

Д. Ю. Орлова^{1,2}, М. А. Юркин¹, К. А. Семьянов¹, В. П. Мальцев^{1,2}

¹ Институт химической кинетики и горения СО РАН
ул. Институтская, 3, Новосибирск, 630090, Россия

² Новосибирский государственный университет
ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 630090, Россия
E-mail: orlova@cyto.kinetics.nsc.ru

ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГРАНУЛЯРНЫХ КЛЕТОК КРОВИ: НЕЙТРОФИЛЫ *

В работе представлены методика и результаты исследований оптических свойств нейтрофилов периферической крови. Исследования проводились на сканирующем проточном цитометре с одновременным измерением сигналов специфической флуоресценции, вызванной мечеными моноклональными антителами, и светорассеяния от одиночных нейтрофилов. Специфическая флуоресценция служила для идентификации нейтрофилов, а светорассеяние использовалось для определения размера и дифференциального сечения рассеяния клеток. Результаты сопоставлены с данными, рассчитанными с помощью метода дискретных диполей.

Ключевые слова: нейтрофил, дифференциальное сечение рассеяния, метод дискретных диполей.

Введение

В настоящее время аллергические заболевания являются широко распространенными и имеют тенденцию к дальнейшему росту. При этом в структуре аллергической заболеваемости у детей ведущая роль принадлежит аллергическим заболеваниям кожи. В реализации иммунных реакций в коже важная роль принадлежит нейтрофилам. Нейтрофил занимает одну из наиболее активных позиций в системе гуморально-клеточной кооперации крови и соединительной ткани. Это делает его универсальной мишенью и соответственно индикатором различных нарушений гомеостаза. В свою очередь, стимулированный нейтрофил становится мощным эффектором и одним из пусковых механизмов каскадных реакций, обеспечивающих развитие воспаления.

Нейтрофилы осуществляют первую линию защиты от аллергенов различной природы благодаря их основной функции – фагоцитарной. Кроме того, нейтрофилы обладают мощным дезактивационным действием в от-

ношении гистамина – главного медиатора аллергической реакции немедленного типа. Наряду с этим нейтрофилы участвуют в регуляции активности базофилов и тучных клеток, секретировав в очаг воспаления вещества, вовлекающие данные клетки (мишени аллергического процесса) в воспалительную реакцию. В то же время нейтрофилы относятся к клеткам-эффекторам поздней фазы аллергического воспаления, и от их функциональной активности во многом зависит течение и исход аллергического воспаления. Следовательно, функциональный потенциал нейтрофилов и пути его реализации имеют большое значение в развитии аллергических заболеваний.

На данный момент качественно изучены морфология, метаболизм и основные функции нейтрофилов, охарактеризованы десятки различных продуктов их секреции. Повреждение функций нейтрофилов приводит к различным заболеваниям. Эти дефекты могут быть врожденными или приобретенными в результате повреждающего действия на нейтрофилы различных факторов: бактерий,

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 07-04-00356) и Сибирского отделения РАН (интеграционные проекты 2006-3, 2006-14).

вирусов, грибов, лекарственных препаратов и т. д. Клиническими проявлениями большинства дефектов нейтрофилов являются инфекционные поражения кожных и слизистых покровов. В течение последнего десятилетия разработано принципиально новое поколение препаратов, корректирующих недостаточность функций нейтрофилов.

Многие заболевания имеют гематологические проявления, например, некоторые характеристики клеток крови, в частности нейтрофилов, выходят за пределы физиологических норм. Поэтому анализ крови является главным компонентом любых диагностических исследований. В настоящее время широко распространены оптические методы изучения и характеристики клеток крови, такие как светорассеяние и флуоресценция [1]. Для анализа крови оптические методы нашли свое главное применение в проточных цитометрах, позволяющих одновременно измерять сигналы светорассеяния и флуоресценции от одиночных клеток со скоростью до сотен тысяч клеток в минуту, что обеспечивает быстрый и качественный анализ.

