

ОБРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ

УДК 578.087.1

Л. А. АНДРИАНОВ, В. С. КИРИЧУК

(Новосибирск)

ИЗУЧЕНИЕ АГРЕГАЦИИ ЖИВЫХ КЛЕТОК КУЛЬТУРЫ ТКАНИ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА АМПЛИТУДНО-ВРЕМЕННОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ СИГНАЛОВ КОНДУКТОМЕТРИЧЕСКОГО ДАТЧИКА

Важнейшим свойством живых клеток является их способность объединяться в агрегаты [1]. Изучение динамики образования агрегатов представляет особый интерес, так как позволяет оценить изменения, вносимые в этот процесс физиологическим состоянием клетки, а также нарушения способности к агрегации в патологии и при действии различных стимулов [2].

Методы изучения динамики агрегации достаточно разнообразны [2], но так как для получения достоверных количественных оценок требуется, как правило, представительная статистика, перспективными следует считать экспериментальные подходы, позволяющие применить средства автоматизации.

Кондуктометрический способ измерения объемов микрочастиц и, в частности, клеток неоднократно описан в литературе [3]. Этот метод может быть реализован с использованием автоматизированной системы сбора и обработки экспериментальных данных.

На основе кондуктометрического метода измерения объемов в сочетании с автоматической системой сбора и обработки данных был проведен анализ клеточных популяций с использованием многопараметрических математических моделей (ММ), как учитывающих [4], так и не учитывающих [5] явления агрегации исследуемых клеток.

В работе [5] было показано, что объем является устойчивым параметром для отдельных фаз митотического цикла и распределение по объемам одиночных клеток смешанной популяции может быть представлено суперпозицией распределений, соответствующих спектрам объемов для отдельных фаз. В работе [4], используя полученные в [5] параметры объемов фаз и постулируя постоянство способности к агрегации для клеток, принадлежащих к одной фазе, авторами показано увеличение этой способности в начале митотического цикла для клеток, имеющих, согласно [5], малый объем. Следует заметить, что хорошее соответствие экспериментальных данных и модельного математического описания может объясняться не только соответствием модели и изучаемого явления, но и хорошими аппроксимационными возможностями многопараметрической ММ. Уменьшение числа свободных параметров ММ без резкого ухудшения оценок согласия можно считать доказа-

тельством ее избыточности, а следовательно, и несоответствия описываемому процессу. В частности, может быть рассмотрена ММ, не учитывающая зависимости изменений способности клеток к агрегации от их объема.

В рамках этой гипотезы система дифференциальных уравнений, описывающая динамику распределения частиц по объемам, имеет вид

$$\frac{dn(v, t)}{dt} = -\alpha n(v, t) \int_{v_{\min}}^{\infty} n(v^*, t) dv^* + \alpha \int_{\substack{v-v^* > v_{\min}; \\ v^* > v_{\min}}}^{\infty} n(v-v^*, t)n(v^*, t) dv^*. \quad (1)$$

Здесь $n(v, t)$ — число частиц объема v , измеренное в момент времени t ; α — коэффициент скорости агрегации; v_{\min} — минимально возможный объем клетки. Первый член в формуле (1) характеризует уход частиц объема v за счет объединения их со всеми остальными, второй — приход частиц за счет образования агрегатов объема v . Справедливость описания (1) проверялась на массовых экспериментальных данных, представляющих собой серии распределений частиц по объемам, снятых в различные моменты времени. В каждой серии методом градиента оценивался параметр α ; в качестве начальных условий принималось распределение, полученное в начальный момент времени. Распределения регистрировались каждые 1800 с и состояли из 28 измерений.

На рис. 1 показана динамика изменений распределений клеток по объемам, полученная по методике, описанной в [4] [сплошными линиями изображены экспериментальные спектры объемов, пунктиром — рассчитанные по формуле (1)]. Временные интервалы между спектрами равны 1800 с. В качестве начальных условий для дифференциального уравнения (1) было взято экспериментальное распределение, соответствующее $t=0$ (на рисунке отсутствует).

