

В.Г. Книгавко,
О.П. Мещерякова,
Є.Б. Радзішевська

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

Математичне моделювання впливу насичення репаративних систем опромінених клітин на виживаність цих клітин Повідомлення 1.

Моделювання кривих виживаності у прокариотів

Mathematical simulation of influence of irradiated
cell reparative system saturation on cell survival.
Communication 1. Simulation of survival curves
in prokaryotes

Цель работы: Построение математических моделей процессов формирования кривых выживаемости для клеток прокариотов при облучении рентгеновским или гамма-излучением.

Материалы и методы: Математическое моделирование, алгоритмизация и программирование.

Результаты: Построены и проанализированы 3 модели, которые отвечают таким модельным предположениям. Абсолютнолетальные нерепарабельные радиационные повреждения (НРП) не образуются, образуются опасные репарабельные радиационные повреждения (ОРП) одного вида (модель 1); НРП не образуются, образуются ОРП двух видов (модель 2); образуются ОРП одного вида и НРП (модель 3). В основу моделей положены представления о насыщении систем репарации клеток при высших дозах облучения.

Выводы: Предложены математические модели процессов формирования кривых выживаемости для клеток прокариотов, которые основываются на представлении о возможности насыщения систем репарации радиационных повреждений ДНК облученных клеток при повышении дозы облучения. Предложенные модели предполагают доступность любого из образовавшихся опасных радиационных повреждений для любого из репарирующих ферментативных комплексов. Это предположение, на наш взгляд, выполняется для прокариотических клеток. Для наиболее простой из рассмотренных моделей обсужден вопрос о методах оценки параметров модели из экспериментальных данных.

Ключевые слова: математическое моделирование, репарация радиационных повреждений, кривые выживаемости.

Objective: To build mathematical models of processes of survival curve forming for prokaryotes at exposure to x- or gamma-rays.

Material and Methods: Mathematical simulation, algorithm, programming.

Results: Three models which corresponded to these model suggestions were built and analyzed. Absolute lethal unreparable radiation lesions (NRL) did not form, but dangerous repairable radiation lesions (DRRL) of one type appeared (model 1); NRL did not form, DRRL of two types appeared (model 2); DRRL of one type and NRL developed (model 3). The models were based on the ideas about saturation of the systems of cell reparation at the highest radiation doses.

Conclusion: Mathematical models of the processes of forming survival curves for prokaryotes which are based on the idea about the possibility of saturation of radiation lesion reparation systems of DNA of the irradiated cells at the dose increase were worked out. The models suggest accessibility of any dangerous radiation lesion for any reparative enzyme complex. These suggestion is true for prokaryotic cells. For the simplest of the discussed models the authors discuss the question about the methods of evaluation of the model parameters.

Key words: mathematical simulation, radiation lesion reparation, survival curves.

Як відомо, в більшості видів клітин після ікс- або гамма-опромінювання спостерігається характерна крива виживаності, яка в координатах при низьких значеннях дози має «плече» «логарифм виживаності — доза опромінення», а при високих — ділянку, що традиційно вважається лінійною. Якісному обґрунтуванню й кількісному опису процесів формування кривих такого типу присвячено безліч праць; їх результати узагальнені в монографіях [1, 2] і підручниках з радіобіології [3].

На сьогодні наявність «плеча» найчастіше пов'язують з репарацією радіаційних пошкоджень (РП) ДНК клітини, що виникають при її опромінюванні; досить докладно вивчені ферментативні системи клітини, які репарують ті чи інші види РП. Поширена точка зору [2] про те, що

наявність двох різних ділянок на кривій виживаності («плеча» та лінійної ділянки) пов'язана з насиченням систем репарації при високих дозах опромінення. Ми пропонуємо опис й аналіз математичних моделей процесів, що визначають форму кривої виживаності, причому в основу цих моделей також покладено припущення про існування ефекту насичення репараційних систем клітин.

