Politechnika Śląska Wydział, Automatyki, Elektroniki i Informatyki

Rozprawa doktorska

Modelowanie odpowiedzi komórek nowotworowych na stres indukowany terapią

Jan Poleszczuk

Promotor: dr hab. n. med. Maria Wideł Kopromotor: dr hab. Urszula Foryś

Gliwice, 2013

...

Spis treści

\mathbf{s}_{F}	ois tr	ści	i					
1	Wprowadzenie							
	1.1	Motywacja prowadzonych badań i przedmiot pracy	. 1					
	1.2	Cel i tezy pracy	. 3					
	1.3	Przewodnik po rozdziałach	. 4					
2	Stan wiedzy i hipoteza badawcza							
	2.1	Działanie promieniowania jonizującego na komórki	. 8					
	2.2	Białko p53 — strażnik genomu	. 8					
	2.3	Popromienne efekty sąsiedztwa	. 9					
		2.3.1 Eksperyment E. C. Mackonis i in	. 12					
	2.4	Program senescencji komórkowej	. 13					
	2.5	lipoteza badawcza \ldots \ldots 16						
3	Wy	iki eksperymentalne	19					
	3.1	Materiały i metody	. 19					
		3.1.1 Linie komórkowe i metoda hodowli	. 19					
		3.1.2 Metody napromieniania i badania efektu sąsiedztwa	. 20					
		3.1.3 Metody pomiaru frakcji przeżywających komórek klonogen-						
		nych	. 21					
		3.1.4 Pomiar frakcji komórek w stanie senescencji	. 22					
		3.1.5 Pomiar apoptozy	. 22					
		3.1.6 Pomiar całkowitej liczby komórek pozostających w dołkach						
		i insertach po zakończeniu koinkubacji	. 23					
	3.2	Wyniki przeprowadzonych eksperymentów	. 24					
	3.2.1 Frakcja komórek pozostających w dołkach i insertach po							
		zakończeniu koinkubacji	. 24					
		3.2.2 Odsetek komórek w stanie senescencji	. 25					
		3.2.3 Poziomy apoptozy	. 28					

		3.2.4 Frakcje przeżywających komórek klonogennych	29				
	3.3	Analiza wyników i wnioski	31				
		3.3.1 Korelacje	32				
4	Roz	Rozszerzenie radiobiologicznego modelu liniowo-kwadratowego					
	4.1	Radiobiologiczny model liniowo-kwadratowy	40				
		4.1.1 Dopasowanie modelu LQ do danych eksperymentalnych	41				
	4.2	Rozszerzony model LQ	43				
		4.2.1 Napromienianie i koinkubacja	44				
		dalszej hodowli	45				
		4.2.3 Dopasowanie rozszerzonego modelu do danych eksperymen-					
		${ m talnych}$	47				
	4.3	Wnioski	53				
5	Mo	del hybrydowy	55				
	5.1	Sformułowanie modelu	55				
		5.1.1 Cykl komórkowy a heterogeniczność populacji	56				
		5.1.2 Bezpośredni wpływ promieniowania jonizującego na komórki	64				
		5.1.3 Wpływ komórek w stanie senescencji	67				
	5.2	Symulacje \ldots	73				
		5.2.1 Zwiększona przeżywalność komórek napromienionych	73				
		5.2.2 Zwiększona przeżywalność komórek pod osłoną	76				
	5.3	Wnioski	77				
6	Pod	lsumowanie	79				
Bi	bliog	grafia	83				
Α	Pro	cedury eksperymentalne i numeryczne	93				
	A.1	Frakcja przeżywających komórek klonogennych	93				
	A.2 A.3	Funkcje służące do wybierania miejsca dla komórki potomnej Funkcje generująca macierze i wektory określające układ równań różniczkowych liniowych wynikający z metody elementów skończo-	94				
		nych	96				
в	Wy	korzystane narzędzia statystyczne	99				
	B.1	Test t-Studenta różnicy pomiędzy średnimi	99				
	B.2	Zależność pomiędzy zmiennymi	100				
	B.3	Współczynnik determinacji modelu	101				
Sp	Spis rysunków 103						
Sp	Spis tabel 1						

Rozdział 1

Wprowadzenie

1.1 Motywacja prowadzonych badań i przedmiot pracy

Na podstawie danych zebranych z placówek medycznych szacuje się, że w samym 2012 roku w Europie na raka zachorowało ponad 3,45 miliona osób [33]. Co więcej, odnotowano jednocześnie 1,75 miliona zgonów spowodowanych chorobami nowotworowymi. W samej Unii Europejskiej w roku 2012 u 1,4 miliona meżczyzn i 1,2 miliona kobiet zdiagnozowano nowe przypadki nowotworów, a 707 tys. mężczyzn i 555 tys. kobiet zmarło w wyniku choroby nowotworowej. Najczęściej wykrywanymi nowotworami w Europie były: rak piersi (464 tys. przypadków), jelita grubego (447 tys. przypadków), prostaty (417 tys. przypadków) i płuc (410 tys. przypadków). Jak łatwo zauważyć, powyższe cztery typy nowotworów stanowią mniej więcej połowę wszystkich odnotowanych przypadków raka w Europie. Do zgonu pacjenta najczęściej dochodziło z powodu raka płuc (353 tys. zgonów), jelita grubego (215 tys. zgonów), piersi (131 tys. zgonów) i żołądka (107 tys.). Te zatrważające dane spowodowały, że na całym świecie od wielu lat prowadzone są intensywne badania nad biologią nowotworów, których nadrzędnym celem jest opracowanie lepszych metod walki z rakiem i, co za tym idzie, znaczące wydłużenie życia chorych.

Coraz częściej przy badaniu nowotworów wykorzystuje się zaawansowane modele matematyczne, które służą lepszemu poznaniu mechanizmów rządzących rozwojem nowotworu i optymalizacji interwencji farmakologicznej czy też chirurgicznej. W literaturze można znaleźć różne przykłady pokazujące, że takie modelowanie przynosi wymierne korzyści. W szczególności na podstawie modelu procesu krwiotwórczości autorstwa prof. Lasoty i doc. Ważewskiej-Czyżewskiej zaproponowano nową metodę leczenia białaczki [96], czyli nowotworu układu krwionośnego. Widząc potrzebę większego zaangażowania matematyków w badania nad nowotworami, w trakcie studiów doktoranckich zajmowałem się modelowaniem matematycznym różnych aspektów inicjacji i rozprzestrzeniania się nowotworu w organizmie nosiciela. W celu dokładnego zrozumienia pierwszych etapów karcynogenezy, czy też wpływu stosowanych leków na już rozwinięty nowotwór, należy zejść na poziom pojedynczej komórki i zbadać ekspresje poszczególnych genów, która w znacznym stopniu determinuje sposób funkcjonowania komórki. Dlatego ważne jest rozwijanie modeli ekspresji genów i badanie ich własności. W serii prac, które ukazały się w roku 2011 [12, 34, 65], udało nam się stworzyć i przeanalizować zarówno stochastyczny jak i deterministyczny opis ekspresji genu, gdy jedna z rozważanych reakcji pośrednich zachodziła z pewnym opóźnieniem czasowym. Wynik pozwolił odrzucić wcześniejsze rezultaty, które istnienie eksperymentalnie obserwowanych oscylacji w ilości białka wyjaśniały poprzez obecność rozważanej przez nas opóźnionej reakcji. Drugim bardzo ważnym zagadnieniem, które było przeze mnie badane w trakcie studiów doktoranckich, jest proces angiogenezy nowotworowej, czyli proces, w którym już rozwinięty nowotwór, poprzez wysyłanie odpowiednich sygnałów, rekrutuje z otaczającej go tkanki nowe naczynia krwionośne [73, 74, 76]. Głównym celem mojej pracy było zbadanie możliwych scenariuszy leczenia nowotworów, gdy wykorzystujemy substancje atakujące naczynia krwionośne nowotworu. Wyniki potwierdziły przypuszczenia biologów, że jednoczesne podanie tych substancji razem ze standardowo podawaną chemioterapią może prowadzić do zwiększenia skuteczności leczenia. Prowadziłem również badania dotyczące m. in. rozwoju nowotworu, gdy pacjent zakażony jest jednocześnie wirusem HIV [75], czy też wrażliwości nowotworu na stres, jakim jest immunoterapia, w przypadku bardzo niebezpiecznego nowotworu mózgu [72].

Prowadzone przez biologów i matematyków badania nie dotycza jedynie odpowiedzi komórek na stres związany z zastosowaniem nowatorskich metod leczenia, lecz również i tych stosowanych obecnie. Nadal dość dużym wyzwaniem jest pełne zrozumienie zasad rządzących odpowiedzia nowotworu (nie tylko na poziomie pojedynczej komórki) na środki terapeutyczne stosowane od wielu lat, takie jak promieniowanie jonizujące wykorzystywane przy radioterapii. Radioterapia stanowi od dawna ważny element walki z nowotworami. Szacuje się, że około połowa wszystkich pacjentów z rozpoznanymi nowotworami poddawana była radioterapii na którymś z etapów leczenia [25, 32]. Co więcej, stanowiła ona element terapii u około 40% wszystkich pacjentów, których udało się skutecznie wyleczyć z pierwotnego nowotworu [38]. Mimo tak dużej skuteczności radioterapii, w radiobiologii, nauce zajmującej się wpływem promieniowania jonizującego na komórki, nadal pozostaje wiele zjawisk i procesów, które nie doczekały się dotychczas pełnego wyjaśnienia. Dobrym przykładem takiego zjawiska jest popromienny efekt sąsiedztwa, który nieco ponad dwie dekady temu zachwiał podstawami radiobiologii. Efekt ten poddał próbie jeden z ważniejszych paradygmatów radiobiologii mówiący o tym, że do zmian w komórkach napromienianej tkanki dochodzi wyłącznie na skutek bezpośredniego przejścia fotonów lub cząsteczek promieniowania jonizującego przez komórke, w której główna tarczą podatna na uszkodzenia jest DNA. W opozycji do tego paradygmatu znalazły się wyniki eksperymentalne pokazujące, że nienapromienione komórki wykazują zmiany podobne do tych powstających po bezpośrednim napromienieniu, gdy komórki znajdujące się w ich pobliżu (sąsiadujące) są napromieniane małymi dawkami promieniowania. Od momentu opublikowania pierwszych wyników wiele badań potwierdziło, że odpowiedź populacji komórkowej na promieniowanie jonizujące nie daje się sprowadzić do prostego zagregowania odpowiedzi poszczególnych komórek i należy uwzględnić popromienny efekt sąsiedztwa, por. [10, 83] i podane tam pozycje bibliograficzne. Co ważne, zmiany w komórkach docelowo nienapromienianych nie musza być dla nich niekorzystne i, co pokazano w [63], różne dawki promieniowania mogą prowadzić do zupełnie nieoczekiwanych i niekorzystnych z punktu widzenia radioterapii efektów. W związku z tym kluczowe wydaje się być pełne zrozumienie popromiennego efektu sasiedztwa i dokładniejsze uwzględnienie jego wpływu w obecnie stosowanych protokołach radioterapeutycznych. Dzieki temu może uda się zwiększyć skuteczność metody, która już obecnie jest tak szeroko stosowana.

1.2 Cel i tezy pracy

Podstawą niniejszej pracy jest nowatorska hipoteza o kluczowej roli programu senescencji komórkowej dla występowania popromiennego efektu sąsiedztwa. Hipoteza ta mówi, że substancje odpowiedzialne za indukowanie zmian w komórkach nie poddawanych bezpośredniemu działaniu promieniowania jonizującego wydzielane są przez komórki w stanie senescencji. Te ostatnie pojawiają się w populacji na skutek bezpośredniego działania promieniowania jonizującego. Co najważniejsze, możemy wyróżnić dwa typy wydzielanych przez nie substancji:

- 1. substancje mogące uszkadzać DNA innych komórek, będące cząsteczkami o krótkim okresie połowicznego rozpadu;
- 2. substancje pobudzające inne komórki do kolejnych podziałów, będące białkami o długim okresie stałej biologicznej aktywności.

Substancje pierwszego typu, mające relatywnie krótki zasięg działania, odpowiadają za najczęściej obserwowany szkodliwy (obniżający przeżywalność, zwiększający niestabilność genetyczną) wpływ komórek napromienionych na komórki sąsiadujące. Natomiast substancje drugiego typu, które mają duży zasięg działania, odpowiadają za występowanie niestandardowych typów efektów sąsiedztwa, takich jak zwiększenie przeżywalności komórek napromienionych, gdy komórki znajdujące się w ich otoczeniu otrzymały niewielkie dawki promieniowania.

Celem pracy było zweryfikowanie tej hipotezy za pomocą serii eksperymentów przeprowadzonych na komórkach nowotworowych oraz na podstawie przewidywań modeli matematycznych, które na niej bazują. Zadaniem tych drugich było dokładne wyjaśnienie, jak interakcja komórek z substancjami obu rozważanych typów może doprowadzić do wystąpienia typowych oraz niestandardowych popromiennych efektów sąsiedztwa.

1.3 Przewodnik po rozdziałach

Niniejsza rozprawa doktorska składa się z sześciu rozdziałów, z których każdy rozpoczyna się krótkim streszczeniem.

Rozdział pierwszy stanowi wstęp, w którym przedstawiona jest motywacja dla przeprowadzonych badań oraz najważniejsze stawiane tezy.

W rozdziale drugim przedstawione są najważniejsze procesy i mechanizmy biologiczne, stanowiące integralną część postawionej w pracy hipotezy badawczej. Rozdział rozpoczyna się od opisu wpływu, jaki promieniowanie jonizujące może mieć na napromienianą komórkę oraz mechanizmów, jakimi dysponuje komórka, aby uchronić się przed negatywnymi skutkami promieniowania. W dalszej części rozdziału znaleźć można dokładne opisy popromiennego efektu sąsiedztwa oraz zjawiska senescencji komórkowej, które stanowią podstawę stawianej na końcu rozdziału hipotezy badawczej.

W rozdziale trzecim przedstawione są wyniki eksperymentów wykonanych w celu zweryfikowania postawionej hipotezy. Rozdział rozpoczyna się od opisu materiałów i metod wykorzystanych w trakcie eksperymentów. Przedstawione są wykorzystane linie komórek ludzkich, metody hodowli, napromieniania oraz badania siły efektu sąsiedztwa. W pierwszej części rozdziału znajdziemy również dokładny opis wykorzystanych metod pomiaru poszczególnych charakterystyk populacji komórkowej. W drugiej części rozdziału przedstawione są szczegółowe wyniki poszczególnych eksperymentów oraz analiza ich znaczenia dla postawionej hipotezy badawczej. Wykorzystując narzędzia statystyki, badane są korelacje pomiędzy poszczególnymi zmiennymi oraz różne zależności wyników napromieniania od statusu genu TP53.

W rozdziale czwartym przedstawiony jest pierwszy z rozważanych modeli matematycznych, który, opierając się na postawionej hipotezie i wynikach przeprowadzonych eksperymentów, rozszerza powszechnie stosowany w radiobiologii model liniowo-kwadratowy (model LQ, *ang. linear-quadratic model*). Proponowane rozszerzenie bierze pod uwagę substancje czynnie wydzielane przez wyindukowane promieniowaniem komórki w stanie senescencji, które mogą mieć różnorodny wpływ na otoczenie. W rozdziale przedstawione są również wyniki dopasowywania proponowanego modelu do danych eksperymentalnych dotyczących zarówno komórek bezpośrednio napromienianych, jak i tych przebywających jedynie w ich sąsiedztwie.

W rozdziale piątym przedstawiony jest model matematyczny opisujący przestrzenny i czasowy rozwój populacji komórkowej, która poddana została działa-

1.3. PRZEWODNIK PO ROZDZIAŁACH

niu promieniowania jonizującego. Model oparty jest na asynchronicznym automacie komórkowym, którego ewolucja silnie zależy od wpływu substancji wydzielanych przez komórki w stanie senescencji. Jednocześnie zmiany w czasie stężeń tych substancji opisują równania różniczkowe cząstkowe, których struktura zależy bezpośrednio od aktualnego stanu automatu komórkowego. Celem rozdziału jest sprawdzenie, czy model matematyczny bazujący na postawionej hipotezie badawczej może jakościowo oddać wyniki eksperymentów uzyskanych przez E. C. Mackonis [63], z których wynikają niestandardowe typy efektu sąsiedztwa.

Rozdział szósty, ostatni, zawiera podsumowanie rezultatów przedstawianych w rozprawie.

Rozdział 2

Stan wiedzy i hipoteza badawcza

Streszczenie

W rozdziale drugim przedstawione są najważniejsze procesy i mechanizmy biologiczne, stanowiące integralną część postawionej w pracy hipotezy badawczej. Rozdział rozpoczyna się od opisu wpływu, jaki promieniowanie jonizujące może mieć na napromieniana komórke oraz mechanizmów, jakimi dysponuje komórka, aby uchronić się przed negatywnymi skutkami promieniowania. Ważnym elementem mechanizmu ochronnego komórki jest białko p53, które odgrywa znaczącą rolę w procesie naprawy DNA. W związku z tym, w kolejnym podrozdziale przedstawione jest jego działanie. W dalszej części rozdziału znaleźć można dokładny opis popromiennego efektu sąsiedztwa, zjawiska, które nieco ponad dwie dekady temu zachwiało teoretycznymi podstawami radiobiologii, dziedziny nauki zajmującej się oddziaływaniem promieniowania jonizującego na organizmy żywe. Wpływ tego zjawiska na wyniki napromieniania ilustruje eksperyment przeprowadzony przez zespół E. C. Mackonis w 2007 roku, do którego odnoszą się również następne rozdziały. Ostatni proces biologiczny, którego poznanie niezbędne jest do postawienia i zrozumienia rozważanej w pracy hipotezy badawczej, to zjawisko senescencji komórkowej. Dokładny opis tego zjawiska znajduje się w przedostatniej części rozdziału. Na końcu rozdziału postawiona jest hipoteza badawcza, weryfikowana w dalszych rozdziałach na drodze eksperymentów biologicznych i modelowania matematycznego.

2.1 Działanie promieniowania jonizującego na komórki

Promieniowanie jonizujące, powszechnie wykorzystywane w leczeniu nowotworów, jest promieniowaniem, które ładunek elektryczny nadaje atomom, wcześniej elektrycznie obojętnym. Dzieje się to na skutek wybijania elektronów z powłok elektronowych, co prowadzi do powstania dodatnich jonów i ujemnie naładowanych swobodnych elektronów [86]. Jonizacja zasad azotowych (adeniny, guaniny, cytozyny i tyminy) składających się na nić DNA, może prowadzić do powstawania w niej pęknięć i co za tym idzie uszkodzeń materiału genetycznego, którego integralność jest niezbędna dla przeżycia i funkcjonowania komórek [2]. Jednak do powstawania peknieć dochodzi w dużo wiekszym stopniu poprzez oddziaływanie nici DNA z produktami przemian chemicznych wody, wywołanych pochłonięciem przez nią promieniowania jonizującego (radioliza wody) [55, 82]. Jednymi z takich szkodliwych produktów sa rodnik hydroksylowy czy anionorodnik ponadtlenkowy [55]. Dodatkowo, reakcje zasad azotowych tworzących DNA z produktami radiolizy wody mogą doprowadzić do wystąpienia licznych mutacji, potencjalnie śmiertelnych dla komórki [55]. Przyjmuje się, że najbardziej szkodliwe dla komórki jest tzw. dwuniciowe pęknięcie (ang. Double Strand Break - DSB), czyli powstanie jednoczesnych pęknięć na obu niciach DNA na tyle blisko siebie, że dochodzi do rozerwania całego łańcucha DNA [54].

Pojedyncze i podwójne pęknięcia nici DNA są wykrywane poprzez odpowiednie białka detektorowe, które przekazują następnie sygnał kolejnym białkom mediatorowym. Następujące potem kaskady sygnałów prowadzą do zmian w regulacji różnorodnych aspektów funkcjonowania komórki, takich jak rozpoczęcie procesu naprawy DNA poprzez aktywację odpowiednich białek, spowolnienie już rozpoczętego cyklu podziału komórkowego aby zwiększyć zasób dostępnego czasu na naprawę, zwiększenie poziomu dostępnych budulcowych elementów DNA (deoksynukleotydów, dNTP), czy też w ostateczności, gdy uszkodzenia są zbyt duże, wprowadzenie komórki na szklak zaprogramowanej śmierci komórkowej (apoptozy) [54, 59], por. rys. 2.1. W rzeczywistości, w momencie wykrycia uszkodzenia DNA dochodzi do zmian w poziomach ekspresji bardzo wielu białek i liczba zmian w mechanizmach regulacji komórkowej wykracza daleko poza te wyszczególnione powyżej. Warto podkreślić, że pęknięcia jednoniciowe są stosunkowo łatwo naprawiane i to te dwuniciowe są dużym wyzwaniem dla wbudowanych mechanizmów naprawy DNA, stanowiąc realne zagrożenie dla funkcjonowania komórki [54].

2.2 Białko p53 — strażnik genomu

Jednym z najważniejszych białek regulujących odpowiedź komórki na powstanie uszkodzeń w nici DNA jest białko p53 (kodowane przez gen TP53 położony na chromosomie 17), którego zasadnicza rola polega na wydłużaniu czasu pomiędzy kolejnymi podziałami komórki. Do spowolnienia cyklu komórkowego na skutek



Rysunek 2.1: Schematyczne przedstawienie odpowiedzi komórki na powstanie dwuniciowego pęknięcia DNA. Białka detektorowe wykrywają powstałe pęknięcie i przekazują sygnał dalej do białek mediatorowych. Różnorakie kaskady sygnałowe prowadzą do zmian w regulacji różnych aspektów funkcjonowania komórki.

działania białka p53 dochodzi w fazie G_1 , podczas której ma miejsce synteza różnych enzymów potrzebnych głównie do replikacji DNA w następnej fazie [29]. Wydłużenie cyklu umożliwia naprawę uszkodzeń DNA indukowanych różnymi czynnikami egzo- i endogennymi, co zapobiega przekazywaniu zaburzeń genetycznych komórkom potomnym. Ponadto, jeśli uszkodzenia są zbyt rozległe lub naprawa nieskuteczna, białko p53 uruchamia proces zaprogramowanej "samobójczej" śmierci komórkowej — apoptozy [37, 64]. Ze względu na tak duże znaczenie dla mechanizmów utrzymujących spójność DNA gen TP53, którego produktem jest białko p53, zwany jest "strażnikiem genomu". Dodatkowo, mutacje w genie TP53, które upośledzają jego działanie, stanowią najbardziej rozpowszechnione zmiany genetyczne odnajdywane w nowotworach ludzkich [42]. W przypadku nowotworu płuc, okrężnicy, czy jajnika mutacja genu TP53 odnajdywana jest w około 50% wszystkich zdiagnozowanych przypadków [42].

2.3 Popromienne efekty sąsiedztwa

Nieco ponad dwie dekady temu poddano próbie jeden z ważniejszych paradygmatów radiobiologii mówiący o tym, że do zmian w komórkach napromienianej tkanki dochodzi wyłącznie na skutek bezpośredniego przejścia fotonów lub cząsteczek promieniowania jonizującego przez komórkę, w której główną tarczą podatną na uszkodzenia jest DNA. W [68] H. Nagasawa i J. Little donieśli, że nienapromienione komórki pochodzące z jajnika chomika chińskiego (*Cricetulus griseus*) wykazują zwiększoną częstość wymiany materiału genetycznego pomiędzy siostrzanymi chromatydami (identycznymi kopiami tego samego chromosomu, które powstają przed podziałem komórki), gdy komórki znajdujące się w ich pobliżu są napromieniane małymi dawkami promieniowania α . Od momentu opublikowania tamtych wyników wiele badań potwierdziło, że odpowiedź populacji komórkowej na promieniowanie jonizujące nie daje się sprowadzić do prostego zagregowania odpowiedzi poszczególnych komórek, por. [10, 83, i podane tam pozycje bibliograficzne]. W radiobiologii zaczęło zyskiwać na znaczeniu zjawisko najczęściej nazywane popromiennym efektem sasiedztwa, czyli, w najszerszej możliwej definicji, zjawisko polegające na wywołaniu zmian w komórce poprzez poddanie innej komórki działaniu promieniowania jonizującego [10]. Wnikliwy czytelnik zauważy, że w powyższej definicji nie jest wyszczególniony ani rodzaj zmian, z jakimi mamy do czynienia w komórkach, ani w jakiej odległości od siebie znajdują się badane komórki, ani co działo się z komórka, w której zaobserwowano zmiany. Wydaje się, że wszystkie badane do tej pory niebezpośrednie efekty promieniowania jonizującego można podzielić na trzy klasy efektów, które odnoszą się bezpośrednio do możliwych scenariuszy napromieniania organizmu ludzkiego [10].

