

На правах рукописи

Каретин
Юрий Александрович

Фрактальные свойства клеток и клеточных ансамблей

*03.00.25 – гистология, цитология,
клеточная биология*

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук



Владивосток, 2006

**Работа выполнена на кафедре клеточной биологии Дальневосточного
государственного университета**

Научный руководитель:

Доктор биологических наук, профессор

Исаева Валерия Васильевна

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук, старший научный сотрудник

Долматов Игорь Юрьевич

Доктор медицинских наук

Калиниченко Сергей Георгиевич

Ведущая организация:

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Защита состоится “ 24 “ мая 2006 года в 10 часов на заседании
диссертационного совета Д 005.008.01 при Институте биологии моря им. А.В.
Жирмунского ДВО РАН по адресу: 690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биологии моря им.
А.В. Жирмунского ДВО РАН по адресу: 690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17.

Автореферат разослан « 17 » апреля 2006 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Ващенко

М.А. Ващенко

Актуальность проблемы

Фрактальная геометрия всё чаще применяется для описания и анализа биологических объектов всех уровней организации, от молекулярного до экологического. Показано, что многие биологические структуры и процессы обладают свойствами фракталоподобных объектов и характеризуются фрактальной размерностью и масштабной инвариантностью, или самоподобием. Дизайн заполняющих пространство фрактальных биологических структур оптимален для выполнения функций распределения потока внешней среды в организме животного (Mandelbrot, 1983; 1990; Weibel, 1991, 1994; Goldberger, 1997; Исаева и др., 2004; Исаева, 2005). Биологические структуры геометрически сложной организации (например, клетки и их комплексы), уровень сложности и неоднородности которых не поддаётся точному описанию в рамках традиционной морфометрии, могут быть количественным образом охарактеризованы комплексом методов фрактального формализма, включающих подсчёт фрактальной размерности, или размерности Хаусдорфа-Безиковича, размерности Колмогорова (box-counting размерность), информационной размерности, оценку пространственной неоднородности, лакуарности объекта, его мультифрактального спектра и т.д. Методы нелинейной морфометрии в комплексе с традиционными морфометрическими признаками могут существенно уточнить и расширить методологию описания и классификации цитологических объектов, придать морфологическому описанию более фундаментальный биологический смысл ввиду глубокой связи нелинейных характеристик с биологической, онтогенетической, филогенетической и функциональной сложностью объекта.

Цель работы

Исследование приложимости фрактального формализма для описания морфологии некоторых типов клеток и клеточных ансамблей, процессов самоорганизации клеточных ансамблей *in vitro*, поиск взаимосвязи нелинейных морфологических параметров с традиционными морфометрическими признаками и биологическими свойствами изученных объектов.

Задачи работы

- Описание морфологической организации мезенхимных клеток и клеточных ансамблей морских беспозвоночных, а также спиккулогенеза

культивируемых эмбриональных клеток морского ежа с использованием фрактального формализма;

- Исследование изменения фрактальной размерности клеток в процессе развития и дифференцировки в культуре;
- Исследование фрактальной самоорганизации *in vitro* мезенхимных клеток морских беспозвоночных;
- Описание и классификация ряда типов нейронов позвоночных с использованием комплексной морфометрии, включающей в себя как традиционные морфометрические методы, так и нелинейные методы количественного анализа морфологии объекта;
- Проведение статистического анализа корреляций линейных и нелинейных морфологических признаков нейронов с изучением изменения этих признаков в онтогенезе;
- Исследование применимости методов фрактального формализма как для классификации нейронов, так и для описания уже известных клеточных типов.

Научная новизна работы

Несмотря на вышеописанные преимущества использования фрактального формализма для анализа морфологии нейронов позвоночных, число работ соответствующего профиля невелико, что объясняется относительной “молодостью” этого подхода и недостаточностью знакомства с ним научного сообщества (Falconer, 1990; Jelinek, Fernandez, 1998). Работ, посвященных комплексной морфологической характеристике и/или классификации нейронов рыб и амфибий с использованием фрактального формализма, включающего факторный, корреляционный и кластерный анализ, насколько нам известно, нет. Впервые проведено также сравнительное описание фрактальных свойств ряда дифференцированных и эмбриональных типов клеток морских беспозвоночных. Предложены компьютерные модели, имитирующие паттерны агрегации клеток *in vitro*.

Теоретическое и практическое значение работы

Использованные нами методы фрактального формализма позволили точным количественным образом описать морфологию плохо формализуемых с

применением классической геометрии биологических объектов: дифференцированных (гемоциты и целоциты, нейроны) и эмбриональных клеток и их клеточных ансамблей. Это существенно как для самого морфологического описания, так и для выяснения динамики процессов дифференцировки клеток и надклеточных структур, а также их классификации. Компьютерное имитационное моделирование агрегации клеток при помощи моделей построения самоорганизующихся фрактальных кластеров доказывает присутствие в описываемой системе детерминированного хаоса и позволяет достоверно характеризовать данные объекты как фрактальные кластеры.

С использованием комплексной морфометрии, включающей как традиционные морфометрические, так и нелинейные методы количественного анализа морфологии объекта, охарактеризованы, описаны и классифицированы некоторые типы нейронов позвоночных. Это показывает применимость нелинейных морфометрических характеристик для описания таких аспектов морфологии нейронов, которые плохо формализуемы при помощи линейных параметров (например, неоднородность заполнения пространства отростками). Проведён статистический анализ корреляций линейных и нелинейных признаков, прослежено изменение этих признаков в онтогенезе, что позволяет обсуждать связь нелинейных признаков с онтогенетическими, филогенетическими, функциональными свойствами исследованных нейронов, что в дальнейшем поможет перейти к обратной задаче исследования: предсказанию биологических свойств объекта на основе нелинейного анализа его морфологии.

