

УДК 577.31+577.171.53

ФИЗИЧЕСКИЙ ПОДХОД К МОДЕЛИРОВАНИЮ КОЛЕБАНИЙ КОНЦЕНТРАЦИИ КЛЕТОК КРОВИ ЗДОРОВОГО И БОЛЬНОГО ЛЕЙКОЗОМ ОРГАНИЗМА IN VITRO

А. А. Березин, В. А. Щеглов

Предложена физическая модель суточных и часовых колебаний концентраций сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов у мышей и у людей как здоровых, так и больных острым лейкозом и различными воспалительными заболеваниями. Модель записана в рамках связанных уравнений Ван дер Поля с запаздыванием. Получено хорошее соответствие решений модели экспериментальным данным.

Острый лейкоз – злокачественное опухолевое заболевание кроветворной системы, этиология и патогенез которого в настоящее время окончательно не выяснены. Среди всех других заболеваний кроветворной системы острый лейкоз занимает ведущее место, составляя от их общего числа около 50%. Среднегодовой показатель заболеваемости, по данным ряда авторов, в Европе колеблется от 3 до 5 на 100000 населения [1].

Данные эпидемиологических исследований позволяют в настоящее время утверждать, что в семьях людей, больных злокачественными новообразованиями, риск заболеваемости повышается почти в 5 раз [1]. Определенные генетические факторы также повышают риск заболеваемости лейкозом. Так, например, при синдроме Дауна возможность возникновения лейкоза возрастает приблизительно в 30 раз. При наличии острого лейкоза у одного из монозиготных близнецов возможность заболевания другого составляет около 25%, при развитии заболевания в возрасте до 5 лет – она увеличивается до 50%, а в возрасте до 1 года – приближается к 100% [2].

В настоящее время существует несколько теорий происхождения острого лейкоза, такие как вирусная, вирусно-генетическая, клоновая, теория системного возникновения этого заболевания и др.

В последнее время опубликовано большое число работ, посвященных вирусной этиологии лейкозов и других злокачественных новообразований. В этих работах главное значение отводится специфическим вирусам, которые могут находиться в здоровом организме в латентном состоянии и при определенных условиях проявлять свое патологическое действие, вызывая малигнизацию (злокачественное перерождение) клеток. К числу факторов, активирующих вирусный агент, относятся химические вещества, проникающая радиация и др. В результате исследований многих ученых в настоящее время выделены штаммы вирусов лейкозов кур и лейкоза мышей. Хотя вирусная теория происхождения лейкоза у животных получила свое экспериментальное подтверждение, результаты исследований не решили окончательно вопроса об этиологии лейкоза у человека и не привели к выделению вируса, который мог бы изучаться в качестве этиологического фактора.

То мнение, что лейкоз у человека является заболеванием опухолевой природы, поддерживаются большинством современных авторов. Общие закономерности развития лейкозов и опухолей, иногда имеющее место их сочетание, сходные нарушения обменных процессов, однотипность гормональных нарушений и наследственных влияний – все это говорит в пользу патогенетической общности лейкозов и злокачественных опухолей. Вместе с тем, между ними имеются некоторые отличия. Лейкозы характеризуются системностью поражения кроветворных органов и своим циклическим течением. Для злокачественных опухолей, напротив, характерно локальное возникновение процесса с последующей инфильтрацией соседних тканей, метастазированием и прогрессирующим течением заболевания.

Теория возникновения лейкоза, как системного заболевания, рассматривает лейкоз как болезнь, которая начинается одновременно во всей кроветворной системе из нормальных клеток в результате нарушения процесса их дифференцировки. Причиной этих нарушений считают экзогенные и эндогенные факторы. К экзогенным факторам относят специфические вирусы, проникающую радиацию и канцерогенные вещества. К эндогенным факторам можно отнести нарушение функционирования эндокринной системы организма, продукты нарушенного обмена веществ. Бластомогенным (лейкозогенным) действием могут обладать эндогенные соединения, относящиеся к классу стероидов (половые гормоны, желчные кислоты и др.).

