

УДК 517.598

Вычислительное моделирование динамики хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов

Наталья Ю.Дмитриева*

Денис В.Елизаров†

Лев С.Маергойз‡

Институт фундаментальной подготовки,
Сибирский федеральный университет,
Свободный 82, Красноярск, 660041

Россия

Андрей А.Савченко

Институт фундаментальной биологии и биотехнологий,
Сибирский федеральный университет,
Свободный 79, Красноярск, 660041

Россия

Получена 20.07.2008, окончательный вариант 25.09.2008, принята к печати 10.11.2008

Проведено вычислительное моделирование динамики хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов по методу Прони.

Ключевые слова: метод Прони, хемилюминесценция, нейтрофильные гранулоциты, вычислительное моделирование.

1. Краткое описание физиологического эксперимента по исследованию динамики хемилюминесценции

Оценка уровня здоровья не может быть адекватной без использования критериев, характеризующих функциональную активность лейкоцитов крови — одной из основных систем, обеспечивающих морфологический гомеостаз и защитные реакции организма. Состояние реактивности лейкоцитов также имеет важное значение при самых различных заболеваниях, особенно связанных с воспалительными процессами [1]. Это определяется тем, что, с одной стороны, лейкоциты в случае функциональной активации не только генерируют цитотоксические продукты, но и выделяют биологически активные вещества, влияющие на состояние других эффекторов воспаления, в то время как, с другой стороны, богатый набор рецепторов у лейкоцитов делает их высокочувствительными клетками к разнообразным нарушениям гомеостаза организма [2, 3]. При этом, воспринимая многочисленные сигналы о дестабилизации внутренней среды, фагоциты активируют свои функции, нацеленные на ее восстановление. Данный универсальный принцип лежит в основе всех фагоцитарных реакций, делая их индикатором нормы и патологии, благополучия и неблагополучия организма [4, 2].

*e-mail: DN27@yandex.ru

†e-mail: denis_elizarov@mail.ru

‡e-mail: bear.lion@mail.ru

Большинство клинических исследований по фагоцитозу проведено на гранулоцитарных клетках крови, причем наиболее изученными оказались нейтрофилы [1]. В результате было установлено, что гранулоцитарные клетки наиболее удобный объект клинико-лабораторного анализа для исследования фагоцитарной функции, так как белые клетки крови чувствительны к широкому спектру эндогенных и экзогенных агентов, а также обладают мощным эффекторным потенциалом. В связи с этим появляется необходимость широкого внедрения в практическую медицину методов, позволяющих оценить функциональное состояние гранулоцитарных клеток крови.

Одним из перспективных методов, позволяющих оценить функциональную активность лейкоцитов, считают хемилюминесцентный анализ [4, 5]. Доказан высокий уровень корреляции между уровнем хемилюминесценции фагоцитов и киллингом [2, 6]. Поэтому определение хемилюминесценции лейкоцитов может использоваться как один из критериев их способности к завершённому фагоцитозу. Однако данный анализ не используется широко, что определяется, прежде всего, до сих пор не изученным механизмом активации данного типа клеток. При этом математическое моделирование развития хемилюминесцентной реакции нейтрофильных гранулоцитов позволит охарактеризовать скрытые закономерности в механизмах функциональной активации клеток.

Материалы и методы исследования. Обследованы здоровые люди в возрасте 25-45 лет. Исследование спонтанной и индуцированной ХЛ лейкоцитов периферической крови проводили по методу De Sole et al [7]. Параметры ХЛ ответа лейкоцитов оценивали с помощью хемилюминометра "CL 3606M" (Россия) с использованием следующих реактивов: донорская сыворотка, раствор Хенкса (без фенолового красного), люминол в концентрации 100 мкг/мл, зимозан в концентрации 2 мг/мл и реаферон (рекомбинантный ИФН- $\alpha 2a$) в концентрации 100000 МЕ/мл. Концентрация реаферона в пробах рассчитывалась исходя из количества клеток в пробе и терапевтических доз 3, 5 и 8 млн МЕ. Результаты ХЛ анализа характеризовали по следующим параметрам: по времени выхода на максимум интенсивности (T_{max}), по максимальному значению интенсивности (I_{max}) и площади (S) под ХЛ кривой. Усиление ХЛ, индуцированной зимозаном, оценивали соотношением площади индуцированной (S_2) к площади спонтанной (S_1) и определяли как индекс активации.

