

²В. Г. Книгавко,
¹С. Ю. Протасеня,
¹Н. О. Гордієнко,
¹І. В. Шуба

¹Харківський національний
медичний університет,

²ДУ Інститут медичної
радіології ім. С.П. Григор'єва
НАМН України,
Харків

Математичне моделювання процесів, що визначають залежність виживаності опромінених клітин пухлини від ступеня їх оксигенації

Mathematical simulation of the processes determining dependence of survival of exposed tumor cells on the degree of their oxygenation

Цель работы: Моделирование зависимости радиочувствительности клеток от степени их оксигенации с целью расчета выживаемости клеток опухолей в их различных слоях, отличающихся степенью оксигенации.

Материалы и методы: Методы математического моделирования.

Результаты: Построены математические модели и получены аналитические выражения для расчета зависимости выживаемости облученных рентгеновским или гамма-излучением опухолевых клеток от концентрации кислорода в околоклеточной среде и от дозы излучения. Эти модели основываются на современных представлениях и гипотезах о механизмах репарации радиационных повреждений и процессах, реализующих кислородный эффект, по критерию выживаемости эукариотических клеток.

Выводы: Установлена зависимость от концентрации кислорода в околоклеточной среде величин, определяющих вероятность образования двунитевых разрывов ДНК и вероятность репарации этих повреждений.

Ключевые слова: математическое моделирование, злокачественная опухоль, выживаемость облученных клеток, дозовые зависимости, кислородный эффект.

Мета роботи: Моделювання залежності радіочутливості клітин від ступеня їх оксигенації з метою розрахунку виживаності клітин пухлин в їх різних шарах, що відрізняються ступенем оксигенації.

Матеріали та методи: Методи математичного моделювання.

Результати: Побудовано математичні моделі та отримано аналітичні вирази для розрахунку залежності виживаності опромінених рентгеновським або гамма-випроміненням клітин пухлини від концентрації кисню в навколклетинному середовищі та від дози випромінення. Ці моделі ґрунтуються на сучасних уявленнях і гіпотезах, про механізми репарації радіаційних ушкоджень та процесів, що реалізують кисневий ефект, за критерієм виживаності еукаріотичних клітин.

Висновки: Встановлено залежність від концентрації кисню в навколклетинному середовищі величин, що визначають імовірність утворення двониткових розривів ДНК та ймовірність репарації цих ушкоджень.

Ключові слова: математичне моделювання, злоякісна пухлина, виживаність опромінених клітин, дозові залежності, кисневий ефект.

Вивчення залежності радіочутливості клітин від ступеня їх оксигенації — надзвичайно актуальна проблема при розв'язанні задачі оптимізації методик променевої терапії злоякісних пухлин. Втім, нам невідомі роботи, де було б отримано такий аналітичний вираз, який би одночасно описував залежність виживаності опромінених клітин і від дози опромінення, і від міри ок-

Objective: Simulation of cell radiosensitivity dependence on their oxygenation with the purpose to calculate survival of the tumor cells in different layers with various degrees of oxygenation.

Material and Methods: Methods of mathematical simulation.

Results: Mathematical models were built. Analytical expressions for calculation of dependence of survival of exposed to x-ray or gamma-rays tumor cells on oxygen concentration in the pericellular environment and irradiation dose were obtained. These models are based on the contemporary ideas about the mechanisms of reparation of radiation lesions and the processes realizing oxygen effect using the criterion of survival of eukaryotic cells.

Conclusion: Dependence on oxygen concentration in the pericellular environment of the values determining the probability of forming two-thread DNA raptures and probability of reparation of these lesions was established.

Key words: mathematical simulation, malignant tumor, survival of exposed cells, dose dependence, oxygen effect.

сигенації цих клітин. Проте, саме такого роду залежність потрібна для розрахунку виживаності клітин пухлин у їх різних шарах, що відрізняються мірою оксигенації. Розв'язати цю задачу можливо тільки ґрунтуючись на аналізі процесів, що викликають загибель еукаріотичних клітин, опромінених рентгеновським або гамма-випроміненням.

Методика дослідження

У роботі використано методи ймовірнісного математичного моделювання.

Результати та їх обговорення

При математичному моделюванні процесів, що зумовлюють залежність виживаності (ймовірності виживання) клітин від концентрації кисню в навколоклітинному середовищі, необхідно враховувати, що ця залежність визначається двома величинами: а) ймовірністю утворення такого радіаційного ушкодження (РУ) ДНК клітини, яке за відсутності репарації зумовлює загибель цієї клітини; б) ймовірністю репарації клітиною цього РУ.