Pierwsza klasa efektów, badana po raz pierwszy w [68] i nazywana dalej po prostu klasą efektów sąsiedztwa (*ang. bystander effects*), odnosi się do układów, w których napromieniona zostaje cała populacja komórek, lecz przy wykorzystaniu na tyle małych dawek, że tylko niektóre komórki doświadczają bezpośredniego działania promieniowania. W tej sytuacji napromienione komórki wywołują zmiany w komórkach nienapromienionych, które również znajdują się w obszarze działania promieniowania jonizującego, por. rys. 2.2A. Tego typu układy ekspe-



Rysunek 2.2: Podział efektów popromiennych w zależności od sposobu napromieniania. Klasyczny efekt sąsiedztwa (A) występuje, gdy jedynie niektóre komórki z napromienianej populacji otrzymują niezerową dawkę promieniowania. Efekt widza (B) ma miejsce, gdy dochodzi do zmian w komórkach, które były poza napromienianym rejonem. Efekt kohorty (C) obejmuje zmiany, jakie wywołują pomiędzy sobą komórki, które otrzymały pewną dawkę promieniowania. Szary kolor na rysunkach oznacza komórkę, która otrzymała niezerową dawkę promieniowania, a strzałki — możliwą sygnalizację międzykomórkową.

rymentalne *in vitro* mają za zadanie odwzorować zachowanie komórek *in vivo* w momencie, gdy ludzkie ciało poddawane jest małym dawkom promieniowania, np. podczas prześwietleń bezpieczeństwa na lotniskach [51] czy w trakcie lotów na dużych wysokościach [13].

Druga klasa efektów, nazywana klasą efektów widza (ang. abscopal effects), odnosi się do sytuacji, w której dochodzi do napromieniania jedynie pewnej części organizmu (np. tkanki nowotworowej przy stosowaniu radioterapii), czyli opisuje układy, w których badane są zmiany w komórkach znajdujących się poza rejonem napromieniania, por. rys. 2.2B. Dobrym przykładem ilustrującym tę klasę efektów są wyniki eksperymentu przedstawionego w [17], gdzie badano wpływ napromieniania nogi myszy na wzrost guza znajdującego się w okolicach linii środkowej grzbietu. Okazało się, że wzrost nowotworu jest wyraźnie słabszy, gdy ma miejsce napromienianie jednej z kończyn. Powszechnie przyjmuje się jednak, że efekt widza, który obserwuje sie *in vivo*, stanowi raczej odpowiedź całego organizmu na efekt zastosowania promieniowania jonizującego, aniżeli jedynie rezultat wysyłania różnego rodzaju sygnałów przez komórki bezpośrednio napromienione [67]. Efekt widza in vivo zależy w dużym stopniu od komórek układu odpornościowego, od ciągłego transportu substancji przez układ krwionośny, czy wysiłków całego organizmu do odzyskania sprawności po przynajmniej częściowym uszkodzeniu napromienianego organu. W związku z tym, wszelkie eksperymenty *in* vitro, w których bada się jedynie wpływ sygnałów wysyłanych przez komórki bezpośrednio napromienione do komórek nienapromienionych, niezależnie od tego czy znajdowały się w napromieniowywanym rejonie, czy też nie, określa się mianem eksperymentów badających efekt sąsiedztwa.

Ostatnia, najrzadziej badana eksperymentalnie klasa efektów, nazywana klasą efektów kohorty (*ang. cohort effects*), odnosi się do sytuacji, w której każda komórka z napromienionej populacji otrzymała pewną dawkę promieniowania jonizującego (niekoniecznie tę samą) i badane są te zmiany komórek, które zostały wywołane przez sygnały pochodzące od innej komórki napromienionej [57], por. rys. 2.2C. W takim układzie każda z komórek składających się na napromienioną populację jest zarówno odbiorcą, jak i nadawcą sygnału. Z tego typu sytuacją *in vivo* ma się do czynienia w przypadku miejsc, które diagnostycznie prześwietlono promieniami Roentgena, bądź też w przypadku klinicznego zastosowania radioterapii, w miejscu napromienienia nowotworu [10].

Nie jest jednoznaczny również rodzaj zmian, jakie zachodzą w komórkach otrzymujących sygnały od komórek bezpośrednio napromienionych. Efekt końcowy zależy w dużym stopniu od układu eksperymentalnego, linii komórkowej oraz wielkości dawki promieniowania [10]. Najczęściej obserwuje się zmiany niekorzystne dla komórek, które dotyczą m. in. obniżenia frakcji przeżywających komórek klonogennych [66] (definicja w podrozdziale A.1 w dodatku), zwiększonej częstości wymiany materiału genetycznego między chromosomami [60, 68] oraz zwiększenia niestabilności genetycznej będącej wynikiem różnego typu aberracji chromosomowych czy indukcji mikrojąder, co może doprowadzić nawet do śmierci komórki na drodze apoptozy [77]. W dostępnej literaturze można jednocześnie znaleźć informacje o pozytywnych zmianach, jakie zachodzą w komórkach odbierających sygnały, wśród których można wyróżnić np. zwiększenie odporności komórek na promieniowanie jonizujące [53] czy też zwiększenie częstości występowania podziałów komórkowych w populacji [52]. Ścieżki sygnałowe odpowiedzialne za występowanie efektów sąsiedztwa nie zostały do końca poznane, ale można wyróżnić kilka wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych cząstek sygnałowych, które mają dla nich kluczowe znaczenie, por. [83, i podane tam pozycje bibliograficzne]. Spośród nich można wyróżnić m. in. reaktywne formy tlenu, tlenki azotu, interleukinę 8, białko p53 oraz białko NF- κ B.

2.3.1 Eksperyment E. C. Mackonis i in.

W pracy z roku 2007 [63] E. C. Mackonis wraz ze współpracownikami opisała eksperyment znakomicie ilustrujący, jak niejednoznaczny może być końcowy rezultat napromieniania, gdy w badanym układzie występuje efekt sąsiedztwa. W eksperymencie dokonano porównania przeżywalności komórek czerniaka (*ang. melanoma*, MM576, złośliwy nowotwór skóry) dla różnych dawek i wzorców napromieniania. Komórki posiewane były na dno specjalnie przygotowanych butelek hodowlanych, na które nakładano odpowiednio spreparowane osłony radiacyjne. Obok całkowitego braku osłony radiacyjnej rozważane były dwa wzorce napromieniania: w pierwszym przypadku osłonę nałożono na 75% całkowitego obszaru hodowli i odsłonięta została jedynie pierwsza ćwiartka powierzchni hodowlanej; w drugim przypadku zasłonięto też 75% całkowitego obszaru, jednak obszar odsłonięty podzielony był na trzy identyczne i równo rozłożone prążki, por. rys. 2.3. Butelki poddawane były działaniu promieniowania jonizującego o różnych daw-



Rysunek 2.3: Przestrzenne wzorce napromieniania rozważane przez E. C. Mackonis i in. [63]. Ciemnoszare fragmenty przedstawiają obszary butelek hodowlanych, które były osłonięte przed promieniowaniem.

kach: 3, 6, 10 i 20 Gy. Dodatkowe szczegółowe pomiary pokazały, że w każdym

z rozważanych scenariuszy, przez zastosowane osłony przeciwradiacyjne przedostawała się nieznaczna ilość promieniowania jonizującego, wywołująca uszkodzenia jedynie w niewielkiej części komórek. W czasie 5 minut po napromienieniu wymieniano pożywkę hodowlaną (medium), a następnie po upływie 10-12 dni obliczono frakcję przeżywających komórek klonogennych in situ (definicja w podrozdziale A.1 w dodatku), czyli kolonie zliczane były bezpośrednio w butelce, w której dochodziło do napromieniania. Frakcje przeżywające obliczano dla całej butelki oraz oddzielnie dla obszarów odsłoniętych i zasłoniętych (poprzez porównywanie odpowiednich obszarów). Z uwagi na niezerową dawkę promieniowania przedostającą się przez osłony radiacyjne, obszary otwarty i zamkniety zdefiniowano jako obszary, do których docierało odpowiednio 90% i 10% całkowitej dostarczonej dawki. Co ważne, pomocnicze eksperymenty wykazały, że w trakcie napromieniania i dalszej hodowli nie dochodziło do przemieszczania się komórek pomiędzy poszczególnymi obszarami. Część uzyskanych wyników przedstawiona jest w tabeli 2.1. Zebrane dane wskazuja na dwa niestandardowe rodzaje odpowiedzi komórek na sygnały generowane przez komórki napromienione. W tabeli 2.1 na kolor zielony zaznaczono wyniki wskazujące na zwiększenie przeżywalności komórek klonogennych w populacji komórek nieosłonietych przed promieniowaniem, gdy w ich otoczeniu znajdowały się komórki, które, mimo przebywania pod osłoną radiacyjną, otrzymały niewielkie dawki promieniowania. Rzeczywiście, frakcje przeżywających komórek klonogennych w tym przypadku (0,528 oraz 0,710) są znacznie większe od tej zmierzonej dla populacji nie mającej tego typu sąsiedztwa (0,279). Z kolei kolorem żółtym zaznaczono dane, które wskazują na zwiększenie przeżywalności komórek klonogennych w populacji komórek osłoniętych zasłoną radiacyjną, w momencie gdy komórki sąsiadujące (nie znajdujące się pod zasłona) otrzymały wysokie dawki promieniowania. Powyższe wyniki mają zasadnicze znaczenie wobec coraz precyzyjniejszych aparatów służących napromienianiu nowotworów, które poprzez przestrzenną modulację wielkości dawki maksymalizują dawkę aplikowaną w rejon nowotworu i minimalizują dawkę promieniowania odbieranego przez otaczającą zdrową tkankę [39]. Wydaje się, że aby należycie zoptymalizować aplikowaną dawkę, należy zrozumieć skomplikowane mechanizmy stojące za popromiennym efektem sąsiedztwa.

2.4 Program senescencji komórkowej

Senescencję komórkową definiuje się jako nieodwracalne zatrzymanie cyklu podziału komórki, która pozostaje mimo tego przy życiu i jest dalej metabolicznie aktywna [58]. Po raz pierwszy senescencję zaobserwowano eksperymentalnie w latach 60. XX wieku, gdy po wykonaniu kilkudziesięciu pasaży część z hodowanych komórek ludzkich zaniechała podziałów [48, 49]. Komórki w stanie senescencji można rozpoznać po zwiększonej w stosunku do komórek aktywnie dzielących się

Dawka	Wzorzec naświetlania	Całkowita frakcja przeżywająca	Frakcja przeżywająca w obszarze nieosłoniętym	Frakcja przeżywająca w obszarze zasłoniętym
3 Gy	Prążki	$0,\!832\pm0,\!093$	$0,\!528\pm0,\!067$	$0,822 \pm 0,100$
6 Gy	Prążki	$0,\!978\pm0,\!169$	$0,\!213\pm0,\!041$	$1{,}034\pm0{,}196$
$10 { m ~Gy}$	Prążki	$0,757 \pm 0,127$	$0,\!021\pm0,\!013$	$0,\!970\pm0,\!167$
$20 { m ~Gy}$	Prążki	$0,\!914\pm0,\!094$	$0,\!000\pm0,\!000$	$1,\!535\pm0,\!131$
3 Gy	Ćwiartka	$0,\!665\pm0,\!085$	$0,710\pm0,136$	$0,\!705\pm0,\!096$
6 Gy	Ćwiartka	$0{,}818 \pm 0{,}112$	$0,\!113\pm0,\!032$	$0,\!838\pm0,\!107$
$10 { m ~Gy}$	Ćwiartka	$0,\!641\pm0,\!082$	$0,\!010\pm0,\!008$	$0,\!848\pm0,\!110$
$20 { m ~Gy}$	Ćwiartka	$0,\!791\pm0,\!087$	$0,\!014\pm0,\!007$	$1,\!313\pm0,\!153$
3 Gy	Brak osłony	$0,\!279\pm0,\!100$		
6 Gy	Brak osłony	$0,\!062\pm0,\!023$		
$10 { m ~Gy}$	Brak osłony	$0,009\pm0,006$		
$20 { m ~Gy}$	Brak osłony	$0,000\pm0,000$		

Tabela 2.1: Podsumowanie wyników eksperymentalnych przedstawionych w [63]. Kolorami zaznaczone są zestawy wartości, które wskazują na pozytywny (zwiększający przeżywalność) wpływ sygnałów wysyłanych przez komórki napromienione.

objętości, czy też powiększonym jądrze komórkowym, por. rys. 2.4. Dochodzi również do szeregu zmian biochemicznych wewnątrz komórki, z których najczęściej stosowanym markerem do oznaczania senescencji jest zwiększony poziom enzymu β -galaktozydazy [27]. Dalsze eksperymenty wykazały, że istnieje skończona liczba podziałów, które komórka może wykonać zanim wejdzie w stan senescencji lub zginie (limit Hayflicka). Pokazano, że limit Hayflicka zależy silnie od tego, jakiego typu jest badana komórka i z jakiego organizmu pochodzi [18]. Co więcej, wykazano istnienie korelacji pomiędzy długością życia, a wielkością limitu Hayflicka [81]. W związku z tym od wielu lat senescencję komórkową wiąże się bezpośrednio z procesem starzenia organizmu. Eksperymenty wykorzystujące enzym telomerazy, który odbudowuje końcowe fragmenty chromosomów (telomery) [44], wyka-



Rysunek 2.4: Komórki raka jelita grubego HCT116 p53 +/+ w stanie senescencji (A) oraz HCT116 p53 -/- wykazujące morfologiczne cechy apoptozy (B) po ekspozycji na dawkę 8 Gy promieniowania X. Komórka w stanie senescencji charakteryzuje się dużo większą objętością oraz znacząco powiększonym jądrem. Zdjęcia z eksperymentów własnych.

zały, że wejście w stan senescencji po wyczerpaniu liczby możliwych podziałów stanowi konsekwencję stopniowego skracania telomerów, mającego miejsce przy każdym podziale komórki [3, 11, 47].

Początkowo sądzono, że stan senescencji komórkowej jest jedynie efektem ubocznym intensywnego hodowania komórek in vitro i w organizmie żadna z komórek nie ma realnej możliwości wyczerpania dostępnej puli podziałów. W opozycji do tego poglądu stoi fakt, że obecność komórek w stanie senescencji zaobserwowano in vivo w wielu różnych tkankach [20]. Jednak nie ma pewności, czy senescencja komórkowa wykryta in vivo wywołana jest przez skracanie telomerów, ponieważ wykazano, że w stan senescencji może wprowadzić komórkę szereg innych bodźców. Jednym z najważniejszych i najczęściej występujących bodźców indukujących senescencję komórkowa jest wystąpienie odpowiednio dużych uszkodzeń DNA, które powstają w skutek poddawania komórek różnego rodzaju stresom, takim jak działanie promieniowania jonizującego czy reaktywnych form tlenu (ang. stress induced senescence, SIS) [58]. Do indukcji senescencji komórkowej może również prowadzić aktywacja onkogenu (ang. oncogene-induced senescence, OIS) [85] lub mutacja genu supresorowego (ang. PICS – PTEN lossinduced senescence, PPIS) [19]. Onkogen oraz gen supresorowy są genami, które mogą prowadzić do transformacji komórki w komórkę nowotworową poprzez odpowiednio ich aktywację oraz dezaktywację [99]. Wyniki eksperymentów sugerują, że nie ma jednej uniwersalnej ścieżki sygnałowej prowadzącej do stanu senescencji komórkowej [88]. Mimo tego uniwersalną wydaje się być zależność programu senescencji komórkowej od statusu genu TP53. Wiele eksperymentów wykazało, że komórki z w pełni funkcjonalnym genem TP53 z większym prawdopodobieństwem wchodzą w stan senescencji komórkowej wywołanej stresem w porównaniu z komórkami, w których doszło do uszkodzenia tego genu [8]. Istnieje wiele hipotez, które próbują wyjaśnić, jaką przewagę ewolucyjną daje posiadanie programu senescencji komórkowej. Najczęściej przytaczana mówi o tym, że senescencja służy jako dodatkowy mechanizm zapobiegający powstawaniu nowotworu [61].

Ostatnie lata pozwoliły na dokładniejsze zbadane wpływu obecności komórek w stanie senescencji na ich bezpośrednie otoczenie. Okazało sie, że wieksza część z komórek, które weszły w stan senescencji komórkowej wykazuje również dobrze zdefiniowany zespół daleko idacych zmian w wbudowanych mechanizmach regulacyjnych (ang. senescence-associated secretory phenotype, SASP) [24]. Zmianom tym towarzyszy ogromny wzrost ekspresji ponad 40 związków przenoszących sygnały pomiędzy komórkami, które mogą mieć różnoraki wpływ na otaczające środowisko [21, 100]. Pokazano, że komórki w stanie senescencji wykazujące jednocześnie SASP mogą w otaczającej populacji zwiększać częstość zachodzących podziałów komórkowych, powodować odróżnicowywanie się komórek (zmniejszanie ich specjalizacji), zwiększać tempo migracji, czy też stymulować proces angiogenezy (proces powstawania nowych naczyń krwionośnych) [24]. Co ważne, jednym z elementów SASP jest wydzielanie przez komórki reaktywnych form tlenu i tlenku azotu [94, 98], które sa uważane za jedne z ważniejszych cząstek sygnalizacyjnych towarzyszących efektowi sąsiedztwa [83]. Wyniki eksperymentów wskazują, że SASP jest zachowany w różnych typach komórek pochodzacych od różnych gatunków [22, 23] i może zostać wywołany za pomocą chemioterapii, która powoduje uszkodzenia DNA [23].

2.5 Hipoteza badawcza

Na podstawie przedstawionych powyżej opisów zjawisk biologicznych możemy wysunąć badaną w niniejszej pracy hipotezę, która mówi o kluczowej roli programu senescencji komórkowej dla występowania popromiennego efektu sąsiedztwa. Rozważmy populację komórek hodowaną w postaci pojedynczej warstwy umieszczonej na płaskim podłożu, która poddawana jest bezpośredniemu działaniu promieniowania jonizującego. Na skutek wyindukowanych uszkodzeń DNA, część komórek w populacji wchodzi w stan senescencji komórkowej odznaczający się jednocześnie SASP. Komórki te zaczynają wydzielać do otaczającego je mikrośrodowiska substancje, spośród których możemy wyróżnić dwa interesujące nas typy:

- substancje mogące uszkadzać DNA innych komórek, będące cząsteczkami o krótkim okresie połowicznego rozkładu (np. wymieniony wcześniej tlenek azotu);
- 2. substancje pobudzające inne komórki do kolejnych podziałów, będące białkami o długim okresie niezmiennej biologicznej aktywności, por. rys. 2.5.

Substancje pierwszego typu, mające relatywnie krótki zasięg działania, wywołują kolejne uszkodzenia w otaczających komórkach i, co za tym idzie, mogą wprowadzać w stan senescencji kolejne komórki (również z SASP). Co najważniejsze,



Rysunek 2.5: W wyniku działania promieniowania jonizującego (obszar w czerwonym okręgu) w populacji indukowana jest pewna liczba komórek w stanie senescencji (kolor zielony). Komórki te zaczynają wydzielać substancje o ograniczonym zasięgu działania i mogące uszkodzić DNA innych komórek (czarne okręgi wyznaczają zasięg) oraz substancje o dalekim zasięgu działania i mogące pobudzić komórki do podziałów (zielone gwiazdki).

jeśli bezpośrednio nad warstwą napromienionych komórek umieścimy warstwę komórek niepoddanych działaniu promieniowania, substancje te wywołają w nich analogiczne zmiany. Zatem substancje pierwszego typu odpowiadają za najczęściej obserwowany szkodliwy (obniżający przeżywalność, zwiększający niestabilność genetyczną) wpływ komórek napromienionych na komórki sąsiadujące. Sygnały typu drugiego natomiast, dzięki zgoła innemu sposobowi działania, odpowiedzialne są za występowanie niestandardowych typów efektów sąsiedztwa. Bez trudu można wyobrazić sobie układ eksperymentalny, w którym obie populacje komórek są od siebie oddalone na tyle, że jedynie sygnały o dalekim zasięgu będą mogły przekazać między nimi jakąkolwiek informację. Przy koinkubacji zaobserwujemy wtedy dużo większe tempo rozwoju populacji komórek nienapromienionych, niż w przypadku ich samodzielnej hodowli. Jednak ciekawe i wymagające zbadania są układy, w których oba typy sygnałów odgrywają rolę i wynik wspólnej hodowli nie jest oczywisty. Powyższe rozważania podsumujemy krótko w następującej hipotezie.

Hipoteza. Wystąpienie popromiennego efektu sąsiedztwa jest konsekwencją pojawienia się w populacji bezpośrednio napromienionej komórek w stanie senescencji z SASP. Co więcej, jego siła zależy bezpośrednio od liczby komórek, w których ten specyficzny fenotyp został wyindukowany (początkowo lub na skutek wtórnych oddziaływań). Różne typy popromiennego efektu sąsiedztwa są natomiast związane z różnymi rodzajami substancji, które są aktywnie wydzielane przez komórki z SASP. Komórki sąsiednie znajdujące się w małej odległości od napromienionej populacji są pod niekorzystnym wpływem substancji, które mogą uszkadzać DNA komórki i, co za tym idzie, zmniejszać ich przeżywalność. Gdy odległość jest większa, do komórek docierają jedynie substancje, które pobudzają je do kolejnych podziałów, czyli zwiększają ich eksperymentalnie szacowaną przeżywalność.

Ważnym wnioskiem wynikającym z powyższej hipotezy jest to, że siła efektu sąsiedztwa (liczba dotkniętych nim komórek) zależy od tego jak często komórki wchodzą w stan senescencji przy danej dawce promieniowania. Ponieważ wiele eksperymentów wykazało, że komórki z w pełni funkcjonalnym genem TP53 z większym prawdopodobieństwem wchodzą w stan senescencji komórkowej wywołanej stresem w porównaniu z komórkami, w których doszło do uszkodzenia tego genu, naturalnym wydaje się badanie tej hipotezy przy wykorzystaniu komórek tego samego typu, ale z różnym statusem tego genu.

Rozdział 3

Wyniki eksperymentalne

Streszczenie

W rozdziale trzecim przedstawione są wyniki eksperymentów wykonanych w celu zweryfikowania hipotezy badawczej postawionej w poprzednim rozdziale. Rozdział rozpoczyna się od opisu materiałów i metod wykorzystanych w trakcie eksperymentów. Opisane zostały wykorzystane linie komórek ludzkich, metody hodowli, napromieniania oraz badania siły efektu sąsiedztwa. W pierwszej części rozdziału znajdziemy również dokładny opis wykorzystanych metod pomiaru poszczególnych charakterystyk populacji komórkowej. W drugiej części rozdziału przedstawione są szczegółowe wyniki poszczególnych eksperymentów oraz analiza ich znaczenia dla postawionej hipotezy badawczej. Za pomocą narzędzi statystyki zbadane zostały korelacje pomiędzy poszczególnymi zmiennymi oraz różne zależności wyników napromieniania od statusu genu TP53.

3.1 Materiały i metody

3.1.1 Linie komórkowe i metoda hodowli

Do eksperymentów wykorzystano trzy linie komórkowe: dwie wyprowadzone z raka okrężnicy (ang. human corolectar cancer, HCT116) oraz jedną wyprowadzoną z ludzkich fibroblastów (ang. normal human dermal fibroblasts, NHDF). Linie komórek HCT116 różniły się od siebie statusem genu TP53. Pierwsze miały pozostawiony gen TP53 w funkcjonalnej i niezmienionej formie (HCT116 p53 +/+), podczas gdy drugie były tego genu całkowicie pozbawione (HCT116 p53 -/-). Obie linie raka okrężnicy zostały pozyskane z banku komórek mieszczącego się w Zakładzie Biologii Nowotworów Instytutu Onkologii w Gliwicach. Wczesne pasaże ludzkich fibroblastów zostały zakupione w firmie Lonza Walkersville Inc. Hodowle komórek prowadzono w podłożu Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F12 Ham (DMEM/F12 1:1) firmy Sigma-Aldrich. Podłoże hodowlane zostało dodatkowe wzbogacone inaktywowaną bydlęcą surowicą płodową (firmy PPA) w ilości 12% końcowej objętości podłoża. Aby uniknąć zakażenia próbki i co za tym idzie zniekształcenia wyników eksperymentów, do podłoża dodano dodatkowo antybiotyku gentamycyny (firmy Krka) w stężeniu 80 µg/ml. Wszystkie trzy linie komórkowe były okresowo sprawdzane pod kątem infekcji przez mykoplazmy, które są rodzajem bakterii pozbawionych ściany komórkowej i odpornych na szerokie spektrum stosowanych obecnie antybiotyków. Do testu na obecność mykoplazm wykorzystano zestaw Mycoplasma Stain Kit zakupiony w firmie Sigma-Aldrich. Hodowla odbywała się w inkubatorze utrzymującym temperaturę 37 °C, 5% stężenie dwutlenku węgla oraz 95% wilgotność powietrza.

3.1.2 Metody napromieniania i badania efektu sąsiedztwa

Do badania efektu sąsiedztwa wykorzystano płytki hodowlane FalconTM zakupione w firmie Becton-Dickinson. Na pojedynczy zestaw składa się płytka, na której znajduje się sześć izolowanych kolistych studzienek (dołków) oraz sześć oddzielnych insertów, por. rys. 3.1. Spód insertów stanowi transparentna mem-



Rysunek 3.1: Zestaw wykorzystany do badania efektu sąsiedztwa. Do poszczególnych dołków zawierających napromieniane komórki, wstawiane są inserty, w których znajdują się komórki nie wystawione na działanie promieniowania.

brana z gęsto upakowanymi porami o średnicy $0,4 \mu m$, przez które przedostają się jedynie pożywka hodowlana, białka i inne cząstki sygnałowe. Insert jest tak zaprojektowany, że po wstawieniu na płytkę jego spód znajduje się w odległości

0,9 mm od dna dołka, czyli nie dochodzi do stykania się komórek umieszczonych w insercie i tych w dołkach, a transparentna membrana pozwala na obserwację komórek pod mikroskopem.

