

УДК 577.24

Возрастная потеря клеточности: исследование *in silico*

В.А. Чистяков, Ю.В. Денисенко

ВЛАДИМИР АНАТОЛЬЕВИЧ ЧИСТЯКОВ — кандидат биологических наук, заведующий лабораторией экспериментального мутагенеза НИИ Биологии Южного федерального университета. Область научных интересов: биохимия и биофизика окислительного стресса.
E-mail vladimirchi@yandex.ru, тел. 8(863)243-39-67

ЮРИЙ ВИКТОРОВИЧ ДЕНИСЕНКО — старший научный сотрудник НИИ биологии Южного федерального университета. Область научных интересов: компьютерное моделирование биологических процессов.

344104 Ростов-на-Дону, просп. Стачки, 194/1, НИИ Биологии Южного федерального университета.

Введение

Одновременное существование множества противоречащих теорий старения отражает системный кризис современной геронтологии. Один из подходов, облегчающих построение единой теории старения, может быть основан на некоем базовом методологическом аппарате, использующем на достаточно очевидные послышки, принимаемые большинством биологов. Ввиду сложности этой задачи, определяемой многообразием явлений, сопутствующих старению (биохимических, генетических, цитологических и др.), можно решать ее по частям, рассматривая последовательно отдельные стороны феномена старения. Выявленные при этом частные закономерности должны быть сведены воедино в рамках предполагаемого будущего синтеза.

В данной работе предпринята попытка реализации такого подхода применительно к исследованию феномена потери клеточности постмитотических тканей. Уменьшение количества клеток, составляющих ткани и органы, представляется одним из наиболее простых и поэтому надежных механизмов прогрессирующего с возрастом ослабления жизнеспособности многоклеточного организма. Важность этого процесса для старения млекопитающих достаточно хорошо показана [1—4]. Очевидно также, что старение взрослых особей (имаго) двукрылых, к которым относится один из наиболее изученных объектов экспериментальной геронтологии — плодовая мушка *Drosophila melanogaster*, обусловлено преимущественно старением постмитотических тканей [5, 6].

В настоящее время накоплено достаточно фактов, на основе которых можно построить модель возрастной потери клеточности, позволяющей учитывать замедление этого процесса геропротекторами. Ее логические предпосылки следующие.

- Постмитотические клетки способны генерировать вещества, индуцирующие программируемую клеточную смерть [7], например таким веществом является пероксид водорода. (Далее в качестве индуктора программируемой клеточной смерти будем рассматривать в общем виде некое вещество X и также символом X обозначать количество этого вещества; нам не хотелось бы конкретизировать природу такого вещества до выяснения механизма потери клеточности.)
- При достижении какого-то предела количества вещества X , выработанного за промежуток времени, который можно назвать циклом, срабатывает механизм самоликвидации биологической клетки.
- Среднее количество вещества X , вырабатываемое в клетках за цикл, составляет величину ниже порога самоликвидации.
- Поскольку количества X , вырабатываемые различными клетками, взаимно слабозависимы, распределение величины X будет подчиняться нормальному закону (распределение Гаусса). Как будет видно из дальнейшего изложения, наличие у функции распределения величины X коэффициентов асимметрии и эксцесса не меняет анализируемых закономерностей принципиально. Главное, чтобы функция распределения X при стремлении аргумента к бесконечности асимптотически приближалась к нулю. Поскольку такая кривая не пересекается с осью абсцисс, теоретически могут существовать сколь угодно большие отклонения от среднего значения X .
- В клеточной популяции при средней выработке X ниже порога самоликвидации постоянно будут существовать клетки, которые способны генерировать вещество X в количестве выше порога самоликвидации.

