

УДК 577.31+577.171.53

**МОДЕЛИРОВАНИЕ КОЛЕБАНИЙ КОНЦЕНТРАЦИЙ
РАЗЛИЧНЫХ КЛЕТОК КРОВИ У ЗДОРОВЫХ
И БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ЛЕЙКОЗОМ ДОНОРОВ
В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*. 1. МОДЕЛИРОВАНИЕ
С ПОМОЩЬЮ СВЯЗАННЫХ УРАВНЕНИЙ ВАН ДЕР
ПОЛЯ С ЗАПАЗДЫВАНИЕМ И СВЯЗЬ ПАРАМЕТРОВ
КОЛЕБАНИЙ КОНЦЕНТРАЦИЙ КЛЕТОК
С КОЛЕБАНИЯМИ МОЛЕКУЛ ДНК**

А. А. Березин

*Изучены колебания концентраций сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов в донорской крови *in vitro*, а также лимфоцитов и лейкемических (опухолевых) клеток в крови больных острым лейкозом в условиях *in vitro*. На основе экспериментальных данных построена физико-математическая модель динамики колебаний концентраций клеток крови *in vitro*. Связь параметров колебаний концентраций указанных типов клеток с колебаниями молекулы ДНК выражалась в параметрическом воздействии колебаний молекулы ДНК на время запаздывания в уравнениях Ван дер Поля, описывающих колебания концентраций сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов в донорской крови *in vitro*, а также лимфоцитов и лейкемических (опухолевых) клеток в лейкемической крови *in vitro*. Получено хорошее соответствие результатов моделирования экспериментальным данным.*

Среди известных типов автоколебаний, которые наблюдаются в условия *in vitro*, можно перечислить следующие. Это темновые реакции фотосинтеза [1], автоколебания

в гликолизе [2], автоколебания в реакциях окисления малоновой кислоты [3], колебания АТФазной активности в концентрированных препаратах актомиозина [4]. В целях изучения процессов, протекающих в крови *in vitro*, были проведены следующие исследования. Были изучены колебания концентраций сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов в крови здоровых и больных острым лейкозом доноров в условиях *in vitro* [5]. Исследования проводились в отделении гематологии Онкологического Научного Центра МЗ РФ под руководством академика АН СССР Н. Н. Блохина. Методика эксперимента состояла в следующем. Гепаринизированную кровь 20 здоровых доноров и 20 больных острым лейкозом в количестве 200 мл от каждого исследуемого помещали в стерильный флакон и сохраняли при температуре 37°C. Инкубированная таким образом кровь сохранялась в течение пяти суток в холодильнике. Измерения проводились в течение первых и вторых суток. После пяти суток хранения в крови наступал лизис (распад) клеток. Во время эксперимента кровь во флаконах перемешивалась с помощью магнитных мешалок. Через каждые 15 минут производился забор крови для определения количества лейкоцитов в 1 мм³ и подготовки мазка для подсчета лейкоцитарной формулы по стандартной методике. В целях повышения достоверности процентное содержание упомянутых клеток подсчитывалось не менее чем в 200 полях зрения и одним и тем же цитологом (профессор И. С. Петерсон). Количество лейкоцитов подсчитывалось в камере Горяева. При этом для повышения точности значений анализа производился дублирующий подсчет количества лейкоцитов с помощью целлоскопа ТОА СС108. Это позволило довести ошибку измерения до 2.5%. Полученные результаты аппроксимировались суммой гармонических функций с помощью метода наименьших квадратов. В процессе этих экспериментов было обнаружено, что в крови *in vitro* у здоровых доноров происходят противофазные колебания концентраций сегментоядерных нейтрофилов (С) и лимфоцитов (Л). В спектре колебаний присутствуют две гармоники: с периодом около 2 часов 40 минут и 1 часа 20 минут (рис. 1) [5].