В еукаріотичних клітинах хроматин розділений на кілька хромосом. Ймовірно, окремий ферментативний комплекс (ФК), що здійснює репарацію РП певного виду, реалізує свої функції тільки в обмеженій ділянці геному (напр., у межах однієї хромосоми). Тому при моделюванні радіобіологічних процесів, яке враховує репарацію клітиною РП ДНК, важливим є питання про те, чи весь хроматин доступний для кожного з ФК, чи тільки його частина. Простішою є модель, яка припускає, що кожному з ФК доступний весь хроматин клітини. Можливо, саме такою є ситуація в прокаріотичних клітинах, де хроматин не розділений на окремі хромосоми. В даній роботі розглядатимемо моделі, що відповідають останньому припущенню.

В основу моделей покладено такі уявлення. При опромінюванні в клітині виникають РП одного чи декількох видів, які клітина може репарувати, але репарація потребує певного часу. Якщо клітина не встигає до певного моменту клітинного циклу репарувати всі ці пошкодження, вона гине. Такі пошкодження ДНК слід було б назвати потенційно-летальними РП, але термін «потенційно-летальні пошкодження» використовується в радіобіології в дещо іншому значенні, тому вищезгадані РП називатимемо небезпечними репарабельними радіаційними пошкодженнями (НРРП). Зазначений момент клітинного циклу, до якого має завершитися репарація НРРП, найімовірніше відповідає певному етапу S-стадії клітинного циклу. Якщо до цього певного моменту репарація НРРП не завершилася, то настає необоротна дезорганізація геному клітини.

Дотепер нез'ясованим залишається питання про те, чи утворюються в клітині при опромінюванні РП, які вона взагалі не може репарувати впродовж жодного періоду часу, тобто чи утворюються абсолютно-летальні нерепарабельні радіаційні пошкодження (НРП). Розгляньмо моделі, що припускають і можливість і неможливість утворення НРП.

Важливим також є питання про те, скільки існує видів НРРП і що це за пошкодження. Традиційно до таких пошкоджень відносять двониткові розриви (ДР) ДНК. Відомо також [2–4], що внаслідок опромінювання клітин у них утворюється деяка кількість одониткових пошкоджень (ОП) ДНК, які повільно репаруються. На наш погляд, вони також є претендентами на роль НРРП. У працях [3, 5] зазначалося, що серед ДР існує фракція таких пошкоджень, що залишаються нерепарованими протягом дуже тривалого часу після опромінювання, причому механізм їхнього утворення, очевидно, відрізняється від механізму утворення інших ДР, оскільки для цих ДР характерна квадратична залежність їхнього числа від дози опромінення, тоді як для інших ДР у більшості джерел [3] зазначається лінійна залежність числа від дози. Можливо, такі ДР можуть претендувати на роль НРП.

Розгляньмо 3 моделі, що відповідають таким модельним припущенням:

НРП не утворюються, утворюються НРРП одного виду (модель 1);

НРП не утворюються, утворюються НРРП двох видів (модель 2);

Утворюються НРРП одного виду і НРП (модель 3).

При моделюванні припустимо, що випадкова величина, якою є кількість РП певного виду, що утворюються в клітині при опромінюванні, підпорядковується розподілу Пуассона (традиційне припущення при моделюванні в радіобіології).

Припустимо також, що опромінюється асинхронна популяція клітин.

Нехай S — виживаність клітин (тобто ймовірність виживання), $p_i(n)$ — ймовірність утворення в клітині n НРРП i -го виду, m_i — число ФК, що репарують РП i -го виду. Вважатимемо, що на репарацію одного РП даного виду кожний ФК витрачає фіксований час. Позначимо цей час τ_i . Нехай t — проміжок часу від моменту утворення РП до моменту клітинного циклу,

після якого нерепарованість даного РП спричиняється до загибелі клітини. Називатимемо цей проміжок часу репарабельним інтервалом. Нехай T — максимальна тривалість репарабельного інтервалу, $k_i = \frac{\tau_i}{T}$, а N_i — ціла частина числа $\frac{T}{\tau_i}$.

Розгляньмо модель 1.

