

А.В. СЕДЫХ

Донецкий медицинский университет

**МАТЕМАТИЧЕСКОЕ
МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ
АПОПТОЗА И НЕКРОЗА
В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК IN VITRO**



Предложены математические модели апоптоза и некроза клеток в культуре in vitro для различных способов индикации фенотипических проявлений данных процессов. Указанные модели позволяют рассчитывать вероятности программирования клеток к апоптозу и некрозу, оценивать и сравнивать интенсивности последних на основании экспериментальных данных.

© А.В. СЕДЫХ, 2004

Введение. Ряд исследований посвящены изучению апоптоза и некроза клеток в культуре in vitro [1–3]. При этом возникает необходимость оценки интенсивности данных процессов. Как правило, для этого определяют доли клеток с фенотипом апоптоза и/или некроза в определенные моменты времени от начала инкубации [4, 5]. Однако получаемые показатели не всегда верно отражают интенсивность апоптоза и некроза, особенно при использовании морфологических методов, основанных на выявлении дистальных проявлений этих процессов, во-первых, из-за нелинейной зависимости концентрации клеток от времени и, во-вторых, из-за различного времени достижения морфологически идентифицируемых стадий апоптоза и некроза.

Целью настоящей работы является построение математической модели, описывающей апоптоз и некроз клеток в культуре in vitro и позволяющей более объективно оценивать их интенсивность на основании экспериментальных данных.

Описание моделей. Модель I. Для построения модели формализуем процессы апоптоза и некроза в культуре клеток. Предположим, что программирование исходных клеток к апоптозу и некрозу, который назовем первичным (инициация апоптоза и первичного некроза), осуществляется с некоторыми постоянными в каждый момент времени вероятностями p_1 и p_2 соответственно. Клетки, находящиеся на различных стадиях реализации апоптозной программы, подвергаются программированию к некрозу, который назовем вторичным, с постоянной в каждый момент времени вероятностью p_3 . Считаем, что клетки не пролиферируют и не элиминируются из культуры. В этом случае доли исходных клеток (w_0), всех клеток с апоптозным фенотипом (w_1), первично-некротических (w_2), вторично-некротических (w_3) и апоптозных клеток, исключая запрограммированные ко вторичному некрозу (w_4) к моменту времени t от начала инкубации, определяются уравнениями

$$w_1 = w_0' e^{kt}, \quad (1)$$

$$w_2 = w_1' + w_0' (p_1/p)(1 - e^{kt}), \quad (2)$$

$$w_3 = w_2' + w_0' (p_2/p)(1 - e^{kt}), \quad (3)$$

$$w_4 = w_3' + w_1' (1 - e^{mt}) + w_0' (p_1 p_3 / p) \sum_{j=0}^{m-1} (1 - e^{kj}) e^{m(j-t)}, \quad (4)$$

$$w_4 = w_1 + w_3, \quad (5)$$

где w_1' , w_2' , w_3' , w_4' — доли исходных клеток, всех апоптозных, первично-некротических, вто-

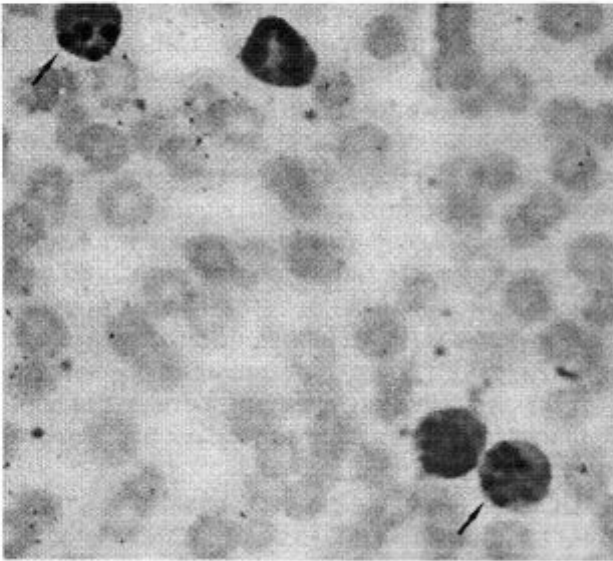


Рис. 1. Апоптоз нейтрофилов гепаринизированной венозной крови больной сепсисом после 6-часовой инкубации при 37 °С (апоптотные клетки указаны стрелками). Окраска по Романовскому. Ув. ×1000 (Наблюдение А.Н. Нестеренко, А.В. Седых)