Примем, что величина Ua (рис. 1) — это пороговое значение X , при превышении которого запускается ме-

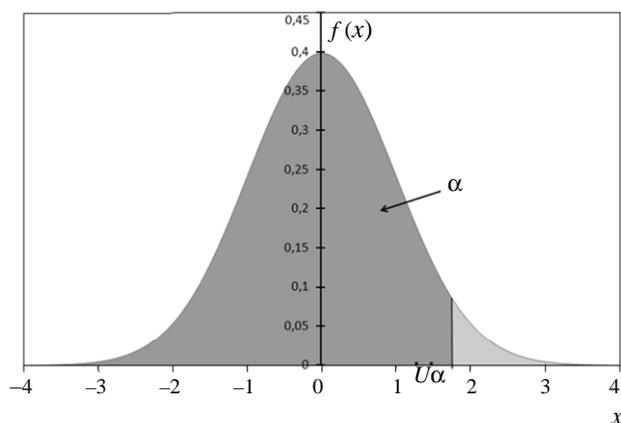


Рис. 1. Кривая нормированного нормального распределения величины X

ханизм самоликвидации клетки. Тогда величина $1 - \alpha$ (α — площадь темной области на рис. 1) будет равна доле клеток, погибающих в течение цикла (поскольку на рис. 1 приведена нормированная гауссова кривая, то общая площадь под кривой равна единице). Сдвигая величину $U\alpha$ и/или изменяя стандартное отклонение σ распределения величины X (для нормированного распределения $\sigma = 1$), экспериментаторы (в реальности эволюционирующие живые системы) получают возможность регулировать скорость потери клеточности, а следовательно, и скорость старения. Даже поверхностный визуальный анализ (см. рис. 1) убеждает, что незначительные сдвиги $U\alpha$ могут вызывать большие изменения величины $(1 - \alpha)$.

Конкретизируя биологический смысл рассматриваемых процессов, можно предположить, что слабые, многократно повторяющиеся воздействия, например постоянное введение малых доз герпротекторов, способны значительно замедлять старение.

Методика исследования *in silico* действия герпротекторов

Для количественного подтверждения изложенной выше концепции была создана многоагентная имитационная модель популяции клеток с использованием подходов, изложенных в работе [8]. Модель реализована на языке Java2. При ее построении использованы алгоритмы, взятые из работы [9].

Следует отметить, что задача моделирования популяции клеток в тривиальной постановке, когда агенты (клетки, особи) пассивны и неразличимы, может быть решена аналитически. Однако применение многоагентной имитационной модели позволяет поэтапно наращивать сложность задачи, не меняя саму модель концептуально. Более того, такой подход не требует априорных знаний о закономерностях поведения системы. Напротив, исследователь, изучая индивидуальное поведение агента (клетки), может выявить глобальные закономерности поведения системы (организма) как целого, которые формируются как результат взаимодействия аген-

тов со средой и друг с другом. Фактически нахождение таких закономерностей и является одной из целей исследования биологического объекта.

Мы полагаем, что многоагентная модель, дискретная, децентрализованная, стохастическая и возможно асинхронная, будет точнее отражать поведение биологического объекта, чем непрерывная аналитическая модель [10].

В представленной работе использовалась многоагентная модель, состоящая из 2000 агентов, из них 1000 агентов вводятся в эксперимент, а 1000 составляют контрольную группу.

Методика эксперимента заключается в следующем. Задается время существования биологической модели в условных циклах. Считается, что каждый агент модели (клетка) вырабатывает некую субстанцию X , причем ее выработка за цикл подчиняется нормальному закону распределения с задаваемым стандартным отклонением. Задается пороговое значение количества X , превышение которого ведет к гибели агента. Начиная с некоторого цикла, уменьшают математическое ожидание вырабатываемого количества субстанции X на некоторую задаваемую величину. Проводя биологические аналогии, можно сказать, что агенту по графику дают препарат (герпротектор), который уменьшает выработку вещества X . Рассчитывают количество выживших клеток в каждом цикле.

Существует возможность задания параметров для каждого агента индивидуально, задания местоположения каждого агента, взаимодействия между агентами и т.д., однако ради простоты эксперимента эти возможности в первом приближении не использовались. (С работой данной модели можно ознакомиться на сайте <http://www.winmobile.biz/shou/demoApp.php>)

Результаты эксперимента и их обсуждение

Рис. 2 демонстрирует запись результатов компьютерного исследования возрастной потери клеточности с использованием разработанной модели. Средняя величина выработки X в данном случае составляет 100 ед., отклонение — 20 ед., пороговое значение X — 158 ед., уменьшение среднего значения X под действием герпротектора — 5 ед. На рисунке видно, что хотя пороговое значение вещества X превышает его среднюю выработку в 1,58 раза или на $\sim 3\sigma$, примерно две клетки контрольной популяции погибают в каждом цикле.

