этапе оценивалось состояние хроматина MNL и PMNL в ходе инкубации *in vitro* при физиологической температуре и в условиях теплового шока. При этом среди оставшихся параметров хроматина лейкоцитов следовало выявить чувствительные к изменениям условий среды их существования (изъятие крови из русла циркуляции, повышенная температура). Третий этап заключался в оценке степени зависимости параметров, отобранных на предыдущих двух этапах, от типа клеток и времени инкубации при различных температурных условиях, т.е. их чувствительности и информативности.

Гистограммы распределения лейкоцитов по морфологическим параметрам хроматина характеризовались индивидуальной изменчивостью (табл. 1) и во многих случаях оказались прерывистыми, по этой причине в дальнейшем мы пользовались методами непараметрической статистики.

Достоверные различия морфологии хроматина MNL и PMNL выявлены по трем параметрам: Mean_OD и StdDev_OD (p=0,000049-0,019), а также по Max_OD (p=0,000015-0,014). CONTST хроматина у PMNL был достоверно выше в 13 случаях из 14 (92,8%; p=0,000093-0,031).

Исследование зависимости состояния хроматина лейкоцитов от клеточного состава крови показало значительные корреляции некоторых параметров с характеристиками тромбоцитов. Так, степень $CONTST_{MNL}$ находилась в прямой статистической зависимости от широты распределения тромбоцитов по размеру (коэффициент корреляции r=0,58 при p=0,028), в то время как Int_OD_{PMNL} находилась в обратной зависимости от данного показателя (r=-0,55; p=0,041). Значения Min_OD_{MNL} обнаружили отрицательную статистическую связь с количеством тромбоцитов и тромбокритом (r=-0,5697 при p=0,033; r=-0,535 при p=0,049). Были также обнаружены значительные корреляции морфологии хроматина с составом эритроцитов крови: Int_OD_{MNL} со средним объемом эритроцита (r=0,56; p=0,038) и широтой распределения эритроцитов по объему (r=0,58; p=0,028), $StdDev_OD_{PMNL}$ (r=0,54; p=0,045) и Min_OD_{PMNL} (r=0,57; p=0,033) с гематокритом, Min_OD_{PMNL} с концентрацией гемоглобина (r=0,56; p=0,039), а также $CONTST_{PMNL}$ со средней концентрацией гемоглобина в эритроците (r=-0,54; p=0,047). Что касается количества лейкоцитов, то была обнаружена статистическая связь Int_OD_{MNL} с содержанием моноцитов в крови (r= 0,55; p=0,04), $Skew_{PMNL}$ с концентрацией лимфоцитов (r=0,54; p=0,048), $CONTST_{PMNL}$ и концентрацией гранулоцитов (r=-0,55; p=0,042).

Корреляционный анализ связей между параметрами хроматина выявил тесную обратную связь между S хроматина лейкоцитов, их Mean_OD и StdDev_OD (здесь и далее r>0,5 при p<0,05). Была также обнаружена тесная обратная статистическая связь между q1 и q4. Кроме закономерностей, характерных для обоих типов лейкоцитов, обнаружены их отличительные особенности. Так, S_{MNL} обнаруживает, кроме того, тесную связь с Int_OD_{MNL}, а S_{PMNL} – с Max_OD_{PMNL}.

Исходя из данных, полученных на первом этапе исследования, мы сочли целесообразным использовать при анализе поведения хроматина лейкоцитов *in vitro* следующие параметры: q1, Mean_OD, IntDen_OD, Min_OD, Max_OD, Skew и CONTST.

Анализ результатов эксперимента *in vitro* показал, что во время инкубации крови при 37°C мин. наблюдалось постоянное сокращение компонента $q1_{MNL}$; $q1_{PMNL}$ уменьшался только через 90 мин. На ранних сроках (15-30 мин.) увеличивался $CONTST_{MNL}$ (рис. 1). Через 60 мин. $Mean_OD_{MNL}$, Min_OD_{MNL}, $Skew_{MNL}$ лимфоцитов в целом уменьшались, сокращался Max_OD_{PMNL}.