рично-некротических клеток до начала инкубации (в момент времени $t = 0$), $k = \ln(1 - p_1 - p_2)$, $m = \ln(1 - p_3)$, $p = p_1 + p_2$. Вероятности программирования к апоптозу и первичному некрозу рассчитываются из уравнений (1) — (3) по формулам

$$p_1 = \frac{w_1 - w_1'}{w_0' - w_0} \left(1 - \left(\frac{w_0}{w_0'} \right)^{1/t} \right),$$

$$p_2 = \left(1 - \frac{w_1 - w_1'}{w_0' - w_0} \right) \left(1 - \left(\frac{w_0}{w_0'} \right)^{1/t} \right).$$

Вероятность программирования ко вторичному некрозу (p_3) рассчитывается из уравнения (4) с использованием численных методов решения уравнений [6].

Применение предложенной модели для расчета величин p_1 , p_2 , p_3 возможно при использовании методов, выявляющих наиболее ранние изменения фенотипа клеток. Этими изменениями являются перестройка плазмалеммы, заключающаяся в транслокации фосфатидилсерина на поверхность клеточной мембраны при апоптозе и повышение ее проницаемости при некрозе, что выявляется с помощью проточной цитометрии с использованием меченого флюоресцеином аннексина V (AnV) и

пропидия йодида (PI) [7, 8]. Пренебрегая временем, в течение которого возникают вышеуказанные изменения мембраны от момента инициации апоптотной или некротической программы, можно провести соответствие между фенотипом клеток, выявляемым с помощью проточной цитометрии, и клеточными популяциями, описываемыми моделью I:

Исходные клетки (w_0)	AnV-/PI-
Все апоптотные клетки (w_1)	AnV+
Апоптотные клетки без вторично-некротических изменений (w_2)	AnV+/PI-
Первично-некротические клетки (w_3)	AnV-/PI+
Вторично-некротические клетки (w_3)	AnV+/PI+
Все некротические клетки ($w_2 + w_3$) ...	PI+

Модель II. При использовании методов световой, в том числе люминесцентной микроскопии, невозможно достоверно дифференцировать первично- и вторично-некротические клетки, а также нельзя пренебречь временем, в течение которого происходит формирование морфологически идентифицируемых данными методами апоптотных и некротических клеток. В силу этого для построения модели, описывающей кинетику клеточных популяций, пренебрегаем явлением вторичного некроза и полагаем, что исходные клетки программируются к апоптозу и некрозу с постоянными в каждый момент времени вероятностями p_1 и p_2 . После ряда промежуточных стадий образуются морфологически идентифицируемые клетки с апоптотным и некротическим фенотипом в течение времени τ_1 и τ_2 соответственно (рис. 1). Считаем, что клеточная культура стационарна, клетки с дистальными проявлениями апоптоза и некроза находятся в конечной стадии этих процессов и не элиминируются из культуры. В этом случае доли исходных клеток (w_0), всех апоптотных (w_a) и некротических (w_n) клеток, морфологически идентифицируемых апоптотных (w_1) и некротических (w_2) клеток к моменту времени t от начала инкубации определяются следующими уравнениями:

$$w_0 = w_0' e^{kt}, \quad (6)$$

$$w_a = w_a' + w_0' (p_1/p) (1 - e^{kt}), \quad (7)$$

$$w_n = w_n' + w_0' (p_2/p) (1 - e^{kt}), \quad (8)$$

$$w_1 = w_a' + w_0' (p_2/p) (1 - e^{k(t-\tau_1)}), \quad t \geq \tau_1, \quad (9)$$

$$w_2 = w_n' + w_0' (p_2/p) (1 - e^{k(t-\tau_2)}), \quad t \geq \tau_2, \quad (10)$$

где w_0' , w_a' , w_n' — доли исходных, всех апоптотных и некротических клеток до начала инкуба-