Na około 20 godzin przed rozpoczęciem eksperymentu do każdego dołka płytki sześciodołkowej i do insertów umieszczonych w oddzielnych płytkach wysiewano po 100 tys. komórek zawieszonych w 3 ml podłoża hodowlanego. Tak przygotowane próbki były dalej inkubowane. W momencie rozpoczęcia napromieniania komórki w dołkach zajmowały około 50% całkowitej dostępnej powierzchni hodowlanej wynoszącej 9,6 cm². Przed napromienieniem podłoże z dołków i insertów było wymieniane na świeże. Płytki z komórkami rosnacymi w dołkach poddawane były działaniu promieniowania jonizującego w pojedynczej dawce wynoszącej 2, 4, 6 oraz 8 Gy (1 Gy = 1 J/kg; dźul na kilogram [86]) i generowanej w temperaturze pokojowej przez akcelerator elektronów Cliniac 600 firmy Varian. Przy każdej serii eksperymentów z różnymi dawkami promieniowania prowadzona była również płytka kontrolna (oznaczana przez dawkę 0 Gy), czyli nie poddawana działaniu promieniowania i traktowana analogicznie do pozostałych. Natychmiast po napromienieniu do dołków wstawiane były wcześniej przygotowane inserty z nienapromienianymi komórkami (sasiednimi) i taki zestaw był dalej inkubowany przez określony czas. Całość procedury eksperymentalnej ilustruje rysunek 3.2. Dla wszystkich rozważanych dawek promieniowania i linii komórkowych, każdy



Rysunek 3.2: Układ eksperymentalny wykorzystany do badania efektu sąsiedztwa. Komórki po 20 godzinach od posiania w dołkach poddawane są działaniu promieniowania jonizującego. Po upływie około 10 minut do dołków wstawiane sa inserty z komórkami posianymi również 20 godzin wcześniej.

eksperyment prowadzono w co najmniej czterech oddzielnych dołkach, czyli wykonano minimum cztery powtórzenia każdego eksperymentu.

3.1.3 Metody pomiaru frakcji przeżywających komórek klonogennych

Do oceny przeżywalności komórek klonogennych napromienione komórki koinkubowano z nienapromienionymi, po czym inserty wyjmowano z dołków i komórki zbierano oddzielnie z dołków i insertów za pomocą roztworu trypsyny. Po kilkuminutowej inkubacji i dodaniu świeżej pożywki hodowlanej w celu inaktywacji zastosowanej trypsyny, zawiesinę z każdego dołka i insertu przenoszono do oddzielnych probówek i wirowano przez 2 minuty przy prędkości 2000 obr/min. Medium znad komórek osadzonych na dnie probówki było zlewane, a same komórki zawieszane w świeżej porcji pożywki. Za pomocą hemocytometru określana była średnia liczba komórek przypadających na 1 ml tak przygotowanej zawiesiny i po odpowiednim rozcieńczeniu zawiesina nanoszona była na płytki Petriego o średnicy 6 cm. Tak przygotowane płytki inkubowane były dalej przez 7 dni celem określenia frakcji przeżywających komórek klonogennych, por. dodatek A.1.

3.1.4 Pomiar frakcji komórek w stanie senescencji

Pomiar komórek w stanie senescencji odbywał się *in situ*, czyli bezpośrednio w dołkach i insertach. Uniknięto w ten sposób dodatkowego niekorzystnego oddziaływania na badane komórki. Do rozpoznawania komórek w stanie senescencji wykorzystany został szeroko stosowany biochemiczny marker: zwiększona ekspresja związanej z senescencją β -galktozydazy (SA- β -gal, ang. *senescence-associated* β -galactosidase) [27]. Do oznaczania komórek ze zwiększoną ekspresją SA- β -gal wykorzystano komercyjny zestaw Senescence Cells Hostochemical Staining Kit zakupiony w firmie Sigma-Aldrich, który po zastosowaniu wybarwiał komórki ze zwiększoną ekspresją SA- β -gal na kolor zielony. Szacowania frakcji wybarwionych komórek w całej populacji dokonywano wizualnie przy wykorzystaniu odwróconego mikroskopu. Za jego pomocą rejestrowane były zdjęcia zawierające w kadrze minimum 500 komórek, a następnie na każdym z nich zliczana była całkowita liczba komórek oraz liczba komórek wybarwionych na kolor zielony. W przypadku każdej płytki/dołka rejestrowane było minimum osiem zdjęć. Na rysunku 3.3 przedstawione jest przykładowe zdjęcie, które zostało poddane analizie.

3.1.5 Pomiar apoptozy

Pomiar apoptozy wykonywano jednocześnie z analizą indukcji mikrojąder po zastosowaniu bloku cytokinetycznego. W tym celu po napromienieniu komórek w dołkach i połączeniu z insertami, do podłoża hodowlanego dodawano cytochalazynę B (toksynę pochodzącą z grzybów pleśniowych, która blokuje podział cytoplazmy, czyli cytokinezę) w dawce 3 μ l/ml. Po zakończeniu koinkubacji, do dołków oraz insertów wprowadzono enzym trawienny trypsynę celem odseparowania komórek od podłoża. Po kilkuminutowej inkubacji i dodaniu świeżej pożywki hodowlanej w celu inaktywacji zastosowanej trypsyny, zawiesinę z każdego dołka i insertu przenoszono do oddzielnych probówek i wirowano przez 2 minuty przy prędkości 2000 obr/min. Medium znad komórek osadzonych na dnie probówek było zlewane, a same komórki zawieszane w 96% etanolu o temperaturze -20 °C i przechowywane w zamrażarce przez kilka następnych dni. Komórki były następ-



Rysunek 3.3: Przykładowe zdjęcie fragmentu płytki hodowlanej po przeprowadzeniu wybarwiania komórek odznaczających się zwiększoną ekspresją β galaktozydazy (komórek w stanie senescencji).

nie utrwalane w roztworze metanol:kwas octowy (3:1) i przygotowywano szkiełka mikroskopowe, które były dalej analizowane w mikroskopie fluorescencyjnym, po wybarwieniu fluorochromem DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) przy długości fali wzbudzenia 355 nm i emisji 460 nm. Komórki apoptotyczne były oceniane wizualnie na podstawie charakterystycznych zmian morfologicznych, takich jak zmniejszenie rozmiaru komórki, czy też kondensacja chromatyny i fragmentacja jądra komórkowego w późnych fazach apoptozy.

3.1.6 Pomiar całkowitej liczby komórek pozostających w dołkach i insertach po zakończeniu koinkubacji

W celu oszacowania całkowitej liczby komórek przeżywających napromienianie i następującą po nim koinkubację, bezpośrednio po zakończeniu koinkubacji medium ze wszystkich dołków oraz insertów zostało zebrane do oddzielnych probówek. Uniknięto w ten sposób pominięcia przy dalszym zliczaniu tych komórek, które nie przywarły do podłoża. Do dołków oraz insertów wprowadzono następnie enzym trawienny trypsynę celem odseparowania komórek od podłoża. Po kilkuminutowej inkubacji i dodaniu świeżej pożywki hodowlanej w celu inaktywacji zastosowanej trypsyny, zawiesinę z każdego dołka i insertu przenoszono do tych samych probówek, do których zebrano wcześniej medium i wirowano przez 3 minuty przy prędkości 2000 obr/min. Medium znad komórek osadzonych na dnie probówek było zlewane, a same komórki utrwalane w 1 ml 96% etanolu o temperaturze $-20\,^{\circ}$ C i trzymane w zamrażarce przez kilka następnych dni. Ostatecznie, niewybarwione komórki zliczano w komorze Bürkera korzystając z odwróconego mikroskopu i kontrastu fazowego.

3.2 Wyniki przeprowadzonych eksperymentów

W kolejnych podrozdziałach przedstawione są wyniki wszystkich eksperymentów, które zostały przez nas przeprowadzone w celu sprawdzenia biologicznych podstaw hipotezy badawczej postawionej w tej pracy. Objaśnienie dla wszystkich narzędzi statystycznych wykorzystanych w dalszej części rozdziału, takich jak test t-Studenta, współczynnik korelacji Pearsona czy współczynnik determinacji modelu R^2 , czytelnik może odnaleźć w dodatku B do niniejszej rozprawy.

3.2.1 Frakcja komórek pozostających w dołkach i insertach po zakończeniu koinkubacji

Co było do przewidzenia, wyniki eksperymentalne pokazują wyraźnie, że stosunek liczby komórek znajdujących się w dołkach po 48 godzinach koinkubacji do ich liczby przed napromienianiem maleje wraz ze wzrostem dawki promieniowania, por. rys. 3.4. Jednak biorąc po uwagę kluczową rolę białka p53 dla mecha-



Rysunek 3.4: Zmierzony eksperymentalnie stosunek liczby komórek znajdujących się w dołkach po 48 godzinach koinkubacji do ich liczby przed napromienianiem. Przedstawione są średnia i odchylenie standardowe z czterech niezależnych eksperymentów.

nizmów naprawy DNA, może zaskakiwać bardzo mała różnica pomiędzy obiema rozważanymi liniami HCT116, por. rys. 3.4. Z przeprowadzonego testu t-Studenta dla wykonanych pomiarów wynika, że niezależnie od rozważanej dawki promieniowania, różnice pomiędzy obiema liniami nie są statystycznie istotne (p-wartość >(0,3). Wynik ten jest jednak w zgodzie z wynikami eksperymentalnymi przedstawionymi w [70], gdzie poprzez dokładny pomiar odsetka nienaprawionych dwuniciowych peknięć DNA wykazano, że różnice w efektywności naprawy DNA pomiędzy liniami HCT116 o różnym statusie genu TP53 są pomijalne. Co ciekawe, w matematycznym modelowaniu procesów nowotworowych często zakłada się, że prawdopodobieństwo przeżycia komórki nowotworowej napromienionej dawka D jest równe frakcji przeżywających komórek klonogennych (SF), por. np. [31, 71]. Jednak tak zdefiniowane prawdopodobieństwo jest o kilka rzędów wielkości mniejsze niż to sugerowane przez prezentowane powyżej wyniki eksperymentalne, por. rys. 3.11. W szczególności, dla dawki 8 Gy wartość SF dla napromienianych komórek HCT116 p53 +/+ wynosi 0,015, podczas gdy po 48 godzinach koinkubacji wielkość populacji w dołku to mniej więcej 42% wielkości wyjściowej populacji.

W przypadku komórek sąsiadujących, czyli tych znajdujących się w insertach, różnice pomiędzy obiema rozważanymi liniami komórkowymi HCT116 są wyraźniejsze niż w przypadku komórek znajdujących się dołkach, por. rys. 3.5. Widzimy, że względna wielkość populacji po 48 godzinach koinkubacji, tak jak w poprzednim przypadku, maleje wraz ze wzrostem dawki promieniowania, ale jest wyraźnie mniejsza dla komórek z funkcjonalnym genem TP53. Rzeczywiście, korzystając z testu t-Studenta stwierdzamy, że statystycznie istotna różnica (pwartość < 0,05) ujawnia się dla dawek 4 i 6 Gy. W przypadku pozostałych dawek, p-wartość testu nie pozwala na rozróżnienie obu linii, lecz patrząc na ułożenie punktów eksperymentalnych, założenie o różnicy pomiędzy obiema liniami dla dawki 8 Gy wydaje się być mało dyskusyjne. Jednak co najważniejsze, powyższy wynik bezpośrednio wskazuje na występowanie efektu sąsiedztwa oraz na to, że jest on silniejszy w przypadku komórek z funkcjonalną postacją genu TP53.

3.2.2 Odsetek komórek w stanie senescencji

Pomiar odsetka komórek w stanie senescencji został wykonany po 48 godzinach koinkubacji napromienionych dołków z insertami. Uzyskane wyniki wskazują na istotną różnicę pomiędzy obiema rozważanymi liniami HCT116, gdy porównuje się względną ilość senescencji wywołanej promieniowaniem jonizującym, por. rys. 3.6. Wyraźnie widać, że dla dawek powyżej 2 Gy odsetek komórek w stanie senescencji w całej populacji w przypadku linii komórek z funkcjonalną postacią genu TP53 (p53 +/+) jest dużo wyższy niż dla linii komórek tego genu pozbawionych (p53 -/-). W przypadku dawki 8 Gy różnica pomiędzy obiema liniami jest ponad czterokrotna. Obliczona p-wartość testu t-Studenta, wynosząca mniej niż 0,05 dla dawek większych niż 2 Gy, potwierdza istotność tych różnic. Wydaje się ponad-



Rysunek 3.5: Zmierzony eksperymentalnie stosunek liczby komórek w insertach po 48 godzinach koinkubacji do ich liczby przed koinkubacją. Przedstawione są średnia i odchylenie standardowe z czterech niezależnych eksperymentów.

to, że zależność odsetka komórek w stanie senescencji od dawki promieniowania jest w przypadku linii HCT116 p53 +/+ wykładnicza. Rzeczywiście, dopasowanie modelu wykładniczego do danych eksperymentalnych dotyczących linii HCT116 p53 +/+ jest dużo lepsze niż dopasowanie modelu liniowego. W przypadku tego pierwszego współczynnik determinacji R^2 , który mówi o jakości danego dopasowania, wynosi 0,973, podczas gdy dla modelu liniowego $R^2 = 0,8557$.

Niemal idealnie liniową zależność odsetka komórek w stanie senescencji od wielkości dawki promieniowania obserwujemy natomiast w populacji komórek sąsiadujących, por. rys. 3.7. Obserwujemy również, tak jak w poprzednim przypadku, wyraźnie większą względną ilość wzbudzonej senescencji w komórkach z funkcjonalnym genem TP53 (p53 +/+). Statystyczna istotność tych różnic ujawnia się również powyżej dawki 2 Gy. Wynik ten sugeruje, tak jak pomiar względnej liczby komórek przeżywających koinkubację, że efekt sąsiedztwa występujący w przypadku obu linii komórkowych może mieć różną siłę. Co więcej, porównując poziom senescencji w komórkach bezpośrednio napromienianych, otrzymujemy wyraźny marker odróżniający obie linie.

W celu sprawdzenia, czy zależność poziomu senescencji od dawki promie-



Rysunek 3.6: Odsetek komórek w stanie senescencji w populacji komórek bezpośrednio napromienianych. Pomiar został wykonany po 48 godzinach koinkubacji. Przedstawione są średnia i odchylenie standardowe z ośmiu niezależnych eksperymentów.

niowania nie jest specyficzna dla linii komórkowej HCT116, przeprowadzony został dodatkowy eksperyment na linii nietransformowanych fibroblastów ludzkich (NHDF). Jak poprzednio, pomiar odsetka komórek w stanie senescencji został wykonany po 48 godzinach koinkubacji fibroblastów w napromienionych dołkach razem z fibroblastami w nienapromienionych insertach. Okazuje się, że tak jak w przypadku linii HCT116, obserwujemy zwiększanie się odsetka senescencji w całkowitej populacji wraz ze wzrostem stosowanej dawki promieniowania jonizującego, por. rys. 3.8. Zależność ta spełniona jest również dla fibroblastów sąsiadujących, czyli znajdujących się w koinkubowanych insertach. Podobnie jak w przypadku bezpośrednio napromienianej linii HCT116 p53 +/+ zależność ta wydaje się być nieliniowa. W przypadku fibroblastów sąsiadujących lepszy współczynnik determinacji $R^2 = 0,9891$ otrzymujemy również stosując model wykładniczy ($R^2 = 0,8371$ dla modelu liniowego). Dodatkowy pozytywny rezultat dla nietransformowanych fibroblastów sugeruje, że zależność poziomu senescencji od dawki promieniowania może być zjawiskiem uniwersalnym.



Rysunek 3.7: Odsetek komórek w stanie senescencji w populacji komórek znajdujących się w insertach sąsiadujących z napromienionymi dołkami. Pomiar został wykonany po 48 godzinach koinkubacji. Przedstawione są średnia i odchylenie standardowe z ośmiu niezależnych eksperymentów.

3.2.3 Poziomy apoptozy

Pomiar odsetka komórek apoptotycznych w populacji, tak jak w poprzednich przypadkach, wykonano po 48 godzinach koinkubacji. Odwrotnie niż w przypadku odsetka senescencji, odsetek komórek apoptotycznych w populacji napromienionej jest wyraźnie większy w populacji pozbawionej funkcjonalnej formy genu TP53, por. rys. 3.9. Widać, że w przypadku pomiaru odsetka apoptozy ma miejsce duży rozrzut pomiarów wokół estymowanych średnich. Jednak posługując się testem t-Studenta można stwierdzić, że obserwowane różnice pomiędzy obiema liniami są, mimo tak dużych wahań, statystycznie istotne. Z uwagi na ułożenie punktów pomiarowych ciężko jest natomiast stwierdzić, jakiego typu jest zależność odsetka komórek apoptotycznych od wykorzystanej dawki promieniowania.

W przypadku komórek sąsiadujących pomiary apoptozy wykazują, że jej odsetek w populacji zależy od dawki promieniowania w taki sam sposób, jak w przypadku komórek bezpośrednio napromienianych, por. rys. 3.10. Wydawać by się



Rysunek 3.8: Odsetek komórek w stanie senescencji zmierzony w populacji nietransformowanych ludzkich fibroblastów (NHDF) bezpośrednio napromienianych w dołku oraz koinkubowanych w sąsiadujących insertach. Pomiar został wykonany po 48 godzinach koinkubacji. Przedstawione są średnia i odchylenie standardowe z czterech niezależnych eksperymentów.

mogło jednak, że zależność ta jest w tym przypadku wyraźnie liniowa. Współczynnik determinacji R^2 modelu liniowego wynosi w tym przypadku 0,8674 oraz 0,8536 dla odpowiednio komórek p53 -/- oraz p53 +/+, czyli model liniowy stanowi dość dobry opis tej zależności. Powyższe wyniki, tak jak te prezentowane we wcześniejszych podrozdziałach, sugerują, że siła efektu sąsiedztwa jest różna dla komórek różniących się statusem genu TP53.

3.2.4 Frakcje przeżywających komórek klonogennych

Inaczej niż w poprzednich przypadkach, komórki wykorzystane do eksperymentalnego wyznaczenia frakcji przeżywających komórek klonogennych zebrano już po 24 godzinach koinkubacji napromienionych dołków z insertami. Okazuje się, że dla populacji bezpośrednio napromienianej różnica w przeżywalności pomiędzy obiema rozważanymi liniami komórkowymi jest nietrywialna i silnie zależy od zastosowanej dawki promieniowania, por. rys. **3.11**. Wydawać by się mogło, że dla mniejszych dawek promieniowania (2 i 4 Gy), to komórki z funkcjonal-



Rysunek 3.9: Odsetek komórek apoptotycznych w populacji bezpośrednio napromienianej w dołkach. Pomiar został wykonany po 48 godzinach koinkubacji. Przedstawione są średnia i odchylenie standardowe z czterech niezależnych eksperymentów.

nym genem TP53 (p53 +/+) odznaczają się niższą przeżywalnością komórek klonogennych. Jednak w obu przypadkach nie jest to różnica statystycznie istotna (p-wartość>0,17 w teście t-Studenta) i nie można mieć pewności, że taka zależność ma miejsce. Sytuacja zmienia się dla większych dawek promieniowania (6 i 8 Gy), kiedy to komórki pozbawione funkcjonalnej formy genu TP53 odznaczają się mniejszą przeżywalnością. Dla większych dawek promieniowania różnice w wyznaczonej frakcji przeżywających komórek klonogennych są już statystycznie istotne.

W przypadku komórek sąsiednich, czyli tych znajdujących się w insertach, sytuacja jest mniej skomplikowana. Dla każdej z rozważanych dawek komórki z funkcjonalnym genem TP53 (p53 +/+) odznaczają się mniejszą przeżywalnością komórek klonogennych, por. rys. 3.12. Widać wyraźnie, że różnica pomiędzy obiema liniami zwiększa się razem ze zwiększaniem dawki promieniowania jonizującego. Wynik ten stanowi kolejne potwierdzenie silnej zależności efektu sąsiedztwa od statusu genu TP53.


Rysunek 3.10: Odsetek komórek apoptotycznych w populacji znajdującej się w koinkubowanych insertach. Pomiar został wykonany po 48 godzinach koinkubacji. Przedstawione są średnia i odchylenie standardowe z czterech niezależnych eksperymentów.

3.3 Analiza wyników i wnioski

Ze względu na postawioną w pracy hipotezę badawczą, szczególnie interesujące są dla nas zależności pomiędzy poziomem wzbudzonej senescencji, a siłą występującego efektu sąsiedztwa. W celu dokładnego przebadania tych zależności oszacowane zostały m. in. współczynniki korelacji pomiędzy poszczególnymi zmiennymi. Do przeprowadzenia analizy statystycznej wykorzystaliśmy niekomercyjny pakiet statystyczny R z wbudowanymi w niego funkcjami cor.test (do wyliczania współczynnika korelacji i p-wartości) oraz lm (do obliczania parametrów najlepiej pasującego liniowego modelu badanej zależności). W przypadku funkcji cor.test zastosowane zostały domyśle wartości parametrów, czyli przy wykorzystaniu tej procedury obliczany był współczynnik korelacji Pearsona.



Rysunek 3.11: Zmierzona eksperymentalnie frakcja przeżywających komórek klonogennych dla populacji komórek bezpośrednio napromienianych. Przedstawione są średnia i odchylenie standardowe z czterech niezależnych eksperymentów.

3.3.1 Korelacje

Z uwagi na brak odniesienia do względnej wielkości populacji, bezpośrednie badanie zależności różnych charakterystyk komórek sąsiadujących od odsetka komórek w stanie senescencji w populacji napromienionej (por. rys. 3.6) może okazać się mylące. Rzeczywiście, można wyobrazić sobie sytuację, w której obserwowana jest bardzo silna zależność pomiędzy wartością tego odsetka a np. względną liczbą komórek w populacji sąsiadującej po 48 godzinach koinkubacji. Taka sytuacja sugerowałaby, że rzeczywiście komórki w stanie senescencji odgrywają w efekcie sąsiedztwa kluczową rolę. Mogłoby się jednak okazać, że ubytek komórek pod wpływem napromieniania jest na tyle duży, że w rzeczywistości liczba komórek w stanie senescencji malałaby z dawką. Oczywiście, w takiej sytuacji nie ma możliwości, aby to komórki w stanie senescencji były odpowiedzialne za pogłębiający się wraz z dawką spadek przeżywalności w populacji sąsiedniej. Dlatego w dalszej części, jako podstawową zmienną sprawdzaną pod względem występującej kore-



Rysunek 3.12: Zmierzona eksperymentalnie frakcja przeżywających komórek klonogennych dla populacji komórek koinkubowanych z komórkami bezpośrednio napromienianymi. Przedstawione są średnia i odchylenie standardowe z czterech niezależnych eksperymentów.

lacji, przyjmiemy względną liczbę komórek w stanie senescencji, którą szacować będziemy jako iloczyn względnej liczby komórek po 48 h w populacji napromienionej (por. rys. 3.4) i odsetka komórek w stanie senescencji po 48h koinkubacji, tzn.

nsIR = odsetek komórek w stanie senescencji × względna wielkość populacji.

Oczywiście, gdyby wyjściowe populacje były różnej wielkości, też mielibyśmy problem z interpretacją tak zdefiniowanej zmiennej. W takim przypadku powyższe wyrażenie powinno zostać modyfikowane poprzez przemnożenie prawej strony przez początkową liczebność populacji N. Jednak w naszym przypadku, niezależnie od badanej linii komórkowej oraz dawki promieniowania, w dołkach i insertach posiewana była zawsze zbliżona liczba komórek. Istnienie korelacji pomiędzy poszczególnymi zmiennymi sprawdzaliśmy operując na zbiorze danych, który powstał po połączeniu wyników dla obu badanych linii HCT116 (p
53+/+i p
53-/-).

W pierwszej kolejności sprawdziliśmy jak analogicznie zdefiniowana względna liczba komórek w stanie senescencji w populacji sąsiadującej (nsBy) zależy od wartości nsIR, por. rys. 3.13. Okazuje się, że obie te zmiennie zależą od siebie



Rysunek 3.13: Zależność pomiędzy względnymi liczbami komórek w stanie senescencji w populacjach bezpośrednio napromienianej oraz sąsiadującej. Ciągła linia przedstawia najlepiej odpowiadający danym eksperymentalnym model liniowy (podane jest również odpowiadające modelowi równanie wraz z wyliczonym współczynnikiem determinacji R^2). Przerywane linie opisują 95% przedział ufności dla modelu. Symbol *** oznacza p-wartość dla korelacji (R) wynoszącą mniej niż 0,001.

w sposób niemal idealnie liniowy. Oszacowany współczynnik determinacji wynoszący 0,91 wskazuje, że na podstawie nsIR możemy z dużą dokładnością odtworzyć wartość zmiennej nsBy. Wyliczone współczynniki modelu liniowego nie tylko pokazują, że wraz ze wzrostem liczby komórek w stanie senescencji rośnie również ich liczba w populacji sąsiadującej, ale też że dla rozważanych zakresów dawek promieniowania i dla tych samych początkowych liczebności populacji, w populacji sąsiadującej jest zawsze około cztery razy mniej komórek w stanie senescencji niż w populacji bezpośrednio napromienianej.