Препарат начинают вводить в модель (уменьшать количество X) с 200-го цикла (рис. 2А). До 200-го цикла (до момента введения протектора) процент гибели клеток в контрольной и экспериментальной группах примерно одинаков. К 200-му циклу в обеих группах выживаемость клеток составила $\sim 72\%$ (погибло 28%). С 200-го цикла, когда начал применяться препарат, выживаемость клеток в экспериментальной группе заметно возросла. К 371-му циклу в контрольной группе погибла половина агентов, а в экспериментальной группе к этому моменту погибло $\sim 39\%$ клеток.

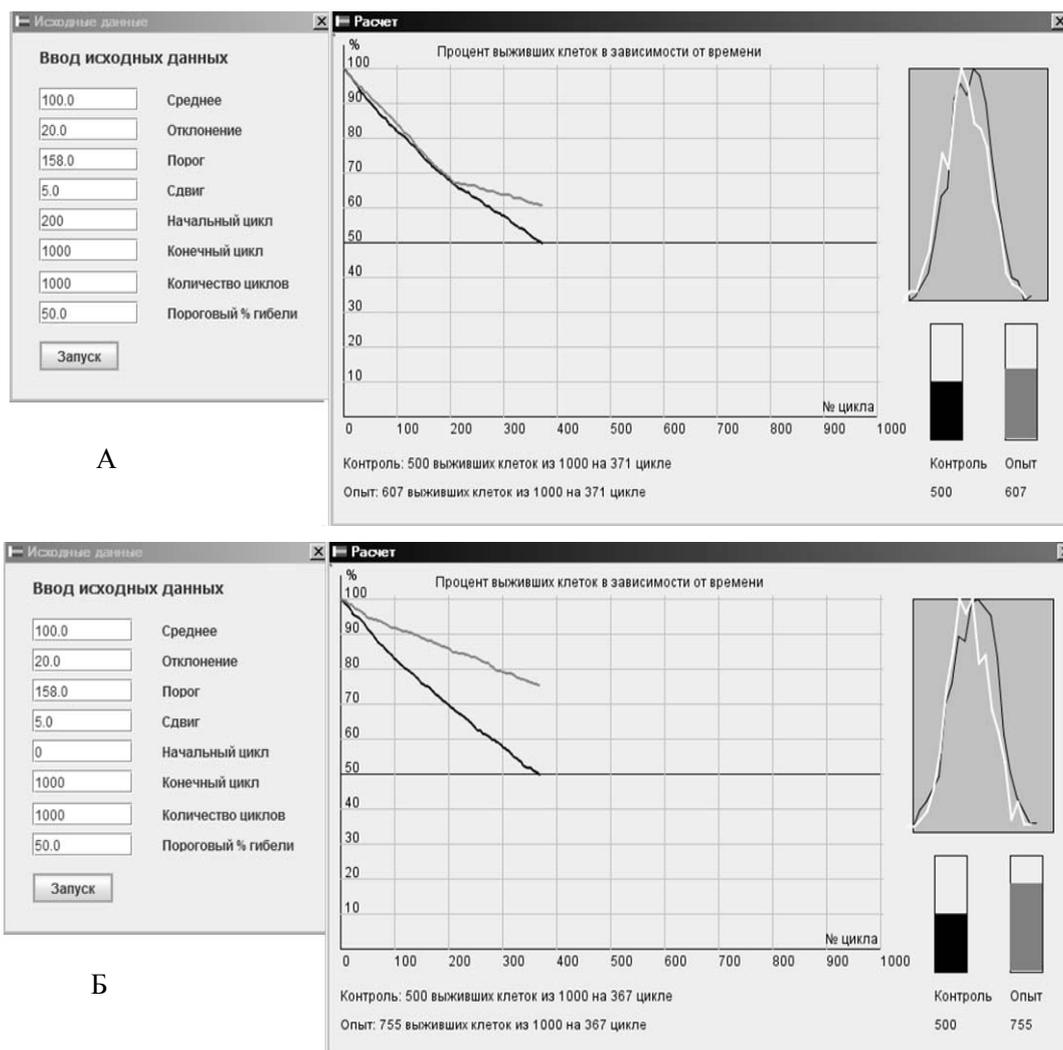


Рис. 2. Компьютерное моделирование действия геропротектора на выживаемость клеток при введении его с 200-го цикла (А) и с нулевого цикла (Б)

При введении протектора с нулевого цикла (рис. 2Б) разница в выживаемости клеток опытной и контрольной популяций составила к 367-му циклу 24,5%. В опытной популяции 50%-ный уровень выживаемости достигает только к 800-му циклу.