Цель настоящего исследования – отработать методику выделения нейтрофилов из периферической крови; провести на сканирующем проточном цитометре идентификацию нейтрофилов с использованием моноклональных антител с флуоресцентной меткой; определить размер и дифференциальное сечение рассеяния нейтрофилов; рассчитать дифференциальное сечение рассеяния на основе теоретического моделирования светорассеяния нейтрофила; сравнить теоретические и экспериментальные дифференциальные сечения рассеяния.

Экспериментальная часть

Для подготовки проб нейтрофилов использовалась цельная периферическая кровь пациентов, которую забирали в 3 мл пробирку с антикоагулянтом. Протокол подготовки пробы:

- 1) забрать пипеткой 1,5 мл крови и перелить в отдельную пробирку;
- 2) довести лизирующим раствором до объема 15 мл;
- 3) выждать 2 мин;
- 4) центрифугировать при 1 500 оборотов в минуту в течение 5 мин при комнатной температуре;

5) аккуратно вылить жидкость из пробирки – клетки останутся на дне;

6) разболтать клетки, проведя несколько раз дном пробирки по ребристой поверхности;

7) дополнить до 15 мл раствором Эрла (без фенолового красного);

8) повторить пункты 4, 5;

9) добавить 20 мкл антител к CD16b (нейтрофилы экспрессируют CD16b [2]);

10) инкубировать в течение 20 мин при комнатной температуре;

11) повторить пункты 6, 7, 8;

12) Добавить 1 мл раствора Эрла для получения рабочей концентрации $\sim 10^6$ клеток/мл;

13) проба готова для измерения, которое необходимо провести в течение 5 часов.

Полученную пробу измеряли на сканирующем проточном цитометре, выходными данными которого являются интенсивность флуоресценции и индикатриса светорассеяния одиночного нейтрофила в диапазоне углов рассеяния от 5 до 60°.

Результаты и обсуждение

Сканирующий проточный цитометр позволяет измерять абсолютные характеристики светорассеяния одиночных частиц любой формы и структуры. Для этого необходимо измерить в одной пробе неизвестные частицы и полимерные микросферы. Индикатрисы светорассеяния микросфер, измеренные на сканирующем проточном цитометре, хорошо согласуются с индикатрисами, посчитанными с помощью теории Ми [3]. Данное свойство используется для установления абсолютного сечения рассеяния для микросфер и анализируемых частиц.

Дифференциальное сечение рассеяния вычислялось по формуле:

$$\sigma = \frac{I_s}{\left(\frac{2\pi n_0}{\lambda}\right)^2},$$

где $I_s = \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} S_{11}(\theta, \varphi) d\varphi$ – сигнал со сканирующего проточного цитометра; S_{11} – элемент матрицы Мюллера; σ – дифференциальное сечение рассеяния; $n_0 = 1,337$ – показатель преломления среды; $\lambda = 660$ нм – длина волны излучения лазера.

Дифференциальное сечение рассеяния характеризует эффективность рассеяния света частицей, разрешенную по углу. Для его определения для нейтрофилов на сканирующем проточном цитометре одновременно измерялись индикатрисы полистирольных микросфер размером 5 мкм и лейкоцитов четырех различных пациентов. Пробоподготовка осуществлялась по описанной выше методике. По специфической флуоресценции были выделены индикатрисы нейтрофилов. Результаты измерения пробы одного пациента представлены на рис. 1. Шкала абсолютного дифференциального сечения рассеяния была определена методом нелинейной регрессии при анализе экспериментальных и теоретических индикатрис полистирольных частиц, рассчитанных с помощью теории Ми. Различия в дифференциальных сечениях рассеяния для разных нейтрофилов вызваны вариацией в размерах клеток и ядер и их внутренней структуре. На различия индикатрис также влияют разброс показателей преломления клетки и ее компонентов.

По измеренным индикатрисам спектральным методом были вычислены размеры клеток четырех пациентов [4]. В табл. 1 представлены средние значения размеров нейтрофилов со стандартной ошибкой среднего и шириной распределения (2 стандартных отклонения).