Dość silną zależność obserwujemy również zestawiając ze sobą zmienną nsIR z frakcją przeżywających komórek klonogennych (cBy), por. rys. 3.14. Z danych



Rysunek 3.14: Zależność pomiędzy względną liczbą komórek w stanie senescencji w populacji bezpośrednio napromienianej i frakcją przeżywających komórek klonogennych w populacji sąsiadującej. Ciągła linia przedstawia najlepiej odpowiadający danym eksperymentalnym model liniowy (podane jest również odpowiadające modelowi równanie wraz z wyliczonym współczynnikiem determinacji R^2). Przerywane linie opisują 95% przedział ufności dla modelu. Symbol ** oznacza p-wartość dla korelacji (R) wynoszącą mniej niż 0,01.

wyraźnie wynika, że wraz ze wzrostem liczby komórek w populacji napromienionej silnie maleje wartość cBy. Współczynnik determinacji modelu liniowego opisującego tę zależność jest w tym przypadku znacząco mniejszy i wynosi 0,73. Mimo tego jest to nadal wartość pozwalająca stwierdzić, że model liniowy stanowi dość dobry opis badanego zjawiska, ponieważ na podstawie zmienności zmiennej nsIR możemy wyjaśnić większość wariacji w wartościach zmiennej cBy. Jednak na podstawie współczynników określających dopasowany model liniowy łatwo widać ograniczenia dla jego stosowalności. Od razu widzimy, że nie może on być rozszerzony na większe wartości zmiennej *nsIR*, ponieważ przewidywana względna frakcja przeżywających komórek klonogennych w populacji sąsiadującej mogłaby przyjmować w takim przypadku wartości ujemne.

Jako ostatnią zbadaliśmy zależność pomiędzy wartościami zmiennej nsIRa odpowiadającymi im względnymi wielkościami populacji sąsiadującej po 48 godzinach koinkubacji (pBy), por. rys. 3.15. Również i w tym przypadku obserwo-



Rysunek 3.15: Zależność pomiędzy względną liczbą komórek w stanie senescencji w populacji bezpośrednio napromienianej i względną wielkością populacji sąsiadującej po zakończeniu koinkubacji. Ciągła linia przedstawia najlepiej odpowiadający danym eksperymentalnym model liniowy (podane jest również odpowiadające modelowi równanie wraz z wyliczonym współczynnikiem determinacji R^2). Przerywane linie opisują 95% przedział ufności dla modelu. Symbol ** oznacza p-wartość dla korelacji (R) wynoszącą mniej niż 0,01.

wano statystycznie istotną zależność — wraz ze wzrostem wartości nsIR, czyli liczby komórek w stanie senescencji w populacji bezpośrednio napromienianej, maleje przeżywalność komórek w populacji sąsiadującej (p-wartość<0,01 dla oszacowanego współczynnika korelacji). Współczynnik determinacji modelu liniowego wynoszący w tym przypadku 0,6, mimo najniższej wartości spośród wszystkich do tej pory badanych zależności, nadal pozwala na stwierdzenie, że opis liniowy jest opisem zadowalającym. Również i w tym przypadku ma on ograniczony zakres stosowalności, ze względu na przewidywane ujemne wartości dla przeżywalności komórek sąsiadujących, gdy wartość nsIR przekroczy około 20%.

Powyższa analiza zależności dostarcza silnych przesłanek przemawiających za prawdziwością hipotezy badawczej postawionej w pracy. Okazało się bowiem, że jedne z najważniejszych charakterystyk siły efektu sąsiedztwa, czyli frakcja przeżywających komórek klonogennych oraz względna wielkość populacji na koniec procesu koinkubacji, zależą silnie od liczby komórek w stanie senescencji wzbudzonych bezpośrednio w populacji napromienionej. Co więcej, najsilniejszą zależność obserwujemy porównując względne liczby komórek w stanie senescencji w populacjach bezpośrednio napromienionych oraz sąsiadujących.

Rozdział 4

Rozszerzenie radiobiologicznego modelu liniowo-kwadratowego

Streszczenie

W rozdziale czwartym przedstawiony jest model matematyczny, który, opierając się na postawionej hipotezie i wynikach przeprowadzonych eksperymentów, rozszerza powszechnie stosowany w radiobiologii model liniowo-kwadratowy (model LQ, ang. linear-quadratic model). Proponowane rozszerzenie bierze pod uwage substancje czynnie wydzielane przez wyindukowane promieniowaniem komórki w stanie senescencji, które mogą mieć różnorodny wpływ na otoczenie. Zakładając, że siła efektu sąsiedztwa zależy od ilości substancji wydzielanych przez komórki w stanie senescencji, o której zakładamy, że jest wprost proporcjonalna do liczby komórek w stanie senescencji wyindukowanych w komórkach bezpośrednio napromienionych, otrzymaliśmy bardzo dobrą zgodność modelu z danymi eksperymentalnymi dotyczącymi frakcji przeżywających komórek klonogennych (SF) w populacji koinkubowanej z komórkami bezpośrednio napromienionymi. Ponadto, rozszerzając model o możliwy pozytywny (stymulujący podziały komórkowe) wpływ substancji wydzielanych przez komórki w stanie senescencji, otrzymaliśmy również bardzo dobre dopasowanie modelu do danych eksperymentalnych dotyczących SF w populacji komórek bezpośrednio napromienianych. Co najważniejsze, w przeciwieństwie do standardowego modelu LQ, model rozszerzony dokładnie wyjaśnia, dlaczego występują różnice w wartościach SF pomiędzy liniami komórkowymi różniącymi się statusem genu TP53.

4.1 Radiobiologiczny model liniowo-kwadratowy

Modele matematyczne opisujące zależność rezultatu leczenia od zastosowanej dawki promieniowania stanowią podstawę współczesnej radiobiologii. Jednym z najczęściej badanych eksperymentalnie markerów wpływu promieniowania jonizującego na żywe komórki jest pomiar frakcji przeżywających komórek klonogennych (SF), por. dodatek A.1. Kluczowym zagadnieniem dla radiobiologów jest opisanie zależności wartości SF od dawki promieniowania oraz protokołu jej dostarczenia. Najczęściej wykorzystywanym do tego celu modelem matematycznym jest radiobiologiczny model liniowo-kwadratowy [14, 28, 35, 69]. W przypadku gdy rozważania dotyczą krzywej przeżycia uzyskanej dla pojedynczych dawek promieniowania jonizującego, model ten opiera się na następujących podstawowych założeniach:

- Pojedyncze trafienie może wywołać dwuniciowe pęknięcie DNA, w wyniku czego może dojść do patologicznej zmiany w genotypie komórki i, co za tym idzie, utraty klonogenności. Zakładamy, że prawdopodobieństwo takiego zdarzenia zależy liniowo od dawki.
- Zmiany patologiczne mogą również powstać na skutek błędnej naprawy położnych blisko siebie dwuniciowych pęknięć DNA, które powstały w wyniku dwóch niezależnych trafień. Przyjmuje się, że liczba tego typu zmian jest wprost proporcjonalna do kwadratu dawki promieniowania.
- Liczba patologicznych zmian przypadających na pojedynczą komórkę ma w całej populacji rozkład Poissona.

Na podstawie powyższych założeń postuluje się, że w wyniku działania promieniowania jonizującego w komórce dochodzi średnio do

$$Y = \alpha D + \beta D^2 \tag{4.1}$$

patologicznych zmian w materiale genetycznym, czyli że Y jest parametrem założonego rozkładu Poissona. Ostatecznie, w populacji klonogenne pozostają jedynie te komórki, w których nie doszło do żadnej patologicznej zmiany, czyli frakcja przeżywających komórek klonogennych w zależności od dawki (SF(D)) wyraża się wzorem

$$SF(D) = e^{-Y} = e^{-\alpha D - \beta D^2},$$
 (4.2)

gdzie *D* określa wykorzystaną dawkę promieniowania. Standardowy model LQ uwzględnia również mechanizmy naprawy dwuniciowych pęknięć DNA, co pozwala na rozważanie nie tylko pojedynczych dawek promieniowania, ale także dawek frakcjonowanych, stosowanych w radioterapii, por. [14]. Przez lata powstało wiele modyfikacji i rozszerzeń modelu LQ uwzględniających np. różne fazy cyklu komórkowego, czy też różne typy dwuniciowych pęknięć DNA, które mogą być naprawiane z różną skutecznością [45, 92, 93, 95]. Jednak w związku z bezpośrednim powiązaniem modelu LQ z dawką promieniowania, jak do tej pory nie został on rozszerzony do opisu SF w populacji komórek sąsiadujących z komórkami bezpośrednio napromienionymi.

4.1.1 Dopasowanie modelu LQ do danych eksperymentalnych

Wykonane przez nas pomiary frakcji przeżywających komórek klonogennych wykazały znaczne różnice pomiędzy komórkami linii HCT116 różniącymi się statusem genu TP53, por. rys. 3.11. W związku z tym, w celu dopasowania modelu LQ (4.2) do danych eksperymentalnych należało założyć różne współczynniki α i β dla obu linii komórkowych (HCT116 p53 +/+ i HCT116 p53 -/-), czyli należało estymować cztery niezależne parametry. W każdym przypadku minimalizowana była suma normalizowanych przez wariancję kwadratów różnic pomiędzy wynikiem pomiaru eksperymentalnego a przewidywaniem modelu LQ (4.2), czyli funkcja

$$f(\alpha, \beta) = \sum_{D=2,4,6,8} \frac{(SF_{\alpha,\beta}(D) - m_D)^2}{\sigma_D^2} \,.$$

gdzie m_D oraz σ_D^2 określają odpowiednio średnią oraz wariancję z wykonanych pomiarów. Wszystkie minimalizacje wykonane zostały przy użyciu funkcji lsqnonlin z komercyjnego pakietu do obliczeń numerycznych (MATLAB® R2012b z Optimization ToolboxTM, The MathWorks Inc., Natick, MA, 2012). Aby zmniejszyć ryzyko znalezienia jedynie minimum lokalnego, w każdym przypadku generowane było 1000 losowych zestawów parametrów początkowych i dla każdego z nich przeprowadzona została minimalizacja.

W przypadku linii komórkowej HCT116 p53 -/- model LQ bardzo dobrze odwzorował eksperymentalnie wyznaczoną zależność frakcji przeżywających komórek klonogennych od wykorzystanej pojedynczej dawki promieniowania, por. rys. 4.1. Krzywa wynikająca z modelu LQ przechodzi w jej przypadku niemal idealnie przez każdy punkt pomiarowy, co znajduje potwierdzenie w bardzo małym końcowym błędzie dopasowania modelu, por. tabela 4.1. Jednak dla linii komór-

mentalnych o	opisujących	$\operatorname{frakcje}$	przeżywa	ıjących	komórek	klonogenn	ych.
			Bład dom	າດໜາກ	10		

Tabela 4.1: Bład dopasowania modelu liniowo-kwadratowego do danych ekspery-

Błąd dopasowania			
Całkowity	HCT116 p53 +/+	HCT116 p53 -/-	
$12,\!0239$	$11,\!4445$	$0,\!5794$	

kowej z funkcjonalnym genem TP53 (HCT116 p53 +/+) model LQ wyraźnie nie odwzorowuje danych eksperymentalnych dotyczących mniejszych dawek promieniowania (2 i 4 Gy). W obu przypadkach krzywa opisywana przez model nie



Rysunek 4.1: Krzywe wynikające z modelu liniowo-kwadratowego (4.2) dla komórek bezpośrednio napromienianych i otrzymane w wyniku dopasowywania modelu do danych eksperymentalnych. Parametry odpowiadające krzywym na wykresie przedstawione zostały w tabeli 4.2.

przechodzi nawet przez przedział określony przez otrzymane eksperymentalnie odchylenia standardowe. Tak duża niedokładność w odwzorowaniu danych ma swoje odzwierciedlenie w wartości błędu dopasowania, który jest niemal dwadzieścia razy większy niż w przypadku linii komórkowej bez funkcjonalnego genu TP53, por. tabela 4.1. Co ciekawe, w skali logarytmicznej punkty eksperymentalne dla linii HCT116 p53 +/+ wydają się układać na krzywej ściśle wypukłej (por. rys. 4.1), podczas gdy krzywe wynikające z modelu LQ są w tej skali wklęsłe niezależnie od przyjętych wartości parametrów.

Obserwowane różnice w wartościach SF pomiędzy obiema liniami HCT116 można próbować wyjaśnić przez różnice w efektywności mechanizmów naprawy nici DNA. Rzeczywiście, gen TP53 koduje jedno z najważniejszych białek regulujących odpowiedź komórki na uszkodzenia DNA, por. podrozdział 2.2. Spodziewać się zatem można wyraźnie mniejszych estymowanych wartości parametrów α i β dla linii komórkowej z funkcjonalną postacią genu TP53. W tabeli 4.2 przedstawione są wartości tych parametrów estymowane na podstawie naszych danych eksperymentalnych. Widzimy, że jedynie różnice w wartościach parametru β odzwierciedlają większą efektywność mechanizmów naprawy w komórkach z funkcjonalnym genem TP53. Porównując jego wartości widzimy, że komórki HCT116 p53 +/+ w porównaniu z komórkami HCT116 p53 -/- są praktycznie niewrażliwe na podwójne dwuniciowe pęknięcia. Zupełnie odwrotna zależność ma miejsce w przypadku parametru α , czyli proporcji zmian patologicznych indukowanych przez pojedyncze dwuniciowe pęknięcia DNA do wielkości dawki promieniowania.

Parametr	Opis	Wartość		
		p53 + / +	p53 -/-	
α	proporcja zmian patologicznych będących wynikiem dwuniciowych pęknięć DNA indukowanych jednym trafieniem wiązki promieniowania do wielkości dawki	$0,\!5406$	0,3968	
β	proporcja zmian patologicznych będących wynikiem błędnej naprawy dwuniciowych pęknięć DNA indukowanych przez dwa niezależne trafienia do kwadratu wykorzystanej dawki	$4,89 \times 10^{-16}$	$0,\!0516$	

Tabela 4.2: Parametry modelu liniowo-kwadratowego (4.2) otrzymane w wyniku dopasowywania modelu do danych eksperymentalnych opisujących frakcję komórek przeżywających.

Dla komórek p53 +/+ jego wartość jest niemal 40 % większa niż dla komórek p53 -/-, co wydaje się być całkowicie niezgodne z hipotezą o większej efektywności naprawy dwuniciowych pęknięć DNA, gdy gen TP53 jest całkowicie funkcjonalny. Co ciekawe, wyniki eksperymentów przedstawione w [70] sugerują, że różnica w efektywności naprawy dwuniciowych pęknięć pomiędzy komórkami linii HCT116 p53 -/- i HCT116 p53 +/+ jest zaniedbywalnie mała. W związku z tym parametry α oraz β powinny być dla obu linii komórkowych takie same, a co za tym idzie, model LQ nie jest w stanie odwzorować otrzymanych przez nas wyników eksperymentalnych. Widzimy zatem, że model LQ mimo dość dobrego dopasowania do danych eksperymentalnych, nie dostarcza żadnych dodatkowych informacji na temat badanego zjawiska i nie może służyć wyjaśnieniu obserwowa-nych różnic pomiędzy badanymi liniami komórkowymi.

4.2 Rozszerzony model LQ

Najważniejszym celem, który przyświeca rozbudowaniu standardowego modelu LQ, jest rozszerzenie jego stosowalności na populację komórek sąsiadujących z komórkami bezpośrednio napromienionymi. Ponadto, chcielibyśmy wyjaśnić obserwowane eksperymentalnie różnice pomiędzy frakcją przeżywających komórek klonogennych w komórkach różniących się statusem genu TP53. Zgodnie z postawioną w podrozdziale 2.5 hipotezą badawczą, podstawowe założenie rozszerzonego modelu stanowi kluczowa rola komórek w stanie senescencji. W standardowym modelu LQ przyjmujemy, że obniżenie przeżywalności komórek jest skutkiem powstawania patologicznych zmian w nici DNA na skutek działania promieniowania jonizującego. Jednak na obniżoną przeżywalność komórek klonogennych mogą mieć również wpływ substancje wydzielane przez komórki w stanie senescencji, por. podrozdział 2.4. W dalszej części będziemy zakładać, że substancje te mogą, tak jak promieniowanie jonizujące, uszkadzać nić DNA i prowadzić do patologicznych zmian w kodzie genetycznym komórki. Z drugiej strony, substancje wydzielane przez komórki w stanie senescencji mogą również stymulować komórki do podziału, co w oczywisty sposób może zwiększać odsetek komórek klonogennych znajdujących się w populacji. Efekt ten należy również uwzględnić w modelu, którego zadaniem jest opisanie zależności SF od zastosowanej dawki promieniowania.

4.2.1 Napromienianie i koinkubacja

Inaczej niż w standardowym modelu liniowo-kwadratowym przyjmujemy dalej, że liczba patologicznych zmian, do których dochodzi w komórkach napromienianych, zależy nie tylko od zastosowanej dawki promieniowania jonizującego, ale również od ilości substancji wydzielanych przez znajdujące się w populacji komórki w stanie senescencji ze specyficznym fenotypem SASP. Zakładamy, że ilość tych substancji $(n_S(D))$ jest wprost proporcjonalna do liczby komórek w stanie senescencji z SASP wyindukowanych w populacji napromienianej, czyli można ją wyrazić przez następującą zależność

$$n_S = D_{ox} \cdot s_{D,IR} \cdot N \cdot P(D), \qquad (4.3)$$

gdzie D_{ox} jest współczynnikiem zakładanej proporcjonalności, N to liczba komórek w hodowli w momencie bezpośrednio poprzedzającym napromienianie, a P(D)oraz $s_{D,IR}$ określają odpowiednio prawdopodobieństwa tego, że komórka przetrwa napromienienie oraz tego, że komórka, która przetrwała, wejdzie na ścieżkę senescencji z SASP, w momencie gdy stosowana jest dawka promieniowania o wielkości D. Stosując dalej formalizm modelu liniowo-kwadratowego dla komórek bezpośrednio napromienianych, średnią liczbę zmian patologicznych powstałych na skutek działania promieniowania (Y) wyrażamy jako

$$Y_{IR} = \left(\alpha D + \beta D^2\right) + \left(\alpha_1 n_S + \beta_1 n_S^2\right), \qquad (4.4)$$

gdzie wyrazy w pierwszym nawiasie, odpowiadające bezpośrednio modelowi LQ, opisują uszkodzenia wywołane działaniem promieniowania jonizującego, natomiast wyrazy w drugim nawiasie opisują szkodliwy wpływ substancji wydzielanych przez komórki w stanie senescencji z SASP. Parametry α oraz β w modelu LQ stanowią konglomeraty parametrów opisujących m. in. zastosowane promieniowanie jonizujące [28]. W związku z tym należało założyć inne wartości tych parametrów dla uszkodzeń związanych z działaniem substancji wydzielanych przez komórki w stanie senescencji i dlatego wprowadzone zostały parametry α_1 oraz β_1 .

Zaproponowany podział liczby zmian patologicznych (4.4) ze względu na źródło pochodzenia pozwala na bezpośrednie rozszerzenie modelu na komórki sąsiadujące, które nie zostały poddane działaniu promieniowania jonizującego. Jeśli założymy, że odległość pomiędzy obiema populacjami komórek jest na tyle mała, że komórki sąsiadujące są pod wpływem tej samej ilości substancji wydzielanych przez komórki w stanie senescencji co populacja bezpośrednio napromieniana, to liczbę zmian patologicznych w populacji komórek sąsiednich (Y_{BY}) możemy wyrazić jako

$$Y_{BY} = \alpha_1 n_S + \beta_1 n_S^2 \,, \tag{4.5}$$

czyli liczba patologicznych zmian wywołanych przez komórki w stanie senescencji jest taka sama jak w populacji komórek bezpośrednio napromienianych, por. równanie (4.4). W przypadku stosowanego przez nas układu eksperymentalnego odległość pomiędzy obiema warstwami komórek wynosiła 0,9 mm, co jest niewielkim odstępem w porównaniu ze średnicą płytki hodowlanej, która wynosiła 3,4 cm. Zakładając tak jak w standardowym modelu LQ poissonowski rozkład liczby patologicznych zmian w całej populacji komórek, otrzymujemy następujące wyrażenia na $f_k(D)$, czyli prawdopodobieństwo, że napromienianie oraz dalsza koinkubacja nie wywołały w komórce żadnej patologicznej zmiany,

$$f_{k,IR}(D) = \exp\left(-\left(\alpha D + \beta D^2\right) - \left(\alpha_1 n_S + \beta_1 n_S^2\right)\right)$$
(4.6)

w przypadku komórek bezpośrednio napromienianych oraz

$$f_{k,By}(D) = \exp\left(-\alpha_1 n_S - \beta_1 n_S^2\right) \tag{4.7}$$

w przypadku komórek sąsiadujących.

Wyrażenia (4.6) i (4.7) są w oczywisty sposób bardzo uproszczonym opisem badanego zjawiska. Po pierwsze, substancje wydzielane przez komórki w stanie senescencji z SASP nie stanowią, tak jak promieniowanie jonizujące, pojedynczego impulsu, lecz są produkowane przez komórki w sposób ciągły. Dlatego należałoby uwzględnić mechanizmy naprawy DNA i zastosować formalizm modelu LQ odnoszący się do dawek promieniowania równo rozłożonych w czasie. Po drugie, rzeczywista populacyjna frakcja komórek w stanie senescencji może ulegać zmianom w czasie, ponieważ pozostałe komórki ulegają kolejnym podziałom, albo dochodzi do indukcji senescencji w kolejnych komórkach. Jednak uwzględnienie tych dwóch procesów wymagałoby wprowadzenia wielu zmian bardzo komplikujących model, co nie koniecznie musi prowadzić do dużej poprawy ilościowego opisu zjawiska. Powyższe założenia są jedynie pierwszym przybliżeniem i, co można zobaczyć w następnych częściach rozdziału, wystarczają, aby dobrze odwzorować wyniki eksperymentalne.

4.2.2 Pozytywny wpływ komórek w stanie senescencji podczas dalszej hodowli

Po napromienieniu i 24 godzinnej koinkubacji komórki z obu populacji zostają zebrane, przeliczone i posiane na płytkach hodowlanych (o średnicy 6 cm) w celu zbadania frakcji przeżywających komórek klonogennych. Przy założeniu, że gęstość z jaką komórki zostały posiane jest na tyle mała, że zasięg działania negatywnych substancji wydzielanych przez komórki w stanie senescencji jest zbyt mały aby wywołać dalsze zmiany patologiczne w genotypie hodowanych komórek, moglibyśmy przyjąć, że frakcja przeżywających komórek klonogennych (por. dodatek A), czyli

$SF_D = \frac{\text{liczba wyrośniętych kolonii po dawce } D \text{ promieniowania}}{\text{liczba posianych komórek } \times PE \text{ komórek nienapromienianych}}$

będzie wynosić odpowiednio $f_{k,IR}(D)$ i $f_{k,By}(D)$ (patrz równania (4.6) i (4.7)) dla komórek napromienianych i sąsiadujących.

Wyniki badań wskazują jednak na istnienie substancji wydzielanych przez komórki w stanie senescencji z SASP, które mogą pobudzić inne komórki do podziałów i, co za tym idzie, potencjalnie zwiększyć tempo formowania się kolonii, por. podrozdział 2.4. O substancjach tych zakładamy, że są białkami o relatywnie długim czasie trwania, więc mogą docierać do komórek znajdujących się w dużej odległości. W przypadku gdy badana jest klonogenność komórek w populacji, wpływ tych substancji nie powinien zostać pominięty i wyrażenie opisujące frakcję przeżywających komórek klonogennych SF należy poddać dalszym modyfikacjom. W tym celu wyznaczmy najpierw liczbę komórek w populacji, które są potencjalnie klonogenne (N_{pk}) . Z definicji będą to wszystkie te komórki, które po napromienieniu i koinkubacji nie są klonogenne i nie weszły w stan senescencji komórkowej. Niech funkcja $f_{sen}(D)$ określa frakcję komórek w stanie senescencji (nie tylko z SASP) w całej populacji na koniec koinkubacji. W oczywisty sposób dla tej samej dawki promieniowania wartość funkcji $f_{sen}(D)$ nie może przekroczyć wartości $1 - f_k(D)$ PE, ponieważ z definicji komórka klonogenna nie może być komórką w stanie senescencji. Zakładając, że frakcja komórek klonogennych wśród komórek posianych jest taka sama jak w całej koinkubowanej populacji, liczbę komórek potencjalnie klonogennych możemy wyrazić jako

$$N_{pk} = N\left(1 - f_k(D)\operatorname{PE}\right)\left(1 - \frac{f_{sen}(D)}{1 - f_k(D)\operatorname{PE}}\right) = N\left(1 - f_k(D)\operatorname{PE} - f_{sen}(D)\right),$$

gdzie N oznacza liczbę posianych komórek, $f_k(D)$ PE to część populacji, która jest klonogenna oraz $f_{sen}(D)/(1 - f_k(D)$ PE) to część komórek w stanie senescencji w populacji pomniejszonej o komórki klonogenne. Przyjmujemy dalej, że całkowita liczba utworzonych kolonii w zależności od dawki promieniowania $(N_{kol}(D))$ wyrażona jest jako suma kolonii utworzonych przez komórki klonogenne, w których nie doszło do żadnych zmian pod wpływem promieniowania i koinkubacji oraz pewnej części komórek potencjalnie klonogennych, która utworzy kolonie pod wpływem substancji wydzielanych przez komórki w stanie senescencji z SASP

$$N_{kol}(D) = f_k(D) \operatorname{PE} \cdot N + g(f_{sen}^{SASP}(D)) N_{pk},$$

gdzie funkcja g opisuje prawdopodobieństwo, że komórka potencjalnie klonogenne uformuje kolonię, a $f_{sen}^{SASP}(D)$ określa frakcję komórek w stanie senescencji z SASP

w całej populacji na koniec koinkubacji. O funkcji g zakładamy, że dla małych argumentów, czyli dla małej frakcji komórek w stanie senescencji, prawdopodobieństwo pobudzenia komórki jest niskie. Dodatkowo, wraz ze wzrostem wartości argumentu prawdopodobieństwo powinno rosnąć w sposób odzwierciedlający akumulację sygnałów. Wreszcie zakładamy, że nawet przy granicznej wartości argumentu nie wszystkie komórki potencjalnie klonogenne mogą zostać pobudzone do uformowania kolonii. Na podstawie powyższych założeń przyjmujemy arbitralnie, że g jest funkcją Hilla

$$g(s) = g_{max} \frac{s^n}{\theta^n + s^n}, \qquad (4.8)$$

 $z \ 0 < g_{max} < 1 \text{ oraz } \theta, n \in \mathbb{R}^+.$

Ostatecznie, po dokonaniu prostych przekształceń, dochodzimy do następującego modelu opisującego frakcję przeżywających komórek klonogennych

$$SF(D) = f_k(D) + \frac{g\left(f_{sen}^{SASP}(D)\right)}{\text{PE}} \left(1 - f_{sen}(D) - f_k(D)\text{PE}\right), \qquad (4.9)$$

gdzie funkcja $f_k(D)$ opisana jest równaniem (4.6) w przypadku komórek bezpośrednio naświetlanych oraz równaniem (4.7) w przypadku komórek sąsiadujących, a funkcja g opisana jest równaniem (4.8).

