

ОЦЕНКА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК С ПРИВЛЕЧЕНИЕМ ПОЛОЖЕНИЙ ТЕРМОДИНАМИКИ НЕРАВНОВЕСНЫХ ПРОЦЕССОВ

Спorykhin В.Я, Меркулова Е.В

Донецкий национальный технический университет, кафедра АСУ

E-mail: kate@kita.dgtu.donetsk.ua

Герасимов И.Г.

НИИ медицинских проблем семьи Донецкого медицинского университета им. М. Горького

Abstract

Sporykhin V.Y., Merkulova E.V., Gerasimov I.G. Researches of a functional cells fibroblasts condition with the help of positions of thermodynamics of nonequilibrium processes. The method of calculation of thermodynamics criteria is given, parameters for calculation are chosen, researches on revealing necessary quantity of cells are carried out. Intervals of change of thermodynamic equivalent for revealing stages cells are received

Определение функционального состояния клеток или уровня их жизнеспособности – одна из наиболее актуальных задач медицины и биологии. И не только потому, что помогает врачу поставить диагноз или оценить эффективность лечения. Целостная картина жизненной активности клеток позволяет оценить состояние отдельных тканей и даже всего организма в целом. Наиболее часто используемые на практике способы определения функционального состояния клеток основываются на цитохимических, биохимических и цитоэнзиматических методах, в большинстве своем предполагающих обработку клеток специальными химическими препаратами для выявления различной степени интенсивности специфической окраски. Эти методы позволяют изучать преимущественно локализацию и оценивать количество определяемых веществ в различных клеточных элементах, однако они трудоемки, занимают много времени, а получаемые результаты в ряде случаев субъективны.

Для определения функционального состояния биологических систем в работах последних лет предлагается использовать положения термодинамики неравновесных процессов, фундаментальные основы которых сформулированы И. Пригожиным [1] и развиты в работах Дж. Николиса [2], Г. Хакена [3] и других.

В работе [4] функциональное состояние биологических систем (биосистем) оценено с позиции теории неравновесной термодинамики. Биосистема в процессе развития характеризуется значениями энтропии, которые в оптимальном состоянии поддерживаются на минимальном уровне. Однако случайные флуктуации или внешние воздействия могут переводить систему из одного стационарного состояния в другое, при этом энтропия биосистемы будет изменяться. Такой процесс может продолжаться, пока энтропия не станет критической, когда система окажется не в состоянии поддерживать свою целостность, что приведет к ее гибели. Таким образом, старение или флуктуации биологических систем можно выявить, оценивая изменение энтропии.

По одному из определений, под биосистемой понимают равновесную динамическую систему, способную к саморегулированию параметров состояния посредством производства, потребления и обмена энергией с внешней средой [5]. Учитывая это, клетки одной ткани можно рассматривать как биосистему, к которой применимы вышеописанные положения. Для оценки энтропии предложен энтропийный эквивалент (ЭЭ), рассчитываемый по формуле [4]:

$$\Xi \Xi = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n (r_{ij})^2, \quad (1)$$

где r_{ij} - это элементы корреляционной матрицы состояния, имеющей вид:

$$\begin{pmatrix} r_{11} & r_{12} & r_{13} & \dots & r_{1j} & \dots & r_{1n} \\ r_{21} & r_{22} & r_{23} & \dots & r_{2j} & \dots & r_{2n} \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ r_{i1} & r_{i2} & r_{i3} & \dots & r_{ij} & \dots & r_{in} \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ r_{n1} & r_{n2} & r_{n3} & \dots & r_{nj} & \dots & r_{nn} \end{pmatrix} \quad (2)$$

где $r_{ij, i \neq j}$ - коэффициенты корреляции между i -м и j -м параметром, n - количество параметров. Элементы главной диагонали корреляционной матрицы состояния определяются следующим образом:

$$r_{ij, i=j} = \frac{\sum_{j=1}^n r_{ij}}{2 \Xi K}, \quad (3)$$

где $\hat{Y}E$ - энтропийный коэффициент, рассчитываемый по формуле:

$$\Xi K = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \sum_{j=1, j \neq i}^n r_{ij}. \quad (4)$$

Цель данной работы - адаптировать положения термодинамики неравновесных процессов для оценки функционального состояния клеток путем выявления зависимостей между энтропийным эквивалентом и уровнем жизнеспособности клеток.

