

$$v < \int_0^{\frac{2\pi}{k\sqrt{3}}} \int_0^{2\pi} |g_1(R)|^3 R dR d\varphi + \int_{\frac{2\pi}{k\sqrt{3}}}^{\infty} \int_0^{2\pi} |g_2(R)|^3 R dR d\varphi. \quad (29)$$

Производя вычисления в (28), получим

$$v < \frac{4\pi^3}{3k^2} + \frac{k^2}{3(2\pi)^3} + \frac{k}{3\sqrt{3}\pi^2} + \frac{4}{3\pi} + \frac{8}{9\sqrt{3}k}. \quad (30)$$

Подставляя (30) в (20), получаем следующую оценку:

$$\Delta_2 < \left(\delta \sum_{l=1}^{W_s} \sum_{m=1}^{W_s} \sum_{n=1}^{W_s} |F_{\rho l}| |F_{\rho m}| |F_{\rho n}| \right)^{\frac{1}{3}}, \quad (31)$$

где

$$\delta = \frac{4\pi^3}{3k^2} + \frac{k^2}{3(2\pi)^3} + \frac{k}{3\sqrt{3}\pi^2} + \frac{4}{3\pi} + \frac{8}{9\sqrt{3}k}. \quad (32)$$

Окончательно из (11) при условиях (9) и (31) находим оценку сверху нормы разности $F_{\rho}(x, y) - F(x, y)$:

$$\|F_{\rho}(x, y) - F(x, y)\| < M^{\frac{1}{3}} + \left(\delta \sum_{l=1}^{W_s} \sum_{m=1}^{W_s} \sum_{n=1}^{W_s} |F_{\rho l}| |F_{\rho m}| |F_{\rho n}| \right)^{\frac{1}{3}}. \quad (33)$$

ЛИТЕРАТУРА

1. В. В. Изох, А. В. Сергеев. Оптимальная дискретизация функций, заданных на полусфере.— «Журн. техн. физ.», 1973, т. 43, № 9.
2. Г. Г. Харди, Д. Е. Литтлвуд, Г. Полиа. Неравенства. М., Изд-во иностр. лит., 1948.
3. D. P. Petersen, D. M. Middleton. Sampling and reconstruction of wave-number-limited functions in N-dimensional euclidean spaces.— "Inform. and Control.", 1962, vol. 5, № 2.

Поступила в редакцию 19 апреля 1974 г.

УДК 576:36:578.081.1

Л. А. АНДРИАНОВ, М. А. АХМАМЕТЬЕВ, О. П. ФЕДОРОВА,
Е. В. ХИЖНЯК, Б. М. ШТОКМАН, М. И. ШТОКМАН

(Новосибирск)

АВТОМАТИЗИРОВАННЫЙ АНАЛИЗ МИТОТИЧЕСКОГО ЦИКЛА L-КЛЕТОК ПО СПЕКТРАМ ОБЪЕМОВ

Изучение динамики клеточного цикла представляется важным как с фундаментальной, так и с прикладной (например, поиск противораковых веществ) точки зрения. Эксперимент на клетках культуры ткани позволяет обеспечить воспроизводимость результатов и использовать автоматизированные методы с последующим анализом получаемой информации на ЭВМ (например, [1, 2]).

Как было показано в ряде работ (например, [3—5]) и подтверждено результатами настоящей работы, спектры клеточных объемов несут

существенную информацию о клеточном цикле. Нами развита модель для описания распределений клеток по объемам, на основании которой показано, что объемы фаз клеточного цикла устойчивы и характерны для данной популяции. Этот подход может быть использован для анализа состава популяций по фазам (среднее время анализа три минуты) и при тестировании биологически активных соединений.

В процессе изучения динамики селективных культур было установлено существование фазы, в которую переходят клетки после деления и в которой объем клетки уменьшается. Эта фаза имеет средний объем, примерно в три раза меньший митозного, и названа *C*-фазой (contraction). Время пребывания в этой фазе для *L*-клеток составляет порядка двух часов.

МЕТОДИКА

Клетки. Была использована культура *L*-клеток [6], полученных из межфакультетской лаборатории МГУ. Клетки пассировались в виде монослойной культуры на матрасах объемом 1,5 л при 37°C в среде Игла с добавлением 10%-ной сыворотки крупного рогатого скота и антибиотиков (100 ЕД пенициллина и 100 мкг стрептомицина). Селекцию метафазных клеток проводили в таких же матрасах по методике, описанной в [7].

Суспензия клеток, полученная после проведения процедуры селекции, в дальнейшем изложении фигурирует как «селективная культура». После инкубации селективной культуры при 37°C в течение 30—140 мин в суспензии накапливалось значительное количество клеток малого объема. Эти культуры были названы «*C*-фазными».

Эффективность методики селекции проверялась приготовлением препаратов, окрашенных по Романовскому, с последующим подсчетом митотического индекса, который колебался в разных опытах от 60 до 85%.

Были также использованы суспензии, полученные после снятия трипсином клеток на поздних сроках инкубации (4—6 дней) без смены среды. Обычно при этих условиях *L*-клетки образуют слившийся монослой. Такие культуры далее именуется «плотными культурами».

Кроме вышеописанных, были исследованы суспензии, полученные после снятия трипсином клеток монослоя в течение 1—3 дней после пересадки или смены среды — стимуляции. Такие культуры в дальнейшем называются «стимулированными культурами».

Аппаратура. Для получения распределений клеток по объемам был использован кондуктометрический счетчик. Применяемая аппаратура не имела принципиальных отличий от варианта, описанного ранее [5]. Распределения клеток по объемам накапливались в двухсотканальном амплитудном анализаторе с последующей обработкой их на ЭВМ в режиме «of line».