В крови *in vitro* у больных острым лейкозом, имевших высокий процент лейкозных клеток в периферической крови, были обнаружены противофазные колебания концентраций лимфоцитов и лейкозных клеток (лимфобластов), в спектре которых были обнаружены колебания с периодом около 2 часов 40 минут, а также с периодом около 1 часа 20 минут [5] (рис. 2). Было установлено, что между колебаниями концентраций опухолевых клеток (ОК) и лимфоцитов (Л) наблюдался дрейф фазы, который отсутствовал в колебаниях концентраций нейтрофилов и лимфоцитов в крови здоровых доноров *in vitro* (рис. 1, 2).

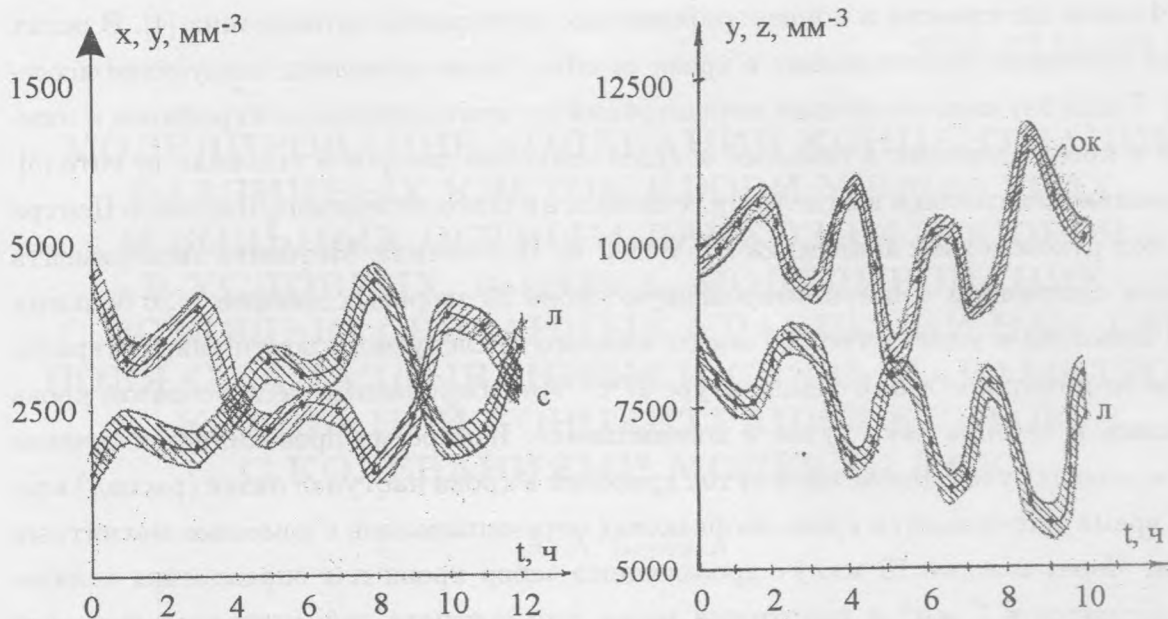


Рис. 1. Колебания концентраций сегментоядерных нейтрофилов (С) и лимфоцитов (Л) в условиях *in vitro* в крови здоровых доноров. (Точки соединены от руки для наглядности, эксперимент.)

Рис. 2. Колебания концентраций лимфоцитов (Л) и опухолевых клеток (ОК) в условиях *in vitro* в крови больных острым лейкозом. (Точки соединены от руки для наглядности, эксперимент.)

Рассмотрим полученные экспериментальные данные с общебиологических позиций. В условиях *in vitro* живая кровь как здоровых доноров, так и лейкозных больных представляет собой живой организм. В отличие от равновесных и метастабильных систем устойчивость живого организма носит не статический, а динамический характер. В этой связи, полученные экспериментальные данные можно интерпретировать с позиции динамического изменения состояний дифференцировки клеток крови. Дифференцировку часто рассматривают как процесс, приводящий к специализации клеточной функции: у дифференцированной клетки становятся выражены некоторые из функций, общих для многих клеток [6]. Наряду с процессом дифференцировки существует процесс дедифференцировки или обратной дифференцировки, имеющий место в процессе регенерации клеток [6]. Проблема дифференцировки – это, в сущности, проблема дифференциальной

активности генов [7, 8]. Однако механизмы активации одних генов и репрессии других генов в этом процессе неизвестны.