Исследовали уровень жизнеспособности клеток эмбриона человека, диплоидных фибробластов, полученных из абортивного материала в институте неотложной и восстановительной хирургии им. В.К.Гусака АМН Украины. В большинстве своем фибробласты используются как стимулирующий материал для роста тканей, например, при лечении ожоговых ран. Выращенный в специальной лаборатории монослой фибробластов (обычно не менее 3-х пассажей) замешивают в коллагеновый гель, который затем наносят на рану. Фибробласты также могут подлежать замораживанию для хранения в специальных банках клеток. При необходимости клетки могут быть разморожены и замешены в гель. При выращивании, а также после размораживания необходимо определять уровень жизнеспособности фибробластов, т. к. при лечении качественным материалом эффективность заживления раны составляет 97%. Если клетки, с помощью которых производится лечение, не имеют требуемого уровня жизненной активности, то использовать данный материал бесполезно. Наблюдение за ростом клеточной ткани и поведением размороженных клеток ведется ежедневно и проверяется несколько раз в день с использованием различных методик. Для уменьшения затрачиваемого времени, трудовых ресурсов и погрешности в работе обслуживающего персонала ведется поиск новых подходов к определению качества выращиваемого материала.

Для определения $\Xi \Xi$ на разных стадиях функционального состояния клеток в НИИ медицинских проблем семьи Донецкого медицинского университета им. М. Горького

проведены специальные эксперименты, в ходе которых фибробласты подвергались внешнему воздействию путем разгерметизации культурального флакона, что лишало их требуемой концентрации углекислого газа над средой и приводило к гибели в течение 3-4 дней. Из каждого монослоя фибробластов брали пробы, с помощью микроскопа и видеокамеры получали оцифрованные изображения клеток, которые заносили в базу данных [6]. Изображения обрабатывали с помощью специального программного обеспечения [7], позволяющего выделить контуры клеток и рассчитать следующие параметры: площадь (S), периметр (P), компактность (C), моменты первого (F1) и третьего порядков (F3), разность моментов (F3-F1) и дескриптор Фурье (FF). Формулы для расчета параметров, приведены в [8]. Исследовали временные зависимости параметров, полученных в разные дни после разгерметизации культурального флакона.

Для эксперимента были взяты выборки клеток фибробластов: выборка А, выборка Б, выборка В, - отличающиеся временем получения клеток. В дальнейшем приводятся типичные результаты, полученные на выборе Б.

В первую очередь, для расчета ЭЭ определили необходимое и достаточное количество клеток в выборках. Для этого проанализировали зависимости силы корреляционных связей между параметрами клеток от объема выборки. На рис.1 в качестве примера приведены изменения значений коэффициентов корреляции периметра с другими параметрами в зависимости от объема выборки. Как видно из рисунка, в интервале примерно 20-40 клеток коэффициенты корреляции остаются практически постоянными и далее не изменяются. В дальнейшем ЭЭ рассчитывали с учетом этого факта.



Рисунок 1. Коэффициент корреляции периметра с другими параметрами. Зависимость от объема выборки.

Эффективность применения показателя ЭЭ зависит от правильного выбора необходимого количества наиболее информативных параметров клеток. В [2] показано, что наиболее информативный ЭЭ получается при использовании 3-х или 4-х наименее скоррелированных параметров. Для выявления наиболее информативных и наименее скоррелированных параметров были найдены средние значения по сумме столбцов всех корреляционных матриц состояний, полученных в разные дни гибели культуры. По наименьшим значениям отобраны наименее скоррелированные параметры клетки-компактность, разность моментов третьего и первого порядков, дескриптор Фурье, площадь.