Анализировались суспензии с концентрацией от 10 до 100 тысяч клеток в мл; распределения, содержавшие данные менее чем о 10 тысячах клеток, обработке, как правило, не подвергались. (Описание математической модели и процедуры обработки см. в разделе результаты.)

РЕЗУЛЬТАТЫ

Типичное экспериментальное распределение *L*-клеток после селекции приведено на рис. 1*. Четкий максимум в области больших объемов однозначно приписывается метафазам. После селекции проводилась

* Здесь и далее графики распределений представляют прямое воспроизведение печати ЭВМ.

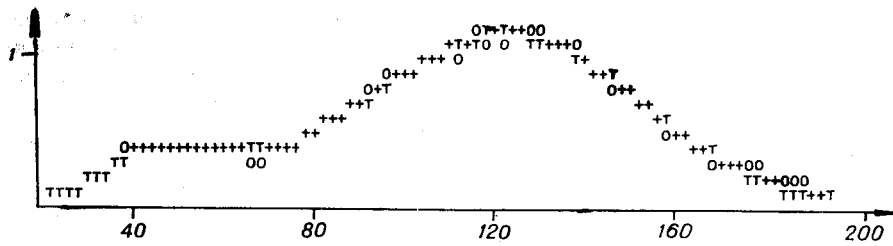


Рис. 1. Распределение по объемам L-клеток, полученное сразу после проведения процедуры селекции.

Теоретическое (Т) и экспериментальное (О) распределения клеток по объемам (+ совпадающие точки). По оси ординат отложен процент клеток на канал, по горизонтальной оси — объем в относительных единицах (одна единица $\sim 2 \text{ мкм}^3$). Число клеток N , проанализированных в данном распределении, $N=42 \cdot 10^3$. Найденные параметры (в качестве погрешностей указаны их стандартные отклонения):

$$n_c = 10 \begin{smallmatrix} +2 \\ -3 \end{smallmatrix}, n_1 = 1 \begin{smallmatrix} +3 \\ -1 \end{smallmatrix}, n_s = 3 \pm 2, n_2 = 7 \begin{smallmatrix} +2 \\ -6 \end{smallmatrix}, n_m = 79 \begin{smallmatrix} +6 \\ -2 \end{smallmatrix}; V_c = 44, V_s = 72 \pm 2, V_m = 123 \pm 1; \\ d_c = 17 \pm 1, d_s = 25 \pm 2, d_m = 42 \pm 1.$$

В тех случаях, когда стандартные отклонения параметров не приводятся, эти параметры при обработке фиксировались равными указанным значениям.

инкубация клеток в стерильных условиях при 37°C , а распределения по их объемам регистрировались через различные промежутки времени.

Характерное распределение через 70 мин после селекции показано на рис. 2, где острый пик при малых объемах обусловлен разделившимися клетками. Для предотвращения влияния агрегации клеточная су-

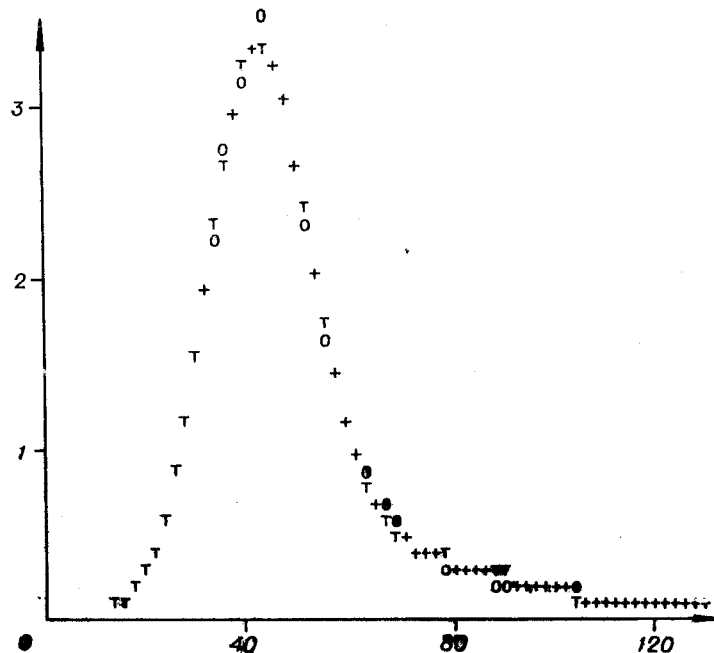


Рис. 2. Распределение L-клеток по объемам через 70 мин после селекции (С-фазная культура). (Обозначения см. в подписи к рис. 1).

$N=35 \cdot 10^3$. Найденные параметры:

$$n_c = 71 \begin{smallmatrix} +6 \\ -2 \end{smallmatrix}, n_1 = 17 \begin{smallmatrix} +2 \\ -10 \end{smallmatrix}, n_s = 3 \begin{smallmatrix} +6 \\ -2 \end{smallmatrix}, n_2 = 8 \begin{smallmatrix} +2 \\ -3 \end{smallmatrix}, n_m = 0 \begin{smallmatrix} +2 \\ -0 \end{smallmatrix}; V_c = 44 \pm 1, \\ V_s = 72 \begin{smallmatrix} +3 \\ -2 \end{smallmatrix}, V_m = 124 \begin{smallmatrix} +3 \\ -1 \end{smallmatrix}; d_c = 14 \pm 1, d_s = 27 \pm 1, d_m = 43 \pm 1.$$

пензия непосредственно перед регистрацией была пропущена через 0,2 мм канал (в режиме турбулентности) со скоростью 2 мл/мин.

