

Объединенный институт ядерных исследований

Лаборатория радиационной биологии,

О.В. Белов

Математическое моделирование в радиационной биофизике: повреждение и репарация ДНК



COMPUTATIONAL PHYSICS Satellite event: students' school Mathematical modeling for NICA

July 3-7, 2017 — Dubna

MODE

Становление РАДИАЦИОННОЙ БИОФИЗИКИ как научной дисциплины было обусловлено необходимостью объяснить эффекты, наблюдаемые в биологических объектах при действии ионизирующих излучений

4 Гр

Полулетальная доза для человека = 4 Гр = 270 Дж = 67 кал



Кривые выживания



Доза, D

Наиболее ранние теории

• 1920 – <mark>«теория точечной теплоты»</mark> Ф. Дессауэр



• 1924 – «принцип попадания и теория мишеней» Д. Краузер

> Принцип попадания и мишени лёг в основу наиболее ранних моделей, призванных описать закономерности выживаемости клеток после облучения. Однако позже эти представления были кардинально пересмотрены.



Математические модели кривых выживания

- Классические модели
- Стохастические модели
- Вероятностные модели
- Репарационные модели
- Молекулярные модели
- Модели, учитывающие влияние качества излучения

В основе классических моделей лежал принцип попадания и мишени

Предпосылки принципа попадания и мишени:

1. В клетке существует уникальная мишень, намного меньшая, чем клетка, и чувствительная к излучению.

2. Энергия излучения передаётся веществу клетки в виде дискретных порций.

3. Отдельные акты передачи энергии происходят независимо друг от друга.



чувствительный объём внутри клетки, V



 $\overline{n} = VD$ $P_{(k)} = \frac{e^{-\overline{n}}\overline{n}^{k}}{k!}$ $P_{(0)} = e^{-VD}$

- распределение Пуассона

- вероятность выживания клетки

Позже было показано, что параметр *V* зависит от многих физических и биологических факторов.

Это не позволяло однозначно интерпретировать экспоненциальные кривые выживания.

Дополнительная проблема: анализ кривых выживания, имеющих "плечо"



Многомишенная формула:

$$P'_{(m)} = 1 - (1 - e^{-VD})^m$$

где т – количество мишеней



Несколько чувствительных объёмов внутри клетки



где *п* - количество попаданий

Многомишенный и многоударный процесс



Многомишенномногоударная формула:

$$P'_{(n,m)} = 1 - \left(1 - e^{-VD} \sum_{k=0}^{n-1} \frac{(VD)^k}{k!}\right)^m$$

m – количество мишеней, *n* – количество попаданий

- Эти параметры не имели реальной биофизической интерпретации.
- Эти параметры значительно <u>варьируют</u> при изменении некоторых факторов физической или биологической природы.

Клетки, облучённые равными дозами, поражаются одинаково и имеют потенциально равную вероятность успешного деления (т.е. выживания).

Однако поскольку процесс деления является стохастическим, зависящим от биологической изменчивости, выживаемость клеток носит вероятностный характер.



Если $D_1 = D_2$, то $P_1 = P_2$, но $P_1^* \neq P_2^*$

Stochastik der Strahlenwirkung

O. Hug und A. M. Kellerer

Mit 34 Abbildungen



Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 1966

Хуг и Келлерер, 1963.

Предполагая одинаковое число начальных повреждений в клетке, авторы считали, что каждое из таких повреждений вызвано большим количеством изменений в каких-либо массовых структурах.

Эти изменения ведут к возрастанию вероятности «отказа» в процессе деления клетки.



Stochastik der Strahlenwirkung

O. Hug und A. M. Kellerer

Mit 34 Abbildungen



Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 1966

Хуг и Келлерер, 1963.

$$-dN = S'N_0dt$$

dN – количество выживающих клеток

N₀ – начальное количество клеток

S'(t, D) – вероятность «отказа» в процессе деления клетки в единицу времени t

Если вероятность «отказа» увеличивается линейно с дозой облучения

$$S'(t,D) = S_1'(t)D_{,}$$

то в результате будет получена экспоненциальная кривая выживания:

$$N = N_0 e^{-D\int_0^\infty S_1'(t)dt}$$

Чтобы учесть принцип попадания, авторы вводят т.н. вектор состояний, дающий распределение клеток по отдельным фракциям (состояниям): ξ_4

$$\boldsymbol{\xi} = (\xi_1, \xi_2, \dots, \xi_n).$$



Начальное состояние соответствует вектору:

$$\xi_0 = (1, 0, \dots, 0).$$



При облучении клеток, находящихся в состоянии *ξ*, дозой *dD* популяция переходит в новое состояние:

$$\xi + d\xi = \xi + A\xi dD,$$



где *А* – матрица вероятностей перехода порядка *n* × *n*.

