

В. Г. Книгавко,
Н. С. Пономаренко,
О. П. Мещерякова,
С. Ю. Протасеня

Харківський національний
медичний університет,
ДУ Інститут медичної
радіології ім. С.П. Григор'єва
АМН України, Харків

Математична модель репродуктивної загибелі опромінених клітин еукаріот, яка враховує насичення систем репарації ДНК

Mathematical model of reproductive death
of irradiated eukaryotic cells, which considers
saturation of DNA reparation system

Цель работы: Построить математические модели процессов, определяющих репродуктивную гибель эукариотических клеток при облучении рентгеновскими или гамма-лучами.

Материалы и методы: В работе использованы методы математического моделирования, программирования, числовые.

Результаты: Построена математическая модель процессов, которые определяют репродуктивную гибель облученных клеток. Модель учитывает явление насыщения систем репарации радиационных повреждений ДНК и структурно-функциональные особенности строения хроматина в эукариот. Обсуждался вопрос оценки параметров модели по экспериментальным данным. Проанализированы возможные трактовки полученных результатов.

Выводы: Полученная аналитическая зависимость выживаемости клеток от дозы облучения хорошо отвечает экспериментальным данным и учитывает существующие представления о сущности процессов репарации радиационных повреждений ДНК.

Ключевые слова: математическое моделирование, репарация радиационных повреждений ДНК, выживаемость эукариотических клеток.

Мета роботи: Побудувати математичні моделі процесів, що визначають репродуктивну загибель еукаріотичних клітин при опромінуванні ікс- або гамма-випроміненням.

Матеріали і методи: У роботі використані методи математичного моделювання, програмування, чисельні.

Результати: Побудована математична модель процесів, що визначають репродуктивну загибель опромінених клітин. Модель враховує явище насичення систем репарації радіаційних ушкоджень ДНК та структурно-функціональні особливості будови хроматину в еукаріот. Обговорене питання оцінки параметрів моделі за експериментальними даними. Проаналізовані можливі трактування одержаних результатів.

Висновки: Одержана аналітична залежність виживаності клітин від дози опромінення добре відповідає експериментальним даним та враховує існуючі уявлення про сутність процесів репарації радіаційних ушкоджень ДНК.

Ключові слова: математичне моделювання, репарація радіаційних ушкоджень ДНК, виживаність еукаріотичних клітин.

Причини репродуктивної загибелі опромінених клітин донині цілком не з'ясовані. Факт існування потенційно-летальних ушкоджень доводить визначальну роль репарації радіаційних ушкоджень (РУ) ДНК у формуванні кривої виживаності клітин, опромінених рентгеновським або гамма-випроміненням. Зокрема, такі дані свідчать про те, що загибель клітин значною мірою визначається репарабельними ушкодженнями ДНК. Більше того, на сьогодні невідомі такі види РУ, які клітина не вміє репарувати; тобто, здавалося б, клітина повинна мати змогу репарувати всі радіаційні ушкодження й зберегти життєздатність і здатність до поділу.

Проте частина опромінених клітин все ж таки гине. Чому клітини гинуть, якщо вони вміють репарувати РУ будь-якого виду? Часто для пояснення цього протиріччя використовують припущення про існування явища насичення систем репарації. Але у чому воно полягає? Висловлювалася думка (наприклад [1]) про те, що у разі великої кількості ушкоджень клітина не встигає репарувати всі з них до вступу в такий етап клітинного циклу, в якому наявність нерепарованих РУ веде до необоротної дезорганізації геному з наступною загибеллю клітини. Відповідна модель досить докладно обговорена в [2].

На наш погляд, модель, яка ґрунтується на описаному розумінні сутності явища насичення систем репарації клітинної ДНК, має у випадку еукаріотичних клітин враховувати також те, що в еукаріот хроматин дискретний (складається з окремих одиниць — хромосом) і кожний з комплексів ферментів репарації (КФР) двониткових розривів (ДР) ДНК, очевидно, має певний жорсткий зв'язок відносно якоїсь ділянки хромосоми. Точніше, якоїсь структурно-функціональної одиниці (СФО) хромосоми. Ймовірно, такою одиницею є петлевий домен або — MASSU (membrane associated superstructure unit) чи щось інше. На користь такого припущення, з нашого погляду, свідчать такі факти: 1) окремі реплікони можуть реплікуватися незалежно один від одного [3]; 2) комплекс ферментів рекомбінаційної репарації ДР ДНК подібний до комплексу ферментів реплікації ДНК [3], а вони, можливо, є частинами одного складного мультифункціонального комплексу ферментів; 3) КФР пов'язані з нитками ядерного матриксу, які з'єднуються з MARs (matrix associated region) на краях петлевих доменів (див. наприклад [4]); 4) у межах однієї MASSU у певний момент часу може відбуватися тільки один акт репарації ДР [5].