Примечательно, что такая значительная прибавка выживаемости получена при действии протектора, снижающего среднее значение X всего на 5 ед. (5%). Этот сдвиг практически неразличим при исследовании методами вариационной статистики (см. кривые распределения в верхнем правом углу рис. 2). Таким образом, имитационный подход позволяет создавать модели процесса функциональной кумуляции, в которых сверхслабые, статистически неразличимые, многократно повторяющиеся воздействия приводят к значительному физиологическому эффекту.

Разработанная нами модель даже в данном несовершенном виде вполне пригодна для моделирования физиологических эффектов геропротекторов. Предположим, что анализируемая популяция — это клетки некой

железы мыши, а продолжительность цикла равна одному дню. Допустим, что 60%-ная потеря численности клеток ведет к снижению выработки секрета, который инициирует выпадение вибрисс*. При условиях, отображенных на рис. 2, у контрольных животных потеря вибрисс будет начинаться на 500-й день жизни, что близко к реальной ситуации. Модельный эксперимент показывает (табл. 1), что даже 2%-ный сдвиг количества X дает заметную отсрочку начала потери вибрисс, а 5%-ное снижение средней выработки индуктора программируемой клеточной смерти ведет к отдалению начала этого процесса за пределы жизни виртуальной мыши — 1000 циклов. Отметим, что эта ситуация напоминает действие препарата SkQ1 (10-(6'-пластохинонил)децилтрифенилфосфоний), антиоксиданта нового поколения, разработанного В.П. Скулачёвым с соавт. специально для задач практической геронтологии [11, 12]. Прини-

* Чувствительные волоски, обеспечивающие ориентировку грызунов в пространстве.

Таблица 1

Оценка отсрочки потери клеточности при действии протектора, снижающего выработку X

Величина сдвига X, %	Отсрочка 60%-ной потери клеточности, циклы
2	200
3	240
4	400
5	>500

мающие его мышцы не теряют вибриссы на протяжении всего срока жизни.

Существует множество примеров, убеждающих, что когда увеличение продолжительности жизни особей способствует процветанию вида, живые системы могут достигать замедления старения достаточно быстро (в эволюционном масштабе времени), т.е. естественный отбор на увеличение продолжительности жизни может быть весьма эффективным.

Одним из путей снижения скорости потери клеточности постмитотических тканей, реализуемых в живых организмах, может быть сдвиг порога самоликвидации в сторону его больших значений. Известно, что большей устойчивостью к пероксиду водорода по сравнению с клетками традиционного объекта экспериментальной биологии — доменной мышью, обладают клетки таких грызунов-долгожителей, как белоногая мышь и голый землекоп [11, 13].

Введение в организм антиоксидантов сдвигает выработку X в сторону ее уменьшения. Здесь имеет место та же самая закономерность, что и в случае снижения чувствительности клеток к пероксиду водорода. Поскольку значение «порога программируемой смерти» задано генетически и вряд ли сдвигается при введении антиоксиданта, сравнительно небольшое уменьшение X будет также, как и в предыдущем случае, сопровождаться значительным снижением скорости отмирания клеток, следовательно, и старения. Поэтому действие антиоксиданта, с помощью которого предполагается замедлить старение, должно быть не столько мощным, сколько постоянным, т.е. эффект, вызванный антиоксидантом, должен действовать при длительном его введении. Моделирование показывает, что кратковременное (в течение 1—100 циклов) введение протекторов, полностью подавляющих потерю клеточности, практически не меняет общей динамики этого процесса. По-видимому, именно пролонгированность действия препарата SkQ1 — антиоксиданта нового поколения, и является его главным преимуществом перед другими антиоксидантами-геропротекторами.