На рис. 2 представлены зависимости интенсивности светорассеяния нейтрофилов от угла, усредненные по 100 клеткам каждого из четырех пациентов. Усредненные индикатрисы нейтрофилов существенно различаются, тем самым они могут служить индикатором состояния пациента. Для того чтобы ответить на вопрос, какие отличия в клетках вызывают эти изменения в индикатрисах, необходимо решить обратную задачу светорассеяния, что начинается с создания адекватной оптической модели нейтрофила.

Нейтрофилы имеют неоднородную структуру и сложную форму. В качестве первого приближения была предложена оптическая модель нейтрофила в виде сферы, заполненной сферами меньшего диаметра – гранулами, и ядром в виде четырех сфероидов различных размеров (рис. 3). Модель имеет следующий набор параметров, значения которых соответствуют литературным данным по морфологии: диаметр клетки $d_c = 9,6$ мкм; диаметр гранул $d_g = 0,1; 0,15$ и $0,2$ мкм; по-

казатель преломления цитоплазмы клетки $m_c = 1,357$; показатель преломления гранул $m_g = 1,54$; показатель преломления среды (в данной работе это физиологический раствор) $m_0 = 1,337$; объемная доля гранул $f = 0,1$; объемная доля ядра – 0,11. Данная модель была использована для расчета дифференциального сечения рассеяния методом дискретных диполей (МДД) [5], который является универсальным методом расчета светорассеяния от биологических частиц произвольной формы и структуры.

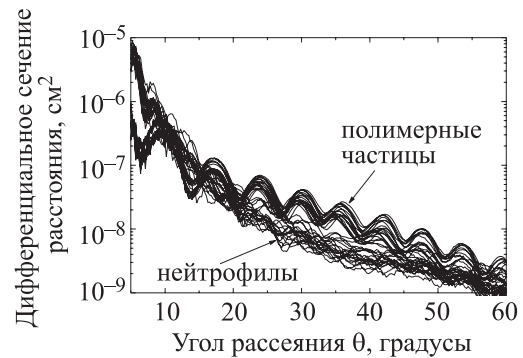


Рис. 1. Дифференциальное сечение нейтрофилов и полистирольных частиц 5 мкм

Таблица 1

Пациент	Среднее значение, мкм	Ширина распределения, мкм
1	9,63 ± 0,04	2,3
2	10,16 ± 0,12	2,6
3	9,50 ± 0,06	4,3
4	10,34 ± 0,16	4,6

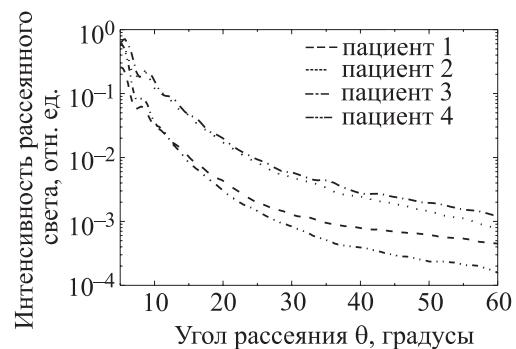


Рис. 2. Интенсивности рассеянного света для нейтрофилов четырех различных пациентов

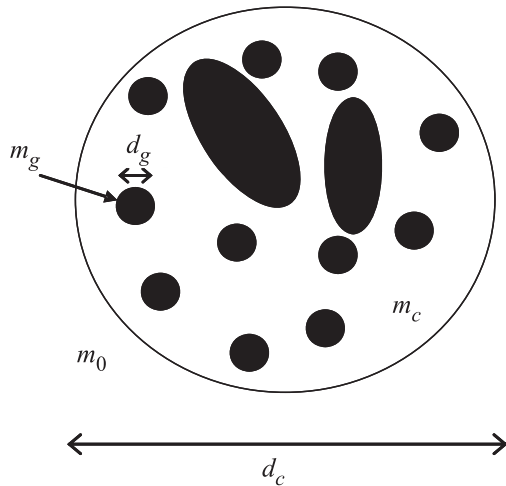


Рис. 3. Оптическая модель нейтрофила. Все гранулы идентичны и расположены случайным образом. Доли ядра отличаются друг от друга по размеру и расположены случайным образом

