

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

УДК 577.32

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ КИНЕТИКИ ПРОЦЕССА АПОПТОЗА РАКОВЫХ КЛЕТОК ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ДОЗАХ АНТРАЦИКЛИНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ

Волынкин В.С., Лапоногов И.В., Рыбаков А.Г.

Севастопольский национальный технический университет

Студгородок г. Севастополь, Украина, 99053

e-mail: rybakov@svpl.da.ru

Предложены модели и алгоритм анализа экспериментальных данных кинетики апоптоза раковых клеток в зависимости от концентрации антибиотика доксорубицина. Определены пороговые значения параметров для инициации процесса апоптоза в клеточной системе.

Введение

Одной из наиболее важных проблем молекулярной биофизики является установление механизмов эффективного уничтожения поврежденных клеток, потенциально опасных для организма. Внутренние процессы контроля различных видов повреждений, в частности, приводящих к генетическим изменениям, определяют выбор «мер подавления» внутриклеточных процессов. Клеточный цикл может быть блокирован на определенной стадии процесса с целью последующего восстановления клетки, либо осуществлен полный вывод клетки из процесса дальнейшего деления в результате запрограммированной смерти (апоптоза).

Именно с нарушением апоптотических процессов связывают формирование различных форм заболеваний, в частности, злокачественных опухолей. Отдельные механизмы апоптоза, факторы их индуцирования и регуляции к настоящему времени уже известны, однако кинетические характеристики процесса апоптоза под воздействием различных внешних факторов пока еще недостаточно изучены [1,2]. Вместе с тем исследование кинетики процесса апоптоза позволяет оценить эффективность инициирующих этот процесс биологически активных веществ на клеточном уровне, изучить механизмы их воздействия на соответствующие компоненты клетки и влияние доз агентов в зависимости от времени.

Результаты и их обсуждение

1. *Экспериментальные данные и их обработка.* Клеточная культура MOLT-3 инкубирована в питательной среде при 37°C с различными дозами апоптоз-индуцирующего препарата (доксорубицин). Регистрация процесса

апоптоза $A_p(t)$ проводилась в течение 8 часов. Каждый эксперимент выполнялся дважды. Для последующей обработки принимались средние значения $A_p(t_i)$ для соответствующих временных точек [3,4].

Экспериментальные зависимости $A_p(t)$ приведены на рисунке 1. В расчетах использованы аппроксимирующие кривые, полученные численными методами минимизации [5]. На основе полученных зависимостей $A_p(t)$ проведена численная экстраполяция экспериментальных данных до времени, превышающего экспериментальное (до 20 часов), а также моделирование $A_p(t)$ для дополнительных концентраций, выходящих за пределы эксперимента (0,125 μM и 5 μM). Методика численного моделирования описана нами ранее в [5]. Результаты приведены на рисунке 2.

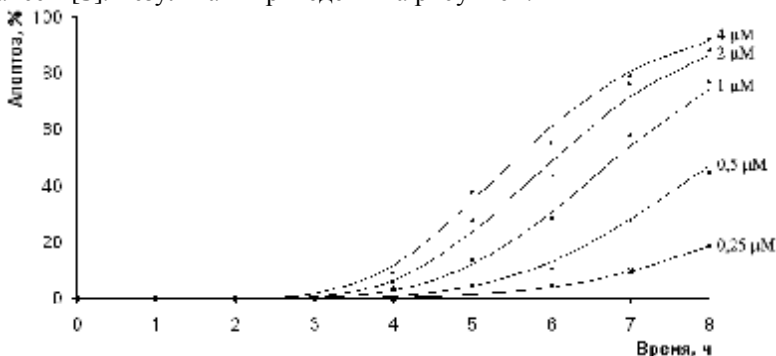


Рисунок 1 – Экспериментальные временные зависимости процента апоптотических клеток при различных концентрациях доксорубина (DOX)

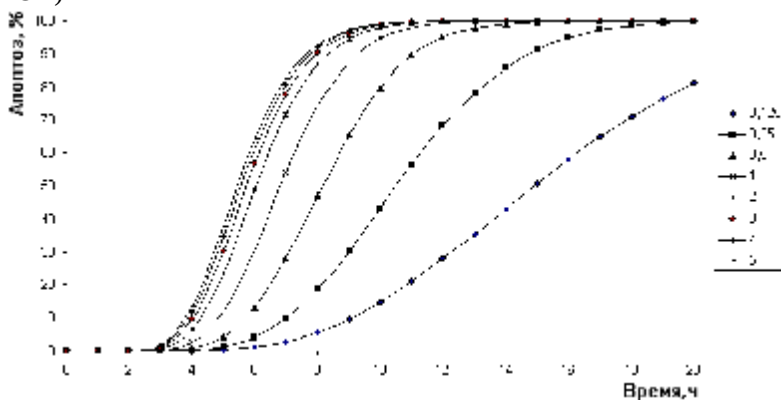


Рисунок 2 – Экстраполяция кривых апоптотического процесса для различных концентраций антибиотика

Характерные времена t_i процесса апоптоза для различных исходных концентраций препарата получены по дифференциальным зависимостям $\frac{dA_p(t)}{dt}$. Временные точки τ_i перегиба зависимостей $A_p(t)$ были использованы в дальнейших расчетах.

