

MODELOVÁNÍ OBNOVY KMENOVÝCH BUNĚK

Jan Šilar, Jiří Kofránek, Tomáš Kulhánek, Katarina Forgáčová,
Emanuel Nečas

Klíčová slova:

fyziologie, kmenová buňka, ionizující záření, hematopoéza, homeostáza, modelování, identifikace parametrů

1 Biologický úvod

1.1 Kmenové buňky

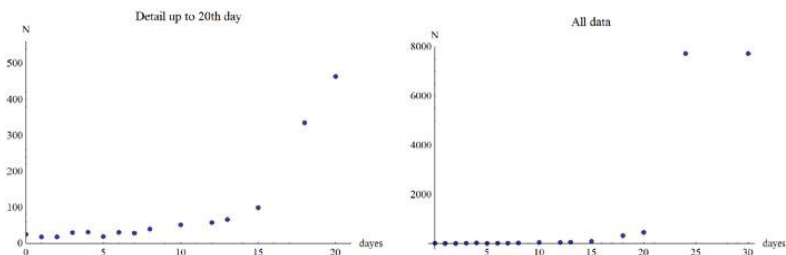
Krvetvorné kmenové buňky jsou zdrojem všech krevních buněk, které jsou nepřetržitě tvořeny během celého života. Kmenové buňky zajišťují stálost krvetvorby specifickou schopností sebeobnovování buněčným dělením. Použití kmenových buněk k tvorbě buněk krevních, prostřednictvím tzv. buněk progenitorových, znamená jejich ztrátu. Doplnění jejich počtu je možné jen buněčným dělením, které může mít dvě alternativy: asymetrické dělení, při kterém vznikne jen jedna nová kmenová buňka, která nahradí buňku, která se rozdělila, a symetrické dělení, při kterém z jedné kmenové buňky vzniknou dvě nové kmenové buňky[1]. Ke dlouhodobému udržení krvetvorby dostačuje asymetrické dělení kmenových buněk, protože se při něm nejen produkují buňky progenitorové, ale obnovují se i buňky kmenové, jejichž počet zůstává stejný. Zvýšení počtu kmenových buněk je možné jen jejich symetrickým rozdělením na dvě buňky kmenové. K tomu dochází po poškození krvetvorné tkáně, které postihne i buňky kmenové, nebo po jejich transplantaci, kdy z malého počtu (v principu i z jedné) kmenových buněk se jich vytvoří dostatečné množství potřebné pro tvorbu krevních buněk.

Krvetvorná tkáň, i její kmenové buňky, jsou značně citlivé k působení ionizujícího záření. Celkový počet kmenových buněk v krvetvorné tkáni myši je normálně asi 4000 až 8000[2] při celkovém počtu všech krvetvorných buněk asi 350 milionů. V závislosti na dávce záření se počet kmenových buněk sníží až na jednotlivé buňky, přičemž přežití expozici záření je možné jen za předpokladu, že se alespoň jedna kmenová buňka zachová nebo jsou po ozáření kmenové buňky transplantovány. Vyplývá to ze skutečnosti, že kmenové buňky nemohou vzniknout z jiných buněk a jejich přítomnost je podmínkou dlouhodobé nepřetržité tvorby buněk krevních.

1.2 Experiment

Myši byly ozářeny dávkou 6 Gy (^{60}Co) přičemž bylo možno odhadnout, že v krvetvorné tkáni zůstalo přibližně jen 20 kmenových buněk. Tuto, relativně vysokou dávku záření, přežijí všechny myši i bez transplantace nových kmenových buněk. Jsou-li jim však kmenové buňky transplantovány, velmi účinně začnou podporovat krvetvorbu a stanou se dlouhodobým zdrojem krevních buněk společně s kmenovými buňkami, které přežily vystavení účinkům ionizujícího záření. V případě, kdy transplantované kmenové buňky pocházejí z jiného jedince, vznikne tzv. chimerická krvetvorba, ve které jsou tvořeny krevní buňky z obou zdrojů kmenových buněk paralelně. Poměr,