В основе клоновой теории происхождения лейкозов лежит хромосомная мутация в какой-либо одной кроветворной клетке с последующим ее безудержным размножением и образованием клона патологических клеток. Причиной мутаций могут быть разно-

образные факторы (вирусы, радиация, различные физические и химические агенты и др.). С помощью клоновой теории удастся объяснить наличие хромосомных нарушений при лейкозах [3], предрасположение к заболеваемости острым лейкозом лиц с хромосомными абберациями (например, с болезнью Дауна и с аномалиями половых хромосом), развитие врожденных лейкозов, а также семейного лейкоза, в основе которых могут лежать различные эндогенные и экзогенные факторы, способствующие развитию мутаций с появлением новых наследственных свойств.

Вместе с тем, в настоящее время имеются работы [4, 5], в которых указывается на ограниченную способность лейкозных клеток к пролиферации. Последнее ставит под сомнение возможность образования клона опухолевых клеток из одной мутировавшей клетки, которая послужила началом развития лейкозного процесса.

Несмотря на то, что каждая из перечисленных теорий объясняет ряд явлений, наблюдающихся при возникновении и развитии лейкоза, ни одна из них не дает интегрального представления об этиологии и патогенезе этого заболевания. В связи с этим, целью данной работы является разработка физической модели острого лейкоза, которая включала бы в себя элементы всех перечисленных теорий.

Экспериментальные данные по исследованию колебательных характеристик ряда элементов крови у животных (мыши) и у человека. В целях изучения связи между колебаниями концентраций различных компонентов крови было проведено следующее экспериментальное исследование. Методика исследования суточных колебаний ряда параметров крови людей и животных состояла в следующем. Для опыта было взято 100 мышей – самцов в возрасте 3.5 мес. Из них 50 – линии АКР – мыши, у которых к возрасту в 9 месяцев в 98% случаев развивается острый лейкоз, и 50 – линии С57BL – беспородных здоровых мышей. Мыши обеих линий были рассажены по две в клетки и в течение всего периода наблюдения содержались на стандартной диете. Заборы крови для исследований производились у подопытных мышей в 9, 14, 18 и 21 час. Эти точки были выбраны в целях аппроксимации суточных колебаний концентраций нейтрофилов и лимфоцитов синусоидальной функцией с периодом 24 час. У каждого животного было сделано в течение трех суток по 12 анализов. Такое число анализов было необходимо для достаточно достоверной оценки амплитуды и фазы суточных колебаний исследуемых типов клеток крови. Кровь у мышей для анализов забиралась стандартным методом из вены хвоста. Мазки крови готовились на предметных стеклах, фиксировались метиловым спиртом и затем окрашивались по Романовскому–Гимза. Мазки крови изучались под микроскопом с увеличением $\times 1800$ и подсчитывалось процентное содержание сег-

ментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов на 100 лейкоцитов. В целях повышения достоверности процентное содержание упомянутых клеток подсчитывалось не менее чем в 200 полях зрения и одним и тем же цитологом. При этом, для повышения точности значений анализа производился дублирующий подсчет количества лейкоцитов с помощью целлоскопа ТОА СС108.

Исследование суточных колебаний концентраций сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов у людей производилось в группе из 50 здоровых доноров в возрасте от 19 до 45 лет мужского и женского пола по вышеупомянутой методике. В группе сравнения исследовалась кровь в группе больных в количестве 90 человек с солидными опухолями, лейкозами и воспалительными заболеваниями (пневмония, гепатит, туберкулез, ревматизм, послеоперационные осложнения воспалительного характера).

В связи с сильной вариацией продолжительности дня в течение года, в качестве стабильной суточной кривой была выбрана суточная вариация магнитного поля Земли. Анализ суточных вариаций магнитного поля Земли осуществлялся с помощью экспериментального параметрического магнетометра чувствительностью 1 гамма.

Все экспериментальные результаты подвергались статистическому анализу на компьютере методом наименьших квадратов в плане соответствия экспериментальных кривых "идеальной" синусоиде с периодом в 24 часа, имеющей максимальное значение в 9 час и минимальное в 21 час.