Апробация работы

Основные положения и результаты диссертационной работы были представлены на международной конференции по клеточной биологии в Петербурге (Каретин и др., 2001), региональной естественнонаучной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых ДВГУ во Владивостоке (Каретин, Исаева, 2002), региональных конференциях по актуальным проблемам морской биологии и экологии студентов, аспирантов и молодых ученых ДВГУ (Владивосток, 1999, 2002-2005), международной нематологической конференции во Владивостоке (Karetin, 2003), ежегодных научных конференциях Института биологии моря (Владивосток, 2002-2005).

Публикации

По результатам исследований опубликовано 7 научных работ.

Структура и объём диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, их обсуждения, выводов, списка литературы (254 источника, из них 210 на иностранных языках) и приложения. Работа изложена на 188 страницах, содержит 12 таблиц, 80 рисунков.

Материалы и методы

Первичные клеточные культуры гемоцитов и эпителиальных тканей беспозвоночных

В работе использовались иглокожие шести видов: морские звезды *Patiria pectinifera*, *Asterias amurensis*, *Evasterias retifera*, *Distolasterias nipon*, трепанг *Apostichopus japonicus*, морской ёж *Strongylocentrotus nudus* и двустворчатые моллюски трёх видов: *Mizuhopecten yessoensis*, *Mytilus trossulus*, *Crassostrea gigas*. Животные были собраны в заливе Восток Японского моря.

Первичные клеточные культуры из эмбриональных клеток морского ежа *Strongylocentrotus nudus* и эпителия гонады и водных легких трепанга *Apostichopus japonicus* получали диссоциацией эмбрионов в 0.25 % растворе коллагеназы на CMFSS и многократного пипетирования в этом растворе для механической диссоциации на отдельные клетки.

Первичную клеточную культуру гемоцитов моллюсков и целоцитов иглокожих шприцем переносили в пластиковые чашки Петри и культивировали в гомологичной сыворотке до 12 часов. Культуру гемоцитов приморского гребешка фиксировали парами 4%-ного формалина в течение 20 минут. Фиксированные препараты гемоцитов или целоцитов беспозвоночных окрашивали гематоксилином.

Имитационные модели агрегации клеток создавали на основе программ: DLA Java applet (Анна Уманская) и клеточного автомата «Жизнь» (Johan G. Bontes, 1998).

Нейрональный материал

В работе использовали выборки нейронов мозга (вентральной колонны спинного мозга, ядра тройничного нерва, медиальной ретикулярной формации, верхнего ядра шва, дорсальных рогов спинного мозга) костистых рыб опистоцентра безногого *Pholidapus dybowskii*, тихоокеанской кеты *Oncorhynchus keta*, симы *Oncorhynchus masou*, а также ганглиозных клеток сетчатки (ГКС) опистоцентра *Pholidapus dybowskii* и саламандры *Notophthalmus viridescens*.

Для оценки общих закономерностей распределения ГКС клетки окрашивали путём прижизненного ретроградного мечения тетраметилпроламином из зрительного нерва. Для детального изучения морфологии и параметризации ГКС окрашивали методом прижизненного ретроградного мечения пероксидазой хрена из зрительного нерва с последующим проявлением метки (Adams, 1977).

Фиксацию нейронов головного и спинного мозга проводили в 4%-ном растворе параформальдегида в течение недели. Для выявления нейронов применяли классический быстрый хромо-серебряный метод Гольджи. Материал заливали в парафин, резали на ротационном микротоме в трансверсальной плоскости, далее обрабатывали по стандартной методике.

Результаты

Первичные культуры гемоцитов и целоцитов морских беспозвоночных

В первичной однослойной культуре изучено образование пространственных паттернов клетками нескольких видов иглокожих: морских звезд *Patiria pectinifera*, *Asterias amurensis*, *Evasterias retifera*, *Distolasterias nipon*, трепанга *Apostichopus japonicus*, морского ежа *Strongylocentrotus nudus* и двустворчатых моллюсков: *Mizuhopecten yessoensis*, *Mytilus trossulus*, *Crassostrea gigas*.

Наиболее подробно изучена динамика агрегации и морфогенеза *in vitro* гемоцитов приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis*. При исследовании морфогенеза в среде гомологичной гемолимфы выявлено несколько стадий, регулируемых различными механизмами:

1. Рост конгломератов в суспензии. В организме здорового неповрежденного животного гемоциты находятся в виде суспензии отдельных, не связанных друг с другом, клеток; межклеточная адгезия между гемоцитами гребешка столь сильна,

что агрегация гемоцитов начинается непосредственно при вскрытии гребешка и взятии гемолимфы.

2. Прикрепление и рост агрегатов на дне. После перенесения гемолимфы в чашку Петри одновременно с продолжающейся агрегацией происходит осаждение агрегатов, и через 3-5 минут (с начала вскрытия животного) наблюдаются лежащие на дне чашки уплощенные рыхлые агрегаты различного размера и разнообразной причудливой конфигурации. На дне конгломераты продолжают увеличиваться и объединяться за счёт оседания клеток из суспензии. Осевшие на дно клетки распластываются, мигрируя и объединяясь в новые мелкие конгломераты или присоединяясь к уже существующим.

3. Сокращение. Через некоторое время присоединение новых клеток к конгломерату заканчивается. Становится заметным сокращение конгломерата. Происходит отрыв ветвей крупных агрегатов от субстрата, их втягивание и осферивание всей структуры. Вокруг агрегатов сохраняется ореол их прежних очертаний, маркируемый одиночными клетками, оставшимися прикрепленными ко дну после сокращения агрегата.

4. На последней стадии всё дно чашки Петри хаотично усеяно шарообразными конгломератами разного размера, прикрепленными филоподиями клеток нижней поверхности конгломератов. В агрегатах происходят процессы синтеза материала внеклеточного матрикса и формирование концентрических клеточных слоёв. Множество одиночных клеток распластано по дну. Через сутки начинается дегградация конгломератов.