Математическая модель. Для описания спектров развита модель [5], основанная на предположении о существовании в популяции среднего клеточного цикла, характеризуемого зависимостью среднего объема \bar{V} клетки от координаты цикла τ . Обобщенная координата однозначно связана с физиологическим состоянием клетки т. е. с активностью синтезов, характеризующей положение клетки в цикле [8]. Следует указать, что состояние клетки τ не является однозначной функцией от времени t (от момента деления), но существенно зависит от условий культивирования (см. обсуждение результатов). В экспоненциально растущей (Steady State) культуре координата цикла τ пропорциональна собственному времени: $\tau = 1/T\tau$, где T — время цикла, в течение которого τ изменяется от 0 до 1.

Вероятность того, что клетка в состоянии τ имеет объем V , дается функцией распределения $f(V, \bar{V}(\tau))$, имеющей острый максимум при $V = \bar{V}$. При этом распределение клеток по объемам $\rho(V)$ имеет вид

$$\rho(V) = \int_0^1 f(V, \bar{V}(\tau)) \Phi(\tau) d\tau, \quad (1)$$

где $\Phi(\tau)$ — плотность вероятности распределения клеток по состояниям τ .

Предполагая, что отклонения объемов клетки в состоянии τ от среднего объема $\bar{V}(\tau)$ имеют характер случайных флуктуаций, параметризуем функцию $f(V, \bar{V})$ в виде нормального распределения с центром $\bar{V}(\tau)$ и диффузностью $d(\bar{V})$, плавно зависящей от среднего объема \bar{V} :

$$f(V, \bar{V}) = (\sqrt{\pi}d)^{-1}(\bar{V}) \exp \left\{ - (V - \bar{V})^2 / d^2(\bar{V}) \right\}. \quad (2)$$

Параметризация зависимости среднего объема клетки от состояния $\bar{V}(\tau)$ может быть построена на основании следующих соображений.

1. Рост клетки неравномерен по циклу; его скорость минимальна в период синтеза ДНК (S-фаза). Здесь учтено то обстоятельство, что синтез ДНК требует постоянства внутренней среды [9]. Поэтому синтез структурных элементов не совпадает по времени с максимальной скоростью синтеза ДНК.

2. Увеличение объема клетки происходит до и после синтеза ДНК (в фазах G_1 и G_2). Максимальный объем клетка достигает в метафазе.

Поскольку диффузность $d(V)$ оказывается не слишком малой: $d(\bar{V}) \sim 0,1\bar{V}$, то детальная зависимость $\bar{V}(\tau)$ несущественна и для фаз G_1 , S, G_2 и M может быть аппроксимирована как кусочно-линейная на участках BD, DE, EF, FH соответственно (рис. 3).

В этом приближении увеличение среднего объема клетки происходит в G_1 -фазе от минимального объема $V_1 \equiv \bar{V}(B)$ до объема S-фазы $V_s \equiv \bar{V}(D)$, объем \bar{V} не изменяется в S-фазе $\bar{V}(D) = \bar{V}(E)$ и затем увеличивается в G_2 -фазе от V_s до максимального объема V_m . Вблизи точки достижения максимального объема скорость роста $\bar{V}'(\tau)$ равняется нулю, и поэтому зависимость $\bar{V}(\tau)$ для метафазы может быть аппроксимирована прямой $\bar{V} = V_m$ (участок FH). Как видно из рис. 1, 2,

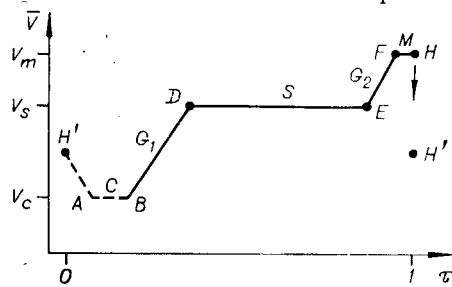


Рис. 3. Изменение объема клетки в митотическом цикле (модель).

шкала объемов линейна, средний объем разделившихся клеток меньше среднего объема метафаз примерно в три раза. Таким образом, клетка после деления пополам ($H \rightarrow H'$) продолжает уменьшать объем. Этот прямой экспериментальный факт позволяет выделить фазу уменьшения объема, которую можно назвать S -фазой (contraction). Это отражено на рис. 3 участком $H'AB$. В области минимального объема V_c участок кривой AB также может быть аппроксимирован горизонтальной прямой аналогично участку FH (см. выше).

Для однородной культуры, где отсутствуют корреляции между состояниями различных клеток, функция $\Phi(\tau) = 1$ и подстановка (2) в (1) при учете параметризации $\bar{V}(\tau)$ (см. рис. 3) позволяет получить распределение клеток по объемам в аналитическом виде

$$\rho(V) = \rho_c(V) + \rho_{G_1}(V) + \rho_s(V) + \rho_{G_2}(V) + \rho_m(V). \quad (3)$$

Для фаз с мало меняющимся объемом (S , M и участок AB S -фазы) распределение имеет нормальный вид, например,

$$\rho_s(V) = N_s (V\pi d_s)^{-1} \exp \{(V - V_s)^2 / d_s^2\}, \quad (4)$$

где $d(s) = d(V_s)$, N_s — относительное количество клеток в S -фазе. Выражения для ρ_m и ρ_c получаются из (4) заменой $n_s \rightarrow n_m$, $V_s \rightarrow V_m$, $d_s \rightarrow d_m \equiv d(V_m)$, $n_s \rightarrow n_c$, $V_s \rightarrow V_c$, $d_s \rightarrow d_c \equiv d(V_c)$ соответственно.