З огляду на запропоноване в [1] розуміння сутності явища насичення систем репарації, важливим є питання про те, починаючи з якого етапу клітинного циклу наявність нерепарованих ДР неминуче веде до репродуктивної загибелі клітини. Сам автор [1] вважав, що це якийсь етап S-стадії клітинного циклу. Не виключаючи такого трактування, ми припускаємо, що цей етап може належати стадії G₂ або переходу зі стадії G₂ до мітозу.

Модель, у якій використані такі міркування, була описана в [6]. На цей час ми уточнили дану модель і ретельно проаналізували результати, які випливають із неї. Описанню цієї модернізованої моделі та її аналізу присвячена подальша частина представленої роботи.

Модельні припущення

Будемо називати інтервал часу від моменту утворення РУ до зазначеного вище етапу клітинного циклу таким, що є репарабельним інтервалом. Очевидно, для асинхронної популяції опромінованих клітин репарабельний інтервал — це випадкова величина із рівномірним розподілом.

У запропонованій моделі умовою виживання опроміненої клітини є відсутність у всіх її СФО до завершення репарабельного інтервалу нерепарованих ДР. Якщо ж хоча б в одній СФО до моменту закінчення репарабельного інтервалу залишився нерепарованим хоча б один ДР, то клітина гине. Іншими словами, якщо протягом репарабельного інтервалу клітина встигла репарувати всі ДР, вона виживає, якщо ж хоча б один ДР клітина репарувати не встигла, то згодом вона загине.

Непростим є питання про те, чи існують такі радіаційні ушкодження, які не репаруються в принципі, тобто абсолютно летальні, РУ ДНК. Тут ми припускатимемо, що у разі існування таких ушкоджень їх вплив на виживаність клітин при опроміненні в дозах до 3–4 Гр не є значущим.

Будемо використовувати традиційне для радіобіології припущення про те, що розподіл ДР за СФО є розподілом Пуассона. Для спрощення припущення вважатимемо, що час репарації всіх ДР однаковий.

Математична модель

Домовимося про деякі умовні позначення. Нехай S — виживаність (імовірність виживання) опромінених клітин, D — доза випромінення (поглинута доза), n₀ — середнє число ДР, які додатково утворюються в клітині при збільшенні дози на 1 Гр, n_e — число СФО в клітині, t_p — час репарації одного ДР, T₀ — тривалість клітинного циклу, t_i — тривалість репарабельного інтервалу для розглянутої клітини, T — максимальна тривалість репарабельного інтервалу для до-

сліджуваного виду клітин, N — ціла частка відношення $\frac{T}{t_p}$, $k = \frac{T_0 - T + t_p}{T_0}$, $k_1 = \frac{t_p}{T_0}$, $k_2 = \frac{T - Nt_p}{T_0}$.

Якщо формально вважати, що ті стадії клітинного циклу, на яких наявність нерепарованих ДР призводить до загибелі клітини, відповідають нульовому значенню тривалості репарабельного інтервалу, то для щільності ймовірності тривалості репарабельного інтервалу ($f(t_i)$) можна записати

$$f(t_i) = \begin{cases} 0, & t_i < 0 \\ \frac{T_0 - T}{T_0} \cdot \delta(t_i), & t_i = 0 \\ \frac{1}{T_0}, & 0 < t_i \leq T, \\ 0, & t_i > T, \end{cases}$$

де $\delta(t_i)$ — δ -функція Дірака.