Мозырский государственный педагогический университет имени И.П. Шамякина

Таблица 1

Характеристики распределения лейкоцитов здоровых доноров (n=14) по морфологическим параметрам хроматина

№	Название параметра, единицы измерения	Условное обозначение (для MNL и PMNL)	Среднее значение	Размах (минимум-максимум)	Межквартильный размах (25%-75% значений)	Асимметрия распределения лейкоцитов по признаку (минимум-максимум)
ф1	Общая площадь, мкм^2	S_{MNL}	53,21	36,41 – 74,25	41,23 – 65,48	-0,68 – 1,295
		S_{PMNL}	45,19	25,57 – 109,07	31,29 – 60,54	-0,77 – 2,63
2	Гранулярный хроматин, %	$q1_{MNL}$	42,40	17,72 – 73,16	25,73 – 58,84	-1,285 – 0,77
		$q1_{PMNL}$	36,84	18,62 – 64,91	26,42 – 52,95	-1,053 – 1,067
3	Переходный хроматин, %	$q2_{MNL}$	21,83	14,395 – 29,72	17,59 – 28,40	-1,85 – 0,875
		$q2_{PMNL}$	21,45	14,62 – 27,86	18,35 – 25,25	-1,65 – 1,52
4	Диффузный хроматин, %	$q4_{MNL}$	12,21	3,31 – 30,93	6,50 – 25,75	-0,33 – 1,045
		$q4_{PMNL}$	15,74	2,73 – 34,03	7,72 – 24,94	-0,49 – 1,37
5	Средняя оптическая плотность	$Mean_OD_{MNL}$	0,31	0,26 – 0,37	0,27 – 0,35	-0,67 – 0,63
		$Mean_OD_{PMNL}$	0,37	0,28 – 1,61	0,30 – 1,23	-1,054 – 1,93
6	Стандартное отклонение величины оптической плотности	$StdDev_OD_{MNL}$	0,0295	0,019 – 0,047	0,02 – 0,044	-0,82 – 1,39
		$StdDev_OD_{PMNL}$	0,06	0,028 – 0,191	0,033 – 0,16	-1,43 – 2,37
7	Минимальное значение величины оптической плотности	Min_OD_{MNL}	0,22	0,18 – 0,28	0,20 – 0,27	-0,51 – 1,55
		Min_OD_{PMNL}	0,24	0,16 – 1,15	0,21 – 0,76	-0,755 – 1,32
8	Максимальное значение величины оптической плотности	Max_OD_{MNL}	0,40	0,32 – 0,57	0,34 – 0,49	-0,64 – 1,58
		Max_OD_{PMNL}	0,55	0,37 – 2,04	0,42 – 1,50	-1,75 – 1,52
9	Интегральная оптическая плотность	Int_OD_{MNL}	16,82	13,07 – 21,83	13,75 – 18,965	-1,83 – 1,077
		Int_OD_{PMNL}	15,16	2,52 – 34,81	4,34 – 18,79	-1,91 – 3,036
10	Асимметрия гистограммы величины оптической плотности	$Skew_{MNL}$	-0.17	-0,75 – 0,673	-0,50 – 0,37	-1,05 – 1,23
		$Skew_{PMNL}$	0,15	-1,38 – 1,26	-0,25 – 0,80	-1,71 – 1,00195
11	Эксцесс гистограммы величины оптической плотности	$Kurt_{MNL}$	-0,20	-0,66 – 2,695	-0,475 – 0,27	-1,12 – 2,76
		$Kurt_{PMNL}$	-0,50	-3,41 – 1,71	-1,72 – 0,15	-1,43 – 2,37
12	Оптичеокий контраст, доли от единицы	$CONTST_{MNL}$	0,295	0,21 – 0,395	0,25 – 0,36	-0,315 – 1,48
		$CONTST_{PMNL}$	0,35	0,23 – 0,52	0,29 – 0,43	-1,76 – 2,45