Подобные разветвлённые конгломераты образуются при эксплантации в культуру различных типов клеток, принадлежащих разным видам морских беспозвоночных, в частности, гемоцитов перечисленных двустворчатых моллюсков и клеток диссоциированных эмбрионов морского ежа *Strongylocentrotus nudus*. Причина этого сходства в единстве процессов образования агрегатов, включающих в себя два простых явления: хаотичное перемещение клеток, пассивное в суспензии или активное движение на субстрате, и их адгезия, слипание. Вариации интенсивности какого-либо из этих процессов и наложение влияния других, более частных факторов, даёт в результате спектр форм тех

принципиально сходных конгломератов, которые мы наблюдали у морских беспозвоночных.

Формирование конгломератов клеток проходит через стадию хаотической самоорганизации. Множество хаотически движущихся клеток, обладающих сходными параметрами и свойствами (размеры, форма, степень адгезивности клеток), хаотически структурируются с образованием неправильной формы кластеров. Эта стадия агрегации подчиняется стохастическим законам фракталообразования. Впоследствии система приобретает новый уровень структурированности, базирующийся на генетической программе поведения клеток и включающей как реакции взаимодействия клетка-клетка и клетка-субстрат. Происходит изменение фрактальной размерности: либо её падение и исчезновение, что говорит о переходе системы на более дифференцированную стадию, описываемую линейными законами, либо изменение фрактальной картины, если фрактальность свойственна данной тканевой системе.

Найдены типичные значения фрактальной размерности, оцененные методом box counting (Df BC) для ранних стадий агрегации клеток в однослойной культуре: Df BC = 1,8; для культуры клеток мезенхимного типа Df BC в среднем варьирует в пределах 1,70-1,75. После образования бластул в культуре клеток диссоциированных эмбрионов морского ежа размерность образующихся бластул с ореолом прилежащих клеток принимает значение, характерное для эпителиальных клеток, образующих обособленные конгломераты в однослойной культуре: Df BC бластул морского ежа 1,79-1,80; эпителия гонады трепанга *Apostichopus japonicus* DF BC = 1,80; эпителия водных легких трепанга DF BC = 1,80-1,81.

От топологии клеток зависит структура внеклеточного матрикса, организация надклеточных структур всех уровней, от тканевого до организменного. Один из интересных примеров зависимости морфогенетических процессов от пространственной организации клеток, измеряемой нами всё тем же подсчётом фрактальной размерности - это изменение формы личиночных спикул морского ежа *Strongylocentrotus* при разрушении цитоскелета спикулогенных клеток.

При обработке спикулогенных клеток цитохалазином, разрушающим систему актиновых филаментов, наблюдалось округление клеток, потеря ими естественной формы, при этом нарушался процесс спикулогенеза: появлялись абберантные

спикулы неправильного разветвлённого строения, фрактальность которых несколько возрастает. Фрактализация спикул свидетельствует о частичной хаотизации процесса спикулообразования. В данном случае определение значения фрактальной размерности даёт количественную характеристику сложности пространственной организации клеток и их ансамблей в динамике процесса морфогенеза, а также позволяет оценить изменение морфологии спикул под действием цитоскелетного ингибитора.

Моделирование агрегации

Была построена компьютерная имитация хаотических фрактальных кластеров гемоцитов на базе модели агрегации, ограниченной диффузией (diffusion limited aggregation, DLA). Эта модель имитирует процессы взаимодействия биологических клеток и воспроизводит формирование конгломератов хаотично перемещающимися клетками. Варьируя вероятность слипания соприкасающихся клеток, можно получить различные формы - от весьма компактных, практически дисковидных, до крайне разветвлённых, напоминающих по своей морфологии нейроны. Модель очень условна, так как процессы ретракции и осферивания конгломерата гемоцитов заменены меньшей вероятностью слипания, однако морфологически картины генерируемых кластеров весьма напоминают природные (рис. 1).



Рис. 1. Примеры имитации морфологии клеточных агрегатов моделью DLA

Но подобные структуры могут быть получены и на основе других программ построения фрактальных кластеров; хотя они не моделируют сам процесс формирования, результат может имитировать морфологию реального

биологического кластера. Варьируя правила «рождения», «выживания» и «смерти» клеток клеточного автомата, можно создавать скопления агрегатов, в разной степени заполняющие двумерное пространство, примеры таких скоплений приведены на рисунках 2 - 4.

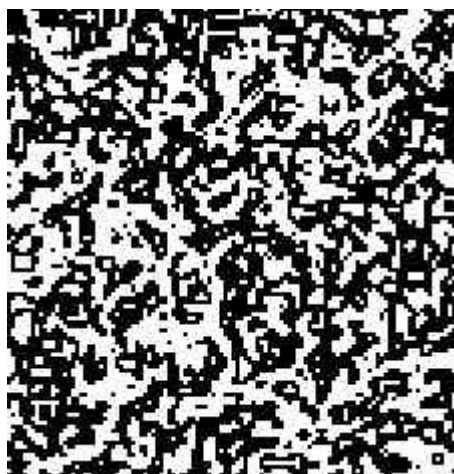


Рис. 2. Рождаются клетки 1 - 8, сохраняются 3 - 6

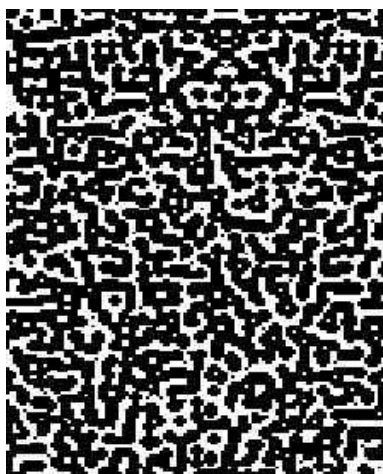


Рис. 3. Рождаются клетки 1 - 8, сохраняются 0 - 4



Рис. 4. Рождаются клетки 2, 3, 8, сохраняются 0, 1, 5 - 8

На рис. 5 представлен пример псевдохаотических паттернов, генерируемых с использованием правил классического семейства клеточных автоматов «Life». Здесь, как и в экспериментальной системе агрегирующих гемцитов, наблюдается переход от хаоса к порядку, фазовый переход состояния клеточной системы с возникновением новой «фазы» (конгломерата) в первоначально гомогенной среде (диффузно разбросанные одиночные клетки), иначе говоря, обобщенная катастрофа.