2. Математическая обработка клинических данных по методу Прони

Вычислительное моделирование показателя хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов выполнено в данной работе с помощью модификаций метода Прони [8]. Для апробации этого способа моделирования была выбрана база данных по динамике хемилюминесценции пяти человек. Согласно эксперименту, выделенные нейтрофильные гранулоциты помещались в среде Хенкса вместе с люминолом в кювету хемилюминометра при температуре 37°C . Под действием температурного фактора наблюдалось повышение активности свечения, что связано с увеличением уровня синтеза активных форм азота и кислорода. После стабилизации спонтанной хемилюминесценции добавляли зимозан. Под действием зимозана клетки активируются, но затем, израсходовав метаболические ресурсы, функциональная активность клеток снижается до исходного уровня. Поэтому графически наблюдаются два уровня стабилизации показателя. Учитывая характер такой динамики, математическое моделирование процесса хемилюминесценции осуществлялось поэтапно (до введения зимозана

и после).

Для обработки клинических данных применялась модификация метода Прони, соответствующая случаю, когда динамика показателя стабилизируется с течением времени к некоторому постоянному уровню, что наблюдается в рассматриваемом эксперименте. Массив данных, полученных экспериментально, имел нестабильный временной шаг. Учитывая характерные свойства метода Прони, массив значений показателя хемилюминесценции трансформируется к равномерной сетке путем линейного интерполирования.

Основная идея метода Прони и его модификаций заключается в представлении дискретных данных в виде значений конечной экспоненциально-гармонической суммы вида

$$y(t) = \sum_{k=1}^n C_k e^{\lambda_k t} + \sum_{r=1}^m e^{\alpha_r t} (A_r \cos \beta_r t + B_r \sin \beta_r t) + D, \quad \lambda_k < 0, \quad \alpha_r < 0, \quad (1)$$

являющейся решением обыкновенных линейных дифференциальных уравнений (ОЛДУ):

$$y^{(s)} + a_1 y^{(s-1)} + a_2 y^{(s-2)} + \dots + a_s y + a_{s+1} = 0, \quad s = n + 2m, \quad (2)$$

где a_1, a_2, \dots, a_s — неизвестные вещественные коэффициенты.

Приближение такими суммами используется при стабилизации показателя к некоторому постоянному уровню.

Алгоритм аппроксимации показателя хемилюминесценции с помощью упомянутого метода разбивается на следующие шаги:

1. Рассматриваем функционал

$$\Phi(p) = \sum_{i=0}^{N-s} (f_{i+s} + p_1 f_{i+s-1} + \dots + p_s f_i + p_{s+1})^2,$$

где $p = (p_1, p_2, \dots, p_s, p_{s+1}) \in \mathbb{R}^{n+1}$ — вектор неизвестных вещественных коэффициентов, $F = \{f_0, f_1, \dots, f_N\}$ — дискретная функция, представляющая собой значения исследуемого показателя хемилюминесценции на равномерной сетке.

2. Стандартными действиями находим минимум функционала $\Phi(p)$ в \mathbb{R}^{n+1}

$$\Phi(q) = \min \{ \Phi(p) : p \in \mathbb{R}^{n+1} \},$$

$q = (q_1, q_2, \dots, q_s, q_{s+1}) \in \mathbb{R}^{n+1}$ — вектор, на котором достигается минимум. По координатам вектора q определяем постоянный коэффициент D (см. (1)):

$$D = -\frac{q_{s+1}}{1 + q_1 + q_2 + \dots + q_s}.$$

3. Рассматриваем многочлен вида

$$z^s + q_1 z^{s-1} + q_2 z^{s-2} + \dots + q_s = 0.$$

Пусть его корни — z_1, z_2, \dots, z_s . По найденным корням определяются главные значения логарифма

$$\lambda_j = \frac{\ln z_j}{d}, \quad j = 1, 2, \dots, s,$$

где d — заданный временной шаг. Если $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_n$ — вещественные числа, то уравнение теоретической кривой есть

$$y_1(t) = \sum_{k=1}^n C_k e^{\lambda_k t} + D. \quad (3)$$

Если $\bar{\lambda}_1, \bar{\lambda}_2, \dots, \bar{\lambda}_{2m}$ — комплексно-сопряженные числа вида $\alpha_j \pm i\beta_j$, $j = 1, 2, \dots, m$, то уравнение теоретической кривой есть

$$y_2(t) = \sum_{r=1}^m e^{\alpha_r t} (A_r \cos \beta_r t + B_r \sin \beta_r t) + D. \quad (4)$$