ve kterém jsou krevní buňky ze dvou subpopulací kmenových buněk tvořeny, odráží jejich vzájemný poměr v době transplantace [3]. V experimentu tohoto bylo využito ke sledování průběhu samovolného obnovování počtu kmenových buněk u myši ozářených dávkou 6 Gy. Různou dobu po ozáření bylo transplantováno konstantní množství dárcovských buněk, které obsahovaly známé množství buněk kmenových. S postupující samovolnou obnovou populace kmenových buněk během regenerace ozářením-poškozené krvetvorné tkáň, se poměr mezi transplantovaným počtem kmenových buněk a jejich počtem nacházejícím se v regenerující krvetvorné tkáni příjemce transplantátu měnil ve prospěch příjemcových kmenových buněk. Tento proces byl sledován v rozmezí 30 dnů po ozáření. Standardní množství transplantovaných kmenových buněk odpovídalo asi 3,5 procentům jejich normálního celkového množství, t.j. asi 140 až 280 kmenovým buňkám. V době po ozáření, kdy výsledkem transplantace bylo po transplantaci dosaženo úrovně chimerismu v krvetvorbě 50% se tedy celkový počet kmenových buněk v ozářeném příjemci zvýšil z původních asi 20 na asi 140 až 280. To nastalo za 18 až 18,5 dnů. Z následného vývoje chimerismu, ve prospěch krvetvorby odvozené od kmenových buněk ozářeného příjemce, pak bylo možné odhadnout další průběh sebeobnovy populace jeho kmenových buněk. Výsledky svědčily pro to, že okolo 25. dne se již přiblížil počet kmenových buněk v regenerované krvetvorné tkáni normálním hodnotám, tedy asi 4000 až 8000 (Obr. 1). V prvním grafu je detail měření do 20. dne. V druhém je celé měření do 30. dne. Je patrný výrazný nárůst mezi 20. a 24. dnem. Hustota měření je v tomto časovém úseku rychlé změny malá, ale hodnoty na jejím začátku i konci byly naměřeny v nejméně dvou opakovaných pokusech.



Obrázek 1 — Počet vlastních kmenových buněk v průběhu prvního měsíce po ozáření.

2. Modelování

Předpokládáme, že při rozdělení kmenové buňky vznikne vždy jedna nová kmenová buňka, zatímco druhá vzniklá buňka může být buď kmenová (symetrické dělení), nebo progenitorová (asymetrické dělení, které je charakteristické pro normální krvetvornou tkáň). S pravděpodobností P vzniká nová buňka kmenová a s pravděpodobností $1 - P$ vzniká buňka progenitorová. Případ, kdy při dělení vzniknou dvě progenitorové buňky neuvažujeme.

Vývoj počtu kmenových buněk N se řídí diferenciální rovnicí kde P je pravděpodobnost vzniku kmenové buňky, T_c doba buněčného cyklu

$$\begin{aligned}\frac{dN}{dt} &= P \frac{24}{T_c} N \\ N(0) &= N_0,\end{aligned}$$

(zakončeného rozdělení buňky) v hodinách. Čas t je ve dnech. N_0 je počet zbylých buněk po ozáření. Člen $\frac{24}{T_c} N$ představuje počet všech uskutečněných dělení během jednoho dne. Vynásobíme-li jej pravděpodobností vzniku kmenové buňky, dostáváme přírůstek kmenových buněk za den.

P i T_c jsou veličiny měnící se v čase. Jejich hodnoty (zvláště hodnotu P) není možné měřit. Předpokládáme, že P závisí na poměru počtu kmenových buněk k jejich maximálnímu možnému počtu, tedy $P(N/N_{max})$. Tuto funkční závislost mezi P a N/N_{max} se budeme snažit nalézt. Dobu buněčného cyklu budeme považovat za konstantní, $T_c = 12\text{h}$. Důsledek tohoto výrazného zjednodušení budeme diskutovat.