Исследования действия SkQ1 на дрозофилу в целом подтвердили адекватность предложенной модели. Так, введение препарата в течение недели в середине жизни дрозофилы было неэффективно, в то время как пролонгированное действие препарата на протяжении второй половины жизни продлевало ее срок. Вместе с тем в

экспериментах на дрозофиле был обнаружен феномен, который пока не удается смоделировать, а именно, сходство геропротекторных эффектов при кратковременном введении SkQ1 в первую неделю и при постоянном введении препарата [12]. Возможно, этот недостаток модели удастся ликвидировать, снабдив виртуальные клетки неким способом к повреждению генетическим аппаратом.

Тем не менее использованный нами подход показывает важность оптимизации схемы введения препарата-антиоксиданта для достижения максимальной его эффективности. Как видно из рис. 3, введение одного и того же суммарного количества протектора в разные периоды жизни клеток практически не меняет финальных результатов относительно их выживаемости в опыте и контроле, т.е. прибавка продолжительности жизни виртуальной популяции клеток практически не зависит от порядка введения препарата. Однако, как следует из рис. 3, от порядка введения препарата существенно зависит площадь под кривой, отражающая общее число «клеткоциклов» за исследуемый период. Этому показателю можно соотнести ряд биологических параллелей. В частности, если предположить, что моделируется популяция клеток тимуса (вилочковой железы) млекопитающих, которые ответственны за «настройку» иммунной системы, то площадь под кривой будет соответствовать интегральному показателю потенциальной силы иммунного ответа. В общем случае площадь под кривой коррелирует с некой суммарной жизнестойкостью, определяющей качество жизни. Таким образом, величину физиологических эффектов геропротектора пролонгированного действия может определять не только общее количество препарата, но и схема его введения.

Намечается еще один подход к снижению потери клеточности. Современная биохимия в своих теоретических построениях оперирует в основном средними величинами. Статистические показатели, характеризующие разброс величин (дисперсия, стандартное отклонение) используются, как правило, для оценки статистической значимости различий средних. Между тем способом снижения скорости потери клеточности постмитотических тканей может быть уменьшение разброса величины X, определяемого через стандартное отклонение σ , т.е. повышение точности работы клеточной биоэнергетики.

Как показывают модельные эксперименты, поставленные с введением исходных данных, указанных на рис. 2 Б, незначительное снижение σ приводит к заметному замедлению потери клеточности при неизменной средней выработке вещества X (табл.2). В связи с этим интересен тот факт, что коэффициент вариации продолжительности жизни мышей, принимавших SkQ1, примерно на 30% ниже контрольного значения (см. табл.1 в работе [12]). Вопрос о том, насколько эти различия могут отражать различия в межклеточных вариациях генерации активных форм кислорода, безусловно актуален и требует отдельного исследования.