Ответы для фаз с существенным изменением объемов (G_1 , G_2 и участка $H'A$ S -фазы) особенно просто получить в случае, когда изменение объема значительно превосходит изменение диффузности. Тогда, например, для G_1 фазы

$$\rho_{G_1}(V) = \frac{n_1}{V_s - V_1} \left[\operatorname{erf} \left(\frac{V_s - V}{d_s} \right) - \operatorname{erf} \left(\frac{V_1 - V}{d_1} \right) \right], \quad \operatorname{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x e^{-x^2} dx, \quad (5)$$

где n_1 — относительная концентрация клеток в G_1 -фазе, erf — функция ошибок. Ответы для других фаз получаются очевидной заменой начальных и конечных объемов и диффузностей в (5).

В случае экспоненциально-растущей культуры концентрации клеток в различных фазах (n_c , n_1 , n_s , n_2 , n_m) однозначно связаны со средним временем пребывания клеток в этих фазах, например, $n_s = \frac{t}{T}$. Известно [7], что метафаза занимает малую часть клеточного цикла: $t_m \ll T$. Наши результаты показывают, что такое же положение имеет место для падающего участка S -фазы (см. рис. 3). Поэтому эти области дают малый вклад в суммарное распределение (3).

Результаты (3) — (5) применимы к более широкому классу фазово-однородных культур, в которых вероятность $\Phi(\tau)$ (1) остается постоянной в пределах одной фазы. Такие культуры, например, могут быть получены из однородных культур различными процедурами селекции, избирательно выделяющих клетки в различных фазах и не меняющих соотношение клеток внутри одной фазы (например, [7]). В этом случае концентрация клеток в метафазе может быть большой (см. рис. 1). Вклад n_c падающего участка S -фазы $H'A$ (см. рис. 3) в обычных условиях находится внутри области объемов G_1 -фазы, поэтому мы его включим в n_1 .

Такой «равновесный» подход к распределению клеток по объемам существенно отличается от предложенных ранее «кинетических» подходов [3, 4].

Обработка спектров. Обработка производилась на ЭВМ подгонкой теоретического распределения (3) к экспериментальным спектрам по десяти независимым параметрам (n_c , n_1 , n_s , n_2 , n_m ; V_c , V_s , V_m ; d_c , d_s , d_m ;

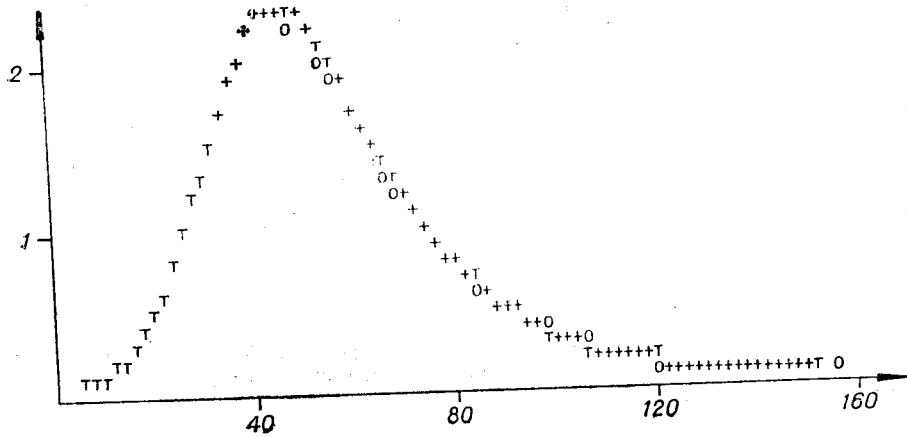


Рис. 4. Распределение L-клеток по объемам через 24 ч после смены среды (стимулированная культура). (Обозначения см. в подписи к рис. 1).
 $N=74 \cdot 10^3$. Найденные параметры:

$$n_c = 0_{-0}^{+1}, \quad n_1 = 26_{-5}^{+7}, \quad n_s = 40_{-6}^{+4}, \quad n_2 = 28_{-5}^{+3}, \quad n_m = 5_{-2}^{+3}; \quad V_c = 44, \quad V_s = 73_{-2}^{+3},$$

$$V_m = 125; \quad d_1 = 14, \quad d_s = 30_{-1}^{+5}, \quad d_m = 45.$$

$n_c + n_1 + n_s + n_2 + n_m = 1$). За оценку неопределенности, с которой параметры находятся из данного графика, принимаются их стандартные отклонения, определяющиеся для заданного параметра следующим образом. Данный параметр сдвигается от положения, дающего наилучшую подгонку (при этом по остальным параметрам проводится минимизация), до тех пор, пока уровень достоверности подгонки по χ^2 -критерию не упадет в $e^{1/2}$ раз*.

Определение характерных объемов цикла в культуре L-клеток.

При определении параметров фаз проводилась следующая процедура. Объем V данной фазы оценивался по положению центров пиков на распределениях для культур, содержащих преобладающее количество клеток в этой фазе. Аналогично диффузность d определялась по ширине соответствующих пиков. Для определения параметров метафазы (V_m , d_m) использовались селективные культуры, имеющие распределения, типа представленных на рис. 1. Для определения параметров С-фазы использовались С-фазные культуры (см. рис. 2). Стимулированные культуры, для которых характерное распределение представлено на рис. 4, содержат большое количество S-фазных клеток ($n_s \sim 40\%$) и использовались для нахождения параметров S-фазы. При этом было легко получить следующие оценки (в относительных единицах): $110 < V_m < 140$, $30 < d_m < 50$; $35 < V_c < 50$, $10 < d_c < 25$; $60 < V_s < 80$, $20 < d_s < 40$. (6)

Затем производилась подгонка на ЭВМ, причем параметры варьировались в пределах, даваемых оценками (6). Оказалось, что параметры заданной фазы уверенно находятся из распределений для культур, в которых преобладают клетки этой фазы. Типичные примеры таких обработок для M-, С- и S-фаз приведены на рис. 1, 2, 4 соответственно. Во всех случаях при подобных обработках найденные значения параметров фаз оказывались в первоначально оцененных пределах (6).