2.1 Původní model

Předpokládalo se, že

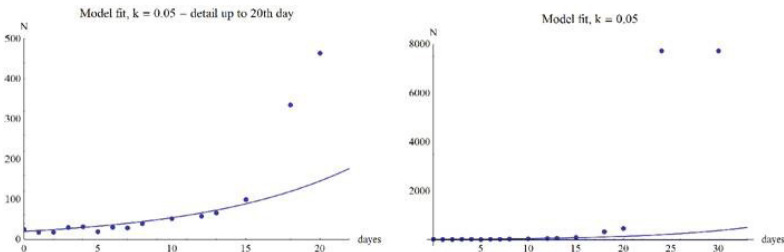
$$P(N/N_{max}) = k(1 - N/N_{max}),$$

kde

$$k \in \langle 0, 1 \rangle$$

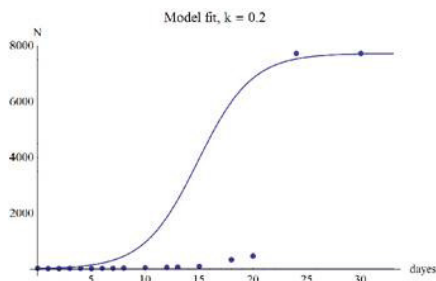
je konstantní.

Když je kmenových buněk málo, poměr N/N_{max} je malý a $P \sim k$. Pravděpodobnost vzniku kmenové buňky je velká. Když je naopak kmenových buněk hodně ($N \rightarrow N_{max}$), pravděpodobnost vzniku kmenové buňky, zvyšující jejich celkový počet, se blíží nule. Hledáním vhodné hodnoty parametru k se snažíme řešením modelu proložit experimentálně naměřená data.



Obrázek 2 — Původní model, $k = 0.05$ (tečky - experimentální data, čára - modelová data)

Na obr. 2 je vykresleno řešení tohoto modelu pro $k = 0.05$. Model dobře popisuje průběh dat do 15. dne. Prudký nárůst mezi 15. a 25. dnem naopak model vůbec nevystihuje.



Obrázek 3 — Původní model, $k = 0.2$

Na obr. 3 je vykresleno řešení modelu pro $k = 0.2$. Model sice vykazuje nakonec stejný nárůst jako experimentální data, ale průběh je úplně jiný.

Tento model není možné vhodnou volbou parametru k nastavit tak, aby popisoval děj probíhající při experimentu. Struktura modelu je zřejmě špatná. Ani v případě, že bychom znali časový průběh délky buněčného cyklu $T_c(t)$ a započítali jej v modelu, nepovede to k jeho zpřesnění. T_c bude nejdříve krátký a jak bude přibývat kmenových a progenitorových buněk se bude T_c postupně prodlužovat. To by vedlo ke zpomalení nárůstu množství buněk, kterých by byl stále značný nedostatek okolo 25. dne.

2.2 Rozšířený model

Model diskutovaný v předchozí podkapitole s $k = 0.05$ dobře popisuje chování reálného systému v prvních 15 dnech. Pak se zdá, že je v systému vyslán nějaký signál, který změní režim, což náš model nepostihuje. Pokusili jsme se proto model rozšířit o tuto změnu režimu. Koeficient k v rozšířeném modelu funkčně závisí na N/N_{max} podle předpisu

$$k(N/N_{max}) = \begin{cases} k_0 & \text{if } N/N_{max} < r_0 \\ k_0 \cdot \left(1 - \frac{N/N_{max} - r_0}{r_1 - r_0}\right) + k_1 \cdot \frac{N/N_{max} - r_0}{r_1 - r_0} & \text{if } r_0 \leq N/N_{max} < r_1 \\ k_1 & \text{if } r_1 \leq N/N_{max}. \end{cases} \quad (1)$$

Na intervalu $\langle 0, r_0 \rangle$ resp. $\langle r_1, 1 \rangle$ je k konstantní, rovno k_0 resp. k_1 . Na intervalu $\langle r_0, r_1 \rangle$ je hodnota k spočtena lineární interpolací k_0 a k_1 – zde dochází postupně ke změně režimu. Správnější a také přesnější by jistě bylo modelovat přímo fyziologickou podstatu řízení procesu – počítat pravděpodobnosti na základě fyziologických dějů, které je ovlivňují. Tyto jevy ale zatím nejsou známé. I tento heuristický přístup přináší některé zajímavé závěry uvedené v následujících odstavcích.

2.3 Identifikace rozšířeného modelu

V rozšířeném modelu vystupují čtyři neznámé parametry k_0 , r_0 , k_1 , a r_1 , jejichž hodnoty je potřeba odhadnout. Model stále nepopisuje reálný děj dostatečně přesně – uvažuje konstantní dobu buněčného cyklu a výraz (1) pro výpočet koeficientu pravděpodobnosti je nejistý.