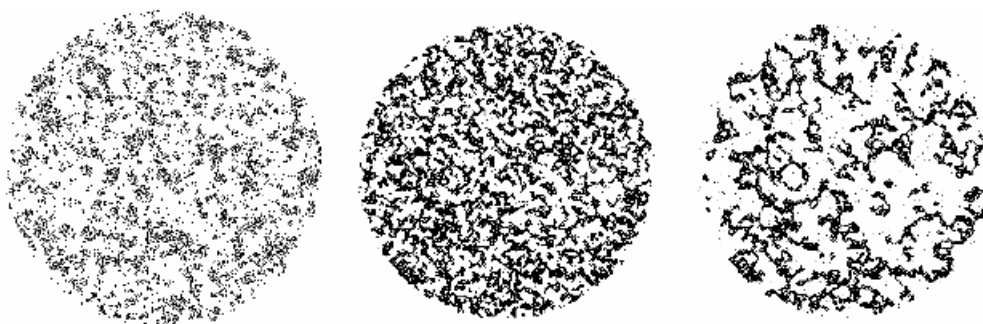


Рис. 5. Имитационное моделирование агрегации клеток клеточным автоматом: динамика преобразования паттерна

Нейроны головного и спинного мозга рыб

К наиболее важным морфологическим особенностям нервных клеток, которые могут быть эффективно охарактеризованы с использованием языка классической (Евклидовой) геометрии, относятся размер и форма перикариона и дендритного поля клетки, стратификация ветвления дендритов и другие (Школьник-Яррос, Калинина, 1986; Butler, Hodos, 1996). В то же время ряд морфологических особенностей нейронов, включающий сложность пространственной организации и степень неоднородности дендритного ветвления, плохо поддаётся адекватному описанию традиционными способами, что связано с большим объемом обчислений, громоздкой статистической обработкой и, в конечном счете, малоэффективно (Morigiwa, 1989; Wingate, Thompson, 1995; Kenkel, Walker, 1996; Moraes et al., 2000). Указанные особенности, однако, могут быть эффективно охарактеризованы при помощи фрактального формализма (Smith et al., 1996; Jelinek, Spence, 1997; Jelinek, Fernandez, 1998; Ristanovic et al., 2002).

Нейроны были использованы нами для более глубокого приложения методик нелинейного анализа по нескольким причинам: во-первых, ввиду разработанности традиционной методики количественного морфологического описания этих типов клеток, что даёт возможность выявить связи между нелинейными и линейными характеристиками объекта, понять биологический смысл первых и их зависимость от последних. Во - вторых, нейроны - элементы нейронной сети, развитие которых в значительной степени определяется процессами самоорганизации; сложная морфология нейронов, отражающая функциональную специализацию и морфогенетические влияния в процессе роста и дифференцировки нейрона, детерминированная в целом и вероятностная в частностях картина дендрогенеза делают нейроны с практической точки зрения лучшим и теоретически наиболее адекватным объектом для приложения методик нелинейного анализа морфологии в целом и фрактального формализма в частности.

Корреляция фрактальной размерности с линейными морфометрическими показателями нейронов. Изменение фрактальной размерности нейронов в онтогенезе

Для исследования были взяты выборки нейронов 5 отделов головного и спинного мозга тихоокеанской кеты *Oncorhynchus keta* и симы *Oncorhynchus masou*: вентральной колонны спинного мозга, ядра тройничного нерва, медиальной ретикулярной формации, верхнего ядра шва, дорсальных рогов спинного мозга. Исследовались однолетние (1-ая группа) и двухлетние (2-ая группа) особи.

Вентральная колонна спинного мозга. У годовалых рыб (первая группа) Df BC и информационная размерность (ИР) скелетонизированных и контурных изображений отрицательно коррелирует с площадью дендритного поля, положительно - с числом точек ветвления и числом конечных отростков; эти корреляции менее выражены во второй группе. С другой стороны, у двухлетних рыб (вторая группа) наблюдается описанная выше корреляция между площадью клетки и Df BC и ИР, в первой же группе она отсутствует. Это можно объяснить увеличением вклада площади клетки во фрактальную размерность и относительным уменьшением вклада сложности паттерна ветвления.

Ядро тройничного нерва. Площадь дендритного поля во второй группе коррелирует с целым рядом параметров: Df BC контурных клеток, общей длиной отростков, длиной конечных отростков, площадью клетки. В первой группе этот параметр не имеет ни одной корреляции. Возможно, это связано с уменьшением вариабельности данного параметра в процессе дифференцировки.

Дорсальные рога спинного мозга. В этом типе нейронов достоверно выражено наибольшее число корреляций в сравнении с другими типами, особенно в первой группе. Df BC и ИР контурных изображений клеток достоверно коррелирует в той или иной степени практически со всеми морфометрическими показателями, кроме площади дендритного поля, в первой группе и почти ни с чем не коррелирует во второй. Общая длина дендритов в первой группе имеет предельно высокие показатели корреляции с длиной конечных дендритов, числом точек ветвления, числом конечных дендритов, площадью клетки и в меньшей мере - с площадью дендритного поля. Во второй же группе общая длина дендритов совсем не коррелирует с числом точек ветвления и числом конечных ветвей, корреляции с прочими признаками сохраняются, как и в первой группе. Число точек ветвления также перестаёт коррелировать во второй группе с Df BC и ИР силуэтных и контурных изображений нейронов.