Анализ суточных ритмов крови мышей показал, что у здоровых мышей линии С57ВL минимальное и максимальное абсолютное содержание лимфоцитов наблюдалось соответственно в 21 и 9 час (рис. 1) [6]. Аналогичные фазовые характеристики наблюдались в группе здоровых людей для суточных колебаний абсолютных концентраций сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов (рис. 2) [7]. Фазовые характеристики суточных колебаний абсолютных концентраций лимфоцитов в группе мышей высоколейкозной линии АКР в возрасте 2,5, 4 и 6 месяцев были отличными от таковых в группе здоровых мышей [6]. Суть отличий состояла в том, что у высоколейкозных мышей кривые суточных концентраций лимфоцитов и нейтрофилов во всех возрастных группах пересекались и имели флуктуирующую фазу (рис. 3). Во всех случаях острого лейкоза и лимфосаркомы у людей в остром периоде заболевания фаза суточных колебаний концентраций исследуемых типов лейкоцитов не была стабильной, как у здоровых людей или больных заболеваниями воспалительного характера (рис. 4) [8]. Во время ремиссий происходила стабилизация фазы суточных ритмов. В группе людей, больных инфекционными и воспалительными заболеваниями, фаза суточных ритмов исследуемых концентраций

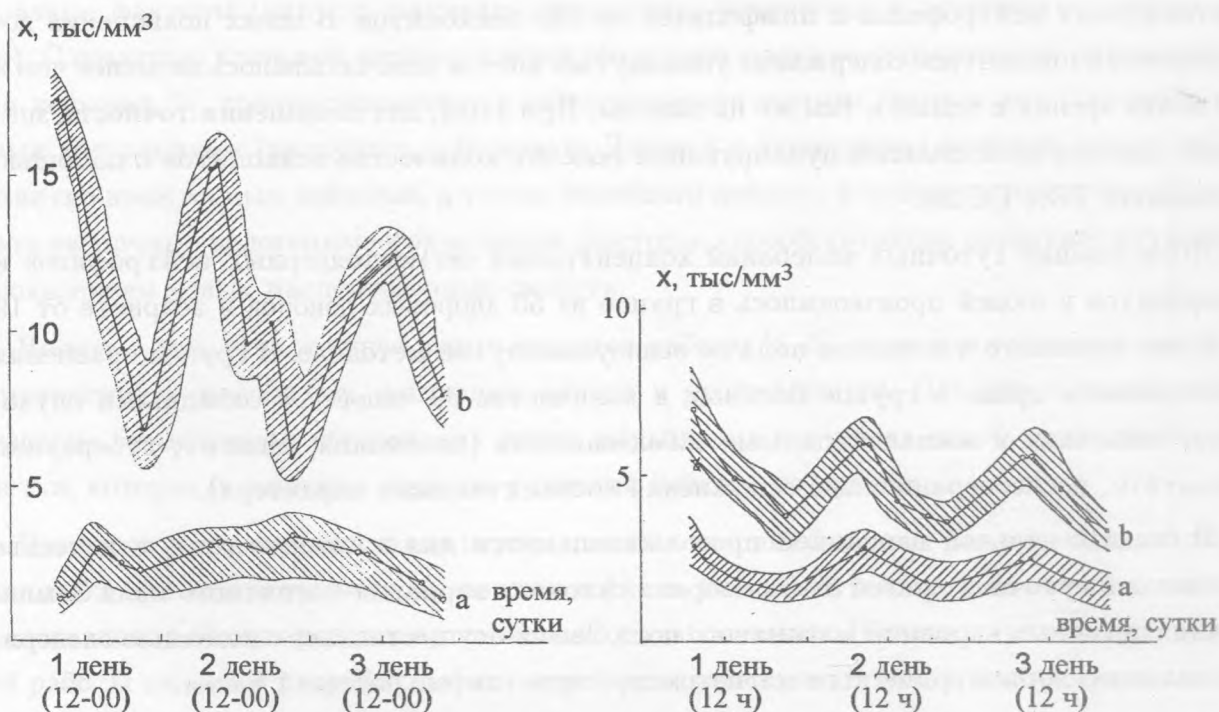


Рис. 1. Усредненные кривые суточных колебаний абсолютных концентраций x нейтрофилов (a) и лимфоцитов (b) в группе здоровых мышей линии C57BL в течение 3-х суток в возрасте 2.5, 4 и 6 месяцев.

Рис. 2. Усредненные кривые суточных колебаний абсолютных концентраций x нейтрофилов (a) и лимфоцитов (b) в группе здоровых людей в течение 3-х суток.