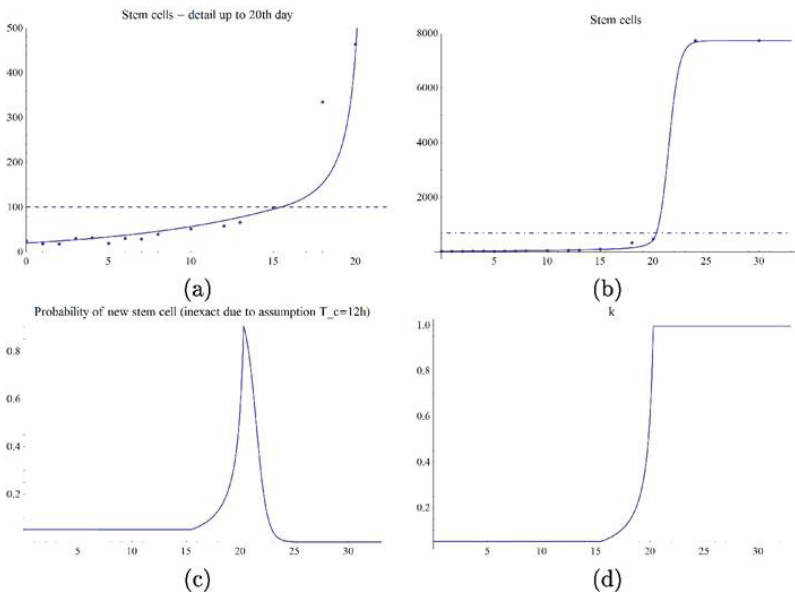
Proto není možné hledat hodnoty parametrů pomocí minimalizace normy rozdílu experimentálních a modelových dat. V oblasti nejprudšího vývoje bylo bohužel provedeno příliš málo měření. Hodnoty parametrů jsme hledali ručně pomocí nástroje manipulate ve výpočetním systému Mathematica. Došli jsme k hodnotám

$$r_0 = 0.013$$

$$k_0 = 0.0525$$

$$r_1 = 0.09$$

$$k_1 = 0.995.$$



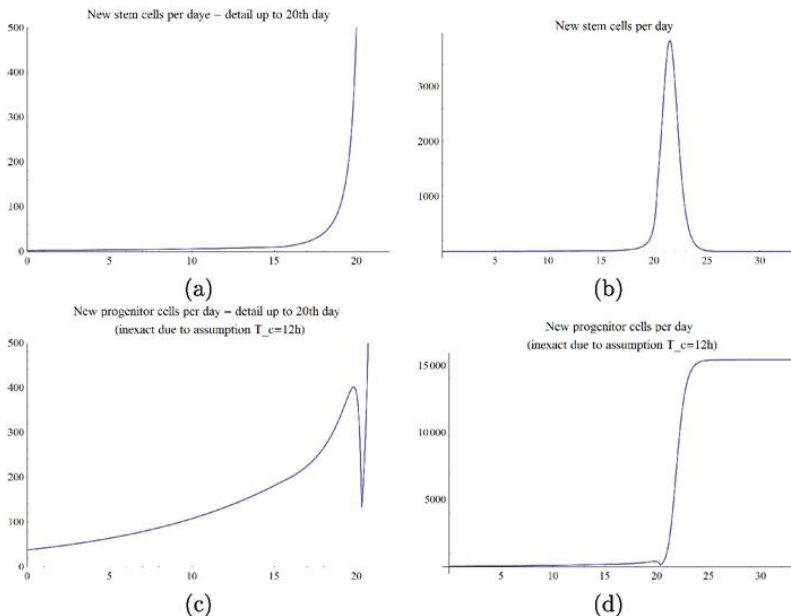
Obrázek 4 — Identifikovaný rozšířený model: (a) množství kmenových buněk – detail. Čárkovaná čára odpovídá $N = N_{max} \cdot k_0$ – ukazuje, kde začíná přechod na druhý režim. (b) množství kmenových buněk. Čerchovaná čára odpovídá $N = N_{max} \cdot k_1$ – ukazuje, kde končí přechod na druhý režim. (c) pravděpodobnost vzniku nové kmenové buňky. (d) - koeficient k .