Могилевский государственный университет имени А.А. Кулешова

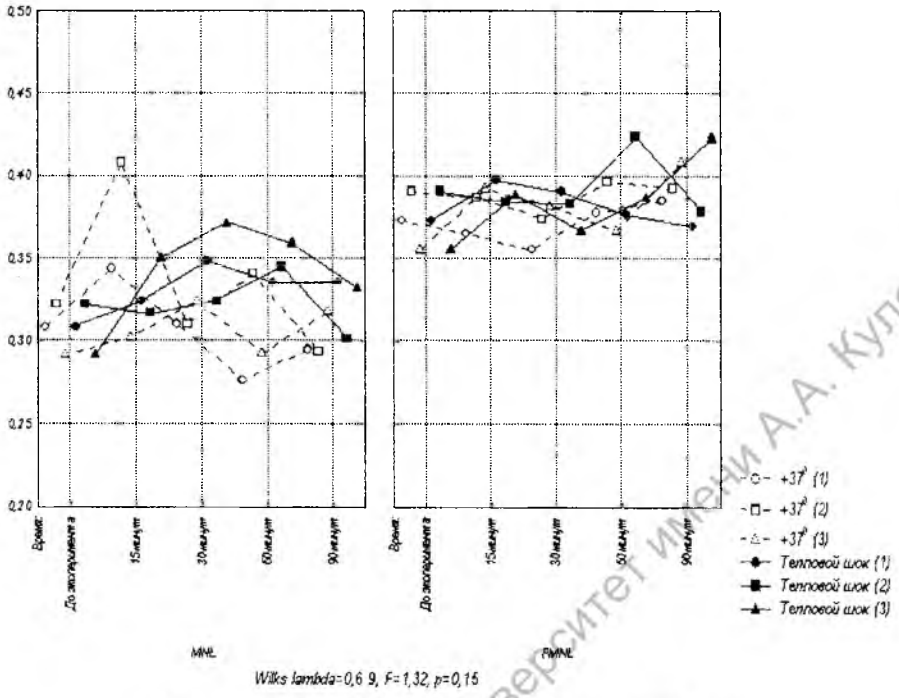

Рис. 1. Изменение контраста хроматина лейкоцитов *in vitro* при различных температурных условиях

При 42°С уже через 15 мин. наблюдалось снижение $Mean_OD_{MNL_PMNL}$ (рис. 2). CONTST хроматина лейкоцитов преимущественно увеличивался в ходе инкубации, хотя динамика изменений существенно различалась в зависимости от типа клеток и сроков инкубации.

Данные, полученные на втором этапе исследования, свидетельствуют о том, что хроматин двух типов лейкоцитов, наиболее многочисленных в периферической крови, является чувствительным к функциональным нагрузкам. В первом случае таковой являлось извлечение крови из организма и кратковременное культивирование *in vitro* с антикоагулянтом при физиологической температуре. Во втором случае кровь *in vitro* подвергалась действию экстремальной температуры.

При извлечении крови из русла циркуляции изменяются условия существования ее клеточного компонента, нарушаются привычные контакты с эндотелием, хотя ресурсы для поддержания тканевого гомеостазиса позволяют крови некоторое время сохранять свои основные свойства. Тем не менее, культивирование цельной крови должно приводить к прогрессирующему дефициту питательных веществ, факторов роста, кислорода; кислородная депривация, как показано, приводит к активации механизмов клеточной гибели по типу апоптоза [6].

С другой стороны, если при 37° метаболизм клеток, по-видимому, должен поддерживаться на уровне, близком к норме, то в условиях теплового шока он может изменяться в сторону уменьшения из-за подавления активности многих ферментов. Экспрессия большинства генов, кодирующих конституционные белки, подавляется. В то же время в клетках активируется транскрипционный фактор теплового шока HSF1, который способен активировать экспрессию множества генов [7], в том числе генов белков теплового шока. Показано, что в лейкоцитах цельной крови in vitro при 42° синтез белков теплового шока начинает преобладать над синтезом других белков уже через 30 мин. [8].