была аналогична фазе ритмов в крови здоровых людей, однако колебания концентраций этих типов лейкоцитов имели противофазный характер и в некоторых случаях резко увеличивалась амплитуда 12 часовой гармоника (рис. 4) [9].

Принимая во внимание полученные результаты, можно сделать вывод о том, что суточные колебания концентраций сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов имеют специфические отличия в случаях острого лейкоза и лимфосаркомы у людей и у мышей высоколейкозной линии АКР по сравнению с ритмами здоровых людей и здоровых мышей линии C57BL.

Математическая модель часовых колебаний концентраций сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов. В целях разработки математической модели острого лейкоза были осуществлены экспериментальные исследования колебаний сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов в крови здоровых доноров и больных острым лейкозом в усло-

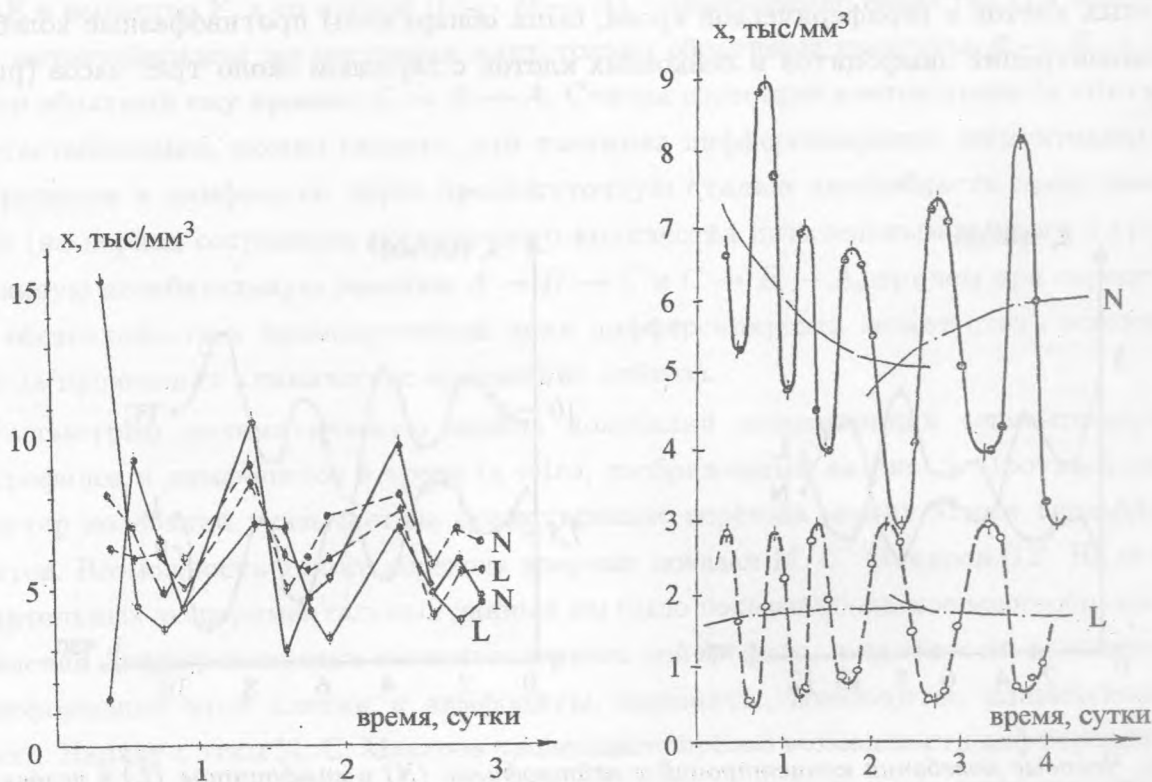


Рис. 3. Суточные колебания абсолютных концентраций x лимфоцитов (L) и сегментоядерных нейтрофилов (N) у мыши высоколейкозной линии АКР в возрасте 3.5 мес и 6.5 мес (исследование $N 6$); сплошная кривая – возраст 3.5 мес; штриховая кривая – возраст 6.5 мес.

Рис. 4. Характерный график концентрации x клеток в периферической крови больного ревматизмом. N – нейтрофилы, L – лимфоциты.