На основании полученных значений τ_i выполнено численное моделирование процесса апоптоза в области низких исходных концентраций ($D_0 \leq 0,125 \mu\text{M}$) препарата с целью установления «порогового» уровня дозы лекарства $D_{кр}$, ниже которого оно практически не обладает токсическим действием (рисунок 3). Из рисунка видно, что при концентрациях $D_0 \leq 0,01 \mu\text{M}$ апоптотический эффект фактически не проявляется.

Расчетная зависимость процента апоптотических клеток A_p от исходной концентрации лекарства D_0 для времени инкубации $\tau = 19$ часов приведена на рисунке 4. Анализ результатов позволяет сделать вывод, что концентрация лекарства $D_0 \leq 0,01 \mu\text{M}$ является практически нетоксичной. Концентрации доксорубина $D_0 = 0,035 \dots 0,05 \mu\text{M}$ можно отнести к критическим, так как в этом диапазоне наблюдается резкий рост процесса апоптоза раковых клеток.

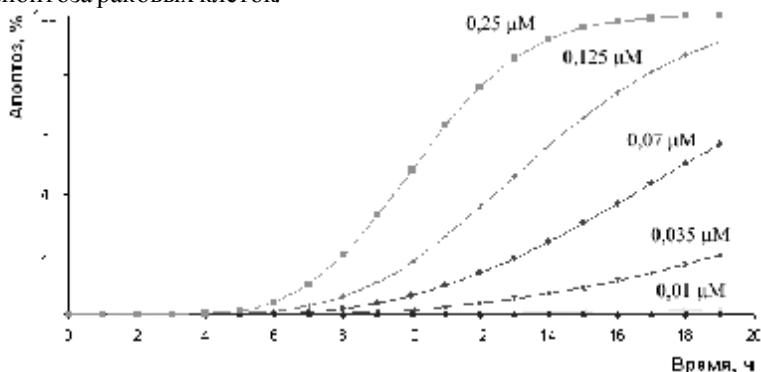


Рисунок 3 – Зависимости процента апоптотических клеток при различных концентрациях препарата

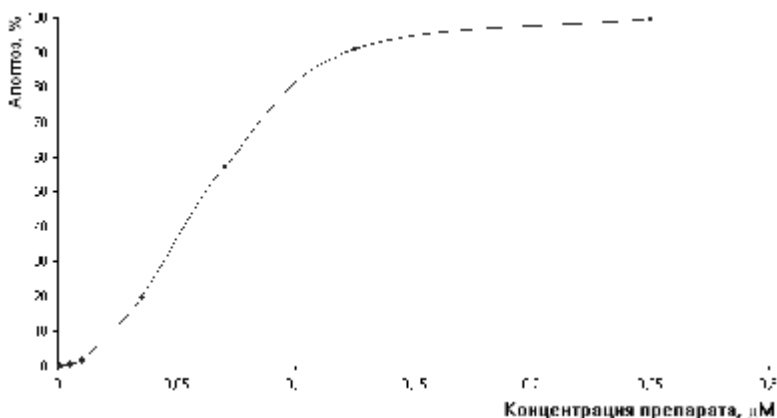


Рисунок 4 – Расчетная зависимость процента апоптотических клеток от концентрации доксорубина по истечении 19 часов после его введения

2. Кинетическая модель. *На первом этапе оценка характерных кинетических параметров апоптоза проведена с помощью линейной модели, основной предпосылкой которой является существование*

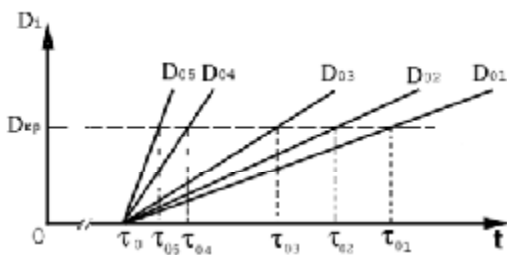


Рисунок 5 – Временные зависимости концентрации препарата в клетке

исходной концентрации D_{0i} (рисунок 5):

$$D_i = kD_{0i}(\tau_i - \tau_0),$$

где D_i – текущая концентрация препарата в клетке, τ_i – текущее время, τ_0 – время, независимое от исходных концентраций D_{0i} , характеризующее процессы, связанные с условиями эксперимента, k – коэффициент пропорциональности

Оценки по данной модели характерных времён τ_i для $t_0 = 4,82$ часа приведены в таблице 1. Результаты свидетельствуют о том, что линейный характер зависимости $D_i(t)$ может быть лишь на начальной стадии процесса при относительно высоких значениях концентрации D_{0i} препарата.