Решение этого уравнения:

$$\xi = \xi_0 e^{AD}$$

Если предположить, что клетки в состоянии *n* – 1 способны восстанавливать возникшие повреждения, а в состоянии *n* они инактивируются (погибают), то кривую выживания можно описать так:

$$S = \sum_{k=1}^{n-1} \xi_k.$$

•<u>Главное затруднение</u> в использовании стохастических моделей – это предположение об одинаковой поражаемости клеток, облучённых в одной дозе.



Если $D_1 = D_2$, то $P_1 = P_2$, но $P_1^* \neq P_2^*$

Вероятностные модели совмещают принцип попадания и биологическую стохастику. Капульцевич, 1978.

Пусть $\alpha < 1 - \underline{вероятность «неосуществления» клеткой$ $деления (т.е. гибели клетки), и <math>P_1 = 1 - \alpha$ – вероятность успешного деления (выживания). Тогда эта вероятность для клеток с *i* повреждениями будет

$$P_i = (1 - \alpha)^i$$

(при условии, что все повреждения независимы друг от друга).

Выживаемость клеток может быть описана как

$$S = \sum_{i=0}^{k} \frac{e^{-a} a^{i}}{i!} \left(1 - \left(\frac{1 - (1 - \alpha)^{i}}{(1 - \alpha)^{i}} \right)^{2} \right)$$

где

b – вероятность образования повреждения на единицу дозы
 a = bD – среднее значение числа повреждений

k – число повреждений, при котором $(1 - \alpha)^k > 0, 5 \ge (1 - \alpha)^{k+1}$

Кривые выживания, рассчитанные по вероятностной модели являются суперпозицией нескольких многоударных кривых с критическими числами попаданий от 0 до *k*

$$S = \sum_{i=0}^{k} \frac{e^{-a} a^{i}}{i!} \left(1 - \left(\frac{1 - (1 - \alpha)^{i}}{(1 - \alpha)^{i}} \right)^{2} \right)$$

При а ≥ 0,5 кривая экспоненциальная

При α < 0,5 кривая сигмоидная





• С помощью вероятностных моделей можно описать различные виды кривых выживания и объяснить связь между эффектами инактивации клеток после облучения.

• Однако эти модели не учитывают возможность восстановления повреждений, которая определяет различные последствия радиационного поражения.

4. Репарационные модели

Учтена способность клеток к репарации. При этом считалось, что способность клеток к восстановлению ограничена.

Модель «ограниченного восстановления»

Хейнс, 1966.

$$S = e^{-kD + \alpha \left(1 - e^{-\beta D}\right)}$$

kD – количество повреждений в клетке, пропорциональное дозе D;
 α (1 – e^{-βD}) – количество восстановленных повреждений;
 α – вероятность «отказа» в процессе клеточного деления
 (вероятность гибели клетки);

в – вероятность репарации повреждений на единицу дозы.

4. Репарационные модели

$$S = e^{-kD + \alpha \left(1 - e^{-\beta D}\right)}$$

Т.к. способность клетки к репарации ограничена, то с ростом дозы *D* количество репарируемых повреждений α (1 – e^{-βD}) стремится к постоянной величине α

Если вероятность β достаточно велика, то кривая экспоненциальная

Если вероятность β достаточно мала, то кривая сигмоидная



4. Репарационные модели



Репарационные модели описывают индукцию и элиминацию повреждений лишь формально и не учитывают биофизические процессы, происходящие в клетке

5. Молекулярные модели

Предложена конкретная связь между повреждениями ДНК и выживаемостью клеток

Чедвик и Линхаус, 1973



Однонитевой разрыв ДНК



Прямой двунитевой разрыв ДНК



Двунитевой разрыв, возникший в результате перекрытия двух однонитевых 5. Молекулярные модели

<u>Летальным событием</u> для клетки считается возникновение в ДНК прямого ДР или ДР из перекрывающихся ОР.

 $S = e^{-\alpha D - \beta D^2}$

а – вероятность индукции прямого двунитевого разрыва ДНК;

В – вероятность индукции двунитевого разрыва из двух

перекрывающихся однонитевых.