Зважаючи на викладене вище, можна твердити, що в разі прийняття припущень моделі 1 клітина виживає, якщо в ній не утворилося жодного НРРП або якщо НРРП утворилися, але час, потрібний клітині для репарації цих пошкоджень, є меншим за тривалість репарабельного інтервалу. Для асинхронної популяції тривалість репарабельного інтервалу має рівномірний розподіл із густиною ймовірності виду

$$f(t) = \begin{cases} 0, & t < 0 \\ \frac{1}{T}, & 0 \leq t \leq T \\ 0, & t > T \end{cases}$$

Ймовірність репарації n НРРП в клітині дорівнює

$$1 - \frac{\tau}{T}, \text{ якщо } n \leq m; \quad 1 - \frac{2\tau}{T}, \text{ якщо } m < n \leq 2m; \quad 1 - \frac{3\tau}{T}, \text{ якщо } m < n \leq 3m \text{ тощо.}$$

Якщо $n > Nm$, то повна репарація взагалі неможлива і клітина обов'язково гине. Тоді

$$\begin{aligned} S &= p(0) + \sum_{n=1}^m p(n) \cdot (1-k) + \sum_{n=m+1}^{2m} p(n) \cdot (1-2k) + \dots + \sum_{n=(N-1)m+1}^{Nm} p(n) \cdot (1-Nk) = \\ &= p(0) + \sum_{j=1}^N \left((1-jk) \sum_{n=m(j-1)+1}^{mj} p(n) \right). \end{aligned} \quad (1)$$

Ураховуючи, що $p(n) = e^{-n_0 D} \frac{(n_0 D)^n}{n!}$, де D — доза опромінення, а n_0 — коефіцієнт пропорційності, який має сенс числа НРРП даного виду, що утворюються в середньому в одній клітині на одиницю дози, формулу (1) можна перетворити на

$$S = e^{-n_0 D} \left(1 + \sum_{j=1}^N \left((1-jk) \cdot \sum_{n=m(j-1)+1}^{mj} \frac{(n_0 D)^n}{n!} \right) \right). \quad (2)$$

Нехай $y = \ln S$. Тоді

$$y = \left(1 + \sum_{j=1}^N \left((1-jk) \cdot \sum_{n=m(j-1)+1}^{mj} \frac{(n_0 D)^n}{n!} \right) \right) - n_0 D. \quad (3)$$

Графік залежності Y від D , що відповідає формулі (3), наведено на рис. 1. Його побудовано для значень $n_0 = 4$; $m = 2$; $k = 0,2$.

Наведений графік свідчить, що крива виживаності в координатах $\ln S, D$ має виражене «плече» і ділянку, яка візуально не відрізняється від прямолінійної. Разом із тим, ділянка кривої виживаності, що відповідає високим значенням дози опромінення, не є прямолінійною. При зміні величини D її нахил також змінюється. Поряд із цим, наявність візуально лінійної ділянки кривої виживаності, але не істинно лінійної залежності характерна й для багатьох інших моделей, що описують репродуктивну загибель клітин, наприклад, для багатоударних моделей [3]. Це можна продемонструвати експериментально — відстежити тільки порівняно невелику лінійну (псевдолінійну?) ділянку кривої виживаності. Чимало авторів [1] підкреслюють, що ті ділянки кривої виживаності, які реально спостерігаються в експерименті, задовольняють умові $S > 10^{-3} \div 10^{-4}$. Крім того, навіть на цих ділянках завжди існує розкид значень експериментальних даних, що не дозволяє відрізнити залежність, близьку до лінійної, від істинно лінійної.

Традиційно для опису кривої виживаності використовують такі показники, як D_0 , D_q і n . Якщо ця крива не має істинно лінійної ділянки, то значення згаданих параметрів залежать від того, при яких значеннях величини D вони були визначені. У зв'язку з цим цікаво дослідити поведінку величини D_0 при $D \rightarrow \infty$. За визначенням, $D_0 = -\frac{dD}{dy}$. Знайдемо похідну $\frac{dy}{dD}$.

$$\frac{dy}{dD} = \frac{\sum_{j=1}^N \left((1-jk) \cdot \sum_{n=m(j-1)+1}^{mj} \frac{(n_0 D)^{n-1}}{(n-1)!} \right)}{1 + \sum_{j=1}^N \left((1-jk) \cdot \sum_{n=m(j-1)+1}^{mj} \frac{(n_0 D)^n}{n!} \right)} - n_0. \quad (4)$$

При $D \rightarrow \infty$ перший доданок у правій частині формули (4) є невизначеністю типу $\frac{\infty}{\infty}$. Розкриваючи її, одержуємо

$$\lim_{D \rightarrow \infty} \frac{dy}{dD} = -n_0 \text{ і } D_0 = \frac{1}{n_0}.$$