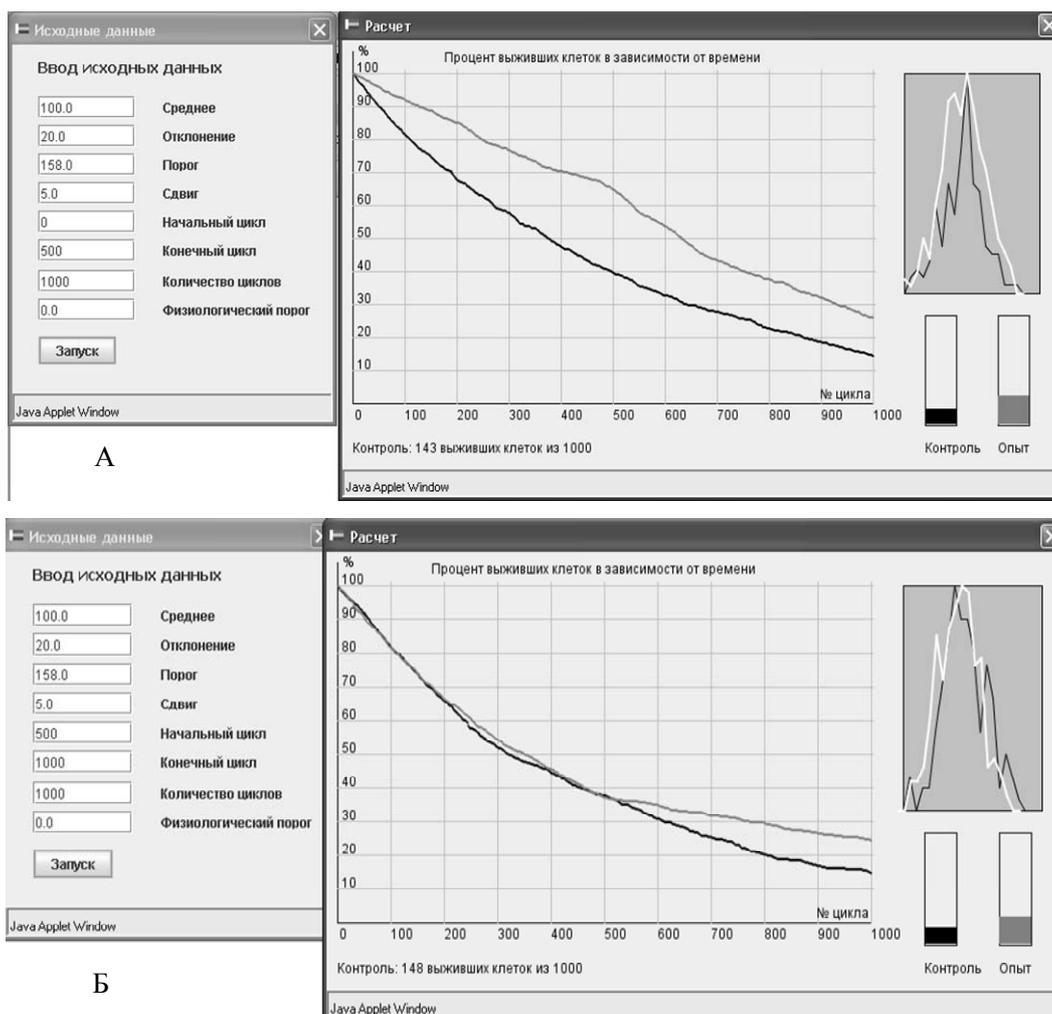


Рис. 3. Компьютерное моделирование действия геропротектора при введении его с нулевого по 500-й цикл (А) и с 500-го по 1000-й цикл (Б)

Программа старения многоклеточных организмов частично задается, по-видимому, соотношением X , σ и U_a (порог самоликвидации) в разных тканях, в основном, в тканях желез. Процессы старения разных тканей определяют общую картину саморазрушения организма, которая может изменяться вследствие генетически детерминированных особенностей в старении отдельных желез и тканей. Так, довольно широко распространены случаи, когда люди сохраняют до глубокой старости

цвет и густоту волос, зубы, ясность мышления и т.д. Тем не менее вероятность отказа всей программы старения крайне низка.

Исключительная сложность живых систем чрезвычайно затрудняет воспроизведение *in silico* реального многообразия свойств моделируемых объектов. Ценность компьютерных исследований во многом определяется тем, что они могут служить методологической основой для экспериментальной биологии, а именно, давать идеи для постановки новых экспериментов и предлагать нетривиальные интерпретации результатов ранее проведенных экспериментов. В связи с этим хотелось бы отметить, что серьезной причиной низкой эффективности геропротекторов может быть их передозировка. Как уже упоминалось выше, хроническое введение антиоксиданта-геропротектора может быть более важным фактором его эффективности, чем «мощность» препарата. Мы полагаем, что в большинстве геронтологических экспериментов используются дозы еще нетоксичные, но уже запускающие клеточные механизмы коррекции антиоксидантного действия в сторону его

Таблица 2

Оценка срока гибели клеток при снижении стандартного отклонения величины X

Стандартное отклонение величины X	Время достижения 50%-ной гибели клеток, циклы
21	230
20	380
19	640
18	1000

снижения. На существование таких механизмов многократно обращал внимание исследователей академик В.П.Скулачев. Удачной попыткой их обойти собственно и стало создание веществ типа SkQ1, действующих в наномолярных концентрациях [11, 14]. Эффективность препарата SkQ1 определяется его способностью многократно накапливаться в митохондриях. Поэтому даже испытанные в настоящее время наномолярные дозы SkQ1, в пересчете на 1 кг массы животных, могут оказаться избыточными также, как милли- и микромолярные дозы таких антиоксидантов-геропротекторов, как токоферол, меркаптоэтанол и др. Прогресс «антиоксидантной гериатрии» будет во многом обусловлен созданием высокоэффективных смесей. Очевидно, что минимизация концентраций действующего начала — одна из предпосылок успеха в достижении желаемой эффективности геропротекторов.