5. Молекулярные модели



Двунитевой разрыв, возникший в результате энзиматической деградации ДНК

$$S = e^{-N\beta D} \left(1 - e^{-\frac{l_0\beta D}{M}} \right)$$

- *в* выход первоначальных повреждений ДНК;
- *l*₀ размер бреши в нити ДНК;
- М размер генома;

N – фактор неоднородности, учитывающий возможность того, что инцизия близлежащих повреждений происходит неодновременно. Такие кривые имеют небольшое плечо в области малых доз и экспоненциальный участок при высоких уровнях облучения.

$$S = e^{-N\beta D} \left(1 - e^{-\frac{l_0\beta D}{M}} \right)$$

5. Молекулярные модели

Вопрос, остающийся без ответа:

Как летальное действие ионизирующих излучений зависит от Линейной Передачи Энергии (ЛПЭ)?



ЛПЭ/



Метод трековых сегментов

Говард-Фландерс, 1958



Метод был успешно применён к описанию эффектов в клетках гаплоидных дрожжей, однако по отношению к клеткам млекопитающих метод оказался неэффективен, поскольку не была учтена структура трека частицы.





Модель Нири (1965)

• В качестве чувствительной структуры рассматривается молекула ДНК.

Модель учитывает:

- простую геометрию молекулы ДНК;
- возможность репарации элементарных повреждений;
- вклад в инактивацию клеток сердцевины трека и

δ-электронов.

Эмпирическая модель Видерё (1968)

 Вклад сердцевины трека и δ-электронов учтён отдельно.

Модель Каца (1967)

Предложен более детальный подход к описанию вклада сердцевины трека и б-электронов в инактивирующее действие излучения.

Введено радиальное распределение дозы излучения в треке частицы.

Введено геометрическое сечение инактивации.



¹²С, 2,57 МэВ/нуклон

Микродозиметрический подход Росси (1968)

- Введена специфическая пороговая энергия при достижении которой в чувствительной области происходит инактивация клетки.
- Модель не учитывает возможность восстановления.

Усовершенствованный микродизиметрический подход

Буз, 1968

• Введена возможность восстановления клеток (репарации)

Теория дуального действия излучений

Келлерер и Росси (1972-1978)

Введены три важные функции:

- зависимость вероятности взаимодействия двух повреждений от расстояния между ними;
- функция, характеризующая распределение чувствительных структур в ядре клетки;
- функция, учитывающая полную энергию, переданную веществу в сферическом сегменте.

Модель Гюнтера-Шульца (1983)

- Чувствительная структура ядра клетки ДНК.
- Выделение энергии в пределах ДНК может привести к образованию повреждений, играющих роль в инактивации клеток.
- Передача энергии вне ДНК не вызывает образования таких повреждений.
- Повреждения ДНК возникают пропорционально дозе облучения.
- Введена т.н. микроскопическая ОБЭ (относительная биологическая эффективность).

Современные направления моделирования в области повреждения и репарации ДНК

Моделирование структуры трека заряженных частиц





Распределение дозы излучения в веществе

Единица дозы



Единица дозы



Рентгеновское излучение

Ион Fe

Моделирование структуры трека





Модель трека частицы

Моделирование структуры трека



Моделирование систем репарации ДНК



Модель SOS-репарации в бактериальных клетках *Escherichia coli*



Блок-схема модели



Уравнения модели

Начальные условия:

 $y_1(0,D) = 1, \quad y_2(0,D) = 1, \quad y_3(0,D) = 0, \quad y_4(0,D) = 1, \quad y_5(0,D) = 1, \quad y_6(0,D) = 0,$ $y_7(0,D) = 1, \quad y_8(0,D) = 0, \quad y_9(0,D) = 0, \quad y_{10}(0,D) = 0, \quad y_{11}(0,D) = 0, \quad y_{12}(0,D) = 0.$

Концентрация белка LexA



- a) The dependence of the LexA concentration on fluence Ψ of UV radiation;
- b) A set of curves for the LexA protein concentration under different UV fluences;
 - experimental data for 5 J/m² [Sassanfar, Roberts; 1991];
 - experimental data for 20 J/m² [Sassanfar, Roberts; 1991];
 - N is the number of protein molecules per cell.