В работе [5] предложена физико-математическая модель для описания колебаний концентраций клеток крови в условиях *in vitro*, включая опухолевые (лейкозные) клетки, в рамках трех связанных уравнений Ван дер Поля с запаздыванием. При этом опухолевые клетки в модели были представлены лимфобластами (опухолевые клетки при лимфобластном лейкозе), интерпретируемыми в виде промежуточной стадии дифференцировки лимфоцитов в сегментоядерные нейтрофилы.

В работе [9] предложена математическая модель механических колебаний в молекуле ДНК и ее изменений, характерных для острого лейкоза. В целях упрощения в описываемой ниже модели был использован непрерывный аналог модели молекулы ДНК, описываемый системой двух связанных дифференциальных уравнений второго порядка. В непрерывном аналоге повреждения молекулы ДНК при остром лейкозе моделировались с помощью разрыва параметрической связи между уравнениями, описывающими каждую цепочку молекулы и с помощью изменения собственной частоты механических колебаний в цепочках. Связь динамики колебаний в молекуле ДНК с процессом дифференцировки клеток крови была отображена в виде параметрической модуляции времени дифференцировки сегментоядерного нейтрофила в лимфоцит T_x и лимфоцита в сегментоядерный нейтрофил T_y механическими колебаниями в молекуле ДНК с собственными частотами ω_3 и ω_4 . Образование промежуточных форм дифференцировки указанных типов клеток крови (лимфобластов и миелобластов) с соответствующими временами дифференцировки T_z и T_k , отображалось в виде уравнений Ван дер Поля, параметрически связанных с уравнениями Ван дер Поля, описывающими динамику колебаний концентраций основных клеток крови – сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов. Нарушения в цепочке ДНК приводят к увеличению концентрации лимфобластов. Система уравнений выглядела следующим образом:

$$\frac{d^2x}{dt^2} + \varepsilon_1 \left(y^2 + \frac{d(y^2)}{dt} T_x \left(1 + \frac{dr}{dt} \right) + k^2 + \frac{d(k^2)}{dt} T_k - 1 \right) \frac{dx}{dt} + (1 + 0.8r)\omega_0^2 x = a_1 F_1 + a_2 F_2,$$

$$\frac{d^2k}{dt^2} + \varepsilon_3 \left(x^2 + \frac{d(x^2)}{dt} T_k - 1 \right) \frac{dk}{dt} + \omega_1^2 k = a_1 F_1 + a_2 F_2,$$

$$\frac{d^2y}{dt^2} + \varepsilon_1 \left(x^2 + \frac{d(x^2)}{dt} T_y \left(1 + \frac{dp}{dt} \right) + z^2 + \frac{d(z^2)}{dt} T_z - 1 \right) \frac{dy}{dt} + (1 + 0.8p)\omega_0^2 y = a_1 F_1 + a_2 F_2,$$

$$\frac{d^2z}{dt^2} + \varepsilon_2 \left(y^2 + \frac{d(y^2)}{dt} T_z - 1 \right) \frac{dz}{dt} + \omega_2^2 z = a_1 F_1 + a_2 F_2, \quad (1)$$

$$\frac{d^2r}{dt^2} + q_1 \frac{dr}{dt} \left(1 + \frac{dp}{dt} \right) + \omega_3^2 (1 + p)r = a_3 F_3 + a_4 F_4,$$

$$\frac{d^2p}{dt^2} + q_2 \frac{dp}{dt} \left(1 + \frac{dr}{dt} \right) + \omega_4^2 (1 + r)p = a_3 F_3 + a_4 F_4,$$