ции (в момент времени $t = 0$), $k = \ln(1 - p_1 - p_2)$, $p = p_1 + p_2$. Для расчета величин p_1, p_2, τ_1, τ_2 необходимо знать доли клеток с дистальными морфологическими проявлениями апоптоза и некроза до начала инкубации (w_1', w_2') и в некоторые ее моменты времени $t_1 (w_{11}, w_{21})$ и $t_2 (w_{12}, w_{22})$. Расчет осуществляется путем решения системы, составленной из уравнений (9), (10) для двух экспериментальных точек

$$w_{ij} = w_i' + w_0'(p_i/p)(1 - e^{k(t_i - \tau_i)}), t_j \geq \tau_i, \quad (11)$$

где $i = 1, 2$ (1 — апоптоз, 2 — некроз), j — номер экспериментальной точки ($j = 1, 2$). При составлении системы (11) положено $w_a' \approx w_1', w_n' \approx w_2'$. Практически решение системы уравнений (11) производится с использованием численных методов решения систем нелинейных алгебраических уравнений [6].

Результаты исследований и их обсуждение. При построении описанных моделей было принято, что инициация апоптоза и некроза клеток носит вероятностный характер. Вероятность программирования клеток к апоптозу и некрозу зависит от влияния внешних и внутренних причин. К первым относится наличие в среде апоптогенных, антиапоптозных, повреждающих и цитопротекторных факторов, к последним — состояние генетического и био-

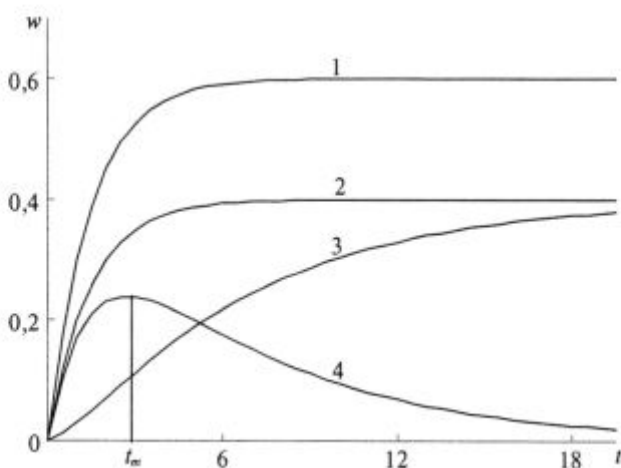


Рис. 2. Кинетика клеточных популяций, описываемая моделью I ($p_1 = 0,2, p_2 = 0,3, p_3 = 0,15, w_0' = 1$): 1 — доля первично-некротических клеток (w_2), 2 — доля всех апоптозных клеток (w_1), 3 — доля вторично-некротических клеток (w_3), 4 — доля апоптозных клеток без вторичного некроза (w_4); t_m — момент времени, соответствующий максимальному значению функции $w_4(t)$

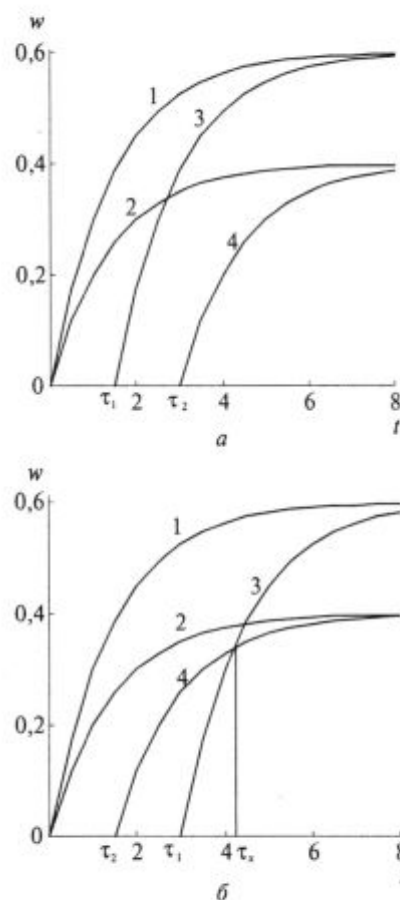


Рис. 3. Кинетика клеточных популяций, описываемая моделью II ($p_1 = 0,3, p_2 = 0,2, w_0' = 1$) при $\tau_1 < \tau_2$ (а) и $\tau_1 > \tau_2$ (б): 1, 2 — доли всех апоптозных (w_a) и некротических (w_n) клеток, 3, 4 — доли морфологически идентифицируемых апоптозных (w_1) и некротических (w_2) клеток; τ_x — момент времени, соответствующий равенству значений функций $w_1(t)$ и $w_2(t)$

синтетического аппаратов, мембранных структур клетки, ее энергетическая обеспеченность и пр.