Если присутствуют и вещественные, и комплексно-сопряженные числа ($s = n + 2m$), то решение записывается с помощью формулы (1):

$$y(t) = y_1(t) + y_2(t).$$

4. Для нахождения неизвестных вещественных коэффициентов C_k, A_r, B_r минимизируется второй функционал:

$$\min \Phi (C_1, \dots, C_k, A_1, \dots, A_r, B_1, \dots, B_r) = \sum_{i=0}^N (f_k - y_k)^2, \quad (5)$$

где f_k — экспериментальные данные, $y_k = y(kd)$, $k = 0, 1, 2, \dots, N$ — значения функции, вычисленные в узлах равномерной сетки по формуле (1). Значения постоянных коэффициентов, при которых достигается минимум функционала, подставляются в формулы (3), (4).

Полученная функция $y(t)$ определяет динамику теоретической кривой, аппроксимирующую вектор дискретных данных изучаемого показателя хемилюминесценции.

5. Для каждого этапа вычисляется стандартное отклонение

$$\xi = \sqrt{\frac{\sum (f_k - y_k)^2}{N}}, \quad (6)$$

где f_k, y_k — соответственно экспериментальные и расчетные данные показателя ХЛ (см. (5)).

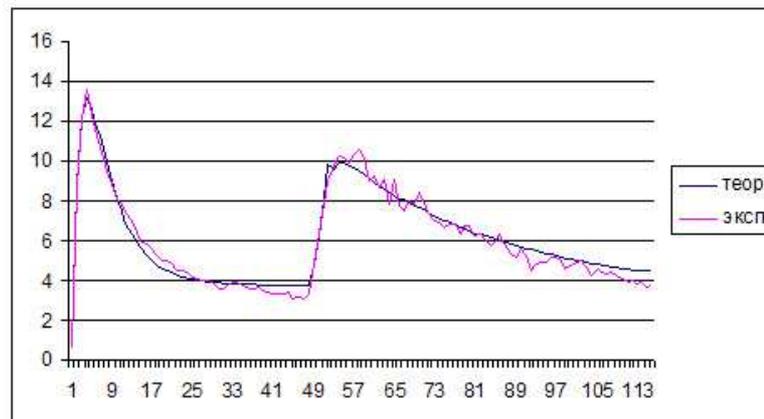


Рис. 1

Вычисления проводились с использованием пакета программ MathCad.

Зависимость экспериментальных и теоретических данных представляется в виде графиков отдельно для каждого человека с учетом контроля (первоначальное состояние обследуемого) и доз введения интерферона.

3. Графические материалы

Результаты математической обработки массива клинических данных указанным методом иллюстрируются на базе данных для одного из всех обследуемых. На первом графике представлена теоретическая и клиническая зависимость при контрольном эксперименте (рис. 1).

Контроль

Теоретическая кривая показателя ХЛ на первом этапе имеет вид (согласно (1)):

$$1\text{-й этап: } y(t) = -26,97e^{-0,011t} + 23,83e^{-0,003t} + 3,75.$$

Стандартное отклонение (6): $\xi = 0,36$.

2-й этап:

$$y(t) = e^{-0,01t}(1,98 \cos(0,043t) + 1,16 \sin(0,043t)) - 8,63e^{-0,01t} + 8e^{-0,0005t} + 3,44,$$

$$\xi = 0,48.$$

Следующие три графика характеризуют динамику показателя ХЛ в результате введения трех доз интерферона (рис. 2, 3, 4).