виях *in vitro*. В этих целях гепаринизированная кровь 20 здоровых доноров и 20 больных острым лейкозом в количестве 200 мл помещали в стерильный флакон и сохраняли при температуре $37^{\circ}C$ в течение 4.5 часов. Кровь во флаконах перемешивалась с помощью магнитных мешалок. Через каждые 15 минут производился забор крови для определения количества лейкоцитов в 1 мм^3 и подготовки мазка для подсчета лейкоцитарной формулы по описанной выше методике. Полученные результаты аппроксимировались 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 и лимфоцитов с периодом около трех часов (рис. 5) [10]. 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 с периодом около трех часов (рис. 6) [10].

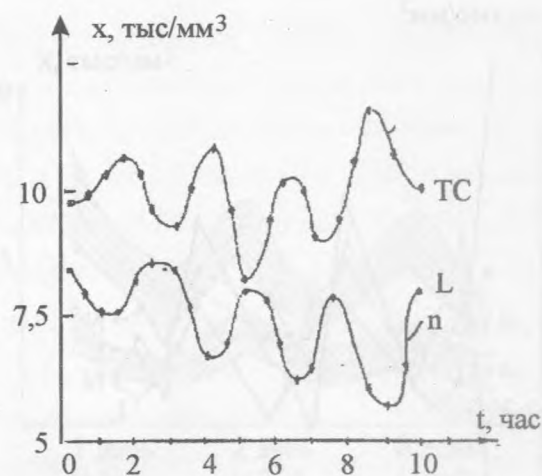
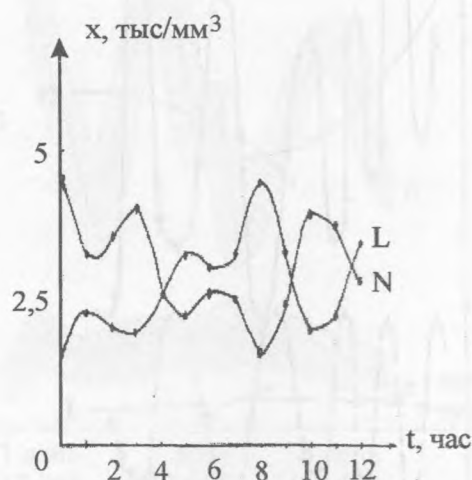


Рис. 5. Часовые колебания концентраций x нейтрофилов (N) и лимфоцитов (L) в условиях *in vitro* в крови здоровых доноров.

Рис. 6. Часовые колебания концентраций x лимфоцитов (L) и лейкозных (опухолевых) клеток (TC) в условиях *in vitro*.

Горизонтальная ось на обоих графиках — часы, вертикальная ось — абсолютные концентрации лейкоцитов в одном куб. миллиметре.

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 нем уравниваются не скорости прямой и обратной стадии одного и того же обратимого процесса, а скорости различных процессов, текущих в противоположные стороны. Схема этих превращений предложена М. В. Фоком и А. Р. Зарицким [11] и состоит в следующем. Например, скорость превращения $A \rightarrow B \rightarrow C$ равна скорости превращения $C \rightarrow D \rightarrow A$, но с этими цепочками реакций сопряжены два других необратимых процесса, благодаря которым как раз и поддерживается постоянство концентраций веществ A , B , C и D . С первой цепочкой ($A \rightarrow B \rightarrow C$) сопряжено превращение некоего веще-

ства E в вещество F , а со второй ($C \rightarrow D \rightarrow A$) – превращение вещества G в вещество H . В метастабильном же состоянии идут только обратимые процессы $A \rightarrow B \rightarrow C$ и строго обратный ему процесс $C \rightarrow B \rightarrow A$. Считая состояние клеток крови *in vitro* квазиметастабильным, можно сказать, что взаимная дифференцировка сегментоядерных нейтрофилов в лимфоциты через промежуточную стадию лимфобласта представляет собой (на период сохранения достаточного количества питательных веществ в крови) описанную колебательную реакцию $A \rightarrow B \rightarrow C$ и $C \rightarrow B \rightarrow A$, причем при определенных обстоятельствах промежуточный цикл дифференцировки может стать основным, и тогда происходит клиническое проявление лейкоза.