Поведение предложенных моделей полностью определяется величинами вероятностей программирования клеток к апоптозу и некрозу (модель I), а также значением времени формирования морфологически идентифицируемых форм апоптозных и некротических клеток (модель II).

Проанализируем модель I. На рис. 2 представлен один из вариантов поведения модельной системы при $p_1 = 0,2, p_2 = 0,3, p_3 = 0,15, w_0' = 1, w_1' = 0, w_2' = 0, w_3' = 0$. Из уравнений (2), (3) следует, что при $t \rightarrow \infty$ предельные концент-

Доля клеток трех морфологических типов (из [4])

№ п.п	VP-16, мкг/мл	Время инкубации, ч	Клетки		
			интактные	апоптозные	некротические
1	0	24	0,82 ± 0,09	0,11 ± 0,06	0,07 ± 0,04
2	100	23	0,43 ± 0,07	0,47 ± 0,06	0,10 ± 0,03
3	100	24	0,37 ± 0,07	0,50 ± 0,06	0,13 ± 0,03

рации всех апоптозных и первично-некротических клеток составят $w_{1np} = w_1' + w_0'(p_1/p)$, $w_{2np} = w_2' + w_0'(p_1/p)$. Таким образом, при $w_0' = 1$, $w_1' = 0$, $w_2' = 0$ величина p_1/p численно равна доле клеток с апоптозным (AnV+) или некротическим (AnV-/PI+) фенотипом, в которые перейдут все исходные клетки при длительной инкубации. Доля вторично-некротических клеток w_3 (рис. 2, кривая 3) при этом будет стремиться к величине w_{3np} тем быстрее, чем больше значение p_3 . Функция $w_4(t)$, описывающая концентрацию апоптозных клеток без вторично-некротических изменений (рис. 2, кривая 4), имеет максимум, достигаемый в некоторый момент времени t_m . Максимальное значение данной функции (w_{4max}) можно получить путем численного дифференцирования уравнения (5).

Перейдем к анализу модели II. На рис. 3 представлены возможные варианты поведения модели в зависимости от соотношения величин p_1, p_2, τ_1, τ_2 . Во всех рассматриваемых случаях положено $w_0' = 1, w_1' = 0, w_2' = 0$. Морфологически идентифицируемые клетки с проявлениями апоптоза или некроза обнаруживаются в культуре не ранее момента времени τ_i ($i = 1, 2$) от начала инкубации. До указанного момента времени возможно выявление клеток, находящихся на различных стадиях трансформации в апоптозные или некротические (клетки с промежуточным апоптозным или некротическим фенотипом). Доли этих клеток лежат в интервалах $(0; w_a(t))$ и $(0; w_n(t))$ при $t \leq \tau_i$ и в интервалах $(w_1(t); w_a(t))$ и $(w_2(t); w_n(t))$ при $t > \tau_i$. Из рис. 3, б видно, что в моменты времени из интервала $(\tau_1; \tau_2)$ доля морфологически идентифицируемых клеток не соответствует величинам вероятностей программирования к апоптозу и некрозу, а соответственно, и интенсивности данных процессов. Использование в этих случаях значений концентраций клеток даже для

качественной оценки и сравнения интенсивностей апоптоза и некроза приведет к неверному заключению.