Вважається (див., наприклад [1]), що радіаційними ушкодженнями, які викликають репродуктивну загибель клітин, є двониткові розриви (ДР) ДНК, оскільки саме для РУ такого виду доведено вірогідність зв'язку їх кількості з виживанням клітини.

Вважається також (наприклад [2]), що при опроміненні клітин рентгенівським або гамма-випроміненням кількість ДР ДНК лінійно залежить від дози випромінення. Відомо також, що існує і фракція ДР, кількість яких пропорційна квадрату дози, але вклад цієї фракції в загальну кількість ДР, мабуть, стає значущим тільки при дозах випромінення, які перевищують використовані при променевій терапії. Отже, щоб описати залежність виживаності опромінених клітин від дози випромінення, ми вважаємо за можливе використовувати формулу, отриману у праці [3], яка припускає лінійність залежності кількості ДР від дози. Ця залежність має вигляд

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

де S — ймовірність виживання (виживаність) клітин;

D — поглинена доза;

k — параметр, що визначає ймовірність репарації ДР (про нього докладніше буде сказано далі),

n_e — кількість структурно-функціональних одиниць хроматину, кожна з яких обслуговуєть-

ся власним комплексом ферментів рекомбінаційної репарації.

У цій формулі величиною, яка визначає кількість ДР, що утворилися, є параметр n_0 , який має зміст середньої на клітину кількості ДР на 1 Гр поглиненої дози. Точніше, його можна визначити як зміну середньої кількості ДР у опроміненій клітині при збільшенні дози випромінення на 1 Гр.

Вважається (наприклад [1]), що 80–90 % ушкоджень ДНК при опроміненні клітин рентгенівським або гамма-випроміненням зумовлені непрямою дією радіації, причому таку дію на клітини зазвичай пов'язують з первинним утворенням не ДР, а якихось простіших та безпечніших для клітини ушкоджень, які можуть за участю кисню чисто хімічно (тобто без додаткової дії випромінення) трансформуватися в розриви ДНК. При такому розумінні процесу утворення розривів у нитках ДНК для появи ДР необхідно, щоб в обох нитках ДНК вищезгадані прості ушкодження зазнали дії кисню та трансформувалися в розриви ниток.

Якщо вважати, що в обох нитках доступність початкових простих ушкоджень для взаємодії з киснем однакова, то ймовірність утворення ДР має дорівнювати квадрату ймовірності такої взаємодії. Можна показати, що її ймовірність (p_v) описується таким виразом:

$$p_v = (1 - (1 - \eta)^{\alpha c_v}),$$

де η — ймовірність того, що одна з молекул кисню, які перебувають від простого ушкодження на досяжній відстані, досягне цього ушкодження і трансформує його в розрив перш ніж клітина репарує це просте ушкодження;

α — деякий коефіцієнт, що залежить від об'єму зони, перебуваючи в якій, молекула кисню може досягти простого ушкодження;

c_v — концентрація кисню всередині ядра клітини.

Тоді ймовірність (p_p) утворення ДР залежить від концентрації кисню таким чином:

$$p_p = (1 - (1 - \eta)^{\alpha c_v})^2.$$

Очевидно, кількість ДР ДНК, що утворюються, прямо пропорційна ймовірності p_p . Зауважимо, що в останній формулі фігурує концентрація кисню не в навколоклітинному середовищі, а в

клітині, точніше в її ядрі. У праці [4] описано результати дослідження внутріклітинного розподілу кисню. Зокрема, показано, що всередині клітини в її різних частинах концентрація кисню приблизно однакова, але така, що значно відрізняється від позаклітинної. Наведені результати свідчать, що різниця концентрацій кисню по обидві сторони мембрани мало залежить як від самих цих концентрацій, так і від величини потоку кисню через мембрану. Виходячи з цих результатів, можна було б використовувати при розрахунках, що є оцінюючими, експериментально отримане значення вищезгаданої різниці концентрацій, хоча можливість перенесення результатів, отриманих у праці [4] для ікринок риб, на ті клітини ссавців, які найчастіше використовуються при радіобіологічних дослідженнях, не видається цілком обґрунтованою. Втім, на сьогодні інші експериментальні дослідження про зв'язок зовнішньої та внутріклітинної концентрацій кисню нам не відомі і, мабуть, для оцінки зниження концентрації кисню на мембрані доведеться використовувати величину, що визначається результатами праці [4], вона дорівнює 48 гПа.