Видимое расхождение экспериментальных и рассчитанных на основе (1) распределений, а также нормированные на дисперсию случайного шума суммы квадратов отклонений I , рассчитанных для каждой пары кривых ($I \in \chi_{28}^2$), наглядно показывают, что предположение $\alpha = \text{const}$ не может быть принято и следует строить ММ, учитывающую зависимость способности к агрегации от объема, что и было сделано авторами [4]. Таким образом, состав агрегатов, по-видимому, не случаен: они должны состоять преимущественно из клеток небольшого объема.

Наиболее сильным подтверждением правильности модели можно считать получение сходных оценок или хотя бы качественных характеристик изучаемого явления на основе измерения других величин в эксперименте. Такое исследование было проведено с использованием

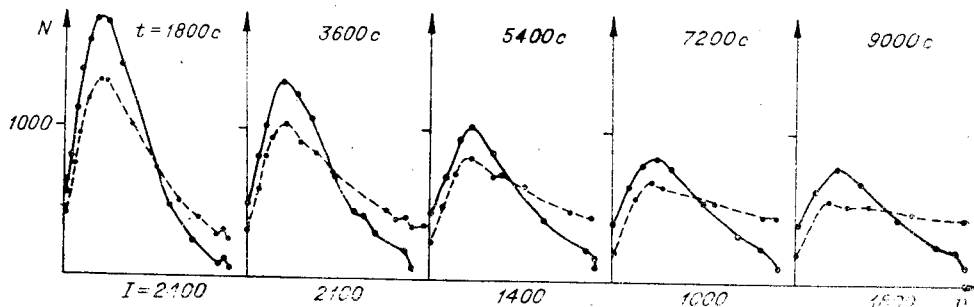


Рис. 1.

автоматизированной системы сбора и обработки экспериментальных данных, которая, помимо амплитуды импульса (амплитуда пропорциональна объему проходящей через датчик клетки) от кондуктометрического датчика, регистрировала временные интервалы между импульсами, а следовательно, и между последовательно поступающими в датчик клетками.

В случае если появление частиц в измерительном пространстве датчика носит случайный характер, интервалы времени между последовательно проходящими датчик частицами должны быть распределены по экспоненциальному закону с плотностью распределения вероятностей.

$$P(t) = \lambda e^{-\lambda t}. \quad (2)$$

Гистограмма распределения интервалов, полученных по результатам измерений 400 000 частиц (время сбора $\cong 600$ с), приведена на рис. 2 (пунктирная кривая).

Попытка аппроксимировать эту гистограмму распределением (2) (сплошная линия) показала, что согласование экспериментального и модельного распределений хорошее в области достаточно длительных интервалов и значительно хуже при коротких интервалах. В связи с этим было выдвинуто следующее предположение: распределение частиц по интервалам после некоторого t_k (t_k — критическое время) подчиняется распределению (2), а при интервалах, меньших t_k , происходит изменение распределения за счет увеличивающегося вклада частиц, появившихся из распавшихся перед входом в датчик агрегатов. Если такое предположение справедливо, то частицы, идущие с малыми интервалами, наиболее вероятно принадлежат к «бывшим» агрегатам и их распределение по объемам должно соответствовать составу агрегатов.

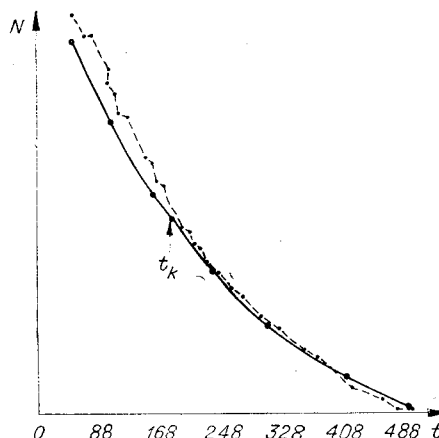


Рис. 2.