где x, y – концентрации *in vitro* сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов соответственно, z, k – концентрации *in vitro* лимфобластов и миелобластов соответственно, r, p – амплитуды механических колебаний в первой и второй нитях молекулы ДНК клеток крови, функция F_1 описывает пуассоновский случайный процесс, моделирующий случайные колебания концентрации белков плазмы крови, функция F_2 описывает гауссовский случайный процесс, моделирующий тепловые флуктуации подвижности белков в растворе, функция F_3 описывает случайные колебания концентраций ионов Na и Cl в растворе клеточной жидкости, в которой находится молекула ДНК, функция F_4 описывает возмущения цепочки, вызванные тепловым движением молекул электролита клеточной жидкости, в которой находится молекула ДНК, $a_1, a_2, a_3, a_4, \varepsilon_1, \varepsilon_2, \varepsilon_3, \varepsilon_4, q_1, q_2$ – постоянные коэффициенты, меньшие единицы, ω_0 – частота собственных колебаний концентраций сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов в условиях *in vitro* с периодом 1 ч 20 мин, ω_1, ω_2 – частоты собственных колебаний концентраций миелобластов и лимфобластов *in vitro* соответственно, ω_3, ω_4 – частоты собственных механических колебаний в первой и второй нитях молекулы ДНК.

Численное исследование системы (1) для моделирования случая здоровой крови (начальные концентрации лимфобластов и миелобластов на три порядка меньше, чем начальные концентрации сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов) показало, что система (1) является устойчивой в широком диапазоне изменения коэффициентов $a_1, a_2, a_3, a_4, \varepsilon_1, \varepsilon_2, \varepsilon_3, \varepsilon_4, q_1, q_2$. Наиболее интересным свойством модели оказалось наличие нескольких (порядка десяти) сценариев развития динамики колебаний концентраций, возникающих при повторных запусках программы счета системы (1), которые повторялись квазипериодически. Спустя некоторое время система при повторных запусках приходила к одному и тому же сценарию (рис. 3). Это отражает привнесение параметров возврата ФПУ из динамики механических колебаний в молекуле ДНК в динамику изменения концентраций клеток крови.

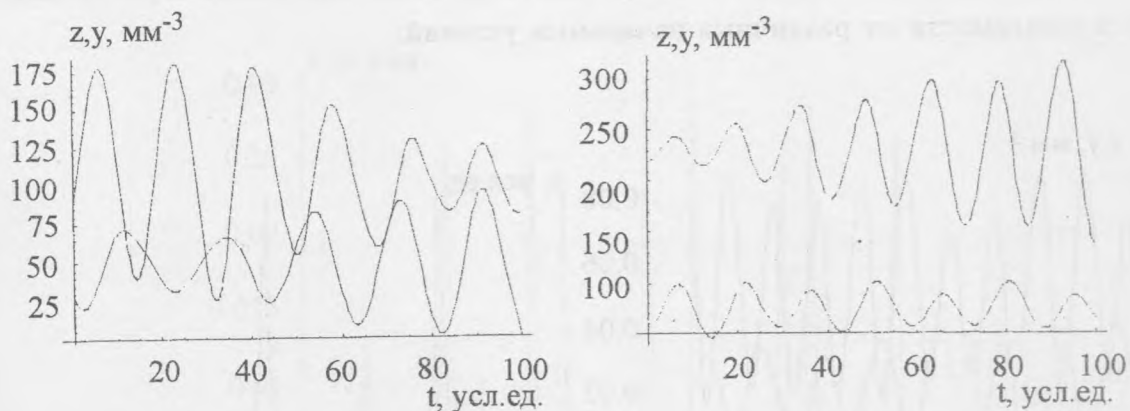


Рис. 3. Графики колебаний концентраций сегментоядерных нейтрофилов (верхняя кривая) и лимфоцитов (нижняя кривая) в модели, описываемой в рамках системы (1) при параметрах молекулы ДНК, соответствующих здоровым клеткам крови. (Верт. ось – концентрация клеток в 1 мм^3).

Рис. 4. Графики колебаний концентраций лимфобластов (верхняя кривая) и лимфоцитов (нижняя кривая) в модели, описываемой в рамках системы (1) при параметрах молекулы ДНК, соответствующих лейкемическим клеткам крови. Динамика развития колебаний соответствует агрессивному сценарию. (Верт. ось – концентрация клеток в 1 мм^3).