Досі ми обговорювали питання, пов'язані з визначенням кількості киснезалежних РУ ДНК. Водночас при опроміненні деяка кількість їх у клітині утворюється внаслідок прямої дії радіації. Ці ушкодження є киснезалежними та, за різними оцінками [2], складають 10–20% від загальної кількості РУ. Звідси випливає, що для величини n_0 остаточно можна записати:

$$n_0 = n_{0H} (\beta + (1 - \beta) p_p) =$$

$$= n_{0H} \left(\beta + (1 - \beta) (1 - (1 - \eta)^{\alpha c_b})^2 \right), \quad (2)$$

де n_{0H} — середня кількість ДР, утворених на 1 Гр поглиненої дози в умовах нормоксії;

β — величина, значення якої лежить у межах 0,1–0,2 і є часткою киснезалежних РУ.

Перейдемо тепер до параметра k у формулі (1), який, як вказувалося вище, визначає ймовірність репарації ДР ДНК.

У праці [3] параметр k вводиться як відношення тривалості (T_{nr}) тієї частини клітинного циклу, впродовж якої репарації РУ не відбувається, до загальної тривалості клітинного циклу, яка,

у свою чергу, є сумою T_{nr} та тривалості (T_p) тієї частини клітинного циклу, протягом якої репарація може відбуватися. Таким чином,

$$k = \frac{T_{nr}}{T_p + T_{nr}}.$$

Відомо, що при зменшенні оксигенації поділ клітин сповільнюється, а при достатньо низьких значеннях концентрації кисню в навколочлітинному середовищі припиняється взагалі, і клітина переходить у стан G_0 .

Розглянемо причини та характер зміни величини k при зменшенні концентрації кисню. При цьому будемо виходити з модельних припущень та результатів розрахунків, викладених у праці [5].

Її авторами використано результати експериментальної праці [6], в якій наведено графік залежності питомої швидкості (v) споживання кисню клітинами від концентрації (c) кисню в навколочлітинному середовищі, виходячи з яких, запропоновано такий аналітичний вираз для функції, що апроксимує цю залежність:

$$v = \begin{cases} v_m & c > c_r \\ \frac{v_m c}{c_r} & c_r \geq c \geq c_n \\ 0 & c < c_n \end{cases},$$

де v_m — швидкість споживання кисню клітинами в нормоксії (при цьому v не залежить від c),

c_r — концентрація кисню, гранична між нормо- та гіпоксією,

c_n — така його концентрація, що при $c < c_n$ клітина гине. При цьому величина c_r приблизно відповідає напрузі кисню в 14 мм рт. ст., а величину c_n ми вважаємо такою, що приблизно відповідає напрузі 1,6 мм рт. ст.

У праці [5] припускалося, що величина v складається з двох частин, з яких одна (v_j), — це та частина, яка йде на забезпечення поточної життєдіяльності, а інша (v_d) — на підготовку і здійснення поділу клітини. При цьому вважалося, що при $c > c_j$ величина v_j залишається сталою, а $v_d = v - v_j$, тобто величина v_d зменшується при зменшенні величини c . Таким чином, величина c_j — це така концентрація кисню, що при $c < c_j$ поділ клітин не відбувається і $v_d = 0$, а $v_j = v$.

Вважалось також, що при будь-яких значеннях c , які задовольняють умові $c > c_{ж}$, клітина при підготовці реплікації та поділу повинна виконати один і той же об'єм синтетичної роботи і витратити на ці цілі таку ж саму кількість кисню. Тому $v_d \cdot T = \text{const}$, де T — тривалість тієї стадії клітинного циклу, на якій відбувається підготовка до реплікації та поділу (головним чином, стадія S).

Враховуючи, що стадія циклу, під час якої відбувається підготовка до реплікації та поділу, та стадія, на якій може відбуватися рекомбінаційна репарація ДР ДНК, збігаються або в основному збігаються, можна вважати, що $T_p = T$. Тоді $T_p \cdot v_d = \text{const}$.

При нормоксії величина T_p набуває мінімального значення (T_{\min}), а

$$v_d = v_m - v_{ж} = \frac{v_m (c_r - c_{ж})}{c_r}.$$

У загальному випадку:

$$T_{\min} v_m \left(\frac{c_r - c_{ж}}{c_r} \right) = T_p v_m \left(\frac{c - c_{ж}}{c_r} \right)$$

$$\text{звідки } T_{\min} (c_r - c_{ж}) = T_p (c - c_{ж})$$

Таким чином, при $c > c_r$

$$k = \frac{T_{\text{нр}}}{T_{\text{нр}} + T_{\min}}, \quad (3)$$

а при $c_r \geq c \geq c_{ж}$

$$k = \frac{T_{\text{нр}}}{T_{\text{нр}} + \frac{T_{\min} (c_r - c_{ж})}{c - c_{ж}}}. \quad (4)$$

З останньої формули видно, що при $c \rightarrow c_{ж}$ величина k наближається до нуля, що відповідно до формули (1) приводить до збільшення виживаності опромінених клітин.