4.2.3 Dopasowanie rozszerzonego modelu do danych eksperymentalnych

Sformułowanie rozszerzonego modelu (4.9) zawiera w sobie wiele zmiennych i parametrów, które można wyznaczyć eksperymentalnie. Po pierwsze zakładamy, że w przypadku eksperymentu kontrolnego (dawka 0 Gy) wszelkie komórki będące w stanie senescencji nie wykazują jednocześnie fenotypu SASP. Innymi słowy przyjmujemy, że $s_{D,IR}$ oraz $f_{sen}^{SASP}(D)$ są równe zero dla D = 0. Założenie to jest podyktowane faktem, że do wzbudzenia fenotypu SASP niezbędny jest pewien poziom uszkodzeń DNA. Po drugie przyjmujemy upraszczające założenie, że dla rozważanych przez nas dawek promieniowania (2, 4, 6 i 8 Gy) odsetek komórek, w których nie doszło do indukcji uszkodzeń DNA, jest na tyle mały, że wszystkie komórki w stanie senescencji odznaczają się jednocześnie fenotypem SASP. Zatem dla dawek 2 Gy i większych zakładamy, że $f_{sen}^{SASP}(D)$ jest tożsamy z $f_{sen}(D)$. W przypadku tego drugiego, wartości dla poszczególnych dawek bierzemy bezpośrednio z pomiarów frakcji komórek w stanie senescencji, por. rys. 3.6 oraz 3.7, ponieważ pomiar został wykonany dokładnie na koniec koinkubacji. W przypadku parametru $s_{D,IR}$ dla D > 0 nie sposób określić momentu, w którym należy dokonać pomiaru frakcji komórek w stanie senescencji, aby jak najlepiej określić jego wartość. Jeśli pomiar ma miejsce niedługo po wykonaniu napromieniania, to większość z komórek, która weszła na ścieżkę senescencji, może nie rozwinąć wystarczającej liczby charakterystycznych zmian, aby zostać poprawnie sklasyfikowana jako takowa. Z drugiej strony, frakcja komórek w stanie senescencji może ulegać zmianom w czasie, ponieważ pozostałe komórki ulegają kolejnym podziałom albo dochodzi do indukcji senescencji w kolejnych komórkach. Jednak o wartościach $s_{D,IR}$ zakładamy, że są one takie same jak wartości $f_{sen}(D)$. Oczywiście dla krótkiego okresu koinkubacji wartości te powinny być zbliżone i różnice pojawiać się mogą wraz z wydłużaniem okresu koinkubacji. W naszym przypadku koinkubacji trwająca 48 godzin wydaje się zbyt krótka, aby różnice te były bardzo istotne. Z danych eksperymentalnych możemy również w sposób przybliżony odczytać prawdopodobieństwo, że komórka przetrwa proces napromieniania P(D). Za wartości tej funkcji przyjmujemy zmierzony stosunek liczby komórek po 48 godzinach po napromienieniu do poczatkowej liczby komórek, por. rys. 3.4. Z danych odczytujemy również wartości parametrów PE dla obu linii (0,457 dla HCT116 p53 + /+ i 0,285 dla HCT116 p53 - /-) oraz liczby posianych komórek dla każdego z rozważanych przypadków. Co najważniejsze, zakładamy również, że różnice pomiędzy rozważanymi liniami HCT116 odzwierciedlone są jedynie przez różnicę w ilości wywołanej senescencji, a nie w wartościach parametrów rozszerzonego modelu. W ten sposób odzwierciedlony zostaje fakt, że nie zaobserwowano istotnej różnicy w efektywności naprawy dwuwiciowych pęknięć DNA dla obu linii [70].

Ostatecznie, jednocześnie estymujemy siedem parametrów α , β , $\alpha_1 D_{ox}$, $\beta_1 D_{ox}^2$, g_{max} , θ , n wspólnych dla obu linii komórkowych oraz populacji napromienianej i sąsiadującej. Tak jak w przypadku standardowego modelu LQ, przy estymacji wartości parametrów minimalizowana była suma normalizowanych przez wariancję kwadratów różnic pomiędzy wynikiem pomiaru eksperymentalnego a przewidywaniem modelu, czyli funkcja

$$f(\mathbf{p}) = \sum_{D=2,4,6,8} \frac{(SF_{\mathbf{p}}(D) - m_D)^2}{\sigma_D^2},$$

gdzie **p** określa wektor parametrów modelu, a m_D oraz σ_D^2 określają odpowiednio średnią oraz wariancję z wykonanych pomiarów. Minimalizacje wykonane zostały przy użyciu funkcji lsqnonlin z komercyjnego pakietu do obliczeń numerycznych (MATLAB® R2012b z Optimization ToolboxTM, The MathWorks Inc., Natick, MA, 2012). Aby zmniejszyć ryzyko znalezienia jedynie minimum lokalnego, w każdym przypadku generowane było 1000 losowych zestawów parametrów początkowych i dla każdego z nich przeprowadzona została minimalizacja.

W przypadku populacji komórek HCT116 p53 -/-, które zostały poddane bezpośredniemu działaniu promieniowania jonizującego, model rozszerzony przewiduje krzywą niewiele różniącą się od krzywej otrzymanej przy wykorzystaniu standardowego modelu LQ, por. rys. 4.2A i 4.1. Dla mniejszych dawek promieniowania (2 i 4 Gy) model rozszerzony nieco dokładniej przewiduje punkty otrzymane eksperymentalnie, lecz radzi sobie wyraźnie gorzej dla dawki promieniowania wynoszącej 8 Gy. Jednak różnice te przekładają się na nieznaczną różnicę w błędzie dopasowania (patrz tabele 4.3 i 4.1) wynoszącą mniej niż 4%. W związku z tym nie



Rysunek 4.2: Krzywe wynikające z rozszerzonego modelu liniowokwadratowego (4.9) dla komórek bezpośrednio napromienianych (A) oraz sąsiadujących (B), które zostały otrzymane w wyniku dopasowywania modelu do danych eksperymentalnych. Parametry odpowiadające krzywym na wykresach przedstawione zostały w tabeli 4.4.

jest możliwe stwierdzenie, który z rozważanych modeli lepiej odwzorowuje dane dotyczące przeżywalności komórek klonogennych linii HCT116 p53 -/-. Zupełnie inna sytuacja ma miejsce dla linii komórkowej z w pełni funkcjonalnym genem TP53 (HCT116 p53 +/+), por. rys. 4.2A. Model rozszerzony, w przeciwieństwie do standardowego modelu LQ, bardzo dobrze odwzorował przeżywalność komórek klonogennych dla mniejszych dawek promieniowania (2Gy i 4Gy) przy jednoczesnym zachowaniu jakości dopasowania dla większych dawek. W dodatku udało się odwzorować wypukły charakter krzywej, na której układają się punkty eksperymentalne. Lepsza jakość dopasowania w stosunku do standardowego modelu LQ oddana jest również w błędzie dopasowania, który w przypadku linii HCT116

Błąd dopasowania				
Komórki napromienione				
Całkowity	HCT116 p53 +/+	HCT116 p53 -/-		
6,7233	$6,\!1633$	$0,\!56$		
Komórki sąsiednie				
Całkowity	HCT116 p53 +/+	HCT116 p53 -/-		
21,999	$5,\!1777$	$16,\!8215$		

Tabela 4.3: Błąd dopasowania rozszerzonego modelu liniowo-kwadratowego (4.9) do danych eksperymentalnych opisujących frakcję przeżywających komórek klonogennych.

p53 +/+ jest niemal dwukrotnie mniejszy, por. tabele 4.3 i 4.1.

Oprócz lepszego odwzorowania danych eksperymentalnych dotyczących populacji komórek bezpośrednio napromienionych, model rozszerzony dość dobrze przewidział zależność przeżywalności komórek klonogennych od dawki promieniowania w populacji komórek sąsiadujących, por. rys. 4.2B. Wiernie odwzorowany został fakt, że komórki z funkcjonalnym genem TP53, będące mniej wrażliwe na większe dawki promieniowania (8 Gy), przewidują jednocześnie większą siłę efektu sąsiedztwa. Jakość dopasowania modelu do danych nie jest już tak dobra jak w przypadku bezpośredniego napromieniania, ale należy pamiętać o tym, że krzywa ta w dużo większym stopniu polega na dokładności danych eksperymentalnych. Przypomnijmy, że ilość substancji uszkadzających DNA szacujemy jako iloczyn względnej liczby komórek oraz odsetka komórek w stanie senescencji po 48 godzinach koinkubacji.

Co ciekawe, model rozszerzony przewiduje bardzo zbliżone wartości parametrów α i β do tych uzyskanych za pomocą standardowego modelu LQ dla linii HCT116 p53 -/-, por. tabele 4.2 i 4.4. Estymowana za pomocą rozszerzonego modelu wartość parametru β jest jedynie o około 12 % większa, a parametru α około 35 % mniejsza, od tej przewidywanej przez model LQ. Niestety, w związku z tym, że analogiczne parametry opisujące odpowiedź na sygnały emitowane przez komórki w stanie senescencji (α_s i β_s) mnożone są przez współczynnik tłumaczący liczbę komórek w stanie senescencji na ilość substancji (D_{ox}), nie można bezpośrednio porównać ich wartości. Bardzo ciekawa jest natomiast uzyskana wartość parametru g_{max} , który opisuje ograniczenie górne dla prawdopodobieństwa pobudzenia komórki potencjalnie klonogennej. Rozszerzony model przewiduje, że jedynie około 1% komórek potencjalnie klonogennych może mieć wkład do wyznaczanej wartość SF. Jednak należy pamiętać, że maksymalny odsetek komórek w stanie senescencji uzyskany przez nas eksperymentalnie wynosi około 15%.

Parametr	Opis	Wartość
α	proporcja zmian patologicznych będących wynikiem dwuniciowych pęknięć DNA indukowanych jednym trafieniem wiązki promieniowania do wielkości dawki	$0,\!253$
β	proporcja zmian patologicznych będących wynikiem błędnej naprawy dwuniciowych pęknięć DNA indukowanych przez dwa niezależne trafienia do kwadratu wykorzystanej dawki	$0,\!0576$
$\alpha_S \times D_{ox}$	proporcja zmian patologicznych będących wynikiem dwuniciowych pęknięć DNA indukowanych jednym trafieniem wiązki promieniowania do względnej liczby komórek w stanie senescencji	37,9784
$\beta_S imes D_{ox}^2$	proporcja zmian patologicznych będących wynikiem błędnej naprawy dwuniciowych pęknięć DNA indukowanych przez dwa niezależne trafienia do kwadratu względnej liczby komórek w stanie senescencji	184,4925
g_{max}	parametry funkcji opisującej	0,008654
n	prawdopodobieństwo wzbudzenia do utworzenia kolonii komórki jedvnie	30,387
θ	potencjalnie klonogennej	0,04418

Tabela 4.4: Parametry zmodyfikowanego modelu liniowo-kwadratowego (4.9) otrzymane w wyniku dopasowywania modelu do danych eksperymentalnych opisujących frakcję komórek przeżywających.

W związku z tym nie można mieć pewności, że przebieg krzywej g(s) powyżej tej wartości jest przez nas dobrze zdefiniowany i, co za tym idzie, wartość parametru g_{max} nie może być większa.

Uproszczenie funkcji g(s)

Duża oszacowana wartość parametru n (por. tab. 4.4) wskazuje, że funkcja g(s) (4.8), która opisuje w modelu prawdopodobieństwo pobudzenia komórek potencjalnie klonogennych do szybkich podziałów, może być dość dobrze przybliżona przez prostszą nieciągłą funkcję przełączeniową, czyli funkcję postaci

$$\tilde{g}(s) = \begin{cases} 0 & \text{dla } s < \tilde{s} \\ g_{max} & \text{dla } s \ge \tilde{s} , \end{cases}$$

$$(4.10)$$

gdzie parametr \tilde{s} jest punktem nieciągłości. Za punkt \tilde{s} przyjmujemy punkt przegięcia funkcji g(s),czyli punkt, w którym jej druga pochodna zmienia znak. Po

obliczeniu drugiej pochodnej

$$g''(s) = -g_{max}ns^{n-2}\theta^n \frac{s^n(n+1) + \theta^n(1-n)}{(\theta^n + s^n)^3}$$
(4.11)

i przyrównaniu jej do zera, otrzymujemy następujące wyrażenie na punkt nieciągłości funkcji $\tilde{g}(s)$ (4.10):

$$\tilde{s} = \theta \sqrt[n]{(n-1)/(n+1)}, \qquad (4.12)$$

które dla oszacowanych wcześniej wartości parametrów (por. tab. 4.4) przyjmuje w przybliżeniu wartość 0,04418 (praktycznie nieodróżnialną od θ). Porównanie przebiegu wyjściowej funkcji g(s) z jej skokowym przybliżeniem przedstawione jest na rysunku 4.3. Widzimy, że rzeczywiście różnica pomiędzy obiema funk-



Rysunek 4.3: Porównanie przebiegu funkcji g(s) (4.8) dla parametrów przedstawionych w tabeli 4.4 z jej skokowym przybliżeniem $\tilde{g}(s)$ (4.10). Za punkt nieciągłości $\tilde{g}(s)$ przyjęto punkt przegięcia funkcji g(s).

cjami jest widoczna na bardzo wąskim zbiorze. Należałoby teraz odpowiedzieć na pytanie, jak ta niewielka różnica przełoży się na krzywe przewidywane przez model rozszerzony.

Okazuje się, że po zastąpieniu funkcji g(s) przez jej skokowe przybliżenie, model rozszerzony przewiduje krzywe przeżycia wizualnie nieodróżnialne od tych otrzymywanych przed uproszczeniem. Co ciekawe, obserwujemy niewielką różnicę w wartościach błędu dopasowania (por. tab. 4.5 i tab. 4.3) na korzyść modelu zredukowanego. Wykorzystana procedura minimalizująca błąd dopasowania (*lsqnonlin* w programie MATLAB®) ma szereg domyślnych opcji, takich jak maksymalna liczba kroków, czy też tolerancja na zmianę wartości funkcji celu (również względem kroku). W związku z tym dokładniejsze przybliżenie funkcji przełączeniowej mogło nie być osiągalne i mniejszy błąd dopasowania otrzymujemy właśnie po dokonaniu redukcji.

Błąd dopasowania			
Komórki napromienione			
Całkowity	HCT116 p53 +/+	HCT116 p53 -/-	
$6,\!5017$	$6,\!0555$	$0,\!4462$	
Komórki sąsiednie			
Całkowity	HCT116 p53 +/+	HCT116 p53 -/-	
21,999	5,1777	16,8215	

Tabela 4.5: Błąd dopasowania rozszerzonego modelu liniowo-kwadratowego (4.9), gdy funkcja g(s) przybliżana jest przez funkcję przełączeniową.

4.3 Wnioski

Zaproponowane rozszerzenie modelu liniowo-kwadratowego, bazujące na postawionej w pracy hipotezie badawczej, istotnie poprawiło matematyczny opis obserwacji eksperymentalnych i pozwoliło wyjaśnić otrzymane w laboratorium wyniki. Po pierwsze, model rozszerzony, oprócz dokładniejszego opisu danych eksperymentalnych dotyczących komórek bezpośrednio napromienianych, pozwolił na wyjaśnienie skąd biorą się różnice w wynikach eksperymentalnych pomiędzy komórkami tej samej linii, ale różniącymi się statusem genu TP53. Okazuje się, że nie wynikają one z różnic w efektywności naprawy dwuniciowych pęknięć, lecz (tak jak przewiduje postawiona hipoteza) z różnic w ilości wzbudzonej senescencji komórkowej. Po drugie, krzywe przewidywane przez model rozszerzony dopasowały się dość dokładnie do danych eksperymentalnych dotyczących komórek koinkubowanych z komórkami napromienionymi. Należy pamiętać, że standardowy model LQ nie obejmuje swoją stosowalnością tego typu danych. Co najważniejsze, po uproszczeniu modelu rozszerzonego, do opisu całego zbioru danych wykorzystywane są jedynie o dwa parametry więcej, niż w przypadku standardowego modelu LQ.

Rozdział 5

Model hybrydowy

Streszczenie

W rozdziale piątym przedstawiamy model matematyczny opisujący przestrzenny i czasowy rozwój populacji komórkowej, która poddana została działaniu promieniowania jonizującego. Model bazuje na badanej hipotezie, wynikach przeprowadzonych eksperymentów oraz na rozszerzonym modelu liniowo-kwadratowym, por. rozdział 4. Model oparty jest na asynchronicznym automacie komórkowym, którego ewolucja silnie zależy od wpływu substancji wydzielanych przez komórki w stanie senescencji. Jednocześnie zmiany w czasie stężeń tych substancji opisują równania różniczkowe cząstkowe, których struktura zależy bezpośrednio od aktualnego stanu automatu komórkowego. Celem rozdziału jest sprawdzenie, czy model matematyczny bazujący na postawionej hipotezie badawczej może jakościowo oddać wyniki eksperymentów uzyskanych przez E. C. Mackonis, por. podrozdział 2.3.1.

5.1 Sformułowanie modelu

Jako podstawę do symulowania rozwoju kolonii komórkowej na płytce hodowlanej wykorzystywać będziemy obliczeniową metodologię automatów komórkowych, która znajduje coraz szersze zastosowanie przy modelowaniu matematycznym w biologii [4, 26], ze szczególnym uwzględnieniem modelowania rozwoju nowotworów [1, 7, 30, 41, 71]. W automacie komórkowym modelowany system jest reprezentowany przez zbiór niezależnych od siebie jednostek (komórek) umieszczonych na dyskretnej siatce, które podejmują samodzielne decyzje na podstawie zaimplementowanych w nich schematów oraz informacji z otoczenia. Zaletę tego typu podejścia stanowi jego duża elastyczność oraz to, że dokładne informacje na temat modelowanych komórek i ich interakcji z otoczeniem są dostępne w każdym momencie symulacji. W dodatku, mając dokładne informacje na temat położenia każdej z modelowanych komórek, można bezpośrednio policzyć liczbę kolonii składających się z więcej niż n komórek, które znajdują się na rozważanej siatce w dowolnym punkcie czasowym. W związku z tym eksperyment określający klonogenność komórek znajdujących się w populacji może zostać w łatwy sposób odwzorowany.

5.1.1 Cykl komórkowy a heterogeniczność populacji

Pierwszym etapem konstrukcji modelu jest zaproponowanie automatu komórkowego, który — przy wykorzystaniu jak najmniejszej liczby parametrów — byłby w stanie oddać ilościowo rozwój populacji komórek na płytce hodowlanej. Co najważniejsze, automat powinien, poprzez modyfikację odpowiednich parametrów, dawać możliwość odwzorowania potencjalnie odmiennej klonogenności dla różnych linii komórkowych. Podstawowe założenie proponowanego modelu mówi o tym, że każda rozważana komórka biologiczna może zajmować tylko jedno miejsce na skończonej dwuwymiarowej siatce. Każde z potencjalnych miejsc pobytu komórki, stanowiące kwadrat o boku długości 10 μ m (za [30]), indeksowane jest uporządkowaną parą liczb $u = (i, j) \in \mathcal{S} = \{1, ..., n_2\} \times \{1, ..., n_1\}$, gdzie n_1 i n_2 określają odpowiednio szerokość i wysokość rozważanej siatki. Zakładamy dodatkowo, że częścią wspólną dowolnych dwóch kwadratów składających się na rozważaną siatkę może być jedynie cała krawędź lub tylko jeden wierzchołek (siatka jest regularna), por. rys. 5.1A. Podstawowy stan układu, czyli przestrzenny rozkład komórek, jest reprezentowany przez macierz $A \in M_{n_2 \times n_1}(\{0,1\})$, gdzie wartości 0 oraz 1 określają odpowiednio miejsce wolne oraz zajęte przez komórkę. Do ewolucji podstawowego stanu układu dochodzi na drodze kolejnych podziałów komórek znajdujących się na siatce. Zakładamy, że komórki na płytce hodowlanej nie migrują, co odpowiada eksperymentalnemu układowi, z którym model będzie porównywany, por. podrozdział 2.3.1. W przypadku braku promieniowania jonizującego przyjmujemy również upraszczające założenie, że żadna z rozważanych komórek nie może zostać uśmiercona.

Co najważniejsze, każda z komórek umieszczonych na siatce ma możliwość dokonania podziału i umieszczenia komórki potomnej na siatce. Oczywiście niezbędne jest określenie, w jakich momentach komórki mogą się dzielić. Często przyjmowanym założeniem jest pełna synchroniczność automatu komórkowego, czyli założenie, że wszystkie komórki w układzie dzielą się w tym samym momencie. W warunkach laboratoryjnych istnieje oczywiście możliwość prowadzenia synchronicznych hodowli bakterii czy też komórek eukariotycznych, w których do podziałów dochodzi w bardzo zbliżonych momentach, por. np. [84, 91]. Jednak zarówno w naszych układach eksperymentalnych, jak i tych rozważanych przez E. C. Mackonis, komórki nie dzieliły się w sposób synchroniczny, więc proponowa-



Rysunek 5.1: Podstawowe założenia modelu. (A) Każda komórka może zajmować tylko jedno miejsce na skończonej dwuwymiarowej regularnej siatce kwadratowej. Na różowo i zielono zaznaczone są miejsca znajdujące się w odległości odpowiednio 1 i 2 od komórki znajdującej się w miejscu (2,3). (B) Nowo powstała komórka potomna umieszczana jest w bezpośrednim otoczeniu komórki macierzystej. W przypadku braku miejsca, losowane jest jedno z miejsc w najmniejszej odległości od komórki macierzystej (jedno z tych zaznaczonych na zielono), a następnie komórki są na nie kolejno przesuwane, aby zrobić miejsce dla komórki potomnej.

ny automat komórkowy będzie asynchroniczny i, co za tym idzie, każda komórka będzie samodzielnie określać moment, w którym dokona podziału. Aby zdefiniować częstość podziałów komórkowych, należy w każdej komórce odwzorować cykl jej podziału. Z biologicznego punktu widzenia cykl komórkowy składa się z kilku następujących po sobie faz: G₁, S, G₂ i M, przy czym faza G₁ może przejść w fazę spoczynkową G₀, por. rys. 5.2. Z naszego punktu widzenia nie jest istotne, jakie procesy zachodzą na poszczególnych etapach, lecz ile czasu zajmuje komórce przejście przez poszczególne fazy. Wyniki badań wskazują, że fazy M, G₂ oraz S charakteryzują się bardzo zbliżonym czasem trwania dla komórek pochodzących z tej samej populacji, a z dużą losowością mamy do czynienia w przypadku długości fazy spoczynkowej G₀ [87] i, co za tym idzie, fazy G₁. Badania wskazują, że danym eksperymentalnym dotyczącym długości poszczególnych faz dość dobrze odpowiada rozkład log-normalny [6, 90]. Na tej podstawie zakładamy dalej, że czas pozostawania komórki w fazie G₁ ma rozkład log-normalny

$$G_1 \sim \log \mathcal{N}(\mu, \sigma^2),$$
 (5.1)

gdzie parametry μ oraz σ^2 mogą być specyficzne dla każdej komórki. Ostatecznie, całkowity czas pojedynczego cyklu podziału komórki T wyraża się jako suma



Rysunek 5.2: Cykl komórkowy jest podzielony na kilka następujących po sobie faz: G_1 , S, G_2 i M, przy czym faza G_1 może przejść w fazę spoczynkową G_0 .

długości fazy G_1 oraz ustalonej łącznej długości faz M, G_2 oraz S (T_p) , tzn.

$$T = T_p + G_1.$$
 (5.2)

W dalszej części, aby ograniczyć liczbę wolnych parametrów stosowanych w modelu, zakładać będziemy $\sigma^2 = 1$ i zmieniany będzie jedynie parametr μ . Przykładowe wykresy gęstości rozkładu log-normalnego fazy G₁ dla różnych wartości parametrów μ i $\sigma^2 = 1$ przedstawione są na rys. 5.3.