Полезная информация о согласованности подхода, а также об устойчивости значений найденных параметров V , d , характеризующих

* Такую процедуру можно оправдать в асимптотике, когда χ^2 -распределение становится нормальным.

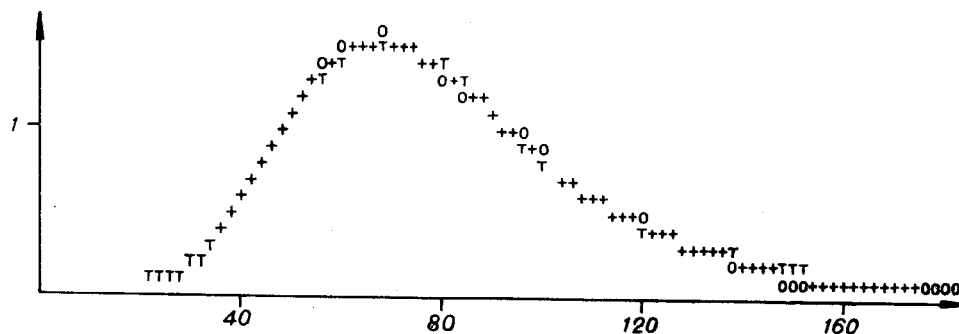


Рис. 5. Распределение L-клеток по объемам в культуре, росшей 96 ч без смены среды (плотная культура). (Обозначения см. в подписи к рис. 1).
 $N=132 \cdot 10^3$. Найденные параметры:

$$n_c = 56 \pm 5, n_1 = 13 \pm 7, n_s = 18 \pm 3, n_2 = 11 \pm 2, n_m = 1 \pm 1; V_c = 46 \pm 2, V_s = 72, V_m = 120, \\ d_c = 20 \pm 1, d_s = 25 \pm 1, d_m = 45.$$

цикл по отношению к изменению плотности культур, может быть получена из распределений для культур, содержащих малое количество ($n \sim 10\%$) клеток в интересующей нас фазе. В этом случае найденные параметры, естественно, разбивались на две группы. В первую группу входили параметры, которые оказывались в пределах оценок (6). Такие параметры учитывались при дальнейшей статистической обработке. Во вторую группу входили параметры, выходящие за пределы (6), что связано с недостаточностью информации, содержащейся в обрабатываемых распределениях. Значения из второй группы в дальнейшем отбрасывались. Опыт показал, что значения параметров, входящих в первую группу, имели дисперсии, существенно меньшие, чем ширины интервалов (6), в которых они искались. Подобным образом параметры S-фазы находились из обработок селективных культур, в которых имелось достаточно большое (10%) количество клеток G₂-фазы и существенно меньшее количество G₁- и S-фазных клеток. В этом случае вид распределения на левом краю метафазного пика определялся параметрами V_s и d_s [ср. выражения (4) и (5)]. Примером может служить рис. 1. Распределения для плотных культур позволяют найти параметры S-фазы и диффузность d_s для S-фазы. На рис. 5 приведено распределение такого типа, и в подписи к нему указаны найденные параметры. (Обсуждение видимого увеличения диффузности d_c см. далее.)

Результаты определения параметров фаз из индивидуальных распределений представлены на рис. 6. Границы (6), в которых искались параметры, обозначены пунктирными прямоугольниками. Видно, что по объемам точки группируются в три группы C, S, M вокруг значений V_c, V_s, V_m соответственно. Такая гипотеза может быть принята с уровнем значимости по критерию Стьюдента [10] более чем 0,1. Диффузности, соответствующие каждому из объемов V_c и V_s , явно разделены на две группы. При определении диффузности d_c из плотной культуры всегда находится завышенное по сравнению с другими типами культур значение d_c . Эти точки образуют верхнюю группу C (см. рис. 6). Было проверено, что при определении относительных концентраций n_c, n_1 (для C-, G₁-фаз) в плотных культурах с достаточной точностью определяется только их сумма $n_c + n_1$, что может свидетельствовать о накоплении клеток, имеющих распределение по объемам, промежуточное между C- и G₁-фазами (4), (5) и соответствующих G₀-фазе [11]. Математически такой эффект описывается как увеличение диффузности d_c .