Přesnost tohoto odhadu nebude kvůli nepřesnosti modelu, tzv. „trade-off“ efektu a špatnému vzorkování experimentálních dat zřejmě příliš vysoká.

Řešení modelu přesto docela dobře prokládá naměřená data, viz obr. 4.

2.4 Fyziologická interpretace výsledků simulace

Na obrázku 5 je srovnání přírůstek kmenových a progenitorových buněk.



Obrázek 5 — Identifikovaný rozšířený model – srovnání přírůstku kmenových a progenitorových buněk: (a) počet nových kmenových buněk za den – detail do 20. dne, (b) počet nových kmenových buněk za den v průběhu celého sledovaného období. (c) počet nových progenitorových buněk za den – detail do 20. dne. (d) počet nových progenitorových buněk za den během celého sledovaného období. Přepnutí režimu na režim zvyšující pravděpodobnost vzniku kmenové buňky přechodně sniží tvorbu progenitorů, protože se jedná o alternativní, vzájemně se vylučující, děje.

V první fázi je pravděpodobnost vzniku kmenové buňky, která by zvýšila jejich celkový počet nízká a vznikají hlavně buňky progenitorové (asymetrickým buněčným dělením). Ty jsou podkladem intenzivní produkce krevních buněk, které plní životně důležité funkce přenosem kyslíku, obranou proti infekcím a předcházením krvácení. Když je vyprodukováno dostatečné množství progenitorových buněk zabezpečujících bezprostřední přežití, přepne se režim a vzniká významně více kmenových buněk v porovnání s jejich počtem, které zanikají. Kmenové buňky se pak rychle namnoží na normální, nebo normálním počtům blízké, hodnoty. Čím více je kmenových buněk, tím více vzniká i buněk progenitorových. Proto se pak i stav progenitorových buněk dostane rychle do normálu.

Předpokládáme, že po obnovení normálního počtu kmenových a progenitorových buněk se výrazně prodlouží buněčný cyklus kmenových buněk. Současně se přepne režim řídicí počet kmenových buněk a vznik buněk progenitorových na režim odpovídající nepoškozené krvetvorné tkáni. Ten odpovídá přísně asymetrickému rozdělování kmenových buněk na jednu buňku kmenovou a jednu buňku progenitorovou při nízké intenzitě (frekvenci) těchto buněčných dělení.

Závěr

Prokázali jsme, že původní model neodpovídá realitě. Navrhli jsme přesnější model, který odpovídá lépe experimentálním datům. Tento model předpokládá přechodnou změnu režimu, který řídí vznik nových kmenových buněk. Bylo doporučeno provést více měření mezi 15. a 24. dnem a pokusit se odhadnout dobu buněčného cyklu kmenové buňky v průběhu regenerace krvetvorné tkáně. Klíčovou otázkou je fyziologická (biologická) podstata režimu, který ovlivňuje pravděpodobnost vzniku více kmenových buněk než kolik jich zaniká.

Poděkování

Práce vznikla za podpory projektu PRVOUK-P24/LF1/3, UNCE204021 a SVV-2012-264507.

Práce byla podporována grantem MPO FR-TI3/8.

Reference

- [1.] Kendra L Congdon and Tannishtha Reya. *Divide and conquer: how asymmetric division shapes cell fate in the hematopoietic system. Current Opinion in Immunology*, 20(3):302 – 307, 2008. *Lymphocyte activation / Lymphocyte effector functions*.
- [2.] Katarina Forgacova and Emanuel Necas. *Availability of haematopoietic niches for transplanted stem cells. Folia Biologica (Praha)*, 59:1–14, 2013.
- [3.] Katarina Forgacova, Filipp Savvulidi, Ludek Sefc, Jana Linhartova, Emanuel Necas. *All hematopoietic stem cells engraft in submyeloablatively irradiated mice. Biol Blood Marrow Transplant*. 2013 Feb 16. pii: S1083-8791(13)00084-0. doi: 10.1016/j.bbmt.2013.02.012. [Epub ahead of print].

Kontakt:

Jan Šilar

Oddělení biokybernetiky a počítačové

podpory výuky

ÚPF 1. LF UK, Praha

U nemocnice 5,

128 53 Praha 2

e-mail: jan.silar@lf1.cuni.cz