Медиальная ретикулярная формация. Df BC и ИР контурных проекций клеток в первой группе положительно коррелирует со всеми линейными морфометрическими параметрами, во второй группе высока корреляция только с числом концевых отростков. Df BC и ИР силуэтных изображений коррелирует с таковыми для контурных изображений, а также с площадью клетки в первой группе, во второй группе Df BC и ИР силуэтных изображений вообще не коррелированы с другими показателями. В первой группе площадь дендритного поля также положительно коррелирует со всеми морфометрическими параметрами, кроме Df BC и ИР силуэтных изображений, во второй же группе не наблюдается ни одной корреляции площади дендритного поля с другими показателями.

Верхнее ядро шва. В этом классе нейронов наблюдается картина, противоположная описанной в предыдущем классе: первая группа не имеет ни одной достоверной корреляции Df BC и ИР силуэтных изображений с другими морфометрическими признаками, во второй же группе положительные корреляции многочисленны. Площадь дендритного поля во второй группе положительно коррелирует с общей длиной дендритов, числом конечных отростков и площадью клетки; в первой группе этот показатель не коррелирован с другими. Во второй группе общая длина дендритов положительно высоко коррелирована также со всеми другими морфологическими признаками, в первой же группе она достоверно не коррелирует ни с одним признаком, кроме площади клетки.

Таким образом, адекватность применения использованных показателей для характеристики пространственной организации нейронов подтверждается большим числом достоверных корреляционных связей численных значений этих показателей. При этом наиболее выражена положительная корреляция значений фрактальной размерности с площадью нейронов, числом конечных ветвей, точек ветвления и длиной отростков, а также отрицательная корреляция со значением лакунарности.

Наши данные подтверждают заключение Смита и Ланге (Smith, Lange, 1996) о корреляции относительно низких значений фрактальной размерности с узкой специализацией клетки, а высокой фрактальной размерности, наоборот, с меньшей функциональной специализацией нейронов, что можно заметить при сравнении сходных типов клеток у животных разного филогенетического уровня. С другой

стороны, в процессе роста нейронов вместе с увеличением значений большинства линейных морфометрических параметров увеличиваются и значения фрактальных размерностей во всех группах, кроме дорзальных рогов спинного мозга. В последнем случае при увеличении общей площади дендритного поля и площади клетки снижается число точек ветвления и уменьшается фрактальная размерность, что можно объяснить первичной избыточностью ветвления онтогенетически недифференцированного нейрона.

Крупные ганглиозные клетки сетчатки

Корреляция фрактальной размерности с линейными морфометрическими показателями крупных ганглиозных клеток сетчатки (КГКС) опистоцентра *Pholidapus dybowskii*

Были исследованы 3 типа ганглиозных клеток сетчатки опистоцентра: альфа а, альфа аб и биплексиформные клетки.

Оценки Df BC КГКС опистоцентра варьировали от 1.19 до 1.31. Df BC клеток типа альфа аб (1.27) достоверно отличалась от таковых клеток типа альфа а и биплексиформных клеток, составлявших соответственно 1.23 и 1.24. Последние же значения между собой достоверно не различались.

Оценки ИР варьировали от 1.22 до 1.37. ИР клеток типа альфа аб (1.31) достоверно отличалась от таковых клеток типа альфа а и биплексиформных клеток, составлявших 1.25 и 1.28, соответственно. Последние между собой достоверно не различались.

Оценки лакуарности варьировали от 0.49 до 0.56, составляя в среднем 0.52 ± 0.006 (биплексиформные клетки), 0.526 ± 0.004 (альфа а) и 0.520 ± 0.005 (альфа аб). Достоверных различий лакуарности между разными клеточными типами обнаружено не было.

Анализ линейных корреляций выявил существенные межтиповые различия силы и достоверности линейных связей между переменными: в случае альфа а и биплексиформных клеток линейные корреляции между переменными в целом и между фрактальными мерами и прочими параметрами дендритной организации, в частности, были значительно слабее и менее достоверны, нежели в случае альфа аб клеток. В случае всех трех типов Df BC и ИР были высоко коррелированы между собой и не коррелировали существенно с Л. В случае биплексиформных клеток

лакунарность (Л) не была существенно коррелирована ни с одной из переменных. В случае альфа а клеток Л была достоверно связана с числом дендритов первого порядка (ЧДПП), а в случае альфа аб — обнаруживала достоверные связи средней силы с общей длиной дендритов (ОДД), площадью дендритного поля (ПДП) и коэффициентом изрезанности клеточной границы (КИГ).

Факторный анализ выявил существенные различия между альфа аб клетками, с одной стороны, и альфа а и биплексиформными клетками, с другой, по степени консолидированности объясненной дисперсии. Так, в случае альфа аб клеток два первых фактора в совокупности объясняли 75.44% полной дисперсии, тогда как в случае альфа а и биплексиформных клеток — лишь 63.53 и 52.52% соответственно. Во всех клеточных типах Df BC обнаруживала высокую ассоциацию с ИР (существенные нагрузки обеих мер всегда приходились на один и тот же фактор), в то время как Л не обнаруживала сильных связей с ИР и Df BC. В случае биплексиформных клеток фактор, существенно нагруженный Df BC и ИР, был умеренно связан с ПДП. Фактор, существенно нагруженный Л, не был связан с другими переменными. В случае альфа а клеток фактор, существенно нагруженный ИР и Df BC, был умеренно ассоциирован с числом точек ветвления дендритов (ЧТВ), ОДД и длина терминальных дендритов (ДТД)/ОДД и сильно связан с коэффициентом изрезанности клеточной границы (КИГ); Л существенно нагружала фактор, имеющий сильную ассоциацию с ЧДПП. В случае альфа аб клеток фактор, существенно нагруженный ИР и Df BC, был также существенно нагружен ОДД, ДТД/ОДД, ПДП, ЧТВ, но слабо ассоциирован с КИГ; Л существенно нагружала фактор, имеющий существенные нагрузки ОДД, ПДД, ЧПДД и КИГ.