Якщо клітина або вже ввійшла в нерепарабельний етап клітинного циклу, або тривалість репарабельного інтервалу менша за час репарації одного ДР, тобто $t_i < t_p$, (імовірність цієї події дорівнює k), то вона виживе тільки в тому випадку, якщо в жодній із СФО цієї клітини не утворилося жодного ДР. Імовірність останньої події (позначимо цю ймовірність P_0) дорівнює

$$P_0 = \left(\exp\left(-\frac{n_0 D}{n_e}\right) \right)^{n_e} = \exp(-n_0 D).$$

Якщо тривалість репарабельного інтервалу більша або дорівнює t_p , але менша $2t_p$, то клітина виживе в тому випадку, якщо в кожній СФО утворилося не більше одного ДР. Таким чином, при $t_p \leq t_i < 2t_p$ (імовірність цієї події дорівнює k_1) імовірність виживання клітини (P_1) становить

$$P_1 = \left(\exp\left(-\frac{n_0 D}{n_e}\right) + \frac{n_0 D}{n_e} \exp\left(-\frac{n_0 D}{n_e}\right) \right)^{n_e} = \exp(-n_0 D) \left(1 + \frac{n_0 D}{n_e} \right)^{n_e}.$$

Аналогічно для $n = 2; 3; \dots; N-1$ при $nt_p < t_i \leq (n+1)t_p$ (імовірність цієї події при будь-якому n , що задовольняє умові $1 \leq n < N$, дорівнює k_1) для ймовірності виживання клітини отримуємо

$$P_n = \exp(-n_0 D) \cdot \left(1 + \sum_{i=1}^n \left(\frac{1}{i!} \left(\frac{n_0 D}{n_e} \right)^i \right) \right)^{n_e}.$$

При $Nt_p < t_i \leq T$ (імовірність цієї події дорівнює k_2) імовірність виживання клітини становить

$$P_N = \exp(-n_0 D) \cdot \left(1 + \sum_{i=1}^N \left(\frac{1}{i!} \left(\frac{n_0 D}{n_e} \right)^i \right) \right)^{n_e}.$$

Поєднуючи отримані результати, для S , можна записати

$$S = \sum_{n=0}^N P_n = \exp(-n_0 D) \left(k + k_1 \sum_{n=1}^{N-1} \left(1 + \sum_{i=1}^n \left(\frac{1}{i!} \left(\frac{n_0 D}{n_e} \right)^i \right) \right)^{n_e} + k_2 \left(1 + \sum_{i=1}^N \left(\frac{1}{i!} \left(\frac{n_0 D}{n_e} \right)^i \right) \right)^{n_e} \right). \quad (1)$$

Обговорення

У радіобіології прийнято аналізувати експериментальну криву залежності $\ln S$ від D . У запропонованій нами моделі аналітичне вираження для цієї залежності має такий вигляд:

$$\ln S = \ln \left(k + k_1 \sum_{n=1}^{N-1} \left(1 + \sum_{i=1}^n \left(\frac{1}{i!} \left(\frac{n_0 D}{n_e} \right)^i \right) \right) \right)^{n_e} + k_2 \left(1 + \sum_{i=1}^N \left(\frac{1}{i!} \left(\frac{n_0 D}{n_e} \right)^i \right) \right)^{n_e} - n_0 D. \quad (2)$$

При опромінюванні еукаріотичних клітин рентгенівським або гамма-випроміненням графік зазначеної залежності має характерний вигляд: «плече» при менших значеннях дози і прямолінійну ділянку при більших значеннях дози випромінення. За нахилом лінійної ділянки прийнято визначати величину такого показника радіочутливості клітин як D_0 ($D_0 = -(\ln S)'$). У зв'язку з цим розглянемо поведінку кривої, описану формулою (2), при більших значеннях D . Точніше, знайдемо $\lim_{D \rightarrow \infty} (\ln S)'$. Легко показати, що ця межа становить невизначеність типу $\frac{\infty}{\infty}$, розкриваючи яку за Лопиталем, отримаємо $(\ln S)'_{D \rightarrow \infty} = -n_0$.

Таким чином, традиційно зумовлений з експериментальних кривих показник D_0 у рамках запропонованої нами моделі є величиною, зворотною n_0 , тобто обчислюється як $D_0 = \frac{1}{n_0}$.

Якщо використовувати експериментальні дані, наведені, наприклад, у [7], для клітин лінії HeLa, отримаємо: $n_0 = 0,55 \text{ Гр}^{-1}$.