Критическое значение интервала, при котором происходит нарушение зависимости (2), определяем по динамике поведения суммы квадратов. Точка считается критической, если величина

$$I_i = \sum_{t_j=t_i}^{t_N} (n_j - \hat{N}\hat{\lambda}e^{-\hat{\lambda}t_j})^2. \quad (3)$$

Здесь t_i — текущее значение границы; n_j — число частиц, интервал следования которых лежит в диапазоне $(t_j, t_j + \Delta t)$; \hat{N} , $\hat{\lambda}$ — оценки неизвестных параметров распределения, полученные по методу наименьших квадратов. Точка считается критической, если величина

$$F_i = \frac{\frac{1}{(N_i - N_{i-1})} (I_i - I_{i-1})}{\frac{1}{(N_i - 2)} I_{i-1}}, \quad (4)$$

распределенная по закону Фишера * F с $(N_i - N_{i-1})$ и $N_i - 2$ степенями

* Поскольку анализируется достаточно большое число частиц, то в силу центральной предельной теоремы распределение шума гистограммы близко к нормальному.

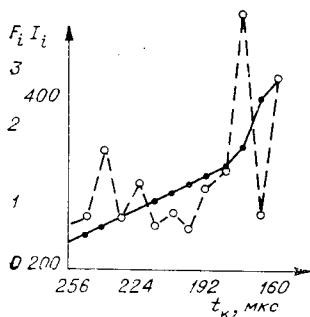


Рис. 3.

свободы, превосходит α -квантиль распределения Фишера [6]. Здесь N_i — число точек, по которым получены I_i . На рис. 3 приведены кривые F_i и I_i , которые наглядно показывают, что критической точкой необходимо считать интервал длительностью 176 мкс ($F_i \in \in F_{8,334} > 3,7$). Дисперсия аппроксимации $S = \frac{I_i}{N_i - 2} = 1024$ при интервале аппроксимации 176—512 мкс и при числе анализируемых частиц 206 000.

Теперь, зная t_k , строим распределение частиц по объемам до и после критического интервала. Разница этих распределений будет характеризовать распределение частиц, на которые разбиваются агрегаты перед измерительным отверстием.

Действительно, пусть двумерная функция плотности распределения частиц по интервалам и объемам имеет вид:

$$\begin{aligned} \rho_1(v, t) &= \varphi(v)\psi(t) + f(v, t) + \xi(v, t), & t \leq t_k; \\ \rho_2(v, t) &= \varphi(v)\psi(t) + \xi(v, t), & t > t_k. \end{aligned}$$

Здесь $f(v, t)$ описывает изменения распределения, которые вносит распад агрегатов; $\psi(t)$ — экспоненциальное распределение; $\varphi(v)$ — распределение частиц по объемам, которое в отсутствие распада частиц в силу наших предположений не должно зависеть от интервала следования; $\xi(v, t)$ — шум. Нам необходимо определить то изменение в распределении, которое вносит распад частиц, т. е.

$$f(v) = \int_{t_{\min}}^{t_k} f(v, t) dt \quad (5)$$

(t_{\min} — минимальный регистрируемый интервал). Интегрируя распределения по t , получаем

$$f(v) = \int_{t_{\min}}^{t_k} \rho_1(v, t) dt - \int_{t_k}^{\infty} \rho_2(v, t) dt \int_{t_k}^{t_{\min}} \psi(t) dt \bigg/ \int_{t_k}^{\infty} \psi(t) dt. \quad (6)$$

Вид функции $f(v)$ и ее сглаженное значение приведены на рис. 4.

Первый член (6) характеризует распределение частиц, на которое распались агрегаты, второй — распределение агрегатов, которые распались в процессе измерения.