Складнішим є питання про радіочутливість клітин за умови оксигенації, що відповідає умові $c_n < c < c_{ж}$.

Відомо [7], що в аноксії ферменти рекомбінаційної репарації не працюють. В той же час, стан $c_n < c < c_{ж}$ — це не аноксія. Ми вважаємо за можливе як $c_{ж}$ прийняти таку концентрацію кисню, яка відповідає напрузі приблизно в 3 мм рт. ст. Відомо [8], що при напруженнях кисню, менших за 3 мм рт. ст., відбувається різке зниження енер-

гетичних процесів у одноклітинних організмів, що змушує сумніватися в можливості репарації ДР ДНК за такої оксигенації клітин.

На нашу думку, оцінюючи радіочутливість клітин пухлин при оксигенації, що відповідає умові $c_n < c < c_{ж}$, можна виходити з таких міркувань. При вказаному рівні оксигенації поділ клітин не відбувається. Тому й при утворенні внаслідок опромінення РУ ДНК вони можуть існувати невизначено довго. Проявитися вказані ушкодження можуть після поліпшення оксигенації та відновлення поділу клітин.

При променевої терапії гине велика кількість пухлинних клітин (особливо в нормоксичній частині пухлини) та починається процес реоксигенації пухлинної тканини. Проте, враховуючи, що клітини гинуть не одразу після опромінення, а частина їх до загибелі встигає здійснити декілька поділів, можна зробити висновок про те, що процес реоксигенації пухлини взагалі і особливо її найбільш гіпоксичних ділянок має більш повільний перебіг, ніж процес репарації ДР ДНК у ділянці пухлини, що здійснюють поділ. Тому можна вважати, що, перейшовши за рахунок реоксигенації пухлини зі стану $c < c_{ж}$ у стан $c_{ж} < c < c_r$, клітини довго перебувають при концентраціях кисню дещо більших, ніж $c_{ж}$ і, отже, для них також є правильною формула (4).

Висновки

1. При математичному описі залежності виживаності клітин, опромінених рентгенівським або гамма-випроміненням, від поглиненої дози та ступеня оксигенації необхідно враховувати, що ця виживаність залежить від двох факторів (описується двома параметрами), які залежать від концентрації кисню; один з них пов'язаний з імовірністю утворення радіаційних ушкоджень ДНК клітини, а другий — з імовірністю репарації таких ушкоджень.

2. Наведені у роботі формули описують у явному вигляді залежності обох вказаних параметрів від концентрації кисню в клітині. При цьому враховується, що другий параметр пов'язаний з тим, що при зменшенні оксигенації клітин збільшується час, протягом якого може відбуватися репарація радіаційних ушкоджень.

Література

1. Ярмоненко С.П. Радиобиология человека и животных. – М.: Высш. шк., 1988. – 424 с.
2. Москалева Е.Ю., Илюшина Н.А. // Итоги науки и техники. Радиационная биология. – 1990. – Т. 9. – С. 1–113.
3. Книгавко В.Г., Пономаренко Н.С., Мещерякова О.П., Протасеня С.Ю. // УРЖ. – 2009. – Т. XVII, вип. 4. – С. 497–502.
4. Березовский В.А., Сушко Б.С. // Физиол. журн. – 1984. – Т. 30, № 3. – С. 345–354.
5. Книгавко В.Г., Бондаренко М.А., Пахомов В.И., Проценко Е.В. // Біофіз. вісн. – 2004. – № 637, вип. 1–2 (14). – С. 88–93.
6. Волошина Е.А., Мещерякова В.В. // Радиобиол. – 1979. – Т. XIX, вып. 2. – С. 283–285.
7. Гродзинський Д.М. Радиобіологія. – К.: Либідь, 2000. – 448 с.
8. Березовский В.Н. Напряжение кислорода в тканях животных и человека. – К.: Наук. думка, 1975. – 280 с.

Надходження до редакції 13.10.2010.

Прийнято 21.12.2010.

Адреса для листування:

Книгавко Володимир Гілярієвич,
ДУ Інститут медичної радіології ім. С.П. Григор'єва
НАМН України,
вул. Пушкінська, 82, Харків, 61024, Україна