Доза 20

1-й этап:

$$y(t) = e^{-0,011t}(-6,11 \cos(0,016t) - 6,41 \sin(0,016t)) + 11,17e^{-0,003t} + 1,8,$$

$$\xi = 0,16.$$

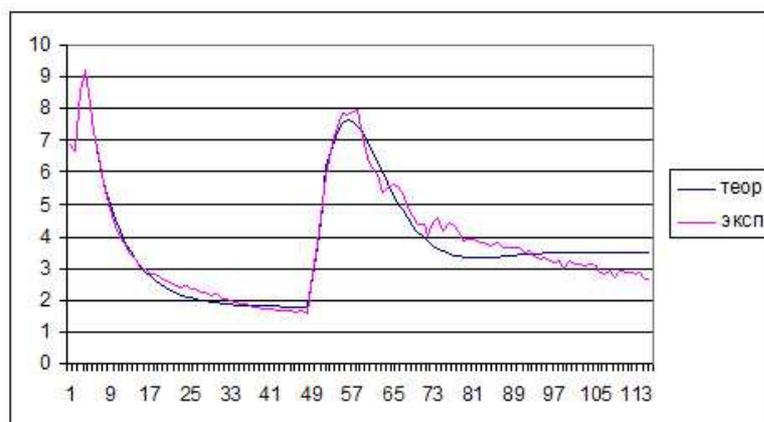


Рис. 2

2-й этап:

$$y(t) = e^{-0,011t}(0,72 \cos(0,04t) + 0,34 \sin(0,04t)) + e^{-0,002t}(-1,51 \cos(0,002t) + 14,38 \sin(0,002t)) + 3,49,$$

$$\xi = 0,48.$$

Доза 40

1-й этап:

$$y(t) = e^{-0,012t}(-6,81 \cos(0,014t) - 5,62 \sin(0,014t)) + 9,186e^{-0,004t} + 2,85,$$

$$\xi = 0,16.$$

2-й этап:

$$y(t) = e^{-0,016t} (3,89 \cos(0,04t) + 3,41 \sin(0,04t)) - 11,23e^{-0,011t} + 7,35e^{-0,0006t} + 3,8,$$

$$\xi = 0,45.$$

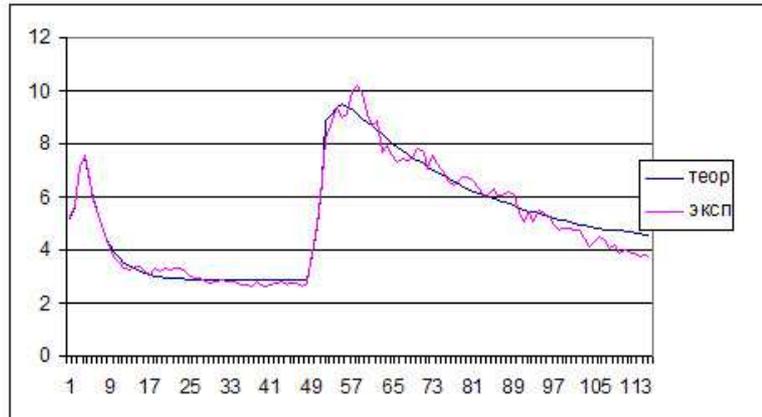


Рис. 3

Доза 100

1-й этап:

$$y(t) = e^{-0,005t} (1,37 \cos(0,0015t) + 47,47 \sin(0,0015t)) + 3,22,$$

$$\xi = 0,2.$$

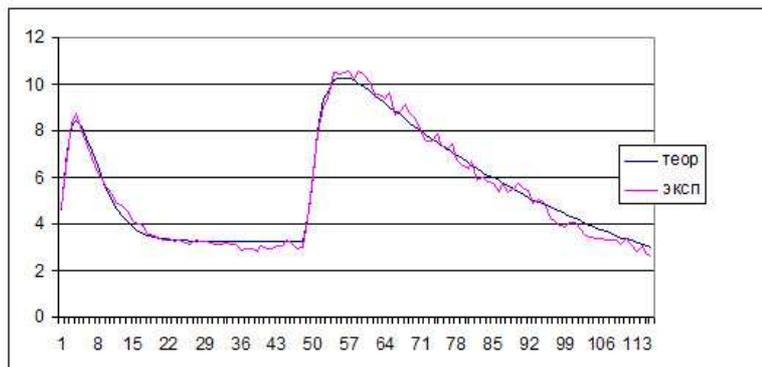


Рис. 4

2-й этап:

$$y(t) = e^{-0,007t} (0,84 \cos(0,042t) + 0,16 \sin(0,042t)) - 8,61e^{-0,007t} + 13,53e^{-0,0003t} - 1,22,$$

$$\xi = 0,32.$$

Сводный график, объединяющий четыре предыдущих, изображен на рис.5.

Отношение площади индуцированной (S_2) к площади спонтанной (S_1) под ХЛ кривой (диапазон данных первого и второго этапов) сведены в табл.1.