Необходимость и достаточность 20-40 клеток для расчета ЭЭ подтверждено результатами, приведенными на рис. 2. Из рисунка видно, что, начиная с 20 клеток, ЭЭ существенно не изменяется.

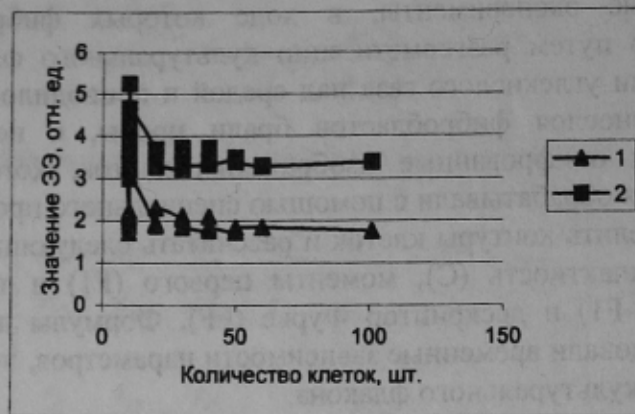


Рисунок 2. Зависимость ЭЭ от количества клеток при разном времени после разгерметизации первого (1) и четвертого(2) дня.

На рис.3 представлены временные зависимости ЭЭ, рассчитанные по 3-м: компактность, разность моментов третьего и первого порядков, дескриптор Фурье и 4-м: компактность, разность моментов третьего и первого порядков, дескриптор Фурье, площадь клетки параметрам.

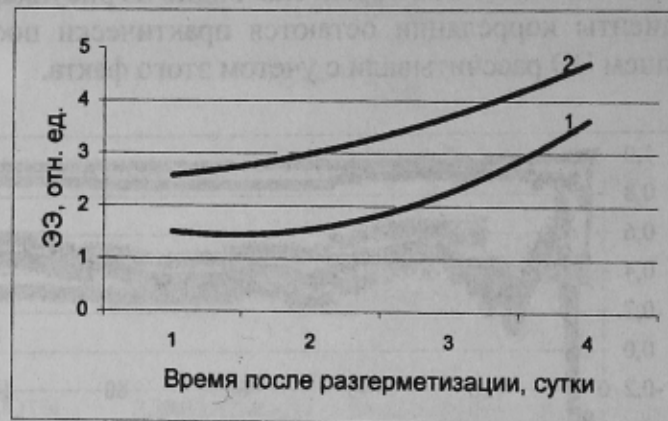


Рисунок 3 Кривые изменения ЭЭ, рассчитанного по 3-м (1) и 4-м (2) параметрам в зависимости от времени разгерметизации.

Согласно термодинамическим представления, в процессе гибели клеток их энтропия возрастает. ЭЭ в полной мере отражает энтропию, и как видно на рис. 3, изменение показателя полностью соответствует априорному представлению динамике изменения энтропии в связи с гибелью системы. Полученные результаты согласуются с динамикой старения биосистем [5] и данными о гибели фибробластов, оцененными прямыми методами с помощью окрашивания метеленовым синим, или пропановым синим, или акридиновым оранжевым в сочетании с этидиумом бромидом [9].

Для оценки уровня жизнеспособности клеток необходимо поставить в соответствие ему значения ЭЭ.

Точки, характеризующие равновесное функциональное состояние могут соответствовать точкам золотого сечения [10]. Золотое сечение - точка x , в которой отрезок длиной ab разделен в отношениях $(ax/bx)=(bx/ax):0,85, \dots, 0,62, \dots, 0,38, \dots, 0,24$, и т.д. Они могут определять границы устойчивых областей.