Могилевский государственный университет имени А.А. Кулешова

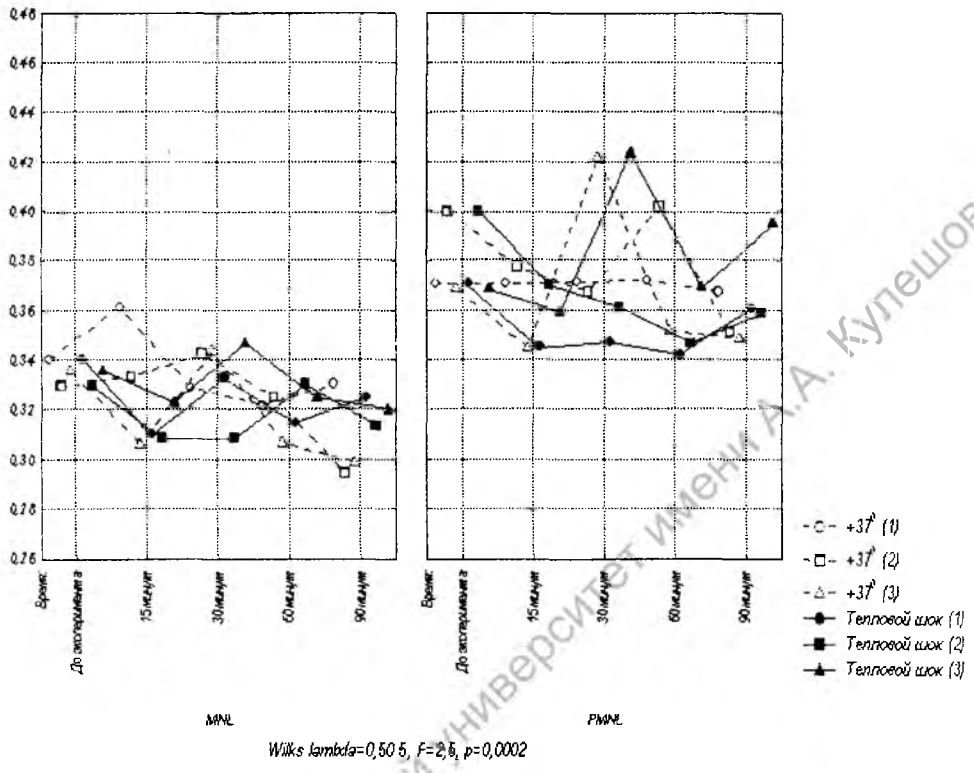

Рис. 2. Изменение средней оптической плотности хроматина лейкоцитов *in vitro* при различных температурных условиях

Таким образом, в обоих рассмотренных нами случаях у ядросодержащих клеток крови должны наблюдаться перестройки хроматина, направленные на изменение паттерна экспрессии и поддержание клеточного энантиостазиса в изменившихся условиях.

Дисперсионный анализ показал, что такие параметры, как Mean_OD и CONTST, изменяются в достоверной зависимости от типа клеток, а также от времени инкубации крови *in vitro* при разных температурных условиях (рис. 3, 4; табл. 2). Mean_OD также зависит от сочетания этих двух факторов, то есть $Mean_OD_{MNL}$ и $Mean_OD_{PMNL}$ по-разному изменяются в зависимости от температурных условий.

Таблица 2

Проверка значимости различий контраста и средней оптической плотности хроматина в зависимости от типа лейкоцитов и времени инкубации *in vitro*

Переменные \ Дисперсионный анализ		λ (тест Уилкса)	Критерий Фишера	p (вероятность ошибки)
Mean_OD	Тип клеток	0,198	53,21	0,000001
	Время инкубации	0,18	7,28	0,000001
	Тип клеток* Время инкубации	0,505	2,50	0,000204
CONTST	Тип клеток	0,23	44,46	0,000001
	Время инкубации	0,54	2,24	0,001
	Тип клеток* Время инкубации	0,69	1,32	0,15

Могилевский государственный университет имени А.А. Кулешова

Заключение

Исходя из результатов проведенного исследования, средняя оптическая плотность и оптический контраст хроматина периферической крови достоверно различаются у мононуклеарных и полиморфонуклеарных лейкоцитов и могут использоваться в качестве критериев при оценке общего состояния их генома. Средняя оптическая плотность хроматина лейкоцитов может использоваться не только при проверке гипотез о влиянии тех или иных условий среды, но также при решении более сложных диагностических задач, в том числе в системах поддержки принятия решений.

Автор считает своим долгом выразить искреннюю благодарность своему научному руководителю доценту кафедры биологии УО "МГУ им. А.А. Кулешова", кандидату биологических наук Акуличу Николаю Васильевичу, начальнику Регионального центра коллективного пользования исследовательским оборудованием и приборами МГУ кандидату физико-математических наук Томову Александру Васильевичу, коллективу Могилевской областной станции переливания крови и лично главному врачу кандидату медицинских наук Гольдинбергу Борису Михайловичу, заведующему кафедрой АСУ УО "Белорусско-российский университет", кандидату технических наук доценту Крутолевичу Сергею Константиновичу за неоценимую помощь в работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. ***Ченцов, Ю.С.*** Введение в клеточную биологию / Ю.С. Ченцов. – М., 2004.
2. ***Эренпрейса, Е.А.*** Организация хроматина в ядре интерфазной клетки / Е.А. Эренпрейса. – Рига, 1990.
3. ***Жукоцкий, А.В.*** Микрофотометрический анализ интерфазных ядер гепатоцитов в норме и при функциональных нагрузках: автореф. дис. ... канд. биол наук; А.В. Жукоцкий. – М., 1984.
4. Current Protocols in Immunology // www.mrv.interscience.wiley.com/cp/cpim/articles/im0723/image_n/im0723.pdf
5. ***Боровиков, В.*** STATISTICA. Искусство анализа данных на компьютере / В. Боровиков. – СПб., 2003.
6. ***Brunelle, J.K.*** et al // Apoptosis 2002. – Vol. 7, N 6. – P. 475-482.
7. ***Trinklein, N.D.*** et al // Mol. Biol. of the Cell 2003. – Vol. 15, March. – P. 1254-1261.
8. Eid, N.S. et al // J. Exp. Med. 1987. – Vol. 165, May. – P. 1448-1452.

Поступила в редакцию 20.10.2009 г.

Могилевский государственный университет имени А.А. Кулешова