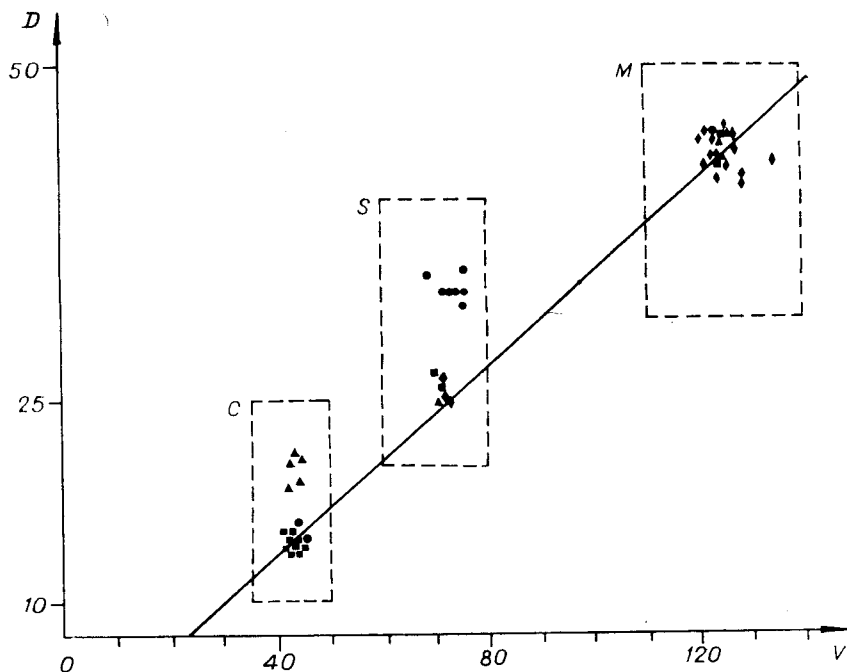


Рис. 6. Соотношения между средними объемами (\bar{V}) и диффузностями (\bar{D}) различных фаз митотического цикла для L-клеток.

Аналогичное явление увеличения диффузности S-фазы наблюдается при обработке распределений стимулированных культур (верхняя группа S на рис. 6). По нашему мнению, это связано с увеличением числа клеток, находящихся в конце G_1 - и начале G_2 -фаз при стимуляции, что выглядит как увеличение диффузности d_s . Эффекты увеличения диффузностей связаны с перераспределением клеток внутри фаз под действием внешних условий.

Из рассмотрения рис. 6 видно, что объемы фаз являются абсолютно устойчивыми по отношению к изменению условий культивирования и могут быть использованы как основные характеристики фаз.

Параметры, полученные из индивидуальных обработок, усреднялись с весами, равными обратным квадратам их стандартных отклонений. Полученные средние значения и выборочные дисперсии (округленные с точностью до 0,5) приведены в табл. 1. Как видно из таблицы, средние значения объемов, полученные из обработок распределений для культур различных типов, хорошо согласуются между собой. В даль-

Таблица 1

Средние значения объемных параметров фаз для культуры L-клеток (типичная погрешность приведенных средних значений, оцененных по выборочным дисперсиям <1)

Тип культуры, послужившей источником данных	Параметры					
	V_c	d_c	V_s	d_s	V_m	d_m
С-фазная	44	14	71	25	124	—
Стимулированная	—	15	72	32	125	—
Селективная	—	—	72	26	124	44
Плотная	41	20	—	25	—	—

нейшем при определении относительных концентраций фаз объемы фиксировались в соответствии со средними значениями. Диффузности С-, S-фаз, фиксировались равными $d_c=14$, $d_s=25$ в соответствии с приведенными выше соображениями.

Найденное отношение средних объемов метафазы и С-фазы $V_m/V_c=2,82\pm 0,04$ (указана только статистическая ошибка) существенно больше 2 и однозначно свидетельствует о существовании С-фазы.

При инкубировании клеток, полученных методом селекции, их распределения по объемам закономерно изменялись во времени: падало относительное число клеток с большими объемами и возрастал процент клеток с малыми объемами (разделившиеся клетки). Изменения состава клеток на различных сроках инкубации после селекции приведены в табл. 2. Параметры n_c , n_1 , n_s , n_2 , n_m — относительные концентрации клеток в фазах С, G₁, S, G₂, М соответственно (см. описание модели и процедуры обработки). Из табл. 2 видно, что процент митозов резко

Таблица 2
Изменения во времени состава популяции L-клеток, полученных методом селекции метафаз

№ опыта	Время после селекции (мин)	Число проанализированных клеток $\times 10^6$	Найденные относительные концентрации, %					χ^2	NDF*
			n_c	n_1	n_s	n_2	n_m		
1**	0	25	$6,0\pm 2$	$0\pm 2_0$	$3,0\pm 2_3$	$7,0\pm 7_2$	$83\pm 2_6$	187	82
	20	30	23 ± 2	20 ± 2	15 ± 2	$0\pm 2_0$	42 ± 2	135	82
	45	13	18 ± 2	60 ± 2	$0\pm 2_0$	14 ± 2	8 ± 2	165	165
	70	15	$54\pm 5_3$	$22\pm 7_{10}$	$7\pm 6_{10}$	$17\pm 3_6$	$0\pm 4_0$	69	82
	105	9	$16\pm 3_4$	$65\pm 5_7$	$0\pm 5_0$	11 ± 5	7 ± 4	149	168
2	35	15	$72\pm 6_2$	$17\pm 2_{10}$	$0\pm 7_0$	$11\pm 2_3$	$0\pm 2_0$	49	82
	62	15	67 ± 6	$25\pm 6_{10}$	$0\pm 6_0$	$7\pm 2_7$	$0\pm 6_0$	44	82
	70	23	$67\pm 4_2$	$25\pm 2_6$	$0\pm 4_0$	8 ± 2	$0\pm 2_0$	56	82
	105	15	38 ± 1	44 ± 1	$0\pm 1_1$	9 ± 1	9 ± 1	149	82
3	58	17	48 ± 6	$36\pm 6_{10}$	$0\pm 7_0$	$15\pm 2_7$	$0\pm 6_0$	99	164
	65	19	58 ± 2	17 ± 2	$0\pm 2_0$	21 ± 2	4 ± 2	109	82
	93	13	51 ± 6	$36\pm 6_{10}$	$0\pm 7_0$	$12\pm 2_7$	$0\pm 6_0$	50	82
	143	11	40 ± 2	40 ± 2	$0\pm 2_0$	17 ± 2	4 ± 2	190	165
4	900	43	$0\pm 2_0$	39 ± 2	43 ± 2	18 ± 2	$0\pm 2_0$	111	82
5	0	33	$10\pm 4_3$	$25\pm 6_{10}$	$10\pm 10_8$	$18\pm 7_8$	44 ± 6	67	82
	600	88	3 ± 3	$58\pm 6_7$	$11\pm 10_6$	$22\pm 3_{14}$	6 ± 2	78	57
	1320	91	$1\pm 2_1$	$0\pm 2_0$	30 ± 2	68 ± 2	$0\pm 2_0$	175	67

* NDF — число степеней свободы при подгонке.