Отриманий результат, на перший погляд, суперечить експериментальним даним, оскільки чимало авторів (див. наприклад [7, 8]) оцінюють число DR , утворюваних у клітинах ссавців при дозі $D = 1 \text{ Гр}$, у кілька десятків. Можна навести декілька пояснень зазначеного протиріччя. Так, у праці [9] вказувалося, що для клітин *E. coli* тільки деяка частина виявлених DR утворилися саме внаслідок опромінювання. Автори [9] пов'язують появу більшої частини DR із тим, що вони виникли внаслідок роботи механізмів репарації РУ клітинної ДНК. Іншою ймовірною причиною завищення дійсного числа DR в експериментальних роботах може бути те, що лізис клітини з наступним виділенням ДНК при наявності нерепарованих одноститкових розривів може супроводжуватися трансформацією двох або більше одноститкових розривів, розташованих один від одного не занадто далеко, у двониткові розриви. Якщо значення числа DR , наведені в літературі при $D = 1 \text{ Гр}$, об'єктивно відбивають кількість двониткових розривів ДНК, які утворилися саме внаслідок опромінення, а не внаслідок вищевказаних причин, то тоді, очевидно, варто припускати, що не будь-які DR можуть викликати загибель клітини. Відомо (див. наприклад [5]), що серед DR є такі, час репарації яких у кілька разів перевищує звичайний для репарації DR , причому кількість таких розривів квадратично залежить від дози, тоді як у звичайних DR — лінійно. Цей факт свідчить, очевидно, про розбіжності в механізмах виникнення цих видів DR і, ймовірно, про різну їхню значущість із погляду виживаності клітин.

Можливі й інші пояснення вищезгаданого протиріччя. Наприклад, відомі явища затримки реплікації й мітозу після опромінювання можуть бути пов'язані з тим, що клітина не входить в S-стадію поки не репаровані всі РУ певного типу. У цьому випадку у вищевказаних формулах мають враховуватися не всі DR , а тільки деяка їх частина.

Слід зазначити, що якщо величина n_0 дійсно має значення порядку 1 Гр^{-1} , а величина n_e — більші значення, то при дозах у кілька греїв величина $\frac{n_0 D}{n_e}$ значно менша за одиницю й формула (1) може бути спрощена до вигляду

$$S = \exp(-n_0 D) \cdot \left(k + (1-k) \left(1 + \frac{n_0 D}{n_e} \right)^{n_e} \right). \quad (3)$$

Якщо використовувати дані (наприклад [7]) про тривалість різних стадій клітинного циклу для клітин HeLa, то величина k має приймати значення в діапазоні від 0,13 (якщо кінець репарабельного інтервалу — це кінець стадії G_2) до 0,53 (якщо кінець репарабельного інтервалу відповідає переходу від стадії G_1 до стадії S).

Порівняння кривої, розрахованої з формули (3), і експериментальної кривої [7] показує, що відповідність між цими кривими досягається при різних поєднаннях значень параметрів k , n_0 і n_e , причому, чим більше значення k , тим більше ті величини n_0 і n_e , при яких спостерігається гарна відповідність між теоретичною та експериментальною кривими. Наприклад, при $k = 0,3$ отримуємо $n_0 = 1,39 \text{ Гр}^{-1}$ і $n_e = 2,5$, а при $k = 0,5$ — $n_0 = 1,7 \text{ Гр}^{-1}$ і $n_e = 6$.

Отримані описаним чином результати є несподіваними з двох причин.

По-перше, оцінка n_0 , проведена раніше з використанням прямолінійної ділянки кривої виживаності дала значення $0,55 \text{ Гр}^{-1}$, а при оцінці, отриманій шляхом підганяння параметрів моделі для отримання найкращої відповідності експериментальній кривій, величина n_0 при різних значеннях k приймає значення від 1,24 до 1,70. Такі значення істотно більші, ніж ті, які одержують при оцінці прямолінійної ділянки кривої виживаності. Це протиріччя, очевидно, можна пояснити тим, що на ділянці кривої, яку вважаємо прямолінійною, крива $\ln S = f(D)$ все-таки ще не є дійсно прямолінійною і її нахил до осі абсцис із ростом величини D повільно збільшується. Звідси випливає, що визначення n_0 за хвостом кривої виживаності є недостатньо коректним і може використовуватися тільки для досить грубої заниженої оцінки величини n_0 . Очевидно, досить точні оцінки цієї величини на прямолінійній ділянці залежності $\ln S = f(D)$ можуть бути отримані тільки при таких великих значеннях дози випромінювання, при яких виживаність настільки мала, що не визначається експериментально у відомих нам дослідженнях.