В случае для 4-х параметров максимальный ЭЭ, рассчитанный по формуле (1), в которой все недиагональные члены r_{ij} корреляционной матрицы приняты равными 1, имеет значение 12,4. Тогда величины двойного золотого сечения составляют 1,7, 2,9 и 4,8. Согласно экспериментальным данным в интервале $1,7 \leq ЭЭ \leq 2,9$ количество живых клеток более

90%. В интервале $2,9 < ЭЭ \leq 4,8$ – число живых клеток 10 - 80%. В случае, когда $ЭЭ > 4,8$ практически все клетки (более 80%) мертвые. Значение $ЭЭ \leq 1,7$, вероятно, несвойственны системе, как таковой. Впрочем, максимальное значение $ЭЭ = 12,4$ также недостижимо в реальной системе, где энтропия стремится к максимуму. Приведенные результаты обобщены на рис 4.

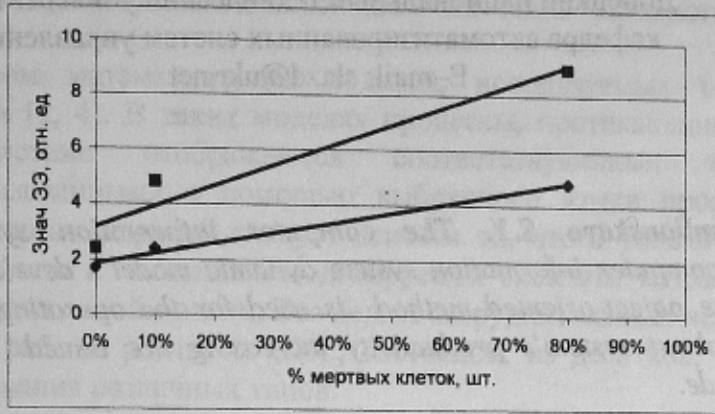


Рисунок 4 Зависимость ЭЭ от доли мертвых клеток.

Таким образом, найдена взаимосвязь между ЭЭ и уровнем жизнеспособности фибробластов, что в дальнейшем может быть использовано для оценки качества культуры фибробластов.

Авторы статьи благодарят магистра кафедры АСУ ДонНТУ Кокова А.А., принимавшего участие в получении зависимостей, представленных на рис.1

Литература.

1. Пригожин И. От существующего к возникающему. - М.: Наука, 1985. – 328 с.
2. Николис Д. Динамика иерархических систем: Эволюционное представление. - М.: Мир, 1989.- 486 с.
3. Хакен Г. Информация и самоорганизация. Макроскопический подход к сложным явлениям. - М.: Мир, 1991. 240с.
4. Герасимов И.Г. Использование энтропийных характеристик для оценки биологического возраста и функционального состояния организма. - Проблемы старения и долголетия., 1996, №1-2.- С. 32-35
5. Герасимов И.Г. Энтропия биологических систем. - Проблемы Старения и долголетия, 1998, Т. 7, №2. - С. 119-126.
6. Спорыхин В.Я., Адамова Е.В. Автоматизация процесса исследования функционального состояния клеток. - Наукові праці ДДТУ, вып. 25, Донецк, 2001. - С. 110-116.
7. Спорыхин В.Я., Меркулова А.А., Коков А.А. Автоматизированная подсистема распознавания и оконтуривания клеток. - Вестник ХГТУ, Херсон, 2003. - С. 162-167.
8. Gavrielides M.A., Kallergi M. and Clarke L.P. Application of shape analysis to mammographic classifications. - IEEE Transactionson medical imaging, vol. 13, NO 2, june 1994, p. 263-276.
9. Попандопуло А.Г., Игнатов Д.Ю., Слипченко И.О., Васильев Р.Г., Меркулова Е.В., Герасимов И.Г. Влияние факторов культивирования на жизнеспособность фетальных фибробластов человека in vitro. - Вестник неотложной и восстановительной медицины, Донецк, том 4, №2, 2003. - С. 323-325
10. Спорыхин В.Я., Адамова Е.В., Герасимов И.Г. Выбор критерия определения жизнеспособности клеток для автоматизированной системы диагностики. - Наукові праці ДонДТУ, вып. 20, 2000. - С. 224-230.