Таблица 2

Номер индикатрисы	Диаметр гранул d_g , мкм	Угол поворота β , градусы
11	0,10	0
12	0,15	0
13	0,20	0
14	0,15	45
15	0,10	45
16	0,20	45

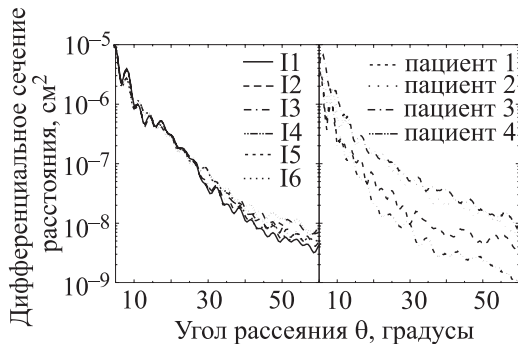


Рис. 4. Дифференциальное сечение рассеяния оптической модели нейтрофилов для различных наборов параметров (слева). Дифференциальное сечение рассеяния для полистирольной частицы 5 мкм и характерных нейтрофилов четырех различных пациентов (справа)

Расчет с помощью МДД производился для шести различных наборов параметров, представленных в табл. 2. Варьировали диаметр гранул d_g и угол β поворота клетки относительно направления распространения падающего излучения. Результаты расчета представлены на рис. 4. Анализ теоретических индикатрис нейтрофилов для различных наборов параметров позволяет сделать заключение, что интенсивность рассеянного света в углы более 30° , зависит от размера гранул и их количества. Абсолютные сечения рассеяния модели нейтрофила (см. рис. 4, слева) и экспериментально измеренных клеток (см. рис. 4, справа) демонстрируют хорошее согласие, что позволяет сделать вывод об адекватности, предложенной нами оптической модели нейтрофила.

Заключение

Данная работа является одной из первых в исследовании оптических свойств нейтрофилов, которые представляют собой, по-видимому, самую сложную биологическую частицу. Впервые эффективность рассеивать свет нейтрофилами исследовалась двумя наиболее современными методами анализа одиночных частиц, а именно с помощью сканирующей проточной цитометрии и метода дискретных диполей.

Впервые было измерено сечение рассеяния нейтрофила, что позволило приступить к созданию оптической модели клетки. Предложена оптическая модель нейтрофила, использованная для расчета абсолютного дифференциального сечения рассеяния методом дискретных диполей. Экспериментальные и теоретические сечения рассеяния хорошо согласуются, что говорит об адекватности предложенной оптической модели.

Следует отметить потенциал сканирующей проточной цитометрии в диагностике связанных с нейтрофилами патологий. Усредненные индикатрисы четырех пациентов продемонстрировали заметные отличия, что может говорить о наличии тех или иных отклонений. В данном направлении планируется исследование в кооперации с клинической лабораторией медицинского учреждения. Использование сканирующей проточной цитометрии открывает новый способ определения гематологических характеристик, которые могут быть использованы как признаки патологий нейтрофилов.

Список литературы

1. *Maltsev V. P., Semyanov K. A.* Characterisation of bio-particles from light scattering. Inverse and Ill-posed problems series. Utrecht: VSP, 2004.

2. *Thureau A.M., Schylz U., Wolf V. et al.* Identification of eosinophils by flow cytometry // *Cytometry*. 1996. P. 150–158.

3. *Soini J. T., Chernyshev A. V., Hänninen P. E. et al.* A new design of the flow cuvette

and optical set-up for the Scanning Flow Cytometer // *Cytometry*. 1998. Vol. 31. P. 78–84.

4. *Tarasov P., Yurkin. M., Avrorov P. et al.* Optics of erythrocytes // *Optics of Biological Particles*. 2007. P. 231–246.

5. *Yurkin M. A., Hoekstra A. G.* The discrete dipole approximation: an overview and recent developments // *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* 2007. Vol. 106. P. 558–589.

Материал поступил в редколлегию 05.10.2007