В заключение этого раздела рассмотрим вопрос о соответствии использованных нами параметров распределений реальным распределениям межклеточных вариаций. Как упоминалось выше, современные биохимия и, как ни странно, цитология сосредоточены в основном на анализе средних величин. Тем не менее есть ряд работ, в которых подробно анализируются межклеточные вариации. Важным элементом биохимии фагоцитоза является уничтожение поглощенных нейтрофилами микроорганизмов за счет усиления внутриклеточной генерации активных форм кислорода (дыхательный взрыв). В статье [15] приведена частотная гистограмма внутритканевую гетерогенность клеточных популяций, влияние клеток друг на друга. Кроме того, индукторы программируемой клеточной смерти в подпороговых концентрациях могут повреждать ДНК, запуская процессы в свою очередь способные вызвать смерть клеток. Тем не менее возможности имитационного моделирования далеко не исчерпаны — его аппарат позволит учесть вышеназванные характеристики в более сложных моделях.

Авторы приносят глубокую благодарность Владимиру Петровичу Скулачеву и Василию Николаевичу Манских за идеи, высказанные при подготовке и обсуждении статьи.

Работа выполнена при финансовой поддержке компании «Митотехнология» и Министерства науки и образования РФ (грант «Развитие научного потенциала высшей школы (2009—2010 гг.)» № 2.1.1/5630)

ЛИТЕРАТУРА

1. Анисимов В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения. СПб.: Наука, 2003, 468 с.
2. Gruver A.L., Hudson L.L., Sempowski G.D. J. Pathol., 2007, v. 211, № 2, p. 144—156.
3. Jung T., Bader N., Grune T. Ann. N.Y. Acad. Sci., 2007, № 1119, p. 97—111.
4. Krishnan K.J., Reeve A.K., Samuels D.C., Chinnery P.F., Blackwood J.K., Taylor R.W., Wanrooij S., Spelbrink J.N., Lightowers R.N., Turnbull D.M. Nat Genet., 2008, v. 40, № 3, p. 275—279.
5. Miquel J. Exp. Gerontol., 1998, v. 33, № 1-2, p. 113—126.
6. Miquel J. Ann. N.Y. Acad. Sci., 2002, v. 959, p. 508—516.
7. Манских В.Н. Цитология, 2007, т. 49, № 11, с. 909—915.
8. Карпов Ю.Г. Имитационное моделирование систем. Введение в моделирование с AnyLogic 5. СПб.: Изд-во БХВ-Петербург, 2005, с. 291—310.
9. Кнут Д. Искусство программирования, т. 2. Москва—Санкт-Петербург—Киев: Изд-во Вильямс, 2000, с. 146—157.
10. Джонс М.Т. Программирование искусственного интеллекта в приложениях. М.: Изд-во ДМК пресс, 2006, с. 141—174.
11. Скулачев В.П. Биохимия, 2007, т. 72, № 12, с. 1572—1586.
12. Анисимов В.Н., Бакеева Л.Е., Егоркин П.А. и др. Биохимия, 2008, т. 73, № 12, с. 1665—1670.
13. Labinskyy C.N., Zhao X., Hu F., Serpillon S., Huang Z., Balabh P., Levy R.J., Hintze T.H., Wolin M.S., Austad S.N., Podlutzky A., Ungvari Z. Aging Cell, 2007, v. 6, № 6, p. 783—797.
14. Антоненко Ю.Н., Аветисян А.В., Бакеева Л.Е., Черняк Б.В. Биохимия, 2008, т. 73, № 12, с. 1589—1606.
15. Szucs S., Vámosi G., Póka R., Sárváry A., Bárdos H., Balázs M., Kappelmayer J., Tóth L., Szöllosi J., Adány R. Cytometry, 1998, v. 33, № 1, p. 19—31.
16. Raj A., Peskin C.S., Tranchina D., Vargas D.Y., Tyagi S. PLoS Biol., 2006, v. 4, № 10, p. 309.