

УДК 591.1.04+591.81

БИОФИЗИКА

А. В. ЗОРИН, Н. А. ИСАНИН, А. Ю. ЯКОВЛЕВ

ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИКИ ПЕРЕХОДА КЛЕТОК К СИНТЕЗУ ДНК В РЕГЕНЕРИРУЮЩЕЙ ПЕЧЕНИ

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 12 II 1973)

Системы со стимулированной пролиферацией, как, например, регенерирующая печень млекопитающих, представляют собой очень удобные объекты для изучения механизмов, контролирующих клеточное размножение и дифференциацию. Однако используемые в настоящее время показатели клеточной кинетики в таких системах не воссоздают детальной картины вступления клеток в фазу синтеза ДНК и другие фазы митотического цикла. Дальнейшим шагом вперед могло бы быть построение на основе имеющихся экспериментальных возможностей каких-либо более удобных и информативных критериев, позволяющих оценивать динамическую организацию пролиферативных процессов. В настоящей работе предлагается один из таких критериев, способ его нахождения и применения к конкретным опытным данным на примере регенерирующей печени крысы.

Введем в рассмотрение функцию времени $q(t)$, под которой будем понимать отношение числа клеток, вступивших в некоторую фазу клеточного цикла за время t (отсчитываемое от момента нанесения стимулирующего воздействия — частичной гепатэктомии), к общему числу клеток в момент $t = 0$ (т. е. числу клеток, оставшемуся в печени после гепатэктомии). По отношению к S-фазе эта функция записывается в виде

$$q_S(t) = \int_0^t k_{1S}(\tau) d\tau / n(0), \quad (1)$$

где $k_{1S}(t)$ — скорость вступления клеток в S-фазу, $n(0)$ — начальное общее число клеток. Ясно, что дифференцированием $q_S(t)$ нетрудно получить в явном виде и скорость вступления клеток в S-фазу, нормированную на начальное число клеток.

Измерить критерий $q_S(t)$ в прямом эксперименте невозможно, но он может быть построен методами математического моделирования. Будем полагать, что числом клеток в S-фазе интактной печени можно пренебречь по сравнению с их числом в регенерирующей печени. Тогда на основе тех же соображений, которые были использованы в модели установившегося состояния клеточной кинетики (^{1, 2}), можно написать

$$n_S(t) = \int_0^1 k_{1S}(\tau) [1 - \varphi_S(t - \tau)] d\tau, \quad (2)$$

где $n_S(t)$ — число клеток S-фазы регенерирующей печени, $\varphi_S(u)$ — функция распределения клеток по длительности S-фазы. Производя интегрирование в (2) по частям и учитывая обозначение (1), приходим к интегральному уравнению II рода относительно функции $q_S(t)$

$$J_S^*(t) = q_S(t) - \int_0^t q_S(\tau) f_S(t - \tau) d\tau, \quad (3)$$

где $J_S^*(t) = \frac{n_S(t)}{n(0)}$ подобно индексу метки $J_S(t) = \frac{n_S(t)}{n(t)}$ отражает долю клеток, синтезирующих ДНК, но по отношению к числу клеток печени сразу после гепатэктомии. Плотность распределения клеток по длительности

S-фазы $f_s(u) = \varphi_s'(u)$, как отмечалось ранее ⁽¹⁾, может быть аппроксимирована стандартным Γ -распределением, т. е. функцией вида

$$f_s(u) = \frac{\beta^\alpha}{\Gamma(\alpha)} u^{\alpha-1} e^{-\beta u},$$

$$\alpha = \bar{\tau}_s / \sigma_s^2, \quad \beta = \bar{\tau}_s / \sigma_s^2, \quad (4)$$

$\bar{\tau}_s$ — средняя длительность S-фазы, σ_s^2 — дисперсия длительности S-фазы. Аналитическое решение уравнения (3) с ядром (4) может быть получено с помощью одностороннего преобразования Лапласа в предположении, что α принимает лишь целые значения. При α целом нечетном решение представляется в виде

$$q_s(t) = J_s^*(t) + \frac{\beta}{\alpha} \int_0^t J_s^*(\tau) d\tau +$$

$$+ \frac{2\beta}{\alpha} \sum_{k=1}^{\frac{\alpha-1}{2}} \int_0^t J_s^*(t-\tau) e^{-\beta\tau \left(1 - \cos \frac{2\pi}{\alpha} k\right)} \cos \left(\frac{\alpha-1}{\alpha} 2\pi k - \beta\tau \sin \frac{2\pi}{\alpha} k \right) d\tau, \quad (5)$$

а при α целом четном в виде

$$q_s(t) = J_s^*(t) + \frac{\beta}{\alpha} \int_0^t J_s^*(\tau) d\tau - \frac{\beta}{\alpha} e^{-2\beta t} \int_0^t J_s^*(\tau) e^{2\beta\tau} d\tau +$$

$$+ \frac{2\beta}{\alpha} \sum_{k=1}^{\frac{\alpha-2}{2}} \int_0^t J_s^*(t-\tau) e^{-\beta\tau \left(1 - \cos \frac{2\pi}{\alpha} k\right)} \cos \left(\frac{\alpha-1}{\alpha} 2\pi k - \beta\tau \sin \frac{2\pi}{\alpha} k \right) d\tau. \quad (6)$$