Рассмотрим математическую модель колебаний концентраций сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов в крови *in vitro*, изображенных на рис. 5. Противофазный характер колебаний указывает на существование перехода между этими типами лейкоцитов. Возможность такого перехода впервые показал М. С. Макаров [12]. На основе убедительных экспериментальных данных им было показано большое многообразие направлений дифференцировки сегментоядерного нейтрофила, в частности, возможность трансформации этой клетки в лимфоциты, моноциты, миелоциты, плазматические клетки. Наряду с этим М. С. Макаров продемонстрировал возможность дифференцировки лимфоцитов в сегментоядерные нейтрофилы. Поскольку процесс дифференцировки клеток обусловлен активностью различных групп генов, будем полагать, что белки, синтезируемые лимфоцитами, могут проникать внутрь сегментоядерных нейтрофилов и путем активации определенных генов в этих клетках вызывать их трансформацию в лимфоциты. В свою очередь, белки, синтезируемые сегментоядерными нейтрофилами, диффундируя в лимфоциты, приводят к дифференцировке последних в нейтрофилы. Процесс взаимной дифференцировки этих клеток математически может быть записан следующим образом:

$$\begin{aligned} \frac{dC_N}{dy} &= C_L, \\ \frac{dC_L}{dx} &= C_N, \end{aligned} \quad (1)$$

где C_N, C_L – абсолютные концентрации соответственно сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов в крови *in vitro*, x и y – концентрации белков, синтезируемых сегментоядерными нейтрофилами и лимфоцитами соответственно. При этом процесс динамического перехода между этими типами клеток может быть описан в рамках механизма специализации клеток, предложенного М. В. Фоком [11].

В связи с тем, что сумма абсолютных концентраций указанных типов клеток в исследуемом объеме клеток остается с течением времени постоянной, т.е. $C_N + C_L = \text{const}$, одно из решений системы (1) может быть записано следующим образом:

$$\begin{aligned} C_N &= C_1 e^y - C_2 e^{-y}, \\ C_L &= C_3 e^x - C_4 e^{-x}, \end{aligned} \quad (2)$$

где C_1, C_2, C_3, C_4 – константы.

Рассматривая независимо оба процесса периодического синтеза белков сегментоядерными нейтрофилами и лимфоцитами, запишем автоколебания производных концентраций указанных белков в крови *in vitro* с помощью уравнений Ван дер Поля:

$$\begin{aligned} \frac{d^2 y}{dt^2} + \varepsilon_2 (y^2 - 1) \frac{dy}{dt} + 4\Omega^2 y &= F_2(t), \\ \frac{d^2 x}{dt^2} + \varepsilon_1 (x^2 - 1) \frac{dx}{dt} + \Omega_0^2 x &= F_1(t), \end{aligned} \quad (3)$$

где $\varepsilon_1, \varepsilon_2 < 1$ отражают коэффициенты нелинейности, определяемые механизмом синтеза белков сегментоядерными нейтрофилами и лимфоцитами; $F_1(t), F_2(t)$ – случайные функции, отражающие влияние хаотических тепловых флуктуаций в электролите плазмы крови на концентрации x и y . Параметрическое соотношение частот в уравнениях соответствует экспериментальным данным.

Следующим этапом моделирования является математическая запись связи между уравнениями в системе (3). В рамках модели диффузия белков, синтезируемых лимфоцитами, внутрь сегментоядерных нейтрофилов приводит с некоторым запаздыванием T_x к дифференцировке последних в лимфоциты с последующим синтезом ими уже лимфоцитарных белков. Аналогичный процесс с запаздыванием T_y происходит с лимфоцитами. Математически этот закон взаимного перехода записывается следующим образом:

$$\begin{aligned} x^2 &= y^2 + \frac{d(y^2)}{dt} T_x, \\ y^2 &= x^2 + \frac{d(x^2)}{dt} T_y. \end{aligned} \quad (4)$$

Времена запаздывания T_x и T_y определяются временем взаимной дифференцировки клеток. С учетом (4) связанная система будет выглядеть следующим образом:

$$\frac{d^2 x}{dt^2} + \varepsilon_1 \left(y^2 + \frac{d(y^2)}{dt} T_x - 1 \right) \frac{dx}{dt} + \omega_0^2 = a_1 F_1(t),$$