Таким чином, граничне (при $D \rightarrow \infty$) значення D_0 (D_{0r}) зворотно пропорційне числу НРРП, яке припадає в середньому на одну клітину при дозі, що дорівнює одиниці. Разом з тим, при визначенні величини D_0 на лінійній ділянці кривої виживаності обчислюється більше за граничне значення (розрахункове значення D_0). Щоб отримати розрахункове значення, ми використовували ділянку кривої виживаності поблизу значення $S = 10^{-3}$, тому що ця ділянка, з одного боку, доступна для експериментального вивчення, а з іншого боку, зазвичай відповідає максимальним дозам, при яких визначають криву виживаності (тобто при цьому D_0 розрахункове є найближчим до D_0 граничного). Виявилось, що розрахункове значення D_0 (D_{0p}) прямо пропорційне граничному (рис. 2), тобто $D_{0p} = k_1 D_{0r}$, де k_1 — коефіцієнт пропорційності.

Розрахунки показують, що з ростом параметра k коефіцієнт k_1 зменшується, тобто зменшуються й розрахункові значення D_0 . Це не дивно, збільшення параметра k є наслідком зменшення тривалості репарабельного інтервалу, а отже, й зменшення обсягу репарації РП ДНК клітинами, тоді як параметр D_{0r} , за своєю суттю, є значенням D_0 при відсутності репарації. Разом із тим певна довільність вибору ділянки розрахунків D_{0p} призводить до того, що залежність k_1 від k має складний характер і навряд чи може бути описана досить простим для практичного застосування аналітичним виразом.

Розрахунки також показують, що збільшення параметра m приводить до збільшення коефіцієнта k_1 , що також природно, оскільки при зростанні m збільшуються репараційні можливості клітини. Графік залежності k_1 від m , наведений на рис. 3, свідчить, що ця залежність, зображення якої має опуклість догори, відрізняється від лінійної (особливо при малих значеннях m). Таким чином, і для цієї залежності навряд чи доцільно шукати аналітичне апроксимуюче вираження, тим більше що коефіцієнти апроксимації в такому виразі залежатимуть від значень параметра k . Водночас зазначимо, що результати наших розрахунків указують на те, що залежність k_1 від m при фіксованому k не залежить від n_0 .

Довільність вибору ділянки визначення D_{0p} ще більшою мірою впливає на розрахункові значення традиційно використовуваних показників D_q і n .

Підбиваючи підсумки, можна зробити висновок про те, що визначення з експериментальної кривої виживаності показників D_0 , D_q і n не дозволяє досить точно оцінювати значення параметрів моделі. Отже, необхідно шукати інші шляхи аналізу кривої виживаності для оцінки параметрів n_0 , m , k і N . Втім з огляду на те, що N є цілою частиною величини $\frac{1}{k}$, модель реально залежить не від чотирьох, а від трьох параметрів: n_0 , m і k .

При роботі з експериментальними даними зазвичай найменші похибки їх визначення властиві чисельним методам, пов'язаним з інтегруванням і підсумовуванням. У зв'язку з цим цікаво проаналізувати залежність від параметрів n_0 , m і k площі ($S_{\text{кв}}$) під кривою виживаності, якщо ця

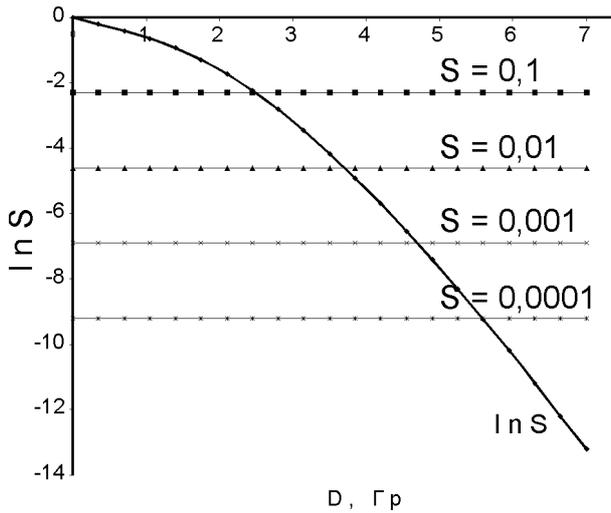


Рис. 1. Залежність $\ln S$ від D , розрахована відповідно до формули (3)