Elementem niezbędnym do dokładnego zdefiniowania ewolucji proponowanego automatu jest również sformułowanie zasad rządzących umieszczaniem na siatce nowo powstałej komórki potomnej. W modelowaniu rozwoju nowotworu najczęściej zakłada się, że komórka może się podzielić jedynie, gdy jest wolne miejsce w jej bezpośrednim sąsiedztwie, por. [30, 71]. W układach tych mamy do czynienia z dużą liczbą komórek obecnych w systemie, co, biorąc po uwagę dużą całkowitą siłę oddziaływań, może rzeczywiście blokować podział w przypadku braku miejsca. Jednak w rozważanym przez nas układzie eksperymentalnym komórki sa rzadko posiane na płytce hodowlanej, a czas prowadzenia hodowli jest na tyle krótki, że pod koniec eksperymentu kolonie komórek składają się z nie więcej niż stu komórek. Innymi słowy, nawet pod koniec hodowli, gdy dochodzi do zliczania kolonii, komórki stanowią jedynie niewielką część dostępnego na płytce hodowlanej miejsca. W związku z tym w proponowanym przez nas automacie komórkowym przyjmujemy, że jeśli nie ma miejsca w bezpośrednim otoczeniu, to może dojść do "przepchnięcia" otaczających komórek w celu zrobienia miejsca dla komórki potomnej. Zakładamy też, że przesunięcie dotyczy jak najmniejszej liczby komórek, czyli ze wszystkich możliwych rearanżacji układu wybieramy takie, w których liczba przesuniętych komórek jest jak najmniejsza. W celu dokładnego



Rysunek 5.3: Przykładowe wykresy gęstości rozkładu log-normalnego $f(t; \mu, \sigma^2)$ opisującego czas trwania fazy G₁ cyklu komórkowego dla różnych wartości parametru μ i przy ustalonym $\sigma^2 = 1$.

zdefiniowania powyższego założenia będziemy posługiwać się odległością na siatce zdefiniowaną jako

$$d((i,j),(k,l)) = \max(|i-k|,|j-l|),$$

czyli zakładamy, że odległość pomiędzy miejscami mającymi wspólny wierzchołek jest taka sama jak pomiędzy miejscami mającymi wspólny bok. Przy tak przyjętej mierze odległości, bezpośrednie otoczenie dla danej lokalizacji, czyli miejsca znajdujące się w odległości wynoszącej 1, pokrywa się z bardzo często stosowanym (por. [30, 31, 40, 71]) ośmiokomórkowym sąsiedztwem Moora, por. różowe miejsca na rys. 5.1A. W momencie podziału komórki w miejscu $u_0 = (i_0, j_0)$, pierwszy etap procedury zwracającej miejsce, w którym zostanie umieszczona komórka potomna i ewentualnie rearanżującej położenie innych komórek, polega na odnalezieniu wolnego miejsca w jak najmniejszej odległości. Przy założeniu, że na siatce znajduje się jeszcze jakieś wolne miejsce, odpowiadająca temu etapowi procedura iteracyjna może zostać zapisana w kilku następujących krokach:

- 1. Przyjmij n = 1.
- 2. Niech $Z = \{u \in S : d(u, u_0) = n, A(i, j) = 0\}$, czyli tworzymy zbiór wszystkich wolnych miejsc w odległości n. Przypomnijmy, że macierz $A \in M_{n_2 \times n_1}(\{0, 1\})$ określa stan podstawowy automatu, czyli układ komórek na siatce.
- 3. Jeśli $Z = \emptyset$, czyli nie ma wolnych miejsc w odległości n, przyjmij n = n + 1i wróć do kroku 2.

4. Wybierz losowo i zwróć indeks $u_n = (i_n, j_n)$ ze zbioru Z, czyli jedno z wolnych miejsc w odległości n.

W przypadku gdy zwrócone przez powyższą procedurę miejsce znajduje się w odległości n większej niż 1, przed umieszczeniem komórki na siatce należy dokonać rearanżacji położenia innych komórek. W tym celu wybieramy losowo jedną ze wszystkich ścieżek prostych o długości n + 1 i łączących komórkę macierzystą w miejscu u_0 z wylosowanym miejscem u_n , czyli wybieramy losowo jeden ze wszystkich ciągów miejsc na siatce $u_0, u_1, ..., u_n$, takich że $u_k \neq u_l$ dla $k \neq l$ oraz $d(u_k, u_{k+1}) = 1$ dla k = 0, ..., n-1. Powyższe zadanie można wykonać za pomocą następującej procedury iteracyjnej:

- 1. Przyjmij $k = 1, u_{tmp} = u_0$. Zapisz u_0 jako pierwszy element szukanej ścieżki.
- 2. Niech $Z = \{u \in S : d(u, u_{tmp}) = 1 \text{ i } d(u_{tmp}, u_n) = n k\}$. W związku z tym, że *n* jest najmniejszą odległością od miejsca u_0 , w jakiej znajdziemy wolne miejsce, wszystkie miejsca zawarte w zbiorze Z są zajęte przez komórki.
- 3. Wybierz w sposób losowy element ze zbioru Z i przypisz go do zmiennej u_{tmp} .
- 4. Przyjmij u_{tmp} jako kolejny element szukanej ścieżki oraz zwiększ k o jeden.
- 5. Jeśli k < n wróć do punktu 2. W przeciwnym przypadku dodaj do ścieżki element u_n i zakończ procedurę.

Ostatecznie, po wylosowaniu konkretnej ścieżki, komórki, które znajdowały się na pozycji u_k dla k > 0, przenosimy na pozycje u_{k+1} , a nowo powstałą komórkę potomną umieszczamy w pozycji określonej przez u_1 . W dodatku A.2 przedstawiony jest zestaw procedur zapisanych w programie MATLAB®, które realizują powyższe zadanie. Procedurę tę można bez trudu zmodyfikować, gdy gęstość komórek jest na tyle duża, że założenie o "rozpychaniu się" komórek może być już dyskusyjne. W procedurze znajdującej wolne miejsce wystarczy jedynie dodać moment stopu, gdy n, czyli aktualnie przeszukiwana odległość, jest zbyt duże.

Mając już zdefiniowane poszczególne kroki postępowania w przypadku pojedynczych komórek, możemy przejść do opisu procedury symulowania całego układu. Podstawowymi danymi wejściowymi dla symulacji są: okres jaki ma być symulowany T_{fin} , początkowy układ komórek na siatce oraz wartości parametrów specyficznych dla każdej komórki. W naszym przypadku parametrami tymi są μ oraz T_p , czyli parametry określające cykl komórkowy każdej komórki, por. równania (5.1) i (5.2). Przed wejściem w pętlę generującą kolejne stany układu, dla każdej komórki losowany jest czas do następnego podziału. Sama pętla składa się z kilku podstawowych kroków. Najpierw wybierana jest komórka z najkrótszym czasem do zakończenia kolejnego podziału. Następnie, po przejściu z bieżącym czasem symulacji do momentu tego podziału, na planszy umieszczana jest komórka potomna. Co ważne, zakładamy, że parametry komórki potomnej są takie same jak macierzystej, co odpowiada prostemu dziedziczeniu. Ostatnim krokiem jest wylosowanie i zapamiętanie czasów do następnego podziału dla komórki macierzystej oraz potomnej. Uproszczony schemat blokowy powyższego algorytmu przedstawiony został na rys. 5.4. Co ważne, w dalszej części będziemy zakładać,



Rysunek 5.4: Uproszczony schemat blokowy algorytmu wykorzystanego do symulowania proponowanego automatu komórkowego.

że komórki w populacji początkowej wyposażone są w te same wartości parametrów μ oraz T_p . Innymi słowy, cały automat opisują jedynie wartości dwóch parametrów. W ten sposób, ponieważ wszystkie komórki są identyczne, nie definiujemy odgórnie, które komórki zdołają uformować kolonie. Układ przewiduje, że każda z komórek jest potencjalnie klonogenna, lecz fakt uformowania kolonii zależy od kolejnych realizacji zmiennych losowych opisujących czas trwania cyklu komórkowego. Taka definicja układu pozwala w prosty sposób odwzorować eksperymentalny fakt, że jedynie część komórek pochodzących z tej samej uformowanej kolonii ma potencjał do dalszego ich formowania. Ponadto, gdyby w kolonii któraś z komórek była z definicji klonogenna, wraz z kolejnymi pasażami wzrastałby odsetek komórek klonogennych w całej populacji, co nie ma odzwierciedlenia w wynikach eksperymentów.

Oszacowanie parametrów dla linii HCT116 p53 +/+ i HCT116 p53 -/-

Mając do dyspozycji eksperymentalnie zmierzoną wartość PE (por. dodatek A), czyli odsetka komórek klonogennych w populacji, dla rozważanych linii HCT116 p53 +/+ i HCT116 p53 -/- możemy spróbować określić wartości parametrów dla zaproponowanego automatu komórkowego. Dla uproszczenia przyjmujemy dalej, że deterministyczny fragment cyklu komórkowego T_p jest dla obu linii taki sam i wynosi 20 godzin. Przyjęta wartość jest zbliżona do tych, które można odnaleźć w literaturze, por. np. 23 godziny dla linii komórkowej HeLa (komórki raka szyjki macicy), 22,5 godziny dla linii komórkowej L5 (mioblasty, czyli komórki prekursorowe mięśni), czy też 15 godzin dla mysich fibroblastów [87]. Przyjmujemy zatem, że różnice pomiędzy populacjami wyrażają się w rozkładzie długości fazy spoczynkowej cyklu komórkowego i na podstawie eksperymentalnego PE wyznaczać będziemy jedynie wartość parametru μ .

Wykonując po 50 symulacji dla różnych wartości parametru μ , wyznaczyliśmy zależność pomiędzy jego wielkością a wartością przewidywanego przez model PE, por. rys. 5.5. Wartość PE wynikająca z symulacji określona była jako stosu-



Rysunek 5.5: Zależność odsetka komórek klonogennych w populacji od wielkości parametru μ , czyli wspólnego dla każdej komórki parametru opisującego rozkład długości trwania fazy spoczynkowej cyklu komórkowego, por. równania (5.1) i (5.2). Zaprezentowane są średnia i odchylenie standardowe z 50 symulacji.

nek liczby kolonii składających się z więcej niż 50 komórek po 7 dniach trwania

symulacji do początkowej liczby komórek. Każda symulacja rozpoczynała się od losowego rozrzucenia 100 komórek na siatce o wymiarze 500×500 miejsc. Przykładowe wizualizacje zrealizowanych symulacji wraz z zaznaczonymi koloniami o wielkości większej niż 50 komórek przedstawione są na rys. 5.6. Tak jak moż-



Rysunek 5.6: Przykładowe wizualizacje układu po przyjętych 7 dniach hodowli dla różnych wartości parametru μ . Symulacje rozpoczęły się od 100 komórek posianych w losowe miejsca siatki. W czerwone okręgi wzięte są te kolonie, które składają się z więcej niż 50 komórek.

na się było spodziewać, wraz ze wzrostem wartości parametru μ maleje odsetek komórek klonogennych w populacji i dla $\mu = 2,5$ średnia wyznaczona wartość PE to jedynie 0,0054. Dla małych wartości parametru μ wartość PE wynosi około 0,9, a nie, jak można by było przypuszczać, 1, ponieważ średnia i wariancja w rozkładzie log-normalnym zależą również od parametru σ^2 i dla $\mu = 0$ wynoszą odpowiednio $\exp(1/2) \approx 1,65$ i $(\exp(1) - 1) \exp(1) \approx 4,67$. Co najważniejsze, na podstawie wartości PE otrzymanych z modelu i tych wynikających z pomiarów eksperymentalnych, oszacowane zostały wartości parametru μ dla obu linii HCT116, por. tabela 5.1. Szacowanie polegało na wykorzystaniu prostej interpo-

Tabela 5.1: Wartości parametru μ oszacowane przez porównanie predykcji modelu (por. rys. 5.5) z eksperymentalnymi pomiarami frakcji komórek klonogennych (PE).

Linia komórkowa	Eksperymentalne PE	Wy estymowane μ
HCT116 p53 +/+	$0,\!457$	1,7263
HCT116 p53 -/-	$0,\!285$	1,8512

lacji liniowej, w której punktami węzłowymi były PE wynikające z modelu oraz tablicę wartości stanowiły odpowiadające im wartości parametru μ . Na potrzeby symulacji przeprowadzonych w dalszej części tego rozdziału, przyjmujemy wartość parametru μ odpowiadającą linii HCT116 p53 +/+.

5.1.2 Bezpośredni wpływ promieniowania jonizującego na komórki

Uwzględnienie w proponowanym automacie komórkowym wpływu promieniowania jonizującego na poszczególne komórki składać się będzie z trzech następujących po sobie etapów:

- 1. Usunięcie z układu komórek, które w wyniku działania promieniowania jonizującego uległy apoptozie lub nekrozie;
- 2. Obniżenie klonogenności komórek w populacji poprzez wprowadzenie zmian w wartościach parametrów opisujących poszczególne komórki;
- 3. Wybranie komórek, które w wyniku działania promieniowania weszły w stan senescencji.

Pierwszy etap jest całkowicie określony poprzez podanie zależnego od dawki promieniowania D prawdopodobieństwa przetrwania komórki P(D). Zgodnie z jego wartością, na podstawie kolejno generowanych liczb z rozkładu jednostajnego na przedziale (0, 1), możemy w przypadku każdej komórki zadecydować, czy usuwamy ją z siatki. Co istotne, zakładamy, że P(D) jest takie samo dla każdej komórki, czyli etap pierwszy nie obniża klonogenności komórek w populacji. Tak jak w przypadku rozszerzonego modelu liniowo-kwadratowego (modelu LQ, por. rozdział 4) zakładamy, że P(D) ma zbliżoną wartość do wyznaczonej eksperymentalnie wzglednej liczby komórek pozostających w dołkach po 48 godzinach koinkubacji, por. rys. 3.4A. Jadnak, inaczej niż poprzednio, w dalszej części rozdziału będziemy posługiwać się dawkami promieniowania wykraczającymi znacznie ponad rozważany eksperymentalnie zakres. W związku z tym, posługując się funkcją dopasowaną do danych eksperymentalnych, będziemy dokonywać ekstrapolacji. Biorąc pod uwagę charakterystyczny układ punktów eksperymentalnych, jako model opisujący P(D) przyjmujemy krzywa wykładnicza, która po dopasowaniu — stosując regresję liniową dla zlogarytmowanych danych — do pomiarów dotyczących linii komórkowej HCT116 p53 +/+ wyraża się wzorem

$$P(D) = e^{-0.1186D} \,. \tag{5.3}$$

Dopasowywanie przeprowadziliśmy jedynie z jednym wolnym parametrem, ponieważ z definicji P(0) = 1. Wysoka jakość dopasowania jest widoczna zarówno na wykresie zestawiającym dane z modelem (por. rys. 5.7A), jak i w wysokim współczynniku determinacji dla pośredniego modelu liniowego ($R^2 = 0,96$, p-wartość < 0,005).



Rysunek 5.7: Ilustracja krzywych wykorzystanych do ekstrapolacji danych eksperymentalnych dotyczących linii komórkowej HCT116 p53 +/+. (A) Krzywa wykładnicza (5.3) opisująca względną wielkość populacji na koniec koinkubacji, por. rys. 3.4. (B) Krzywa wykładnicza (5.5) opisująca odsetek komórek w stanie senescencji na koniec koinkubacji, por. rys. 3.6.

Etap drugi, czyli obniżenie klonogenności komórek w populacji, opiszemy również korzystając z założeń wykorzystanych w modelu LQ. Przypomnijmy, że liczbę patologicznych zmian Z_p , do których dochodzi w komórce po zastosowaniu dawki D promieniowania, opisuje rozkład Poissona

$$P(Z_p = k) = \frac{Y^k}{k!} \exp(-Y),$$

gdzie parametrY, będący zarówno średnią, jak i wariancją tego rozkładu, wyraża się przez

$$Y = \alpha D + \beta D^2 \,.$$

Parametry α i β są parametrami specyficznymi dla danej linii komórkowej i ich wartości dla rozważanej linii HCT116 (odpowiednio 0, 253 i 0, 0576) oszacowane zostały w podrozdziale 4.2.3. Powstające zmiany patologiczne obniżają potencjał komórki do podzielenia się, więc ich wpływ uwzględniamy w modelu poprzez wprowadzenie — do każdej z komórek oddzielnie — zmiany w wartości parametru μ , który definiuje rozkład długości trwania fazy G₁, por. poprzedni podrozdział. Przyjmujemy, że jego nowa wartość ($\tilde{\mu}$) dla każdej z komórek generowana jest na podstawie wzoru

$$\tilde{\mu} = \mu + \gamma Z_p \,, \quad \gamma > 0 \,, \tag{5.4}$$

czyli poprzednia wartość powiększana jest liniowo o realizację zmiennej Z_p . Wartość parametru γ przyjmujemy na poziomie, który jest wystarczający, aby frakcja przeżywających komórek klonogennych (SF) przewidywana przez automat komórkowy odpowiadała temu przewidywanemu przez model liniowo-kwadratowy. Przypomnijmy, że w modelu LQ już jedna patologiczna zmiana wystarcza, aby komórka przestała być potencjalnie klonogenna i z prawdopodobieństwem 1 nie

wygenerowała kolonii. W proponowanym automacie komórkowym natomiast, dla małych wartości γ , jedna zmiana patologiczna w komórce nie zmienia znacznie jej wyjściowego prawdopodobieństwa wygenerowania kolonii i, co za tym idzie, zaobserwujemy dużą różnicę pomiędzy przewidzianymi przez niego wartościami SF, a tymi wynikającymi z modelu LQ. Okazuje się, że w przypadku rozważanej przez nas linii komórkowej, przyjmując $\gamma = 1$ otrzymujemy wysoką zgodność między oboma modelami, por. rys. 5.8. Dlatego na potrzeby dalszych symulacji



Rysunek 5.8: Frakcja przeżywających komórek klonogennych wynikająca z automatu komórkowego z $\gamma = 1$ w równaniu (5.4) (czerwone punkty, średnia ± odchylenia standardowe) oraz modelu liniowo-kwadratowego (czarna linia). Dla poszczególnych dawek wygenerowano po 100 symulacji automatu komórkowego startującego od 100 komórek rozrzuconych losowo na siatce o rozmiarze 500 × 500 pól i uwzględniającego 7 dni hodowli.

przyjmujemy stale $\gamma = 1$.

Ostatni etap, czyli wybranie komórek, które wejdą w stan senescencji, określimy na podstawie danych eksperymentalnych dotyczących odsetka komórek w stanie senescencji po 48 godzin koinkubacji, por. rys. 3.6. Również i w tym przypadku, z uwagi na większy zakres dawek rozważanych w symulacji, jesteśmy zmuszeni dokonać ekstrapolacji wartości zmierzonych eksperymentalnie. W tym celu do danych dopasowana została krzywa wykładnicza opisująca S(D), czyli prawdopodobieństwo, że losowo wybrana komórka w populacji będzie komórką w stanie senescencji

$$S(D) = 0.0075 e^{-0.3887D} . (5.5)$$
Zestawiając otrzymaną krzywą z wynikami eksperymentalnymi, por. rys. 5.7B, widzimy wysoką jakość otrzymanego dopasowania. Model liniowy dopasowany do zlogarytmowanych danych również i w tym przypadku wykazuje znakomity współczynnik determinacji $R^2 = 0,97$ z p-wartością mniejszą niż 0,005. Wybierając komórki, które są w stanie senescencji, należy pamiętać, że w stan ten może wejść jedynie komórka, w której doszło do jakiejś patologicznej zmiany ($Z_p > 0$). W związku z tym dla komórki, która wykazuje jakąś zmianę, prawdopodobieństwo wejścia w stan senescencji nie wynosi S(D), lecz $S(D) (1 + N_0/(N - N_0))$, gdzie N oraz N_0 oznaczają odpowiednio wszystkie komórki w układzie oraz te, które nie wykazują żadnych zmian patologicznych (komórki dla których Z_p zrealizowało się jako 0).

5.1.3 Wpływ komórek w stanie senescencji

Ostatnim kluczowym elementem proponowanego modelu są równania opisujące przestrzenną i czasową ewolucję substancji wydzielanych przez komórki w stanie senescencji oraz funkcje określające ich wpływ na pozostałe komórki. Rozważane są dwie różne substancje obecne w układzie: jedna stymuluje komórki do podziału (n_s) , natomiast druga indukuje uszkodzenia w materiale genetycznym (n_n) . Zakładamy jednak, że obie podlegają tym samym procesom i, co za tym idzie, ich ewolucja opisana jest strukturalnie identycznymi równaniami różniczkowymi czastkowymi określonymi na zbiorze Ω , który bezpośrednio odpowiada siatce automatu komórkowego. Przypomnijmy, że miejscem dla komórki na siatce jest kwadrat o boku 10 μ m, więc zbiór Ω jest prostokątem o wymiarach $10 \cdot n_1 \mu$ m na $10 \cdot n_2 \ \mu m$, gdzie n_1 oraz n_2 opisują liczbę miejsc w poziomie i pionie na rozważanej siatce dla automatu komórkowego. Dzięki temu możemy określić, że miejscu (i, j)w automacie komórkowym odpowiada zbiór $\Omega = [10(j-1), 10j] \times [10(i-1), 10i]$ zawarty w zbiorze, na którym określone jest równanie. Niech c oraz s będą parametrami określającymi odpowiednio tempo rozpadu (denaturacji i destabilizacji w przypadku białek) cząsteczek substancji oraz tempo wydzielania substancji przez komórki w stanie senescencji. Zakładając, że cząsteczki tej substancji rozprzestrzeniają się w medium jedynie pod wpływem procesu dyfuzji oraz mogą być dodatkowo internalizowane oraz degradowane przez znajdujące się w medium komórki, przyjmujemy, że ewolucja stężenia n(x,t) opisana jest odpowiednio rozszerzonym równaniem dyfuzji–konsumpcji

$$\frac{\partial n}{\partial t} = D\Delta_x n - cn + s \mathbb{1}_{\mathcal{S}(t)}(x) - n \left(c_{ks} \mathbb{1}_{\mathcal{S}(t)}(x) + c_{kn} \mathbb{1}_{\mathcal{N}(t)}(x) \right), \qquad (5.6)$$

gdzie D > 0 określa stały współczynnik dyfuzji, Δ_x jest operatorem Laplace'a względem zmiennej przestrzennej ($\Delta_x = \frac{\partial^2}{\partial x_1^2} + \frac{\partial^2}{\partial x_2^2}$), $\mathbb{1}_{\mathcal{X}}(x)$ jest funkcją charakterystyczną zbioru \mathcal{X} , a zbiory $\mathcal{S}(t)$ oraz $\mathcal{N}(t)$ są sumami zbiorów zajmowanych przez odpowiednio komórki w stanie senescencji oraz komórki mogące jeszcze

wejść na drogę podziału, które znajduja się na siatce rozważanego automatu komórkowego w chwili t. Przyjmujemy dalej dla uproszczenia, że każda komórke w stanie senescencji charakteryzuje również specyficzny fenotyp SASP (por. rozdział 2.4). Parametry c_{ks} oraz c_{kn} określają tempo internalizacji oraz degradacji cząsteczek danej substancji. O zbiorze zajmowanym przez daną komórkę zakładamy dla uproszczenia, że jest tożsamy ze zbiorem odpowiadającym miejscu, które komórka zajmuje na siatce automatu. Innymi słowy, zakładamy, że komórka jest kwadratowa i ściśle wypełnia zajmowane przez siebie miejsce. Co ważne, w układzie eksperymentalnym, który ma być opisany przez proponowany model, komórki stanowia jedynie cienka warstwe na dnie płytki hodowlanej, a wysokość medium hodowlanego jest od jej wysokości kilka rzędów wielkości większa. W związku z tym założenie o braku jakiejkolwiek dyfuzyjnej bariery (oprócz brzegu) dla obu substancji, w momencie gdv naturalna bariera jest błona komórkowa, nie wydaje się kontrowersyjnym uproszczeniem, ponieważ substancje swobodnie przepływają nad komórkami. Biorac pod uwage opisywany układ eksperymentalny, zakładamy w naturalny sposób, że substancje nie moga opuścić płytki hodowlanej, więc warunki brzegowe dla rozważanego równania na zbiorze Ω określone są przez brak przepływu substancji przez brzeg. Innymi słowy, pochodna rozwiązania w kierunku normalnym do brzegu jest na nim wszędzie równa zeru.