Концентрация ДНК-полимеразы V



- a) The dependence of DNA Pol V concentration on fluence Ψ of UV radiation;
- b) A set of curves for the DNA Pol V protein concentration under different UV fluences.

Частота мутаций в гене *lacI* бактерий *E. coli*



Mathematical model of base excision repair in *Escherichia coli* bacterial cells

(Belov, 2011)





Escherichia coli bacterial cells

8-oxoguanine (8-oxoG)

8-oxoguanine is the most common and stable product of oxidative DNA damage under ionizing radiation



Base excision repair (BER)





Fpg-dependent base excision repair

Formamidopyrimidine-DNA-glycosilase (Fpg protein, MutM protein)

/Sugahara et al., 2000/

Structural model of *E. coli* BER



GA: glycosylase activity EA: endonuclease activity LA: lyase activity PA: phosphodiesterase activity AP: apurinic/apyrimidinic site ssDNA: a single-stranded DNA Pol I: DNA polymerase I

Stoichiometric model of Fpg-dependent base excision repair in *Escherichia coli* bacterial cells



$$y_6 + e_3 \stackrel{k_9}{\underset{k_9}{\longleftrightarrow}} y_6 e_3 \stackrel{k_{10}}{\longrightarrow} y_7 + e_3$$

Modeling biochemical reactions



(Gillespie, 1977)

RESULTS



The *in vitro* kinetics of Fpg-dependent 8-oxoG removal in comparison with experimental data /*Fedorova et al., 2002*/. Calculated and experimental data are presented for three different initial concentrations of 8-oxoG.

ДР ДНК в клетках человека после воздействия рентгеновского излучения (А) и тяжёлых ионов (В)









Математическая модель NHEJ

Связывание Ки70/80 с концами ДР

Присоединение DNA-PKcs и Artemis

Аутофосфорилирование DNA-PKcs

Образование моста между белковыми комплексами

Присоединение Ligase IV/XRCC4

Присоединение PNK

Обработка и заполнение бреши

Восстановленная ДНК

$$Cucmema O \mathcal{A} \mathcal{Y}:$$

$$\frac{dN_{0}}{d\tau} = -N_{0}(k_{1}x_{1} + p_{1}y_{1}) + k_{-1}x_{2} + p_{-1}y_{2} + N_{ir},$$

$$\frac{dx_{2}}{d\tau} = k_{1}N_{0}x_{1} - x_{2}(k_{-1} + k_{2}x_{3}) + k_{-2}x_{4},$$

$$\frac{dx_{4}}{d\tau} = k_{2}x_{2}x_{3} - x_{4}(k_{3} + k_{-2}),$$

$$\frac{dx_{5}}{d\tau} = k_{3}x_{4} - k_{4}x_{5}^{2} + k_{-4}x_{6},$$

$$\frac{dx_{6}}{d\tau} = k_{4}x_{5}^{2} - x_{6}(k_{-4} + k_{5}x_{7}) + k_{-5}x_{8},$$

$$\frac{dx_{8}}{d\tau} = k_{-7}x_{12} + k_{6}x_{8}x_{9} - x_{10}(k_{-6} + k_{7}x_{11}),$$

$$\frac{dx_{12}}{d\tau} = k_{7}x_{10}x_{11} - x_{12}(k_{8} + k_{-7}),$$

$$\frac{dx_{13}}{d\tau} = k_{8}x_{12} + p_{10}y_{11} + p_{9}y_{12} + q_{6}z_{8},$$

$$\frac{dx_{14}}{d\tau} = \frac{k_{9}(x_{5} + x_{6} + x_{8} + x_{10} + x_{12}) \cdot x_{15}}{k_{10} + x_{5} + x_{6} + x_{8} + x_{10} + x_{12}} - k_{11}x_{13} - k_{12}x_{14}$$

Начальные условия:

	$x_2(0) = 0,$	$x_6(0) = 0,$	$x_{12}(0) = 0,$
$N_0(0) = N_{00},$	$x_4(0) = 0,$	$x_8(0) = 0,$	$x_{13}(0) = 0,$
	$x_5(0) = 0,$	$x_{10}(0) = 0,$	$x_{14}(0) = 0.$



Кинетика изменения уровня фокусов γ-H2AX в культуре фибробластов кожи человека HSF42 при действии ионизирующих излучения с разными физическими характеристиками в дозе 1 Гр. Кривые – результаты расчёта, точки – экспериментальные данные /Asaithamby et al.,2008/.

Спасибо за внимание!