** Во всех определениях, относящихся к одному опыту, последовательно анализировались пробы одной и той же суспензии клеток.

Таблица 3

Изменения во времени состава популяции L-клеток после смены среды и пересадки

№ опыта	Время после сме-	Число про-анализиро-	Найденные относительные концентрации, %					χ^2 400	NDF*
1	3,5	102	44 \pm ₋₄	28 \pm ₋₂	13 \pm ₋₆	12 \pm ₋₂	3 \pm ₋₃		
	6,5	56	43 \pm ₋₃	38 \pm ₋₂	6 \pm ₋₆	8 \pm ₋₂	2 \pm ₋₂	163	82
	24	61	17 \pm ₋₂	36 \pm ₋₂	20 \pm ₋₂	22 \pm ₋₂	4 \pm ₋₂	126	82
	30	79	7 \pm ₋₂	30 \pm ₋₃	28 \pm ₋₃	31 \pm ₋₃	5 \pm ₋₂	175	82
	51	73	24 \pm ₋₂	28 \pm ₋₆	21 \pm ₋₆	20 \pm ₋₄	7 \pm ₋₂	228	88
	76	58	24 \pm ₋₃	29 \pm ₋₂	23 \pm ₋₆	15 \pm ₋₂	8 \pm ₋₃	215	82
2	0***	83	42 \pm ₋₂	31 \pm ₋₃	19 \pm ₋₄	7 \pm ₋₄	1 \pm ₋₁	230	82
	24	46	5 \pm ₋₂	8 \pm ₋₇	34 \pm ₋₅	52 \pm ₋₃	0 \pm ₋₀	70	82
	48	48	10 \pm ₋₃	16 \pm ₋₂	37 \pm ₋₆	32 \pm ₋₂	5 \pm ₋₃	111	82
3	0****	127	20 \pm ₋₂	40 \pm ₋₂	19 \pm ₋₂	16 \pm ₋₂	5 \pm ₋₂	219	82
	19	74	5 \pm ₋₂	16 \pm ₋₂	32 \pm ₋₂	44 \pm ₋₂	3 \pm ₋₂	168	82

* NDF — число степеней свободы при обработке.

** Перед сменой среды клетки культивировались без смены среды 11 сут.

*** Клетки были рассажены и снимались для анализа в указанные сроки.

**** Перед сменой среды клетки росли 96 ч без смены среды.

падает за время порядка 20 мин. Разделившиеся клетки продолжают уменьшаться в объеме, что отражается в постепенном уменьшении n_1 и увеличении n_c . Это, по-видимому, соответствует движению по участку HA (см. рис. 3). Нахождение клеток на участке AB (S -фаза) выражается в большом значении $n_c = 50-70\%$ между 35 и 93 мин. Затем относительная концентрация n_1 снова увеличивается, что свидетельствует о росте объема клеток и переходе их в G_1 -фазу (участок BD на рис. 3). Концентрация клеток в G_2 -фазе в течение 143 мин менялась мало; S -фаза практически не обнаруживалась. Описанная динамика изменения объемов клеток качественно воспроизводилась в разных опытах. В то же время наблюдались различия в скорости изменения n_c , n_1 . Это можно объяснить тем, что процессы, непосредственно следующие за делением, сохраняют высокую температурную чувствительность, свойственную делению, что было уже отмечено в [12].

Через 1320 мин после селекции клетки с объемами S -, G_1 -фаз практически уже не обнаруживались, а преобладали клетки с объемами G_2 -фазы, что согласуется с обычной картиной и временами движения клеток по циклу.

Изменение во времени культуры L-клеток после стимуляции сменой среды. Увеличение индекса метки в культуре клеток после смены среды неоднократно отмечалось в литературе (см. обзор [13]). Данные, полученные при обработке объемных распределений, приведены в табл. 3, из которой следует, что через ~ 30 ч после стимуляции процент кле-

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Приведенные результаты измерений объемов L-клеток в разных условиях культивирования показывают, что объем является устойчивым параметром, несущим информацию о положении клетки в цикле. В отличие от этого длительности фаз, которые являются основными параметрами цикла в методе меток, сильно зависят от условий культивирования [14]. Поэтому в качестве параметра, определяющего положение клетки в цикле, логично использовать ее объем.

Данная методика позволяет одновременно провести анализ распределений клеток по фазам с типичной погрешностью не более 10%, что представляет преимущество по сравнению с методом меток. Идентичность фаз, определяемых предлагаемым методом, и одноименных фаз, определяемых методом меток [15, 16], нельзя считать полностью доказанной, но устойчивость объемных параметров, найденных из различных распределений, позволяет независимо установить объективность нашего подхода.