Для моделирования случая колебаний концентраций опухолевых клеток (лимфобластов) и лимфоцитов в крови больного острым лимфобластным лейкозом *in vitro* начальная концентрация лимфобластов в модели была сделана равной концентрации лимфоцитов. Помимо этого, собственная частота механических колебаний в модели первой нити молекулы ДНК (переменная r) ω_3 была сделана близкой к собственной частоте колебаний концентрации лимфобластов ω_2 . Предполагается, что изменение собственной частоты колебаний в нити молекулы ДНК происходит за счет изменений в этой молекуле, имеющих место при остром лейкозе (нарушения вторичной структуры, комбинированные повреждения молекулы и т.д. [9]). Численный анализ системы (1) в этом случае показывает, что число сценариев динамики колебаний увеличивается по сравнению с моделью колебаний концентраций клеток крови у здорового донора. При этом некоторые сценарии в зависимости от начальных условий приводят к резкому увеличению амплитуды колебаний лимфобластов (рис. 4). В других случаях кривые модели соответствуют экспериментально наблюдаемым параметрам крови у больных острым лимфобластным лейкозом (рис. 5, 2). Другими словами, динамика модели показыва-

ет, что развитие лейкозного процесса может пойти по более или менее агрессивному сценарию в зависимости от различных начальных условий.

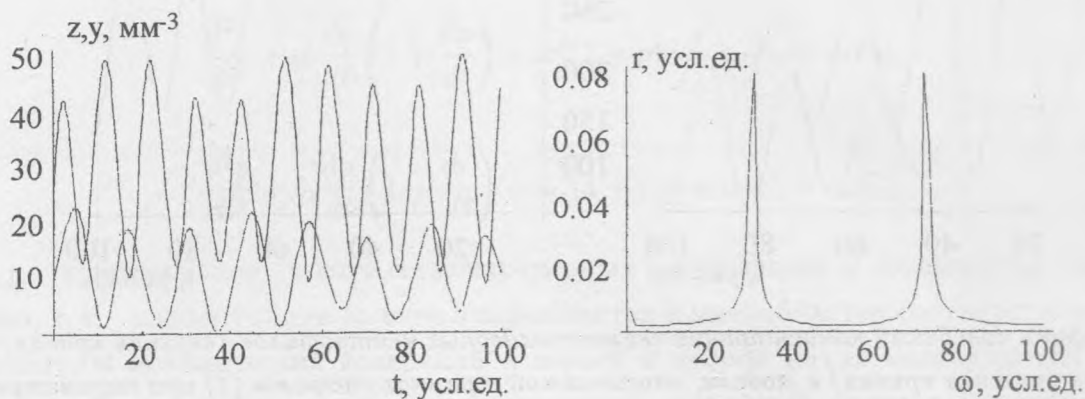


Рис. 5. Графики колебаний концентраций лимфобластов (верхняя кривая) и лимфоцитов (нижняя кривая) в модели, описываемой в рамках системы (1), при параметрах молекулы ДНК, соответствующих лейкемическим клеткам крови. Динамика развития колебаний соответствует спокойному сценарию. (Верт. ось – концентрация клеток в 1 мм^3).

Рис. 6. Фурье спектр колебаний в модели молекулы ДНК, параметры которой соответствуют здоровым клеткам крови. Возврат ФПУ в модели имеет место в относительно узком диапазоне частот в окрестности основной резонансной частоты (Верт. ось – амплитуда, гориз. ось – частота, единицы условн.).

В связи с тем, что возврат ФПУ характеризуется периодическим возвращением картины Фурье спектра первоначального возмущения системы к своему начальному виду, будем в дальнейшем называть его спектром возврата ФПУ. Как видно из результатов моделирования (рис. 6), Фурье спектры возврата ФПУ в динамике механических колебаний в модели молекулы ДНК находятся вблизи собственных резонансных частот (пьедесталы на рис. 6). Фурье спектр механических колебаний в модели цепи молекулы ДНК в случае изменений, характерных для острого лейкоза (рис. 7), резко расширяется по сравнению со спектром "здоровой" ДНК (рис. 6). Кроме того, каждое изменение коэффициентов $a_1, a_2, a_3, a_4, \varepsilon_1, \varepsilon_2, \varepsilon_3, \varepsilon_4, q_1, q_2$ при первом запуске программы счета сопровождалось вначале возникновением нового сценария развития колебаний, который затем вновь возвращался к первоначальной цепочке сценариев. Данная динамика связана с одним из свойств возврата ФПУ, при котором происходит возвращение картины спектра ФПУ к своему первоначальному виду в результате определенного количества