Проиллюстрируем расчет по модели II. Экспериментальные данные взяты из работы [4], в которой исследовалось влияние ингибитора топоизомеразы II этопозида (VP-16) на апоптоз нестимулированных лимфоцитов в культуре клеток. Апоптозные и некротические лимфоциты выявляли с помощью люминесцентной микроскопии препаратов, окрашенных этидия бромидом и акридиновым оранжевым. В таблице представлены результаты опытов. Решая систему уравнений (11) для данных 2, 3 (опыт) и полагая $w_0' = 1, w_1' = 0, w_2' = 0$, получим следующие значения вероятностей программирования лимфоцитов к апоптозу и некрозу: $p_1 = 0,096, p_2 = 0,044$. Время развития фенотипических изменений в клетках, соответствующих апоптозу и некрозу, составляет $\tau_1 = 15,3$ ч, $\tau_2 = 20,5$ ч. Считая, что указанное время относительно постоянно для исследуемой культуры клеток, из уравнений (9), (10) получим вероятности программирования к апоптозу и некрозу для данных 1 (контроль): $p_1 = 0,014, p_2 = 0,021$. Из этого можно заключить, что интенсивность апоптоза лимфоцитов в культуре в присутствии этопозида возросла в 6,9 раза, некроза — в 2,1 раза по сравнению с контролем. Относительно небольшое увеличение интенсивности некроза лимфоцитов под влиянием апоптогенного фактора этопозида может быть обусловлено вторичным некрозом апоптозных клеток.

Таким образом, значения величин вероятностей программирования клеток к апоптозу и некрозу могут использоваться для оценки и сравнения интенсивностей данных процессов в исследуемой культуре клеток при различных условиях.

Автор благодарит В.Н. Мухина за плодотворное обсуждение работы.

SUMMARY. Mathematical models of apoptosis and necrosis in *in vitro* cultured cells for different ways of indication of phenotypical manifestations of these processes are proposed. The models make it possible to calculate the probability of apoptosis and necrosis programming of cells, to appraise and compare intensities of these processes using experimental data.

РЕЗЮМЕ. Запропоновано математичні моделі апоптоза і некроза клітин в культурі *in vitro* для різноманітних засобів індикації фенотипових проявлень цих процесів. Моделі дозволяють обчислювати імовірності програмування клітин до апоптозу і некрозу, оцінювати та порівнювати інтенсивності останніх на основі експериментальних даних.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Маянский Н.А.* Каспазозависимый механизм апоптоза нейтрофилов: апоптогенный эффект туморнекротизирующего фактора α // *Иммунология.* — 2002. — № 4. — С. 15–17.
2. *Тора С., Ряжский Г.Г., Максимова Н.В., Чучалин А.Г., Хамет П., Пшежетский А.В., Орлов С.Н.* Подавление программируемой смерти внутриклеточным сАМР не связано с экспрессией генов, кодирующих ингибитор апоптоза // *Биохимия.* — 2002. — 67, вып. 2. — С. 303–310.
3. *Шано В.П., Черный В.И., Нестеренко А.Н., Лиховид Н.П., Земляной И.В., Седых А.В.* Эндотоксикоз, иммунный дистресс и полиорганные нарушения: клиничко-морфологическое обоснование терапии с позиций SIRS // *Біль, знеболювання, інтенсивна терапія.* — 2001. — № 2(д). — С. 45–47.
4. *Тронов В.А., Конопляников М.А., Никольская Т.А., Константинов Е.М.* Апоптоз нестимулированных лимфоцитов человека и разрывы ДНК, индуцированные ингибитором топоизомеразы II этопозидом // *Биохимия.* — 1999. — 64, вып. 3. — С. 412–420.
5. *Винокуров М.Г., Прохоренко И.Р., Юринская М.М., Долгачева Н.Н., Печатников В.А.* Действие липополисахаридов и УФ-облучения диапазона С на регуляцию апоптоза нейтрофилов человека // *Иммунология.* — 2001. — № 2. — С. 25–27.
6. *Бахвалов Н.С., Жидков Н.П., Кобельков Г.М.* Численные методы. — М.: Лаборатория Базовых Знаний, 2002. — 630 с.
7. *Маянский Н.А.* Состояние каспазы-3 при подавлении апоптоза нейтрофилов гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором // *Иммунология.* — 2001. — № 2. — С. 22–25.
8. *Маянский А.Н., Маянский Н.А., Заславская М.И., Поздеев Н.М., Плескова С.Н.* Апоптоз нейтрофилов // *Иммунология.* — 1999. — № 6. — С. 11–19.

Поступила 20.10.03