Dependence of $\ln S$ on D calculated according to (3)

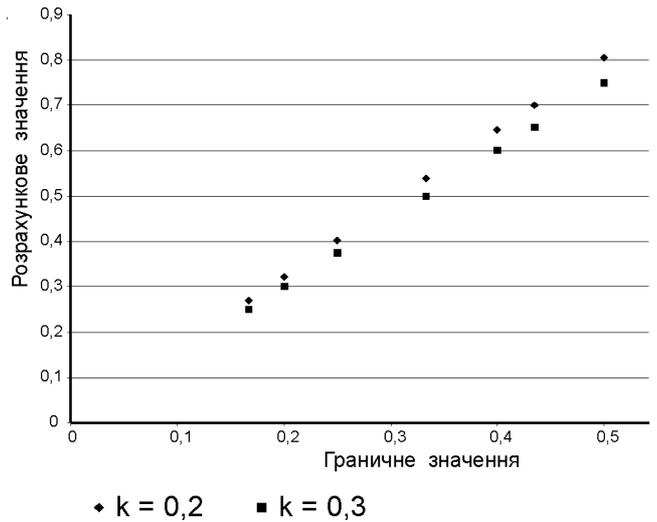


Рис. 2. Залежність розрахункового значення D_0 від граничного при $k = 0,2$ і $k = 0,3$

Dependence of D_0 on the limit at $k = 0.2$ and $k = 0.3$

крива зображена в координатах S, D , оскільки оцінка цієї площі з експериментальних даних пов'язана з підсумовуванням при використанні чисельних методів для обчислення визначеного інтеграла.

Очевидно, що

$$S_{\text{кв}} = \int_0^{\infty} S(D) dD. \quad (5)$$

Обчислимо інтеграл у правій частині формули (5).

$$S_{\text{кв}} = \frac{1}{n_0} \left(1 + mN \left(1 - \frac{k(N+1)}{2} \right) \right) = \frac{2 + mN(2 - k(N+1))}{2n_0}. \quad (6)$$

Оцінюючи з експериментальних даних величину $S_{\text{кв}}$, з формули (6) можна знайти значення кожного з параметрів n_0 , m і k , якщо відомі значення решти двох. Обговоримо питання про можливість такої оцінки значень цих параметрів, яка б не була пов'язана з використанням кривої виживаності.

Величину параметра n_0 визначали для різних видів клітин, і результати таких досліджень наводяться як в оригінальних працях, так і в численних оглядах, монографіях і підручниках [3, 6]. Разом із тим багато джерел указують на те, що частина знайдених пошкоджень ДНК клітин може бути жодним чином не пов'язана з впливом іонізуючої радіації, а бути наслідком природних процесів, пов'язаних із життєдіяльністю клітин, або виникати як результат самої методики виділення ДНК опромінених клітин при експериментальному визначенні величини n_0 .

Дані про величину m дуже обмежені. Втім, якщо ототожнювати НРРП з двонитковими розривами ДНК, а основним механізмом їхньої репарації вважати рекомбінаційну репарацію, то для оцінки величини m можуть виявитися корисними такі міркування. Відомо, що ФК, які здійснюють рекомбінаційну репарацію, значною мірою подібні до комплексів, що здійснюють реплікацію. На наш погляд, буде точніше їх вважати не подібними ФК, а одним мультифункціональним ферментативним комплексом. Як відомо [7], у прокаріотів реплікація починається у певній точці ДНК і відбувається в обох напрямках від точки початку реплікації. На нашу думку, це можна трактувати так, що клітини прокаріотів мають два ФК, які здійснюють реплікацію і, ймовірно, рекомбінаційну репарацію. Таким чином, можна припустити, що в прокаріотичних клітинах $m = 2$. В еукаріотичних клітинах число ФК, що здійснюють репарацію, оче-