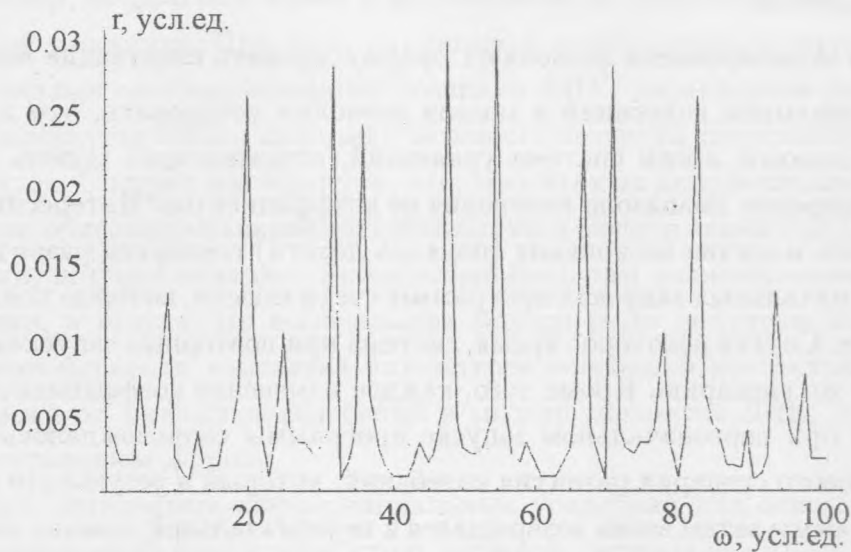


Рис. 7. Фурье спектр колебаний в модели молекулы ДНК, параметры которой соответствуют лейкозным клеткам крови. Локальные возвраты ФПУ в модели имеют место в окрестностях целого ряда резонансных частот (Верт. ось – амплитуда, гориз. ось – частота, единицы условн.).

возвратов. Обнаруженное свойство может быть отнесено к гипотетическому механизму активации одних генов в молекуле ДНК и репрессии других. То есть результаты исследования модели указывают на наличие периодичности в динамике процесса активации и репрессии генов, управляющих дифференцировкой, что соответствует картине изменения во времени спектра возврата ФПУ в динамике механических колебаний в молекуле ДНК. При отсутствии воздействия механических колебаний молекулы ДНК на длительность процесса дифференцировки клеток крови, что моделировалось путем обнуления коэффициентов параметрического воздействия при диссипативных и консервативных членах уравнений 1 и 3 системы (1), система постоянно демонстрировала только один сценарий динамики колебаний концентраций клеток крови. Графики колебаний концентраций сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов в модели, описываемой в рамках системы (1), приведены на рис. 3. Кривые соответствуют экспериментальным колебаниям концентраций этих типов клеток крови у здорового донора в условиях *in vitro*, которые приведены на рис. 1.

Изложенная математическая модель позволила описать полученные экспериментальные результаты. Вместе с тем, интерпретация физического механизма возникно-

вения лейкоза из здоровых клеток крови требует фундаментального подхода с позиции динамических систем.

Результаты моделирования позволяют сформулировать следующие выводы:

1. Анализ динамики колебаний в модели позволил установить, что для моделирования случая здоровой крови система уравнений, описывающих модель (1), является устойчивой в широком диапазоне изменения ее коэффициентов. Интересным свойством модели оказалось наличие нескольких (порядка десяти) сценариев развития динамики колебаний при начальных запусках программы счета модели, которые повторялись квазипериодически. Спустя некоторое время, система при повторных запусках приходила к одному и тому же сценарию. Кроме того, каждое изменение коэффициентов уравнений первой модели при первоначальном запуске программы сопровождалось вначале возникновением нового сценария развития колебаний, который в результате последующих запусков программы затем вновь возвращался к первоначальной цепочке сценариев. При отсутствии параметрического воздействия механических колебаний молекулы ДНК на длительность процесса дифференцировки клеток крови, система постоянно демонстрировала только один сценарий динамики колебаний концентраций клеток крови.