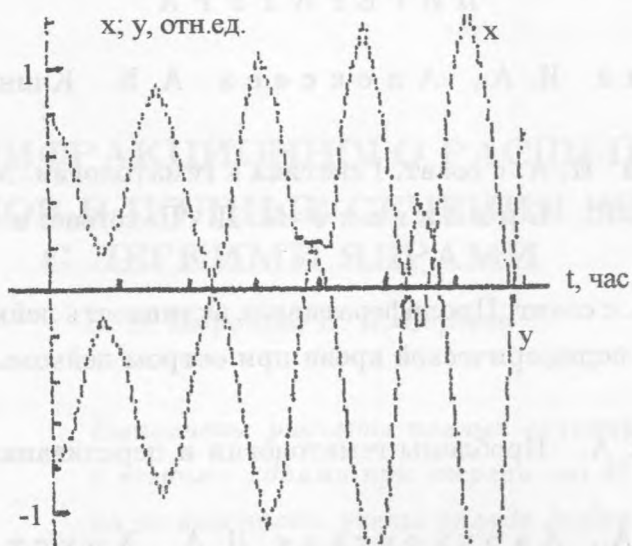


Рис. 7. Результат математического моделирования часовых колебаний концентраций нейтрофилов (x) и лимфоцитов (y) в условиях *in vitro*.

$$\frac{d^2y}{dt^2} + \varepsilon_2 \left(x^2 + \frac{d(x)}{dt} T_y - 1 \right) \frac{dy}{dt} + 4\omega^2 = a_2 F_2(t). \quad (5)$$

Система (5) была исследована на компьютере. Как видно из рис. 7, характер полученных решений указывает на их качественное соответствие экспериментальным данным. В частности, если подставить решения для x и y в уравнения (1), то получим кривые, соответствующие экспериментальным графикам, изображенным на рис. 5.

Особый интерес вызывает моделирование ситуации, когда в крови *in vitro* наряду с сегментоядерными нейтрофилами и лимфоцитами присутствуют лейкоэмические клетки – лимфобласты (рис. 6). Поскольку колебания абсолютной концентрации лимфобластов изменяются противофазно с колебаниями абсолютной концентрации лимфоцитов, лейкоэмические клетки крови принимают непосредственное участие в колебательной динамике дифференцировки клеток крови в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Этот интереснейший и практически важный для лечения больных лейкозом вопрос мы рассмотрим в следующей работе.

Светлой памяти жены одного из авторов Леночки Березиной, умершей от лейкоза в 20 лет.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] К а с с и р с к и й И. А., А л е к с е е в А. Б. Клиническая гематология, Медицина, 1971.
- [2] К а с с и р с к и й И. А. с соавт. Генетика в гематологии. М., 1967.
- [3] В о р о б ь е в А. И., Б р и л л и а н т М. Д. Патогенез и терапия лейкозов. М., 1979.
- [4] А в е р б а х А. Б. с соавт. Проллиферативная активность лейкемической популяции костного мозга и периферической крови при остром лейкозе. Лаб. Дело N 2, 1978, с. 16-21.
- [5] А л м а з о в В. А. Проблемы гематологии и переливания крови. М., N 12, 31 (1969).
- [6] П а в л о в а Л. А., Х а р ь к о в с к а я Н. А., Х р у с т а л е в С. А., Б е р е з и н А. А. Гематология и переливание крови. N 2, 23 (1982).
- [7] М а х о н о в а Л. А., П е т е р с о н И. С., М а я к о в а С. А., и др. Педиатрия, N 8, 16 (1979).
- [8] М а х о н о в а Л. А., Б у а ч и д з е Л. Н., М а я к о в а С. А., и др. Педиатрия, N 12, 5 (1979).
- [9] М а х о н о в а Л. А., М а я к о в а С. А., Б е р е з и н А. А., Г у б а р е в К. М. Труды 9 международного симпозиума по сравнительному изучению лейкоза и сопутствующих заболеваний. Сухуми, 1979, с. 48-52.
- [10] Б е р е з и н А. А. с соавт. Труды первой украинской конференции гематологов и трансфузиологов. Киев, 1980, с. 92-93.
- [11] Ф о к М. В. Краткие сообщения по физике ФИАН, N 4, 30 (1999).
- [12] М а к а р о в М. С. Роль гранулоцитов в процессе воспалительной регенерации по данным сравнительного цитологического исследования. Ставрополь, 1975, 260 с.

Поступила в редакцию 15 мая 2002 г.