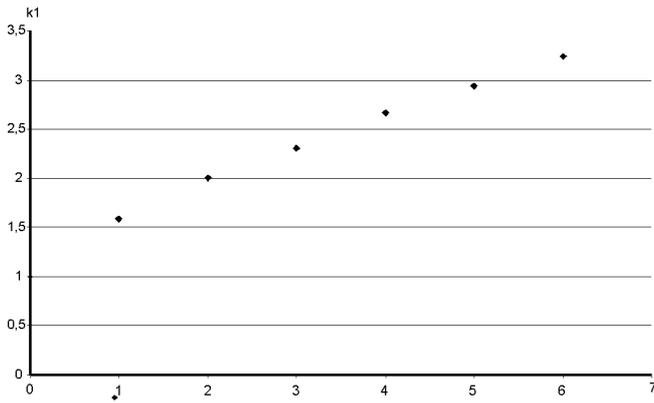


Рис. 3. Залежність коефіцієнта k_1 від m при $k = 0,18$
Dependence of k_1 on m at $k = 0,18$

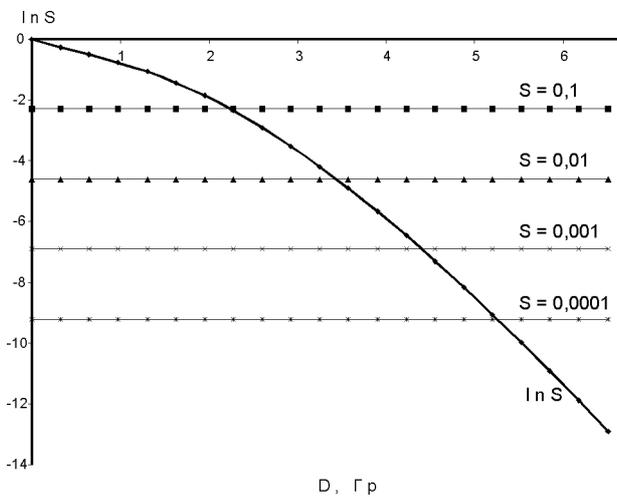


Рис. 4. Залежність $\ln S$ від D для моделі 2
Dependence of $\ln S$ on D for model 2

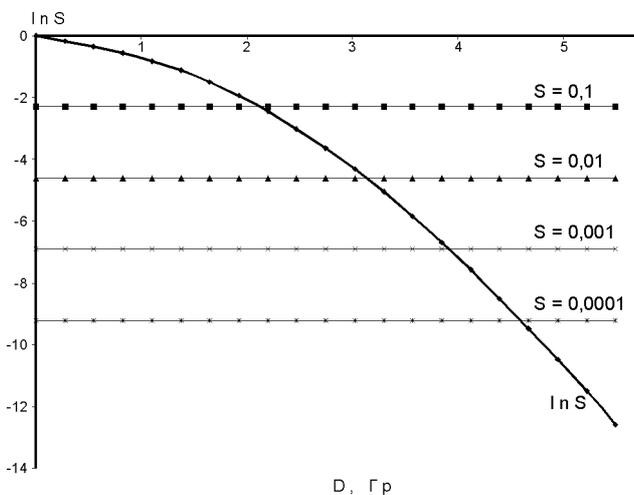


Рис. 5. Залежність $\ln S$ від D для моделі 3
Dependence of $\ln S$ on D for model 3

видно, не менше, ніж число хромосом. Разом з тим, ці ФК обслуговують, як видається, тільки окремі хромосоми (а можливо, й окремі ділянки хромосом, наприклад, реплікони), а не весь хроматин. У такому випадку розглянуті в цій роботі моделі не можуть бути застосовані.

Що стосується величини k , то її оцінка можлива, якщо визначитися з тим, які РП слід ототожнювати з НРРП (для різних видів РП відомі оцінки характерних часів репарації), і з тим, яка частина клітинного циклу відповідає репарабельному інтервалу. Якщо ми знову будемо ототожнювати НРРП із ДР ДНК, припускаючи рекомбінаційний механізм репарації, то репарабельний інтервал у прокаріотів не може бути довшим за той проміжок часу, протягом якого геном прокаріотичної клітини є диплоїдним. Таким чином, репарабельному інтервалу в прокаріотів, очевидно, відповідають якісь частини S і G_2 стадій клітинного циклу; в еукаріотів до репарабельного інтервалу має бути віднесена також G_1 стадія. Тому в прокаріотів значення параметра k має бути значно більшим, ніж в еукаріотів, і приймати значення, принаймні, не менші, ніж $0,1-0,2$, але якнайімовірніше, більші за ці значення. Ймовірно, саме внаслідок цього більшість ДР для прокаріотів є летальними пошкодженнями. Так, у роботі [4] відзначається, що для прокаріотів летальна подія відповідає утворенню $1,4$ ДР у середньому на клітину.