2. В случае моделирования динамики колебаний концентраций клеток крови у больного острым лейкозом было показано, что число сценариев динамики колебаний увеличивается по сравнению с моделью колебаний концентраций клеток крови у здорового донора. При этом некоторые сценарии приводят к резкому увеличению амплитуды колебаний лимфобластов (опухолевых клеток). В других случаях кривые модели соответствуют экспериментально наблюдаемым параметрам крови у больных острым лимфобластным лейкозом в условиях *in vitro*. Другими словами, динамика модели показывает, что развитие лейкозного процесса может пойти по более или менее агрессивному пути в зависимости от различных начальных условий. Это говорит в пользу необходимости пересмотра различных схем химиотерапии злокачественных заболеваний крови. В соответствии с результатами исследования модели каждое применение любого препарата неизбежно приводит к изменению развития сценария болезни. То есть сценарий выздоровления от болезни в результате использования лекарства может смениться сценарием рецидива болезни при применении его в "неудачный" период времени. Следовательно, необходимо осуществлять моделирование воздействия каждого лекарственного препарата на организм во всей цепи сценариев развития болезни.

3. Фурье спектр механических колебаний в модели молекулы ДНК в случае наличия в ней изменений, характерных для острого лейкоза, резко расширяется по сравнению

со спектром "здоровой" ДНК. Это расширение связано с изменением структуры молекулы ДНК, например, ее фрагментацией и возникновением локальных возвратов ФПУ в ее колебательной динамике. При этом нарушается непрерывность перехода между различными картинками спектра основного возврата ФПУ, характерная для спектров ФПУ "здоровой" молекулы ДНК и динамика основного возврата заменяется динамикой локальных возвратов. Следует подчеркнуть, что, несмотря на использование непрерывных уравнений для описания механических колебаний в модели молекулы ДНК вместо дискретной модели, которая обладает значительно большим разнообразием сценариев развития динамики, в результате исследования модели были получены все основные качественные закономерности изменения параметров колебаний концентраций клеток крови в зависимости от динамики колебаний в модели молекулы ДНК, что соответствует экспериментальным данным.

Однако система нелинейных дифференциальных уравнений для описания динамики колебаний концентраций всех клеток столь сложной системы как кровь получается громоздкой и неудобной для изучения. При ее исследовании ускользают главные закономерности процесса дифференцировки клеток крови. Для анализа этих процессов целесообразно изучать не изменения самих величин, а функции, описывающие динамику их изменений, а именно, Фурье спектры этих величин.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Чернавский Д. С., Чернавская Н. М. О колебаниях в темновых реакциях фотосинтеза. Колебательные процессы в биологических и химических системах. Тр. Всесоюзного симпозиума по колебательным процессам в биолог. и химич. системах, т. 1. М., Наука, 1967, с. 51.
- [2] Иванецкий Г. Р., Кринский В. И., Сельков Е. Е. Математическая биофизика клетки. М., Наука, 1978.
- [3] Жаботинский А. М. Концентрационные колебания. М., Наука, 1974.
- [4] Шноль С. Э. Синхронные в макрообъеме колебания АТФазной активности в концентрированных препаратах актомиозина. Колебательные процессы в биологических и химических системах. Тр. Всесоюзного симпозиума по колебательным процессам в биолог. и химич. системах, т. 2, Пущино на Оке, 1971, с. 20.
- [5] Березин А. А., Щеглов В. А. Краткие сообщения по физике ФИАН, N 6, 22 (2002).

- [6] Трумэн Д. Биохимия клеточной дифференцировки. М., Мир, 1976.
- [7] Морган Т. N. Embryology and Genetics, New York Columbia University Press, 1934.
- [8] Spiegelman S. Differentiation as the controlled production of unique enzymatic patterns. Symposia of the Society for experimental Biology, **2**, p. 286-325, London, England, 1948.
- [9] Березин А. А. Краткие сообщения по физике ФИАН, N 12, 27 (2002).

Институт общей физики РАН

Поступила в редакцию 29 апреля 2003 г.

После переработки 12 сентября 2003 г.