***Классификация ганглиозных клеток сетчатки саламандры
Notophthalmus viridescens с использованием нелинейных
морфометрических параметров***

Учитывая характер, силу и достоверность корреляций изученных параметров, из 16 исходных параметров в качестве оснований классификации было отобрано пять: ОДД, ЧТВ, площадь тела клетки (ПТ), ПДП, и фрактальная размерность, оцененная методом mass-radius (Df MR).

Результат классификации по выбранным переменным показан на рисунке 6. В составе классификационной дендрограммы было выделено пять кластеров, каждый из которых предположительно представляет один из типов ГКС нотофтальмуса. Параметрический и ранговый дисперсионный анализ показал, что клетки, отнесённые к разным типам, достоверно отличаются по большинству исходных параметров; при этом любые два типа достоверно различались по трём или более переменным.

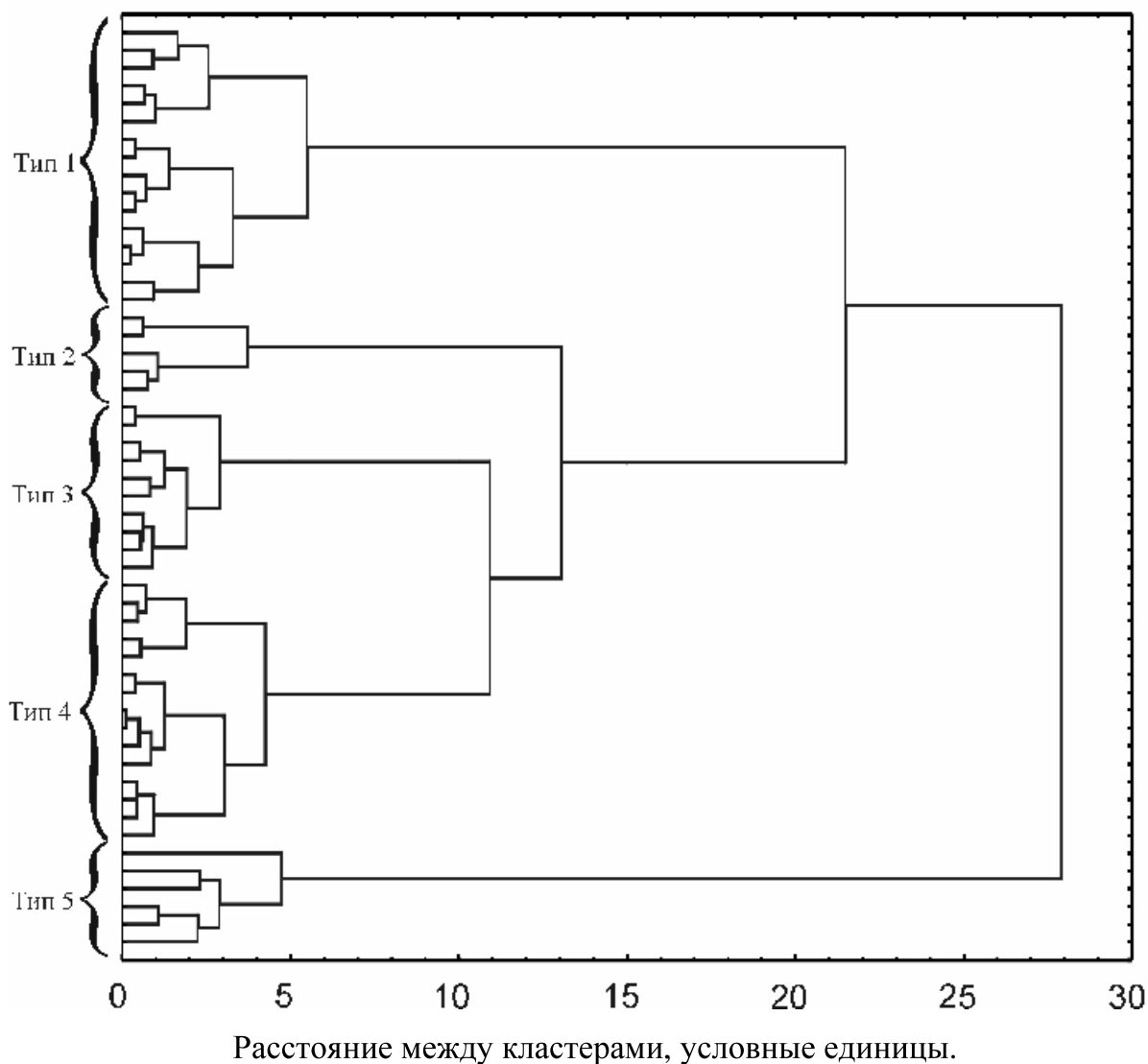


Рис. 6. Дендрограмма сходства ганглиозных клеток сетчатки саламандры *Notophthalmus viridescens*. Фигурными скобками обозначены кластеры, соответствующие выделенным клеточным типам.

Тип 1. Доля клеток первого типа составляет 31% от исследованной выборки. Дендритные поля небольшие, эллиптической или (реже) округлой формы,

асимметричные. Тела небольших и средних размеров. Общая длина дендритов невелика, превосходя таковую лишь клеток четвертого типа. Плотность ветвления дендритов, а также фрактальная размерность превосходит таковые всех других типов. По числу точек ветвления данный тип занимает среднее положение среди прочих. Число дендритов первого порядка 2-5, чаще 3. Ветвятся дендриты, как правило, в средней зоне внутреннего сетчатого слоя сетчатки (ВСС), захватывающей подслои а и б ВСС. Ветвление монослойно, двуслойно или диффузно.