По-друге, ще більш дивною уявляється отримана оцінка величини n_e . Якщо вважати, що СФО — це петлеві домени, то n_e повинно мати порядок десятків тисяч, якщо MASSU — тисяч, якщо хромосом, то $n_e = 46$ (для клітин лінії HeLa). Оцінені значення порядку декількох одиниць змушують по-іншому поставитися до відомого (див. наприклад [10]) явища, сутність якого в тому, що при використанні для опромінювання клітин рентгенівського або гамма-випромінювань у хромосомах ушкоджуються в основному послідовності, які активно транскрибуються. Якщо вважати, що складнорепаровані ДР, які становлять небезпеку для життя клітини, утворюються тільки або майже тільки в тих ділянках ДНК, в яких у момент опромінювання відбувається транскрипція, то в цьому випадку як n_e в описаній моделі слід розуміти не кількість СФО якого-небудь вигляду в клітині, а кількість тих СФО, в яких у момент опромінювання відбувається транскрипція.

Обговоримо деякі підходи до оцінки параметрів моделі за експериментальними даними. Одним з таких підходів є обчислення інтегралів, що мають вигляд $\int_0^{\infty} D^m S(D) dD$. Такі інтеграли досить легко можуть визначатися з експериментальних кривих. Крім того, процедура чисельного інтегрування, як відомо, є стійкою стосовно малих помилок у визначенні вихідних даних. Використовуючи вищевикладену модель, ми отримали аналітичний вираз для найпростішого інтегралу (Z) такого типу ($m = 0$), що становить площу під кривою залежності $S = f(D)$:

$$Z = \frac{1-k}{n_0} \left(1 + \sum_{i=1}^{n_e} \frac{(n_e)!}{n_e^i (n_e - i)!} \right).$$

Аналізуючи наведені вище результати порівняння експериментальної кривої з розрахунковою, можна помітити, що при всіх можливих змінах значень величини k величини n_0 відрізнялися не дуже істотно (від 1,39 до 1,70) і будь-яке значення із цього діапазону може бути прийнято як оцінку величини n_0 .

Оскільки величина Z , як зазначалося, може бути досить легко визначена з експериментальної кривої, то при наявності оцінки n_0 з'являється можливість отримати оцінку величини k при відомому значенні n_e і навпаки.

Література

1. Haynes R.H. // *Radiat. Res. Suppl.* — 1966. — Vol. 6. — P. 1–29.
2. Обатуров Г.М. *Биофизические модели радиобиологических эффектов.* — М.: Энергоатомиздат, 1987. — 152 с.

-
3. Сынзыныс В.И., Саенко И.И., Пелевина И.И. // *Итоги науки и техники. Радиационная биология*. — 1990. — Т. 9. — С. 114–213.
 4. Глазков М.В. // *Молекулярная биология*. — 1995. — Т. 29, вып. 5. — С. 965–982.
 5. Москалева Е.Ю., Илюшина Н.А. // *Итоги науки и техники. Радиационная биология*. — 1990. — Т. 9. — С. 1–113.
 6. Книгавко В.Г., Мещерякова О.П., Радзішевська Є.Б. // *УРЖ*. — 2004. — Т. XII, вип. 4. — С. 438–443.
 7. Гродзинський Д.М. *Радіобіологія*. — К.: Либідь, 2000. — 448 с.
 8. Газиев А.И. // *Радиационная биология. Радиоэкология*. — 1999. — Т. 39, № 6. — С. 630–638.
 9. Бреслер С.Е., Носкин Л.А., Суслов А.В. // *Радиобиология*. — 1981. — Т. 21, № 1. — С. 3–6.
 10. Баскаева И.О. // *Там же*. — 1992. — Т. 32, № 5. — С. 673–683.

Надходження до редакції 02.10.2009.

Прийнято 19.10.2009.

Адреса для листування:

Книгавко Володимир Гілярієвич,
Харківський національний медичний університет,
пр-кт Леніна, 4, Харків, 61022, Україна