Widzimy, że tak zdefiniowane równanie silnie zależy od aktualnego stanu automatu komórkowego i w momencie jakiejkolwiek zmiany stanu podstawowego tego drugiego, zmianie ulega struktura pierwszego, ponieważ zmienia się wielkość zbiorów S(t) i $\mathcal{N}(t)$. W przypadku częstych zmian struktury, borykać się musimy z dużą złożonością obliczeniową całego układu. Dla rozmiaru siatki i początkowej liczby komórek, które w naszym przypadku są interesujące, pojedyncza symulacja może trwać nawet kilkanaście godzin. W związku z tym w dalszej części poczynimy kilka upraszczających założeń, które umożliwią szybkie realizowanie pojedynczych symulacji. Po pierwsze, w rozważanym przez nas układzie eksperymentalnym, który ma na celu zbadanie frakcji przeżywających komórek klonogennych, liczba wszystkich komórek jest na stosunkowo niskim poziomie. Możemy zatem przyjąć, przy dodatkowym założeniu o małych wartościach parametrów c_{ks} i c_{kn} dla obu rozważanych substancji, że usuwanie cząsteczek na drodze internalizacji i degradacji wewnątrz komórek ma znikomy wpływ na dynamikę całego modelu. Innymi słowy, zamiast równania (5.6) rozważamy dalej równanie

$$\frac{\partial n(x,t)}{\partial t} = D\Delta_x n(x,t) - cn(x,t) + s \mathbb{1}_{\mathcal{S}}(x) \,. \tag{5.7}$$

Zbiór Ω , na którym rozważane jest równanie, oraz warunki brzegowe pozostają oczywiście bez zmian. Dzięki powyższemu uproszczeniu do zmiany struktury równania dochodzi jedynie, gdy w układzie pojawia się nowa komórka w stanie senescencji, co jest w oczywisty sposób dużo rzadszym zdarzeniem niż pojawienie się jakiejkolwiek nowej komórki. W celu dokonania dalszych uproszczeń przyjrzyjmy się wpierw dynamice powyższego równania. Do numerycznego rozwiązywania zagadnienia (5.7) wykorzystamy metodę elementów skończonych (MES) z elementami kwadratowymi na Ω (pokrywającymi się z miejscami na siatce automatu komórkowego) oraz aproksymacją kawałkami liniową, por. [15]. Wobec tego węzłami, na których określać będziemy wartość przybliżonego rozwiązania układu (5.7) będą wierzchołki każdego z kwadratów siatki. Po przeformułowaniu zagadnienia (5.7) do postaci wariacyjnej i sformułowaniu odpowiedniego problemu dyskretnego, nasz układ sprowadzamy do liniowego układu równań różniczkowych zwyczajnych

$$\frac{d\tilde{n}}{dt} = -A\tilde{n} + f \,, \tag{5.8}$$

gdzie \tilde{n} jest wektorem zawierającym wartości przybliżonego rozwiązania w punktach węzłowych ułożonych w sposób ciągły rząd po rzędzie. Wartości macierzy Azależą wyłącznie od parametrów D i c równania oraz długości boku rozważanego elementu kwadratowego (10 µm w naszym przypadku), a zmiana liczebności komórek w stanie senescencji ma wpływ jedynie na wartość wektora f. W dodatku A.3 podane są funkcje zapisane w programie MATLAB® służące do generowania macierzy A oraz wektora f w zależności od wartości parametrów. Równanie (5.8)można rozwiązywać na odcinkach czasowych, na których nie dochodzi do powstania nowej komórki w stanie senescencji, korzystając ze standardowych narzędzi programu MATLAB^(R), takich jak np. procedura ode15s. Pozostaje jedynie określić wartości parametrów dla poszczególnych substancji. Tak jak w poprzednim rozdziale, zgodnie z postawioną hipotezą (por. podrozdział 2.5), zakładamy, że substancje stymulujące komórki do podziału (n_s) są białkami o dość długim w rozważanym przez nas medium hodowlanym — okresie połowicznego rozpadu $T_{1/2}$ (w sensie zaniku biologicznej aktywności). Na podstawie dostępnej literatury możemy jedvnie oszacować jakiego rzędu jest długość tego okresu. W [80] oszacowano, że dla Interleukiny-6, białka wpływającego na wzrost niektórych typów komórek, czas ten wynosi około 6 godzin, gdy rozpuszczone jest ono we krwi. Ponieważ w osoczu występuje dużo więcej substancji, które mogą potencjalnie przyspieszać destabilizację lub denaturację białka, niż w medium hodowlanym, przyjmujemy dalej, że w naszym układzie okres połowicznego rozpadu jest dużo dłuższy i wynosi około 30 godzin. W związku z tym parametr $c = \ln 2/T_{1/2}$ dla substancji n_s wynosi 0,0231. W przypadku współczynnika dyfuzji D w literaturze można odnaleźć jego wartości dla różnego rodzaju białek zawieszonych w roztworze wodnym. Dla lizozymu, niedużego białka o właściwościach enzymu, współczynnik ten wynosi około $1, 11 \times 10^{-6} \text{ (cm}^2 \text{s}^{-1})$ jak podano w [16] i około $1, 25 \times 10^{-6} \text{ (cm}^2 \text{s}^{-1})$ wg [5]. Zakładamy dalej, że w przypadku substancji n_s współczynnik dyfuzji jest zbliżony do powyższych wartości, co w odpowiednich dla naszego układu jednostkach daje średnio $D = 432 \times 10^3 \; (\mu m^2 h^{-1})$. W przypadku tempa wydzielania cząstek substancji n_s przyjmujemy zupełnie arbitralnie, że komórka wydziela średnio jedną cząstkę na sekundę, czyli, biorąc pod uwagę powierzchnię komórki wynoszącą 100 µm, przyjmujemy dalej $c = 36 h^{-1}$. W przypadku substancji mogącej uszkodzić komórkę $n_n(t)$ zakładamy, że składa się ona głównie z dość niestabilnego tlenku azotu (por. podrozdział 2.5). W literaturze można znaleźć wartości odpowiadającego mu współczynnika dyfuzji $D = 5, 1 \times 10^{-5} (\text{cm}^2 \text{s}^{-1})$ [97] oraz czasu połowicznego rozpadu, który wynosi jedynie kilka sekund [9]. Przyjmując czas połowicznego rozpadu na poziomie dokładnie 4 sekund, otrzymujemy parametr c wynoszący 623,8325 h⁻¹. Tak jak w przypadku substancji n_s , nie dysponujemy żadnym oszacowaniem wartości parametru s dla substancji n_n . Zakładamy zatem zupełnie arbitralnie, że tempo jej wydzielania przez komórkę w stanie senescencji jest 100 razy większe niż w przypadku substancji stymulujących wzrost n_s i, co za tym idzie, parametr $s = 36 \times 10^2 h^{-1}$. Wartości poszczególnych parametrów dla substancji n_n oraz n_s zebrane zostały w tabeli 5.2.

Tabela 5.2: Przyjęte wartości parametrów równania (5.7) opisującego czasową i przestrzenną ewolucję stężeń substancji prowzrostowych (n_s) oraz uszkadzających DNA (n_n) , które wydzielane są przez komórki w stanie senescencji.

Parametr	Opis	Jednostka	Wartość	
			n_s	n_n
D	współczynnik dyfuzji	$\mu m^2/h$	432×10^3	$183, 6\times 10^5$
s	tempo wydzielania substancji	1/h	36	$36 imes 10^2$
С	tempo rozpadu	1/h	0,0231	623, 8325

Na rysunku 5.9 przedstawione zostały otrzymane numerycznie stacjonarne rozwiązania równania (5.7) dla obu rozważanych substancji, gdy jedna komórka w stanie senescencji została umieszczona na środku siatki o rozmiarze 340×300 elementów. Patrząc na rozwiązania widzimy, że założenie o niewielkim zasięgu



Rysunek 5.9: Otrzymane numerycznie stacjonarne rozwiązania równania (5.7) dla substancji n_s (A) i n_n (B) dla parametrów przedstawionych w tabeli 5.2.

działania substancji mogących uszkodzić komórki znajduje swoje potwierdzenie

i już w niewielkiej odległości od źródła wartość rozwiązania n_n jest bliska zeru. W przypadku substancji prowzrostowych n_s widzimy, że docierają one w każde miejsce rozważanej siatki i są na niej dość równo rozłożone (różnica między największą i najmniejszą wartością to jedynie około 18% tej pierwszej). Z naszego punktu widzenia bardzo ważną kwestię stanowi tempo zbieżności rozwiązania do powyższego stanu ustalonego. Na rysunku 5.10 przedstawiona jest zależna od czasu dyskretna norma infimum różnicy pomiędzy rozwiązaniem n(x,t) a rozwiązaniem stacjonarnym n_{stac} . Za warunek początkowy przyjęliśmy całkowity brak



Rysunek 5.10: Tempo zbieżności rozwiązania równania (5.7) startującego z zerowego warunku początkowego do stanu stacjonarnego przedstawionego na rys. 5.9 dla substancji n_s (A) i n_n (B). Na wykresach przedstawiona jest zależna od czasu dyskretna norma infimum różnicy pomiędzy rozwiązaniem n(x,t) a rozwiązaniem stacjonarnym n_{stac} .

jakiejkolwiek substancji w systemie, a siatka, tak jak w poprzednim przypadku, miała rozmiar 340×300 elementów. Widzimy, że w przypadku substancji prowzrostowych n_s wystarczy jedynie 20 minut, aby rozwiązanie zależne od czasu n(x,t)było zbliżone do rozwiązania stacjonarnego. Dla substancji n_n czas ten jest dużo krótszy i wynosi mniej niż 0,1 sekundy. Co najważniejsze, oba powyższe charakterystyczne czasy są małe w porównaniu z długością trwania cyklu komórkowego. W związku z tym dokonujemy kolejnego uproszczenia rozważanego systemu i zakładamy, że w przypadku pojawienia się nowej komórki w stanie senescencji pomijamy dynamikę równania (5.7) i za rozkład substancji przyjmujemy od razu rozwiązanie stacjonarne. Innymi słowy, gdy w układzie pojawia się nowa komórka w stanie senescencji, zamiast w kolejnych małych krokach czasowych rozwiązywać równanie (5.7), dla obu substancji rozwiązywana jest jednorazowo jego stacjonarna wersja:

$$0 = D\Delta_x n(x,t) - cn(x,t) + s \mathbb{1}_{\mathcal{S}}(x).$$
(5.9)

Założenie powyższego typu jest dość powszechnie stosowane w modelowaniu matematycznym procesów biologicznych i nosi nazwę założenia o *quasistacjonarności*, por [43, 46, 56]. W wyniku wprowadzonych uproszczeń, czas potrzebny na realizację pojedynczej symulacji zmalał z wyjściowych kilkunastu godzin do około piętnastu minut.

Ostatnim elementem niezbędnym do całkowitego zdefiniowania modelu jest sformułowanie reguł rządzacych odpowiedzia komórek na ilość substancji znajdujących się w ich pobliżu. Przypomnijmy, że rozwiązanie równania opisującego rozkład danej substancji w przestrzeni przybliżone jest w węzłach będących wierzchołkami kwadratów, w których znajdują się poszczególne komórki. W związku z tym zakładamy dalej, że każda komórka podejmuje decyzję na podstawie średniej z czterech otaczających ją węzłów (\bar{n}_4). Substancje prowzrostowe są przez komórkę brane pod uwagę, gdy losowany jest czas do zakończenia jej następnego podziału (i dla jej komórki potomnej). Zakładamy w ten sposób, że substancje prowzrostowe nie mają wpływu na czas trwania deterministycznej części cyklu komórkowego (faz G₂, S i M), lecz na czas przebywania w fazie spoczynkowej. Niech ${\cal P}_w$ oznacza prawdopodobieństwo, że komórka zostanie pobudzona przez substancje prowzrostowe i zamiast losować czas trwania fazy spoczynkowej, por. 5.1, przyjmujemy, że rozpocznie podział w ciągu następnej pół godziny. Przyjmujemy dalej arbitralnie, że prawdopodobieństwo to jest wprost proporcjonalne do ilości substancji n_s w jej bezpośrednim otoczeniu

$$P_w = \min\left(\omega \cdot \bar{n}_{4,s}, 1\right),\tag{5.10}$$

gdzie ω jest nieznanym współczynnikiem proporcjonalności. Dla substancji mogących uszkodzić materiał genetyczny chcielibyśmy sformułować podobnie prostą zasadę działania. Jednak musimy wziąć pod uwagę, że do uszkodzenia komórki może dojść na każdym etapie cyklu komórkowego. Niech Δt oznacza długość następnego kroku czasowego w symulacji automatu komórkowego, czyli czas do zakończenia najbliższego podziału komórkowego. Niech P_u oznacza prawdopodobieństwo, że w czasie Δt dojdzie do uszkodzenia komórki pod wpływem działania substancji n_n . Przyjmujemy dalej arbitralnie, że prawdopodobieństwo to jest wprost proporcjonalne do iloczynu ilości substancji n_n w otoczeniu i Δt , czyli

$$P_u = \min\left(\kappa \cdot \bar{n}_{4,n} \cdot \Delta t, 1\right),\tag{5.11}$$

gdzie κ jest drugim nieznanym współczynnikiem proporcjonalności. Zatem po przejściu z czasem o krok Δt , dla każdej komórki w układzie, zgodnie z powyższym prawdopodobieństwem, losowane jest czy została uszkodzona. Zakładamy, że w przypadku wystąpienia uszkodzenia, specyficzny dla komórki parametr μ , który określa rozkład długości trwania fazy spoczynkowej, zostaje powiększony o $\Delta \mu$. Ponadto z prawdopodobieństwem P_z uszkodzenie wprowadzi komórkę na drogę apoptozy lub w stan senescencji komórkowej i przyjmujemy, prawdopodobieństwo realizacji tego drugiego wynosi P_s .

Podsumowując, w sformułowanym powyżej modelu, będącym połączeniem automatu komórkowego z dwoma równaniami różniczkowymi cząstkowymi, nie określiliśmy wartości pięciu parametrów (ω , κ , $\Delta \mu$, P_z oraz P_s), które opisują odpowiedź komórki na dwa rodzaje substancji znajdujących się w jej otoczeniu. Wartości tych parametrów nie sposób oszacować na podstawie literatury i ich dokładne wartości przyjmowane dalej są całkowicie arbitralne.

5.2 Symulacje

Celem tego podrozdziału jest sprawdzenie, czy zaproponowany model może odwzorować nieintuicyjne wyniki eksperymentów uzyskane przez E. C. Mackonis [63], por. podrozdział 2.3.1. Wszystkie przedstawione w dalszej części symulacje modelu były oparte na siatce o rozmiarze 340×300 elementów oraz na następujących, nieokreślonych wcześniej, wartościach parametrów

$$\omega = 1, 5, \ \kappa = 0, 6, \ \Delta \mu = 0, 01, \ P_z = 0, 5, \ P_s = 0, 38.$$

Przypomnijmy, że wartości powyższych pięciu parametrów przyjęte są w sposób całkowicie arbitralny, ponieważ nie można ich oszacować na podstawie dostępnej literatury. Na początku każdej symulacji na rozważanej siatce losowo rozmieszczanych było 100 komórek o identycznych początkowych wartościach parametru μ . Dla każdego rozważanego układu, raportowane w dalszej części średnie estymowane były na podstawie 100 niezależnych symulacji. Analogicznie do [63] frakcja przeżywających komórek klonogennych (SF) obliczana była jako stosunek liczby uzyskanych kolonii po napromienieniu do ich średniej liczby dla nienapromienionej kolonii. W przypadku SF dotyczącego podzbioru właściwego rozważanej siatki, składniki powyższego ilorazu odnoszone były oddzielnie do odpowiednich podzbiorów.

5.2.1 Zwiększona przeżywalność komórek napromienionych

W pierwszej kolejności sprawdzimy, czy uda się za pomocą zaproponowanego modelu zaobserwować i wyjaśnić zwiększoną przeżywalność komórek napromienionych dawką 6 Gy, gdy sąsiadują z komórkami, które otrzymały niewielką dawkę promieniowania. Odwzorujemy w tym celu eksperymentalny układ, w którym 75% całej płytki hodowlanej osłonięte było przed promieniowaniem. Przyjmiemy 6 Gy jako zastosowaną dawkę promieniowania dla całego układu, co zgodnie z [63] daję dawkę równą 0,24 Gy dla obszaru znajdującego się pod osłoną. Powyższy układ eksperymentalny w prosty sposób odwzorowujemy w modelu poprzez wykonanie procedur określających wpływ promieniowania oddzielnie dla populacji w pierwszej ćwiartce i tej pod osłoną. Tak jak w układzie eksperymentalnym przyjmujemy, że hodowla po napromienieniu trwała następnie 10 dni.

W tabeli 5.3 przedstawione są przewidywane przez model średnie wartości frakcji przeżywających komórek klonogennych (SF) w rozważanym układzie oraz w przypadku, gdy nie jest stosowana osłona radiacyjna. Widzimy, że odsetek przeżywających komórek klonogennych wyznaczony dla odsłoniętej ćwiartki układu, gdy pozostała jego część była pod osłoną, jest ponad trzykrotnie większy od SF

	Frakcja przeżywających komórek klonogennych (SF)
Ćwiartka nieosłonięta, gdy stosowana była osłona na pozostałą część obszaru	$0,\!13376\pm0,\!084242$
Obszar pod osłoną, gdy jedynie ćwiartka obszaru pozostała odsłonięta	$0,\!94527\pm0,\!1122$
Ćwiartka, gdy cała siatka napromieniana była tą samą dawką	$0,031474 \pm 0,037106$

Tabela 5.3: Przewidywane przez model frakcje przeżywających komórek klonogennych w poszczególnych obszarach siatki, w przypadku gdy stosowana była dawka 6 Gy promieniowania. Podana są średnie \pm odchylenia standardowe.

dla układu napromienionego jednorodnie dawką 6 Gy. Zatem komórki znajdujące się pod osłoną wpłynęły na zwiększenie przeżywalności komórek napromienionych i, co za tym idzie, model przewidział wyniki eksperymentalne uzyskane przez E. C. Mackonis.

Co najważniejsze, mając do dyspozycji model, możemy na przykładzie pojedynczej trajektorii układu prześledzić, w jaki sposób doszło do zwiększania przeżywalności komórek w nieosłoniętej ćwiartce. Gdy spojrzymy na początkowy rozkład aktywnie wydzielanych substancji oraz układ komórek na siatce, por. rys. 5.11, zobaczymy, że liczba komórek w stanie senescencji i, co za tym idzie, stężenie substancji prowzrostowych jest większa dla populacji jednorodnie naświetlonej dawką 6 Gy. Wydawać by się zatem mogło, że zwiększenie przeżywalności na skutek działania sygnałów pochodzących od komórek w stanie senescencji powinno mieć większy udział w populacji jednorodnie naświetlonej. Jednak wystarczy spojrzeć na stan systemu po 7 dniach od napromienienia (por. rys. 5.12), żeby zrozumieć dlaczego tak nie jest. Widzimy, że komórki z populacji jednorodnie napromienionej dawka 6 Gy bardzo rzadko się dzielą i liczebność populacji w ciągu 7 dni nie zwiększyła się znacząco. W związku z tym, z uwagi na mały zasięg działania substancji uszkadzających DNA, pojawiła się tylko jedna nowa komórka w stanie senescencji i, co za tym idzie, nie zwiększyła się znacząco ilość substancji prowzrostowych. Zupełnie inna sytuacja ma miejsce w układzie, w którym jedynie 25% komórek otrzymało pełną dawkę promieniowania. Widzimy, że komórki pod osłoną, które otrzymały niewielką dawkę promieniowania, dzielą się dużo częściej i populacja rośnie dużo szybciej. Nowo powstałe komórki dostają się w rejony oddziaływania substancji uszkadzających DNA, co prowadzi do powstawania nowych komórek w stanie senescencji. Po 7 dniach w układzie znajduje się już 29 komórek tego typu, co znacząco zwiększa ilość substancji prowzrostowych i populacja znajdująca się w nieosłoniętej ćwiartce jest skuteczniej pobudzana do rozwoju. Co ciekawe, model przewiduje, że w przypadku zakończenia hodowli po 7 dniach



Rysunek 5.11: Stan systemu po 24 godzinach od napromienienia dawką 6 Gy. (Po lewej) Układ, w którym 75% obszaru znajduje się pod osłoną. (Po prawej) Układ bez osłony. Czerwonymi kropkami oznaczone są komórki w stanie senescencji, których liczba (N_s) oraz odsetek w populacji podany jest nad wykresem.

od napromieniania, zwiększenie przeżywalności komórek w nieosłoniętej ćwiartce nie zostałoby zaobserwowane. Zatem to nie początkowa liczba komórek w stanie senescencji odgrywa najważniejszą rolę, lecz to, ile komórek dostanie się w rejon działania substancji uszkadzających komórki i ile z nich zostanie wprowadzonych w stan senescencji.



Rysunek 5.12: Stan systemu po 7 dniach od napromienienia dawką 6 Gy. (Po lewej) Układ, w którym 75% obszaru znajduje się pod osłoną. (Po prawej) Układ bez osłony. Czerwonymi kropkami oznaczone są komórki w stanie senescencji, których liczba (N_s) oraz odsetek w populacji podany jest nad wykresem.

5.2.2 Zwiększona przeżywalność komórek pod osłoną

Drugim zaskakującym efektem zaobserwowanym przez zespół E. C. Mackonis było zwiększenie przeżywalności komórek znajdujących się pod osłoną, gdy komórki w nieosłoniętej ćwiartce zostały napromienione dużymi dawkami promieniowania. W celu sprawdzenia, czy zaproponowany model przewiduje możliwość wystąpienia takiego efektu, rozważyliśmy układ, w którym ćwiartka rozważanej siatki napromieniona została dawką 12 Gy. W rzeczywistym układzie również komórki znajdujące się pod osłoną otrzymują w takim przypadku pewną dawkę promieniowania. Jednak, dla uproszczenia, w rozważanym przez nas układzie przyjmujemy, że osłona była w 100% skuteczna i komórki znajdujące się pod nią nie zostały poddane działaniu promieniowania. W ten sposób uniknęliśmy dodatkowych symulacji, a wartości SF populacji pod osłoną możemy odnosić do 1, czyli SF populacji nie poddawanej działaniu promieniowania jonizującego.

Podana w tabeli 5.4 wartość SF dla populacji znajdującej pod osłoną nie pozostawia wątpliwości, że model skutecznie przewidział również i drugi z efektów sąsiedztwa zaobserwowanych przez E. C. Mackonis. Wartość większa o 16%

Tabela 5.4: Przewidywana przez model frakcja przeżywających komórek klonogennych dla populacji znajdującej się pod osłoną, w przypadku gdy nieosłonięta ćwiartka została napromieniona dawką 12 Gy. Podana jest średnia \pm odchylenie standardowe.

	Frakcja przeżywających komórek klonogennych (SF)
Pod osłoną, gdy ćwiartka układu została napromieniona dawką 12 Gy	$1,\!1611\pm0,\!089939$

względem kontroli wyraźnie wskazuje na wpływ komórek pozostających po napromienieniu przy wykorzystaniu dawki 12 Gy. Taka sytuacja staje się w pełni zrozumiała, gdy spojrzymy na przykładowy stan układu po 7 dniach trwania symulacji, por. rys. 5.13. Widzimy, że przy tak wysokiej dawce promieniowania w nieosłoniętej ćwiartce od samego początku znajduje się dużo komórek w stanie senescencji. Produkowane przez nie substancje już od samego początku pobudzają do wzrostu komórki pod osłoną, co prowadzi ostatecznie do ich zwiększonego SF.

5.3 Wnioski

Zaproponowany model hybrydowy, bazujący w pełni na sformułowanej w niniejszej pracy hipotezie badawczej (por. podrozdział 2.5), jest w stanie odwzorować nieintuicyjne wyniki eksperymentalne przedstawione przez E. C. Mackonnis w [63]. Analiza pojedynczych trajektorii modelu wykazała, że zaobserwowane wyniki są rezultatem skomplikowanych interakcji pomiędzy komórkami a substancjami wydzielanymi przez wzbudzone komórki w stanie senescencji. Okazuje się, że dużą rolę odgrywa nie tylko senescencja wzbudzona pierwotnie przez promieniowanie jonizujące, lecz również ta wtórna, wywołana przez obecne już w układzie



Rysunek 5.13: Stan układu po 7 dniach od napromienienia ćwiartki obszaru dawką 12 Gy. Czerwonymi kropkami oznaczone są komórki w stanie senescencji, których liczba (N_s) oraz odsetek w populacji podany jest nad wykresem.

komórki w stanie senescencji. Co ciekawe, w przypadku mniejszych dawek promieniowania, w związku z ograniczonym zasięgiem sygnałów mogących uszkodzić komórki, kluczowa wydaje się być gęstość posianych komórek. Przy zbyt dużych początkowych odległościach pomiędzy komórkami nie udałoby się zaobserwować wyników analogicznych do tych przedstawionych powyżej. Przedstawiony model, dzięki dużej elastyczności aparatu matematycznego, jakim jest automat komórkowy, może zostać, przy niedużym nakładzie pracy, przeformułowany na inne układy eksperymentalne *in vitro*, czy też nawet na opis zachowania komórek *in vivo*.

Rozdział 6

Podsumowanie

W przedstawionej rozprawie doktorskiej podejmowana jest nowatorska próba połączenia dwóch zjawisk, które do tej pory rozpatrywane były całkowicie oddzielnie: programu senescencji komórkowej i popromiennego efektu sąsiedztwa. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów oraz dwa zaproponowane w pracy modele matematyczne wskazują, że senescencja komórkowa wraz z towarzyszącym jej specyficznym fenotypem komórek może być kluczowa dla występowania popromiennego efektu sasiedztwa i, co za tym idzie, dla odpowiedzi całego nowotworu na działanie promieniowania jonizującego. Podstawą dla przeprowadzonych badań jest przedstawiona na początku pracy hipoteza, która dokładnie wyjaśnia jak te dwa zjawiska są ze sobą połączone. Zgodnie z jej sformułowaniem, na skutek wywołanych promieniowaniem jonizującym uszkodzeń DNA, część komórek w populacji wchodzi w stan senescencji komórkowej. Komórki te zaczynają wydzielać do otaczającego je mikrośrodowiska substancje, które możemy podzielić na dwa typy: substancje mogące uszkadzać DNA innych komórek, będące cząsteczkami o krótkim okresie połowicznego rozkładu (np. tlenek azotu); substancje pobudzające inne komórki do kolejnych podziałów, będące białkami o długim okresie niezmiennej biologicznej aktywności. Różne rodzaje popromiennego efektu sąsiedztwa są natomiast rezultatem skomplikowanych interakcji pomiędzy komórkami a wymienionymi powyżej substancjami.