Наличие критического уровня исходной концентрации $D_{кр}$ препарата предполагает рассмотрение нелинейной модели процесса:

$$D_i = D_{0i} \left(1 - e^{-\lambda(t-\tau_0)} \right),$$

где λ – параметр модели.

Оценка характерных времен τ_i с учетом существования критического уровня концентрации $D_{кр}$ препарата в клетках при $\lambda = 0,448 \text{ час}^{-1}$ дает удовлетворительное согласие характерных времен τ_i с аналогичными временами линейной модели (таблица 1) при высоких концентрациях D_{0i} доксорубина

Таблица 1 – Сравнение характерных времен

$D_0, \mu\text{M}$	0,25	0,5	1,0	2	4
$\tau_{0i}, \text{час}$	τ_{01}	τ_{02}	τ_{03}	τ_{04}	τ_{05}
Линейная модель	12,4	8,6	6,7	5,8	5,3
Нелинейная модель	8,4	7,7	6,9	5,7	5,3

Математическая модель для количественного описания кинетики процесса апоптоза в клетках под воздействием химических веществ включает следующие предположения

а) скорость проникновения молекул антибиотика определяется двумя факторами: разностью концентраций молекул внутри и вне клетки ($k \cdot (D_0 - D)$) и степенью их связывания с рецепторами в клетке; при этом второй фактор складывается из двух составляющих: обусловленных апоптозом ($k_a \cdot n \cdot D$) и репарацией клеток ($k_r \cdot n \cdot D$).

б) скорость изменения количества клеток dn/dt определяется двумя противоположными процессами – апоптозом и репарацией.

Тогда модель процесса может быть представлена в виде системы уравнений:

$$\begin{cases} \frac{dD}{dt} = k \cdot (D_0 - D) + (k_r + k_a) \cdot n \cdot D \\ \frac{dn}{dt} = (k_r - k_a) \cdot n \cdot D \end{cases}, \quad (1)$$

где k – константа скорости диффузии; k_r и k_a – константы скорости репарации и апоптоза соответственно; n – количество клеток, выраженное в процентном отношении к исходному числу клеток.

Рассчитанные значения констант по модели (1) для различных значений исходных концентраций препарата приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Значения констант, рассчитанные по модели (1)

$D_0, \mu\text{M}$	$k, \text{час}^{-1}$	$k_r, \text{час}^{-1}$	$k_a, \text{час}^{-1}$
0,25	0,00061	0,00041	0,0072

0,5	0,00045	0,00054	0,0085
1,0	0,00054	0,00084	0,0097
2,0	0,00029	0,00069	0,0104
4,0	0,00032	0,00079	0,0098

В заключение следует отметить следующее

Предложенная математическая модель для описания кинетики процесса апоптоза в раковых клетках MOL T-3 под воздействием антрациклинового антибиотика доксорубина позволила выявить:

- характерное время (фаза запаздывания) между моментом введения препарата и началом его действия, которое проявляет определенную зависимость (относительно небольшую) от исходной концентрации препарата;
- пороговый уровень дозы препарата доксорубина ($D_0 \leq 0,01 \mu\text{M}$), ниже которого препарат практически не проявляет токсического действия.

Проведенные оценки показывают, что концентрации доксорубина $D_0 = 0,035 \dots 0,05 \mu\text{M}$ можно отнести к критическим, так как в пределах этого диапазона наблюдается резкий рост интенсивности процесса апоптоза.

Авторы искренне благодарят доктора Караваева Л.С. (Гумбольдский университет, Германия) за предоставленные экспериментальные материалы и профессора Веселкова А.Н. за полезные замечания при обсуждении работы.

Библиографический список

1. Apoptosis and cancer / Edited by Seamus J. Martin. — San Diego: Calif, 1997. — 150 p.
2. Kopnin B.P. Targets of Oncogenes and Tumor Suppressors: Key for Understanding Basic Mechanisms of Carcinogenesis / B.P. Kopnin // Biochemistry. — М., 2000. — V. 65. — № 1. — P. 113–126.
3. Role of crown-like side chains in the biological activity of substituted-phenoxazone drugs / L. Karawajew, E.N. Glibin, V.Ya. Maleev *et. al.* // Anti-Cancer Drug Design. — 2000. — № 15. — P. 331–338.
4. The coordinat release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant / J.C. Goldstein, N.J. Waterhouse, P. Juin *et.al.* // Nature Cell Biology. — 2000. — V. 2. — P. 156–162.
5. Рыбаков А.Г. Моделирование процессов трансформации многокомпонентных систем / А.Г. Рыбаков, И.В. Лапоногов, В.С. Волынкин // Вестн. СевГТУ. Сер. Информатика, электроника, связь. — Севастополь, 2001. — Вып. 32. — С. 26–33.

Поступила в редакцию 03.04.2002 г.