Розгляньмо модель 2, яка задовольняє таким припущенням: НРП не утворюються, утворюються НРРП двох видів. У цьому випадку

$$S = S_1 \cdot S_2,$$

де S_1 і S_2 обчислюються за формулою (2), тобто

$$S_i = e^{-n_{0i}D} \left(1 + \sum_{j=1}^{N_i} \left((1 - jk_i) \cdot \sum_{n=m_i(j-1)+1}^{m_i j} \frac{(n_{0i}D)^n}{n!} \right) \right),$$

де індекс i приймає значення 1 і 2 для S_1 і S_2 відповідно.

Нехай знову $y = \ln S$. Тоді графік залежності y від D для моделі 2 має вигляд, показаний на рис. 4.

Таким чином, графік кривої виживаності в координатах $\ln S$, D , як і у випадку моделі 1, характеризується наявністю «плеча» при низьких

значеннях дози і наявністю ділянки, яка візуально не відрізняється від лінійної, при високих

значеннях D . Зауважимо, що в цьому випадку $D_{0r} = \frac{1}{n_{01} + n_{02}}$.

Модель 3, як зазначалося, відповідає таким припущенням: утворюються НРРП одного виду та НРП. В цьому випадку також

$$S = S_1 \cdot S_2,$$

де S_1 обчислюється за формулою (2)

$$S_2 = e^{-\chi D^2},$$

де S_2 — множник, пов'язаний із наявністю НРП, а χ — деякий коефіцієнт пропорційності. У випадку моделі 3 графік залежності u від D має вигляд, показаний на рис. 5.

З рис. 5 видно, що й у цьому випадку графік кривої виживаності в координатах $\ln S$, D має «плече» і ділянку, яка візуально не відрізняється від прямолінійної, хоча в цьому випадку величина D_{0r} не може бути обчислена (вона дорівнює 0).

Усі три розглянуті моделі дають криві виживаності подібної форми. З'ясування питання про те, яка модель і в якому випадку може вважатися адекватнішою при описі процесів утворення і репарації РП, вирішуватиметься на основі аналізу феноменів потенційно-летальних і сублетальних пошкоджень, що ми маємо намір зробити в одному з наступних повідомлень.

ВИСНОВКИ

1. Запропоновано математичні моделі процесів формування кривих виживаності, що ґрунтуються на уявленнях про можливість насичення систем репарації радіаційних пошкоджень ДНК опромінених клітин при підвищенні дози опромінення.

2. Запропоновані моделі передбачають досяжність кожного з утворених небезпечних репарабельних радіаційних пошкоджень для кожного з репараційних ФК. Це припущення, на наш погляд, виконується для прокаріотичних клітин.

3. Для найпростішої з розглянутих моделей обговорено питання про методи оцінки параметрів моделі з експериментальних даних.

Література

1. Хансон К.П., Комар В.Е. Молекулярные механизмы радиационной гибели клеток. — М.: Энергоатомиздат, 1985. — 148 с.
2. Обатуров Г.М. Биофизические модели радиобиологических эффектов. — М.: Энергоатомиздат, 1987. — 148 с.
3. Гродзинський Д.М. Радиобіологія. — К.: Либідь, 2000. — 448 с.
4. Жестяников В.Д. Репарация ДНК и ее биологическое значение. — Л.: Наука, 1979. — 285 с.
5. Москалева Е.Ю., Илюшина Н.А. // Итоги науки и техники. Радиационная биология. — 1990. — Т. 9. — С. 1–113.
6. Газиев А.И. // Радиационная биология. Радиозащита. — 1999. — Т. 39, № 6. — С. 630–638.
7. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1992. — 225 с.

Надходження до редакції 20.04.2004.

Прийнято 07.05.2004.

Адреса для листування:

Кнігавко Володимир Гілярієвич,
Харківський державний медичний університет, пр-кт Леніна, 4, 61022, Україна