Уравнение (3) характеризует корректно поставленную задачу, и погрешность решения $q_s(t)$ определяется погрешностью экспериментально заданной функции $J_s^*(t)$ при фиксированных α и β . На ранних сроках регенерации (при малых t), когда клеточные деления в печени практически отсутствуют, график функции $q_s(t)$ должен совпадать с кривой индекса метки при непрерывном (многократном) введении H^3 -тимидина $J_s^c(t)$. Возможности повторного вступления в S-фазу, что не учитывается показателем $J_s^c(t)$, и деления клеток являются причинами принципиального различия между кривыми $q_s(t)$ и $J_s^c(t)$ на более поздних сроках регенерации. Добиваясь наилучшего совпадения этих кривых на начальном участке, который характеризуется условием $n(t) \approx n(0)$, можно определить временные параметры S-фазы: $\bar{\tau}_s$ и σ_s , поскольку выполняется равенство $J_s^*(t) = J_s(t)$ и оптимизация проводится только по параметрам α и β . Оптимизация параметров на ЭЦВМ «Наири-2» по экспериментальным кривым $J_s(t)$ и $J_s^c(t)$ ^(4, 5) привела к значениям $\bar{\tau}_s = 10$ час., $\sigma_s = 2,5$ часа для регенерирующей печени крыс линии Мак-Коллум. Полученные таким образом параметры могут быть теперь использованы в формулах (5) и (6). Для окончательного нахождения показателя $q_s(t)$ необходимо определить $J_s^*(t)$ по экспериментальной кривой $J_s(t)$, т. е. внести поправку на клеточное размножение, учитывая митотический индекс $J_m(t) = n_m(t) / n(t)$. В наших расчетах использовался следующий приближенный прием. Приведенные в литературе ⁽⁶⁾ и наши собственные данные по измерению длительности митоза методом цейтраферной микрокиносъемки на различных культурах клеток, а также обработка кривых клеточной кинетики для некоторых эпителиальных тканей *in vivo* показывают, что практически всегда длительность видимого митоза имеет среднее значение 0,2–1 час с коэффициентом вариации около 0,5. При такой большой вариабельности и малом среднем (по сравнению с длительностью всего цикла) длительности митоза можно положить

$$dn(t) / dt = n_m(t) / \bar{\tau}_m, \quad (7)$$

т. е. пренебречь возрастной зависимостью процесса выхода клеток из митоза. Следовательно,

$$J_s^*(t) = J_s(t) e^{\frac{1}{\tau_m} \int_0^t J_m(\tau) d\tau} \quad (8)$$

Теперь подстановкой (8) в (5) и (6) окончательно завершаем построение критерия $q_s(t)$. С использованием экспериментальных данных Фабриканта⁽³⁾, по кривым $J_s(t)$ и $J_m(t)$ была построена функция $q_s(t)$ при значениях временных параметров: $\tau_s = 10$ час., $\sigma_s = 2,5$ часа, $\tau_m = 0,5$ часа, приведенная на рис. 1. Данный пример иллюстрирует применение изложенных подходов и показывает, что изучение хода кривой $q_s(t)$ позволяет выявить некоторые существенные особенности процесса регенерации печени крысы.

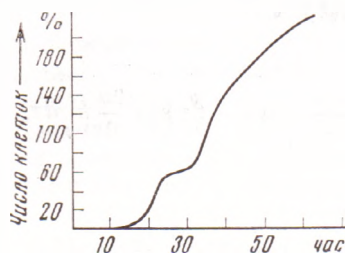


Рис. 1. Графическое изображение функции $q_s(t)$ для паренхимных клеток регенерирующей печени, построенное по экспериментальным кривым $J_s(t)$ и $J_m(t)$ крысы линии Август при значениях временных параметров: $\tau_s = 10$ час., $\sigma_s = 2,5$ часа, $\tau_m = 0,5$ часа

1. Первоначально в цикл вступает только $\approx 60\%$ всей популяции гепатоцитов $n(0)$, и к 26 часу скорость вступления клеток в S-фазу падает практически до нуля. Если все клетки этой фракции вступают в цикл одновременно, то начальный участок кривой $q_s(t)$ будет функцией распределения этих клеток по длительности пререпликативного периода, отражая тем самым их синхронный выход из нулевой фазы. Действительно, анализ с этих позиций начального участка $q_s(t)$ свидетельствует в пользу существования в фазе G_1 периода относительного покоя G_0 .

2. Скорость поступления гепатоцитов в S-фазу имеет два ярко выраженных пика, следующих один за другим, из которых второй несколько выше первого.

3. Всего за период наблюдения к синтезу ДНК приступает около 220% $n(0)$ клеток, что естественно ожидать, так как в опытах Фабриканта удалялось $\approx 2/3$ печени.

4. Функция $q(t)$ по своему смыслу является неубывающей, и это свойство можно использовать для проверки возможности объяснения регенерации печени только за счет эндорепродукции клеток. В этом случае следует положить $J_s^*(t) = J_s(t)$ для всех t . Однако, как показали расчеты, при этом на кривой $q_s(t)$ появляются участки строгого убывания, а за период регенерации кривая $q_s(t)$, в этом предположении, не достигает даже уровня 100% и, таким образом, не обеспечивает восстановления печени в соответствии с опытными данными. Разумеется, вывод не подразумевает, что процессы эндорепродукции в регенерирующей печени вообще отсутствуют.

Предлагаемый метод применим для анализа кинетики других клеточных систем со стимулированной или индуцированной пролиферацией.

Особое конструкторское бюро
биологической и медицинской кибернетики
Северо-Западного заочного
политехнического института
Ленинград

Поступило
29 I 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. Ю. Яковлев, Цитология, 13, 1417 (1971). ² А. Ю. Яковлев, Цитология, 14, 685 (1972). ³ J. I. Fabrikant, J. Cell Biol., 36, 3, 551 (1968). ⁴ J. I. Fabrikant, Am. J. Roent., 105, 4, 734 (1969). ⁵ J. I. Fabrikant, Exp. Cell Res., 55, 2, 277 (1969). ⁶ P. N. Rao, J. Engelberg, Exp. Cell Res., 52, 198 (1968).