Из экспериментальных данных установлено отношение максимального и минимального объемов клеточного цикла L-клеток, равное $2,8 \pm 0,04$. Поскольку максимальный объем достигается в митозе, после чего клетка делится пополам, то этот результат однозначно свидетельствует о существовании фазы уменьшения объема, названной нами C-фазой. Исследование динамики изменения объемов селективной культуры показывает, что C-фаза наступает непосредственно после телофазы митоза.

Факт увеличения процента S-фазных клеток после стимуляции согласуется с результатами других подходов [13]. Обнаруженное накопление клеток с объемами G₂-фазы через 24 ч после стимуляции может свидетельствовать о наличии торможения в этой фазе, связанного с независимой регуляцией синтеза ДНК и процессов подготовки к митозу [17].

ЛИТЕРАТУРА

1. Ornstein, H. R. Ansley. Spectral matching of classical cytochemistry to automated cytology. — "J. Histochem. Cytochem.", 1974, vol. 22, p. 453.
2. H. A. Crissman, R. A. Tobey. Cell cycle analysis in 20 minutes. — "Science", 1974, vol. 184, p. 1297.
3. G. I. Bell, E. C. Anderson. Cell growth and division. 1. A mathematical model with application to cell volume distributions in mammalian suspension cultures. — "Biophys. J.", 1969, vol. 4, p. 329.
4. M. Kim, Khosrow Bahrami, Kwang B. Woo. A discrete-time model for cell-age, size and DNA distributions of proliferating cells, and its application to the movement of the labeled cohort. — "Bio-Med. Eng.", 1974, vol. 21, p. 387.
5. Л. А. Андрианов, М. А. Ахмаметьев, Б. М. Мецгер, Е. В. Хижняк, М. И. Штокман. Использование спектров распределения клеток культуры ткани по объемам в изучении механизмов действия биологически активных соединений. — Препринт № 12. Новосибирск, Изд. ИАЭ СО АН СССР, 1973.
6. Sanford, W. R. Earl, G. D. Likely. The growth in vitro of single isolated tissue cells. — "J. Nat. Cancer Inst.", 1948, vol. 9, p. 229.
7. T. Terashima, L. I. Tolmach. Growth and nucleic acid synthesis in synchronously dividing populations of HeLa cells. — "Expl. Cell. Res.", 1963, vol. 30, p. 344.
8. J. M. Mitchison. The biology of the cell cycle. Cambridge, Cambridge University Press, 1971.

9. Д. Мэзия. Митоз и физиология клеточного деления. М., Изд-во иностран. лит., 1963.
10. Г. Корн, Т. Корн. Справочник по математике. М., «Наука», 1968.
11. О. И. Епифанова, В. В. Терских. Периоды покоя и активной пролиферации в жизненном цикле клетки.— «Журн. общ. биол.», 1968, т. 29, № 4.
12. P. N. Rao and J. Engelbert. Effects of temperature on the mitotic cycle of normal and synchronised mammalian cells.— In: Cell Synchrony. New York — London, Acad. Press, 1966, p. 332.
13. В. В. Терских, А. М. Зосимовская. Синтез ДНК и пролиферация при длительном культивировании клеток китайского хомячка.— «Цитология», 1971, т. 11, с. 1379.
14. D. W. Ross and Sinclair. Cell cycle compartment analysis of chinese hamster cells in stationary phase cultures.— “Cell Tissue Kinet.”, 1972, vol. 5, p. 1.
15. A. Howard, S. R. Peс. Synthesis of desoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage.— Suppl. “Symposium on chromosome breakage”. Cambridge, Cambridge University Press, 1953, p. 261.
16. H. Quastler, F. G. Sherman. Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse.— “Exptl. Cell Res.”, 1959, vol. 17, p. 420.
17. R. F. Kimball, S. W. Perduc and F. H. Y. Chu. Cell cycle and cell protein content of chinese hamster cell grown in culture with daily renewal of medium.— “Exptl. Cell Res.”, 1974, vol. 84, p. 111.

Поступила в редакцию 19 апреля 1975 г.

УДК 57+61:62.506.2

В. Н. КРУТЬКО
(Москва)

СПОСОБ ОБРАБОТКИ СИГНАЛОВ, РЕГИСТРИРУЕМЫХ ВЕСТИБУЛЯРНЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ, В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ

Вестибулярный аппарат животных и человека представляет собой совокупность рецепторов (полукружных каналов и сенсорных поверхностей отолитового аппарата) или датчиков, реагирующих на перемещения и положения тела в окружающем пространстве. Исследование процессов обработки информации, поступающей от этих рецепторов, нервной системой организма представляет интерес как для общей биологии и физиологии вестибулярного анализатора, так и для конструкторов приборов, обеспечивающих автоматическое управление движением и положением различных технических систем.

В предлагаемой работе рассматривается вопрос о возможном способе (схеме) обработки в центральной нервной системе потоков активности от отдельных датчиков с целью получения информации о внешнем сигнале в виде, пригодном для осуществления ответной реакции организма.

Механика вестибулярного аппарата такова [1—4], что каждый полукружный канал регистрирует компонент угловой скорости вращения головы $\vec{\omega}$, ортогональный плоскости канала, т. е. изменение активности J^i , измеряемой в условных единицах, в нерве, идущем от i -го канала, равно скалярному произведению $\vec{\omega} \cdot \vec{n}^i$, где \vec{n}^i — вектор, перпендикулярный плоскости этого канала. Модуль \vec{n}^i равен величине изменения активности, выраженной в условных единицах, в нерве при единичном изменении угловой скорости, действующей по направлению \vec{n}^i . Аналогично можно считать [5, 6], что каждая из рецепторных клеток отолитового аппарата регистрирует проекцию линейного ускорения на направление