Сравнительно небольшое количество клеток, вошедших в разностное распределение ($\sim 10\,000$ из $\sim 400\,000$, что составляет $\sim 1,5\%$ в случае, если разбивались агрегаты, состоящие из двух клеток), и большое количество оставшихся агрегатов (100 000 частиц) с объемом, превышающим самую крупную одиночную клетку, позволяют утверждать, что вероятность распа-

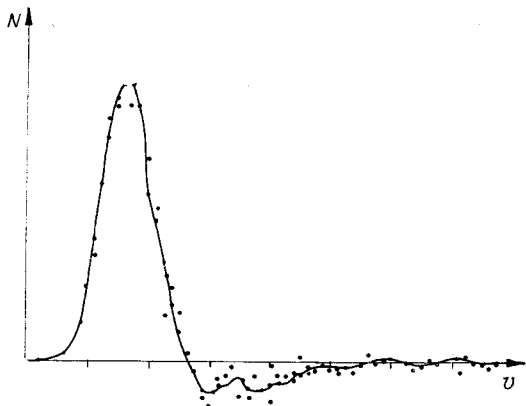


Рис. 4.

да агрегата при входе в датчик скорее зависит от его траектории, чем от состава. Характер разностного распределения (см. рис. 4) соответствует распределению первых двух фаз, для которых авторами [4] была найдена высокая способность к агрегации. Полученный результат прямо подтверждает правомерность ММ, построенной в [4], и косвенным образом — ММ, предложенную в [5], поскольку описываемый в настоящей работе подход можно считать независимым.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. Поликар. Поверхность клетки и ее микросреда. М., «Мир», 1975.
2. Действие физиологически активных соединений на биологические мембраны. Под ред. Л. А. Пирузяна, М. Б. Паперной. М., «Наука», 1974.
3. Ф. М. Рабинович. Кондуктометрический метод дисперсионного анализа. Л., «Химия», 1970.
4. В. А. Иванов, Г. А. Иванченко, Г. А. Кожемякин. О построении математической модели кинетики агрегации клеток в различных фазах митотического цикла. — «Автометрия», 1976, № 1.
5. Л. А. Андрианов, М. А. Ахаметьев, О. П. Федорова, Е. В. Хижняк, Б. М. Штокман, М. И. Штокман. Автоматизированный анализ митотического цикла L-клеток по спектрам объемов. — «Автометрия», 1975, № 6.
6. А. М. Искольдский, В. С. Киричук. Обработка результатов эксперимента, описываемого математической моделью с особыми точками. — «Автометрия», 1975, № 4.

Поступила в редакцию 7 июля 1975 г.

УДК 62—505+62—506

В. А. ИВАНОВ, Г. А. ИВАНЧЕНКО, Г. А. КОЖЕМЯКИН

(Новосибирск)

О ПОСТРОЕНИИ МАТЕМАТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ КИНЕТИКИ АГРЕГАЦИИ КЛЕТОК В РАЗЛИЧНЫХ ФАЗАХ МИТОТИЧЕСКОГО ЦИКЛА

Введение. В последнее время автоматизация биологического эксперимента находит все большее признание, что позволяет резко повысить эффективность исследований. Важная роль в этом принадлежит обработке результатов эксперимента, которая может быть успешной при наличии обоснованной математической модели (ММ).

Механизмы и динамика адгезивных взаимодействий между клетками интенсивно изучаются как в СССР, так и за рубежом. Отмечается несомненная роль клеточной адгезии в становлении многоклеточности и в эмбриогенезе [1, 2]. События в отдельно взятой клетке нельзя рассматривать без учета состояния клеточной популяции в целом [3—5]. Состоянию межклеточного контакта не без основания отводится решающая роль в саморегуляции клеточного роста, что наглядно показано при патологической трансформации нормальных клеток в опухолевые (см., например, [6]).

Поскольку блокада клеточного деления при контактном торможении происходит не в любой фазе митотического цикла, а лишь в наиболее чувствительной к такому воздействию — пресинтетической фазе (подробнее см. [7]), то можно предположить, что адгезивные свойства клеток в этой фазе отличаются от таковых в других фазах, т. е. состоя-