Индекс активации S_2/S_1 возрастает с увеличением дозы введения интерферона.

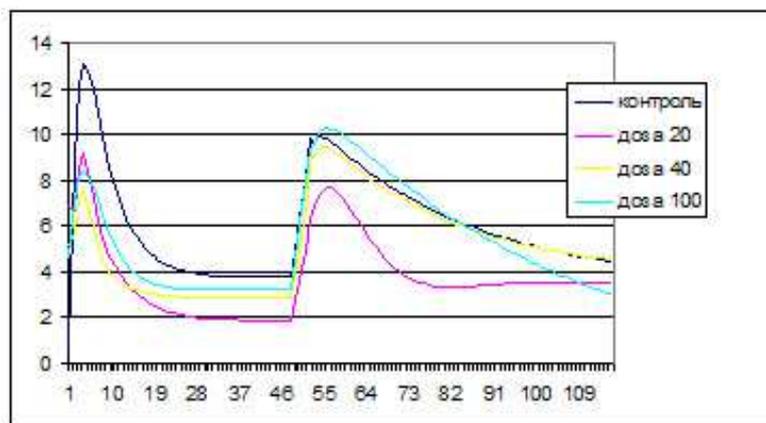


Рис. 5

Вывод

Вычислительное моделирование показателя хемилюминесценции допускает представление с помощью квазиполиномов вида (1) с малым стандартным отклонением, в отличие от аппроксимации с помощью кривых тренда, используемых в математической статистике. Расчеты выявили, что алгоритм упомянутой модификации Прони можно успешно применять при вычислительном моделировании показателя хемилюминесценции.

Таблица 1

	S_1	S_2	S_2/S_1
контроль	85,09165	211,75516	2,49
доза 20	63,73577	51,82452	0,81
доза 40	30,06139	175,12608	5,82
доза 100	44,20288	512,86249	11,6

Работа выполнена при поддержке грантов СФУ по НМ №45.2007 и №54.2007.

Список литературы

- [1] Ю.С.Винник, О.В.Теплякова, С.В.Якимов, А.А.Савченко, О.С.Мешкова, Значение метода индуцированной хемилюминесценции в диагностике инфицированного панкреонекроза, *Сибирское медицинское обозрение*, (2007), №1, 17-19.
- [2] А.Н.Маянский, Д.Н.Маянский, Очерки о нейтрофиле и макрофаге, Новосибирск, Наука, 1989, 344 с.
- [3] Р.М.Хаитов, Б.В.Пинегин, Оценка основных этапов фагоцитарного процесса: современные подходы и перспективы развития исследований, *Патол. физиол. и эксперим. терапия*, (1995), №3, 3-10.

- [4] Ю.С.Винник, А.А.Савченко, О.В.Перьянова, О.В.Теплякова, С.В.Якимов, Е.Ю.Теплякова, О.С.Мешкова. Клинические аспекты применения хемилюминесцентного анализа, *Сибирское медицинское обозрение*, (2006), №3, 3-6.
- [5] P.C.Braga, M.Dal Sasso, M.Culici, Budesonide reduces superoxide and peroxynitrite anion chemiluminescence during human neutrophil bursts, *Pharmacology*, **75**(2005), no. 4, 179-186.
- [6] M.Dal Sasso, M.Culici, E.E.Guffanti, A combination of budesonide and the SH-metabolite I of erdosteine acts synergistically in reducing chemiluminescence during human neutrophil respiratory burst, *Pharmacology*, **74**(2005), no. 3, 127-134.
- [7] P.De Sole, S.Lippa, G.P.Littarru, J.Clin Whole blood chemiluminescence: new technical method to value oxygen-dependent microbial activity granulocytes *Laboratory Autom*, **3**(1983), 391-400.
- [8] Л.С.Маергойз, Асимптотические характеристики целых функций и их приложения в математике и биофизике, Новосибирск, Наука, 1991, 272 с.

A Computing Modelling of the Chemiluminescence Dynamics for Neutrophil Granulocytes

Natalia Yu.Dmitrieva
Denis V.Elizarov
Lev S.Maergoiz
Andrey A.Savchenko

Using Prony's method, we create a mathematical model of the chemiluminescence dynamics for neutrophil granulocytes.

Keywords: Prony's method, chemiluminescence, neutrophil granulocytes, computing modelling.