Тип 2. Клетки этого типа составили 10% от исследованной выборки. Дендритные поля средних размеров, округлой формы. Характерной особенностью клеток данного типа являются крупные тела, превосходящие по размеру таковые остальных типов. Общая длина дендритов несколько превышает таковую предыдущего типа. Плотность ветвления дендритов, а также фрактальная размерность находятся в средней части общего диапазона вариации этих параметров. Число точек ветвления невелико. Число дендритов первого порядка не более трех. Как и в случае предыдущего типа, дендриты стратифицированы чаще в средней зоне ВСС, однако толщина области их стратификации превосходит таковую клеток первого типа. Ветвление диффузно или (реже) монослойно.

Тип 3. Вклад третьего типа в количественном отношении достигает 19%. Дендритные поля средних и больших размеров. Общая длина дендритов примерно соответствует таковой ГКС второго типа. Плотность ветвления дендритов уступает таковой всех остальных типов. Фрактальная размерность и число точек ветвления находятся в средней части общего диапазона вариации этих параметров. Число дендритов первого порядка от 1 до 4, чаще 2-3. Зона стратификации дендритов наиболее широка, захватывая, как правило, все три подслоя ВСС, выделяемые по Кахалю. Ветвление диффузно.

Тип 4. По числу клеток, а также размерам дендритных полей и общей длине дендритов, клетки этого типа сходны с ГКС типа 1. Плотность ветвления дендритов варьирует в пределах типа довольно широко. По фрактальной размерности ГКС четвертого типа значительно уступают клеткам первого типа и сходятся с ГКС типа 3. Число точек ветвления наименьшее среди всех типов. Число дендритов первого порядка до 4, чаще 1-2. Дендриты стратифицированы в

подслоях а и б ВСС, образуя диффузное ветвление. По ширине зоны стратификации ГКС типа 4 уступают лишь клеткам предыдущего типа.

Тип 5. Пятый тип немногочислен, как и второй, составляя 11 % от всей выборки. Дендритные поля - наибольших среди всех типов размеров; тела клеток - средних размеров. По общей длине дендритов ГКС типа 5 также превосходят все остальные типы. Плотность ветвления дендритов невелика, а фрактальная размерность не отличается существенно от таковой ГКС третьего и четвертого типов.

Предполагается, что выделенные при помощи комплекса линейных и нелинейных параметров типы ганглиозных клеток сетчатки нотофтальмуса соответствуют следующим физиологическим типам, известным по литературным данным: клетки типа 1 и 4 - клеткам ON-OFF-типа с небольшими (6-9?) рецептивными полями, лучше всего реагирующие на движение небольших тёмных стимулов; клетки типов 2 и 3 - клеткам ON-OFF-типа с большими по сравнению с предыдущим типом рецептивными полями (9-12?); клетки типа 5 - OFF- и ON-OFF подтипам клеток, реагирующими на диффузное освещение (затемнение) поля.

Моделирование нейрогенеза

Физики, специализирующиеся в области явлений и структур, описываемых моделью агрегации, ограниченной диффузией, DLA, рассматривают квазидвумерные нейроны сетчатки как фрактальный объект, количественно характеризуемый фрактальной размерностью около 1.6-1.7, морфогенез которого имитируется моделью DLA (Stanley, 1989; Caserta et al., 1990).

В качестве абстрактной имитации, не претендующей на научную точность, но скорее являющейся некой визуализацией многих процессов морфогенеза, можно рассматривать имитацию направленного роста биологической структуры, в данном случае отростков нейрона, определяемого градиентом фактора роста или морфогена, с использованием той же модели DLA (рис. 7, б). Подобные паттерны этой модели имитируют уже некое морфогенетическое поле с различным распределением «морфогена» (рис. 7, а, б, в) или взаимодействием хаотических фрактальных кластеров (рис. 7, г).

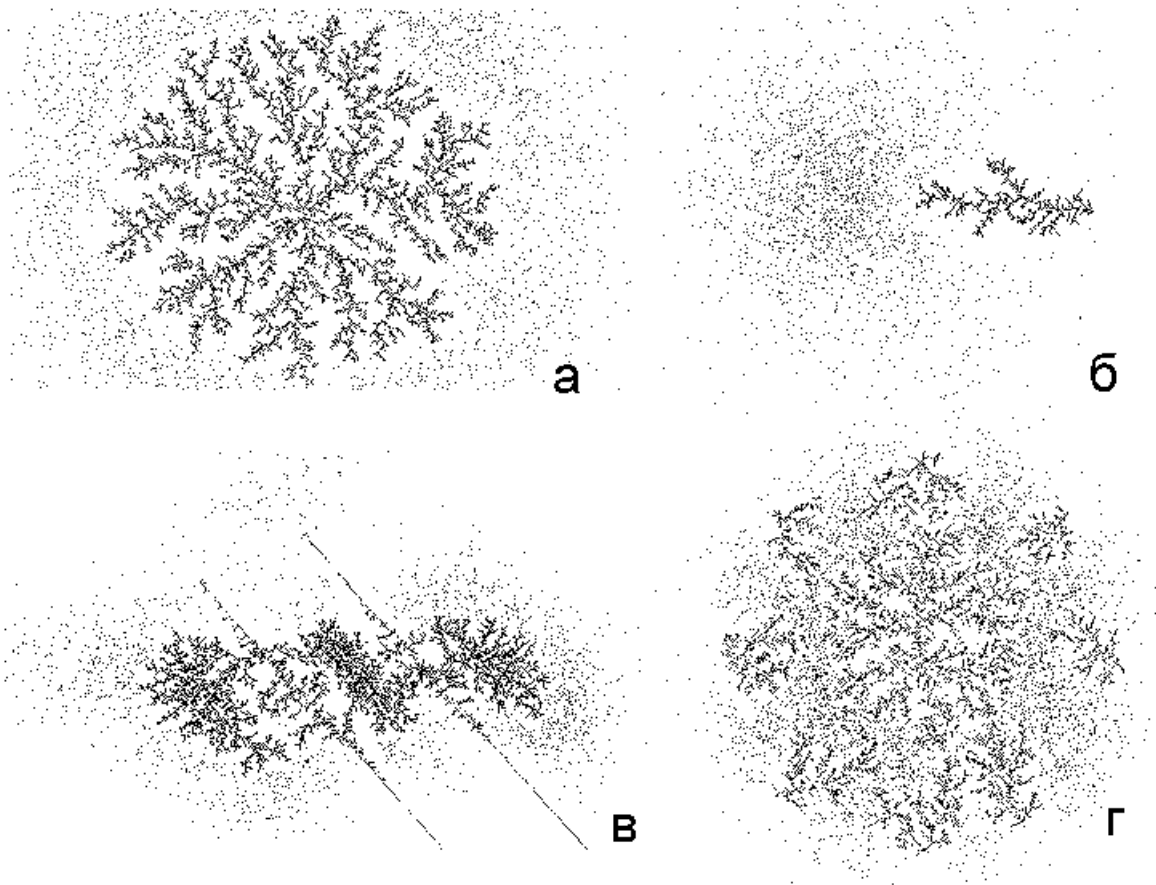


Рис. 7. Моделирование направленного роста кластеров DLA:
 а-кластер в изотропной среде; б-векторизованный рост;
 в-рост в анизотропной среде; г-взаимодействие нескольких кластеров

Выводы

1. Показано, что стадия агрегации гемоцитов двустворчатых моллюсков *Mizuhopecten yessoensis*, *Mytilus trossulus*, *Crassostrea gigas* и целоцитов иглокожих: морских звезд *Patiria pectinifera*, *Asterias amurensis*, *Evasterias retifera*, *Distolasterias nipon*, трепанга *Apostichopus japonicus*, морского ежа *Strongylocentrotus nudus*, а также клеток эпителия гонады и водных лёгких *Apostichopus japonicus* и эмбриональных клеток *Strongylocentrotus nudus in vitro* проходит как хаотическая фрактальная самоорганизация, адекватно описываемая двумя имитационными моделями: моделью агрегации, ограниченной диффузией (DLA - Diffusion limited aggregation) и клеточным автоматом «Life».

2. Значение фрактальной размерности ансамблей клеток в двумерной (однослойной) культуре зависит от концентрации клеток, условий

культивирования, сложности образуемых ими паттернов и варьирует в пределах 1.7-1.8. Выделены 4 стадии процесса агрегации и образования конгломератов гемоцитами приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis*, определяемые различными клеточными механизмами и характеризующиеся различными фрактальными размерностями.

3. Фрактальная размерность нейронов мозга костистых рыб опистоцентра безногого *Pholidapus dybowskii* и тихоокеанской кеты *Oncorhynchus keta* варьирует у разных типов нейронов в пределах значений от 1.22 до 1.72. Фрактальная размерность дифференцированных нейронов достигает наиболее высоких значений у менее специализированных, выполняющих более разнообразные функции клеток, тогда как нейроны узкой специализации характеризуются относительно низкой фрактальной размерностью.

4. В ходе онтогенеза, с первого по второй год жизни тихоокеанской кеты *Oncorhynchus keta* и симы *Oncorhynchus masou*, значения фрактальной размерности возрастают у нейронов пяти исследованных групп головного и спинного мозга. Найдена корреляция основных морфометрических значений и фрактальной размерности и их соответствие с морфологическими преобразованиями дендритного дерева исследованных нейронов в онтогенезе.

5. Система ганглиозных клеток сетчатки саламандры *Notophthalmus viridescens* включает в себя как минимум пять морфологических типов, достоверно отличающихся по большинству исходных параметров, в том числе по фрактальной размерности. Фрактальная размерность исследованных клеток достоверно коррелирует с другими морфометрическими параметрами, в частности с КИГ, ПТ.

6. Рост нейронов и ветвление их дендритов как самоорганизующиеся процессы, обладающие ограниченной детерминированностью, достаточно корректно воспроизводятся моделью DLA.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Деменок Л.Г., Исаева В.В., Каретин Ю.А. Агрегация *in vitro* гемоцитов приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis* // Биология моря. 1997. Т. 23, № 5. С. 327–329.
2. Каретин Ю.А. Исаева В.В., Деменок Л. Г. Самоорганизация гемоцитов *in vitro*: конкуренция межклеточной адгезии и прикрепления к субстрату // Цитология. 2001. Т. 43, № 9. С. 862.
3. Исаева В.В., Каретин Ю.А. Фрактальная организация культивируемых *in vitro* спиккулогенных клеток и продуцируемых ими личиночных спиккул морского ежа *Strongylocentrotus nudus* // Биология моря. 2002. Т. 28, № 5. С. 379–382.
4. Каретин Ю.А., Исаева В.В. Фрактальность клеточных систем *in vitro*: Тез. докл. Фундаментальные исследования морской биоты. – Владивосток.: Изд-во ДВГУ, 2002. С. 34–35.
5. Karetin Yu. Nonlinear approach to Nematology. Russian Journal of Nematology // 2003. V. 11, No. 2. P. 139.
6. Исаева В.В., Каретин Ю.А., Чернышев А.В., Шкуратов Д.Ю. Фракталы и хаос в биологическом морфогенезе. – Владивосток: Дальнаука, 2004. 162 с.
7. Исаева В.В., Пуцина Е.В., Каретин Ю.А. Квазифрактальная организация нейронов головного мозга рыб // Биология моря. 2004. Т. 30, № 2. С. 143–151.
8. Исаева В.В., Пуцина Е.В., Каретин Ю.А. Изменение морфометрических показателей и фрактальной размерности нейронов спинного мозга в онтогенезе симы *Oncorhynchus masou* // Биология моря. 2006. Т. 32, № 2. С. 125–133.