Pierwszym etapem weryfikacji stawianej hipotezy było przeprowadzenie serii eksperymentów, w których mierzony był m. in. zależny od dawki promieniowania odsetek komórek w stanie senescencji, zarówno w populacji napromienianej, jak i sąsiadującej. Do eksperymentów wybrane zostały linie komórkowe różniące się statusem genu TP53, ponieważ zgodnie z dostępną literaturą gen ten odpowiada za prawdopodobieństwo wejścia komórki na ścieżkę senescencji. Podstawowa analiza statystyczna wyników eksperymentalnych potwierdziła tę zależność i, tak jak przewiduje postawiona hipoteza, wykazała, że popromienny efekt sąsiedztwa działa z większą siłą w przypadku komórek częściej wchodzących w stan senescencji, czyli tych z funkcjonalnym genem TP53.

W dalszej części pracy zaproponowane zostało rozszerzenie klasycznego modelu liniowo-kwadratowego, bazujące na postawionej w pracy hipotezie badawczej. Uwzględnienie w modelu substancji wydzielanych przez indukowane promieniowaniem komórki w stanie senescencji istotnie poprawiło matematyczny opis obserwacji eksperymentalnych i pozwoliło wyjaśnić otrzymane w laboratorium wyniki. Po pierwsze, model rozszerzony, oprócz dokładniejszego opisu danych eksperymentalnych dotyczacych komórek bezpośrednio napromienianych, pozwolił na wyjaśnienie skąd biorą się różnice w wynikach eksperymentalnych pomiędzy komórkami tej samej linii, ale różniącymi się statusem genu TP53. Okazuje się, że nie wynikają one z różnic w efektywności naprawy dwuniciowych pęknięć, lecz (tak jak przewiduje postawiona hipoteza) z różnic w ilości wzbudzonej senescencji komórkowej. Po drugie, krzywe przewidywane przez model rozszerzony dopasowały sie dość dokładnie do danych eksperymentalnych dotyczących komórek koinkubowanych z komórkami napromienionymi. Należy pamiętać, że standardowy model LQ nie obejmuje swoja stosowalnościa tego typu danych. Co najważniejsze, po uproszczeniu modelu rozszerzonego, do opisu całego zbioru danych wykorzystywane są jedynie o dwa parametry więcej, niż w przypadku standardowego modelu LQ.

W ostatniej części pracy zaproponowany został model opisujący przestrzenny i czasowy rozwój populacji komórkowej, który bazując w pełni na sformułowanej hipotezie badawczej, jest w stanie odwzorować nieintuicyjne wyniki eksperymentalne przedstawione przez E. C. Mackonnis w [63]. Model oparty jest na asynchronicznym automacie komórkowym, którego ewolucja silnie zależy od wpływu substancji wydzielanych przez komórki w stanie senescencji. Jednocześnie zmiany w czasie stężeń tych substancji opisują równania różniczkowe cząstkowe, których struktura zależy bezpośrednio od aktualnego stanu automatu komórkowego. Analiza pojedynczych trajektorii modelu wykazała, że różnorodność możliwych skutków działania popromiennego efektu sąsiedztwa jest rezultatem skomplikowanych interakcji pomiędzy komórkami a substancjami wydzielanymi przez wzbudzone komórki w stanie senescencji. Okazuje się, że dużą rolę odgrywa nie tylko senescencja wzbudzona pierwotnie przez promieniowanie jonizujące, lecz również ta wtórna, wywołana przez obecne już w układzie komórki w stanie senescencji. Co ciekawe, w przypadku mniejszych dawek promieniowania, w związku z ograniczonym zasięgiem oddziaływania substancji mogacych uszkodzić komórki, kluczowa wydaje się być gęstość posianych komórek. Przy zbyt dużych początkowych odległościach pomiędzy komórkami nie udałoby się zaobserwować wyników analogicznych do tych uzyskanych przez E. C. Mackonnis.

Wyniki zawarte w niniejszej pracy stanowią solidną podstawę do dalszych badań nad rolą senescencji komórkowej w popromiennym efekcie sąsiedztwa. W dalszym etapie należałoby zbudować dokładniejsze modele, w których każdy ze stosowanych parametrów można wyznaczyć eksperymentalnie. Za ich pomocą można podjąć próbę znalezienia bardziej optymalnych protokołów radioterapii.

Bibliografia

- T. Alarcón, H. M. Byrne, P. K. Maini. A cellular automaton model for tumour growth in inhomogeneous environment. J Theor Biol, 225(2):257-274, 2003. [cytowanie na str. 55]
- B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter. *Podstawy biologii komórki*. Polskie Wydawnictwo Naukowe, 2005. [cytowanie na str. 8]
- [3] R. C. Allsopp, H. Vaziri, C. Patterson, S. Goldstein, E. V. Younglai, A. B. Futcher, C. W. Greider, C. B. Harley. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *PNAS*, 89(21):10114–10118, 1992. [cytowanie na str. 15]
- [4] A. Anderson, M. Chaplain, K. Rejniak. Single-cell-based models in biology and medicine. Springer, 2007. [cytowanie na str. 55]
- [5] O. Annunziata, D. Buzatu, J. G. Albright. Protein diffusion coefficients determined by macroscopic-gradient rayleigh interferometry and dynamic light scattering. *Langmuir*, 21(26):12085-12089, 2005. [cytowanie na str. 69]
- J. C. Barrett. A mathematical model of the mitotic cycle and its application to the interpretation of percentage labeled mitoses data. J Natl Cancer I, 37(4):443-450, 1966. [cytowanie na str. 57]
- [7] D. Basanta, H. Hatzikirou, A. Deutsch. Studying the emergence of invasiveness in tumours using game theory. Eur Phys J B, 63(3):393–397, 2008. [cytowanie na str. 55]
- [8] C. M. Beauséjour, A. Krtolica, F. Galimi, M. Narita, S. W. Lowe, P. Yaswen, J. Campisi. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J*, 22(16):4212-4222, 2003. [cytowanie na str. 15]
- [9] J. S. Beckman, W. H. Koppenol. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. Am J Physiol-Cell Ph, 271(5):C1424-C1437, 1996. [cytowanie na str. 70]
- B. J. Blyth, P. J. Sykes. Radiation-induced bystander effects: what are they, and how relevant are they to human radiation exposures? *Rad Res*, 176(2):139–157, 2011. [cytowanie na str. 3, 10, i 11]

- [11] A. G. Bodnar, M. Ouellette, M. Frolkis, S. E. Holt, C. Chiu, G. B. Morin, C. B. Harley, J. W. Shay, S. Lichtsteiner, W. E. Wright. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, 279(5349):349–352, 1998. [cytowanie na str. 15]
- [12] M. Bodnar, U. Foryś, J. Poleszczuk. Analysis of biochemical reactions models with delays. J Math Anal Appls, 376(1):74-83, Apr 2011. [cytowanie na str. 2]
- [13] J. Bottollier-Depois, Q. Chau, P. Bouisset, G. Kerlau, L. Plawinski, L. Lebaron-Jacobs. Assessing exposure to cosmic radiation during long-haul flights. *Rad Res*, 153:526-532, 2000. [cytowanie na str. 11]
- [14] D. J. Brenner, L. R. Hlatky, P. J. Hahnfeldt, Y. Huang, R. K. Sachs. The linear-quadratic model and most other common radiobiological models result in similar predictions of time-dose relationships. *Rad Res*, 150(1):83–91, 1998. [cytowanie na str. 40]
- [15] S. C. Brenner, L. R. Scott. The mathematical theory of finite element methods. Springer, Nowy Jork, 2008. [cytowanie na str. 69]
- [16] D. Brune, S. Kim. Predicting protein diffusion coefficients. PNAS, 90(9):3835-3839, 1993. [cytowanie na str. 69]
- K. Camphausen, M. A. Moses, C. Ménard, M. Sproull, W. Beecken, J. Folkman, M. S. O'Reilly. Radiation abscopal antitumor effect is mediated through p53. *Cancer Res*, 63(8):1990–1993, 2003. [cytowanie na str. 11]
- [18] J. Campisi. From cells to organisms: can we learn about aging from cells in culture? Exp Gerontol, 36(4):607-618, 2001. [cytowanie na str. 14]
- [19] Z. Chen, L. C. Trotman, D. Shaffer, H. Lin, Z. A. Dotan, M. Niki, J. A. Koutcher, H. I. Scher, T. Ludwig, W. Gerald. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature*, 436(7051):725-730, 2005. [cytowanie na str. 15]
- [20] M. Collado, J. Gil, A. Efeyan, C. Guerra, A. J. Schuhmacher, M. Barradas, A. Benguría, A. Zaballos, J. M. Flores, M. Barbacid. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature*, 436(7051):642–642, 2005. [cytowanie na str. 15]
- [21] J. Coppé, P. Desprez, A. Krtolica, J. Campisi. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. Annu Rev Pathol, 5:99–118, 2010. [cytowanie na str. 16]
- [22] J. Coppé, C. K. Patil, F. Rodier, A. Krtolica, C. M. Beauséjour, S. Parrinello, J. G. Hodgson, K. Chin, P. Desprez, J. Campisi. A human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen. *PLoS One*, 5(2):e9188, 2010. [cytowanie na str. 16]
- [23] J. Coppé, C. K. Patil, F. Rodier, Y. Sun, D. P. Muñoz, J. Goldstein, P. S. Nelson, P. Desprez, J. Campisi. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cellnonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol*, 6(12):e301, 2008. [cytowanie na str. 16]

- [24] A. R. Davalos, J. Coppe, J. Campisi, P. Desprez. Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. *Cancer Metast Rev*, 29(2):273–283, 2010. [cytowanie na str. 16]
- [25] G. Delaney, S. Jacob, C. Featherstone, M. Barton. The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. *Cancer*, 104:1129–1137, 2005. [cytowanie na str. 2]
- [26] A. Deutsch, S. Dormann. Cellular automaton modeling of biological pattern formation: characterization, applications, and analysis. Springer, 2005. [cytowanie na str. 55]
- [27] G. P. Dimri, X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj, O. Pereira-Smith. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *PNAS*, 92(20):9363–9367, 1995. [cytowanie na str. 14 i 22]
- [28] B. G. Douglas, J. F. Fowler. The effect of multiple small doses of X rays on skin reactions in the mouse and a basic interpretation. *Rad Res*, 66(2):401-426, 1976. [cytowanie na str. 40 i 44]
- [29] D. Dworakowska. Rola białka p53, pRb, P21WAF1/CIP1, PCNA, mdm2 oraz cykliny D1 w regulacji cyklu komórkowego oraz apoptozy. Onkologia Polska, 8(4):223– 228, 2005. [cytowanie na str. 9]
- [30] H. Enderling, A. Anderson, M. Chaplain, A. Beheshti, L. Hlatky, P. Hahnfeldt. Paradoxical dependencies of tumor dormancy and progression on basic cell kinetics. *Cancer Res*, 69(22):8814-8821, 2009. [cytowanie na str. 55, 56, 58, i 59]
- [31] H. Enderling, D. Park, L. Hlatky, P. Hahnfeldt. The importance of spatial distribution of stemness and proliferation state in determining tumor radioresponse. *Math Model Nat Phenom*, 4(3):117–133, 2009. [cytowanie na str. 25 i 59]
- [32] S. C. Erridge, C. Featherstone, R. Chalmers, J. Campbell, D. Stockton, R. Black. What will be the radiotherapy machine capacity required for optimal delivery of radiotherapy in Scotland in 2015? *Eur J Cancer*, 43:1802–1809, 2007. [cytowanie na str. 2]
- J. Ferlay, E. Steliarova-Foucher, J. Lortet-Tieulent, S. Rosso, J. W. W. Coebergh, H. Comber, D. Forman, F. Bray. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*, 2013. [cytowanie na str. 1]
- [34] U. Foryś, M. Bodnar, J. Poleszczuk. Negativity of delayed induced oscillations in a simple linear dde. Appl Math Lett, 24(6):982–986, Jun 2011. [cytowanie na str. 2]
- [35] J. F. Fowler. The linear-quadratic formula and progress in fractionated radiotherapy. Brit J Radiol, 62(740):679-694, 1989. [cytowanie na str. 40]
- [36] N. Franken, H. M. Rodermond, J. Stap, J. Haveman, C. van Bree. Clonogenic assay of cells in vitro. Nat Protoc, 1(5):2315-2319, 2006. [cytowanie na str. 93]

- [37] J. S. Fridman, S. W. Lowe. Control of apoptosis by p53. Oncogene, 22(56):9030– 9040, 2003. [cytowanie na str. 9]
- [38] J. E. Frödin, E. Jonsson, T. Möller, L. Werkö. Radiotherapy in Sweden a study of present use in relation to the literature and an estimate of future trends. Acta Oncol, 35:967–979, 1996. [cytowanie na str. 2]
- [39] J. M. Galvin, G. Ezzell, A. Eisbrauch, C. Yu, B. Butler, Y. Xiao, I. Rosen, J. Rosenman, M. Sharpe, L. Xing. Implementing IMRT in clinical practice: a joint document of the American Society for Therapeutic Radiology and Oncology and the American Association of Physicists in Medicine. Int J Radiat Oncol, 58(5):1616–1634, 2004. [cytowanie na str. 13]
- [40] M. Gardner. Mathematical games: The fantastic combinations of John Conway's new solitaire game "life". Sci Am, 223(4):120-123, 1970. [cytowanie na str. 59]
- [41] P. Gerlee, A. Anderson. An evolutionary hybrid cellular automaton model of solid tumour growth. J Theor Biol, 246(4):583–603, 2007. [cytowanie na str. 55]
- [42] M. S. Greenblatt, W. P. Bennett, M. Hollstein, C. C. Harris. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*, 54(18):4855–4878, 1994. [cytowanie na str. 9]
- [43] H. P. Greenspan. Models for the growth of a solid tumor by diffusion. Stud Appl Math, 51(4):317-340, 1972. [cytowanie na str. 71]
- [44] C. W. Greider, E. H. Blackburn. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in tetrahymena extracts. *Cell*, 43(2):405-413, 1985. [cytowanie na str. 14]
- [45] P. Hahnfeldt, L. Hlatky. Resensitization due to redistribution of cells in the phases of the cell cycle during arbitrary radiation protocols. *Rad Res*, 145(2):134–143, 1996. [cytowanie na str. 41]
- [46] P. Hahnfeldt, D. Panigrahy, J. Folkman, L. Hlatky. Tumor development under angiogenic signaling a dynamical theory of tumor growth, treatment response, and postvascular dormancy. *Cancer Res*, 59(19):4770–4775, 1999. [cytowanie na str. 71]
- [47] C. B. Harley, A. B. Futcher, C. W. Greider. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 345:458-460, 1990. [cytowanie na str. 15]
- [48] L. Hayflick. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. Exp Cell Res, 37(3):614-636, 1965. [cytowanie na str. 13]
- [49] L. Hayflick, P. S. Moorhead. The serial cultivation of human diploid cell strains. Exp Cell Res, 25(3):585-621, 1961. [cytowanie na str. 13]
- [50] R. M. Hoffman. In vitro sensitivity assays in cancer: a review, analysis, and prognosis. J Clin Lab Anal, 5(2):133-143, 1991. [cytowanie na str. 93]

- [51] O. Hupe, U. Ankerhold. Determination of ambient and personal dose equivalent for personnel and cargo security screening. *Radiat Prot Dosim*, 121(4):429–437, 2006. [cytowanie na str. 11]
- [52] R. Iyer, B. E. Lehnert. Factors underlying the cell growth-related bystander responses to α particles. *Cancer Res*, 60(5):1290–1298, 2000. [cytowanie na str. 12]
- [53] R. Iyer, B. E. Lehnert. Alpha-particle-induced increases in the radioresistance of normal human bystander cells. *Rad Res*, 157(1):3-7, 2002. [cytowanie na str. 12]
- [54] S. P. Jackson. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. Carcinogenesis, 23(5):687-696, 2002. [cytowanie na str. 8]
- [55] M. Jioner, A. J. van der Kogel. Basic clinical radiobiology. CRC Press, 2009. [cytowanie na str. 8]
- [56] T. B. Kepler, T. C. Elston. Stochasticity in transcriptional regulation: origins, consequences, and mathematical representations. *Biophys J*, 81(6):3116-3136, 2001. [cytowanie na str. 71]
- [57] S. Ko, X. Liao, S. Molloi, E. Elmore, J. L. Redpath. Neoplastic transformation in vitro after exposure to low doses of mammographic-energy X rays: Quantitative and mechanistic aspects. *Rad Res*, 162(6):646–654, 2004. [cytowanie na str. 11]
- [58] H. Kondoh, T. Maruyama, M. E. Lleonart. Senescence as a target of cancer therapy. Open Pathol, 2:57-62, 2008. [cytowanie na str. 13 i 15]
- [59] J. Łanuszewska, P. Widłak. Białka detektorowe rozpoznające pęknięcia nici DNA i ich udział w mechanizmach komórkowej odpowiedzi na stres. Postępy Biochemii, 49(4):229–238, 2003. [cytowanie na str. 8]
- [60] B. E. Lehnert, E. H. Goodwin. Extracellular factor(s) following exposure to α particles can cause sister chromatid exchanges in normal human cells. *Cancer Res*, 57(11):2164–2171, 1997. [cytowanie na str. 11]
- [61] M. E. LLeonart, A. Artero-Castro, H. Kondoh. Senescence induction: a possible cancer therapy. *Mol Cancer*, 8(3):1–19, 2009. [cytowanie na str. 16]
- [62] A. Łomnicki. Wprowadzenie do statystyki dla przyrodników. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2006. [cytowanie na str. 99 i 100]
- [63] E. C. Mackonis, N. Suchowerska, M. Zhang, M. Ebert, D. R. McKenzie, M. Jackson. Cellular response to modulated radiation fields. *Phys Med Biol*, 52(18):5469, 2007. [cytowanie na str. 3, 5, 12, 14, 73, 77, 80, 103, i 108]
- [64] E. Michalak, A. Villunger, M. Erlacher, A. Strasser. Death squads enlisted by the tumour suppressor p53. Biochem Bioph Res Co, 331(3):786-798, 2005. [cytowanie na str. 9]
- [65] J. Miękisz, J. Poleszczuk, M. Bodnar, U. Foryś. Stochastic models of gene expression with delayed degradation. Bull Math Biol, 73(9):2231-2247, Sep 2011. [cytowanie na str. 2]

- [66] C. Mothersill, C. Seymour. Medium from irradiated human epithelial cells but not human fibroblasts reduces the clonogenic survival of unirradiated cells. Int J Radiat Biol, 71(4):421-427, 1997. [cytowanie na str. 11]
- [67] C. Mothersill, C. Seymour. Radiation-induced bystander effects: past history and future directions. *Rad Res*, 155(6):759-767, 2001. [cytowanie na str. 11]
- [68] H. Nagasawa, J. B. Little. Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of α-particles. *Cancer Res*, 52(22):6394–6396, 1992. [cytowanie na str. 9, 10, i 11]
- [69] G. J. Neary. Chromosome aberrations and the theory of RBE: 1. General considerations. Int J Radiat Biol, 9(5):477-502, 1965. [cytowanie na str. 40]
- [70] L. M. Orre, B. Stenerlöw, S. Dhar, R. Larsson, R. Lewensohn, J. Lehtiö. p53 is involved in clearance of ionizing radiation-induced RAD51 foci in a human colon cancer cell line. *Biochem Bioph Res Co*, 342(4):1211–1217, 2006. [cytowanie na str. 25, 43, i 48]
- [71] M. J. Piotrowska, S. D. Angus. A quantitative cellular automaton model of in vitro multicellular spheroid tumour growth. J Theor Biol, 258(2):165-178, 2009. [cytowanie na str. 25, 55, 58, i 59]
- [72] M. J. Piotrowska, M. Bodnar, J. Poleszczuk, U. Foryś. Mathematical modelling of immune reaction against gliomas: Sensitivity analysis and influence of delays. *Nonlinear Anal-Real*, 14(3):1601–1620, Jun 2013. [cytowanie na str. 2]
- [73] J. Poleszczuk, M. Bodnar, U. Foryś. New approach to modeling of antiangiogenic treatment on the basis of Hahnfeldt et al. model. *Math Biosci Eng*, 8(2):591–603, Apr 2011. [cytowanie na str. 2]
- [74] J. Poleszczuk, U. Foryś. Angiogenesis process with vessel impairment for Gompertzian and logistic type of tumour growth. Appl Math, 36(3):313-331, 2009. [cytowanie na str. 2]
- [75] J. Poleszczuk, U. Foryś. A delay-differential equation model of HIV related cancer-immune system dynamics. *Math Biosci Eng*, 8(2):627-641, Apr 2011. [cytowanie na str. 2]
- [76] J. Poleszczuk, I. Skrzypczak. Tumour angiogenesis model with variable vessels effectiveness. Appl Math, 38(1):33–49, 2011. [cytowanie na str. 2]
- [77] K. M. Prise. Studies of bystander effects in human fibroblasts using a charged particle microbeam. Int J Radiat Biol, 74(6):793-798, 1998. [cytowanie na str. 12]
- [78] T. T. Puck, P. I. Marcus. A rapid method for viable cell titration and clone production with HeLa cells in tissue culture: the use of X-irradiated cells to supply conditioning factors. *PNAS*, 41(7):432, 1955. [cytowanie na str. 93]
- [79] T. T. Puck, P. I. Marcus. Action of X-rays on mammalian cells. J Exp Med, 103(5):653-666, 1956. [cytowanie na str. 93]

- [80] P. M. Ridker, N. Rifai, M. J. Stampfer, C. H. Hennekens. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation*, 101(15):1767–1772, 2000. [cytowanie na str. 69]
- [81] D. Röhme. Evidence for a relationship between longevity of mammalian species and life spans of normal fibroblasts in vitro and erythrocytes in vivo. PNAS, 78(8):5009-5013, 1981. [cytowanie na str. 14]
- [82] K. Roszkowski, M. Foksiński. Wpływ promieniowania jonizującego na DNA komórki. Współczesna Onkologia, 9:284–286, 2005. [cytowanie na str. 8]
- [83] J. Rzeszowska-Wolny, W. M. Przybyszewski, M. Wideł. Ionizing radiation-induced bystander effects, potential targets for modulation of radiotherapy. *Eur J Pharmacol*, 625(1-3):156-164, 2009. [cytowanie na str. 3, 10, 12, i 16]
- [84] M. G. Sargent. Synchronous cultures of Bacillus subtilis obtained by filtration with glass fiber filters. J Bacteriol, 116(2):736-740, 1973. [cytowanie na str. 56]
- [85] M. Serrano, A. W. Lin, M. E. McCurrach, D. Beach, S. W. Lowe. Oncogenic RAS provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16^{INK4a}. Cell, 88(5):593-602, 1997. [cytowanie na str. 15]
- [86] A. Skłodowska, B. Gostkowska. Promieniowanie jonizujące a człowiek i środowisko. Wydawnictwo Naukowe Scholar, 1994. [cytowanie na str. 8 i 21]
- [87] J. A. Smith, L. Martin. Do cells cycle? PNAS, 70(4):1263-1267, 1973. [cytowanie na str. 57 i 62]
- [88] J. R. Smith, Y. Ning, O. M. Pereira-Smith. Why are transformed cells immortal? Is the process reversible? Am J Clin Nutr, 55(6):1215S-1221S, 1992. [cytowanie na str. 15]
- [89] R. G. Steel, J. H. Torrie, D. A. Dickey. Principles and procedures of statistics: A biometrical approach. McGraw-Hill, 1996. [cytowanie na str. 100 i 101]
- [90] I. F. Tannock. Population kinetics of carcinoma cells, capillary endothelial cells, and fibroblasts in a transplanted mouse mammary tumor. *Cancer Res*, 30(10):2470– 2476, 1970. [cytowanie na str. 57]
- [91] I. W. Taylor, P. J. Hodson, M. D. Green, R. L. Sutherland. Effects of tamoxifen on cell cycle progression of synchronous MCF-7 human mammary carcinoma cells. *Cancer Res*, 43(9):4007–4010, 1983. [cytowanie na str. 56]
- [92] H. D. Thames. Repair kinetics in tissues: alternative models. Radiother Oncol, 14(4):321-327, 1989. [cytowanie na str. 41]
- [93] E. L. Travis, S. L. Tucker. Isoeffect models and fractionated radiation therapy. Int J Radiat Oncol, 13(2):283-287, 1987. [cytowanie na str. 41]
- [94] B. van der Loo, R. Labugger, J. N. Skepper, M. Bachschmid, J. Kilo, J. M. Powell, M. Palacios-Callender, J. D. Erusalimsky, T. Quaschning, T. Malinski. Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging. *J Exp Med*, 192(12):1731– 1744, 2000. [cytowanie na str. 16]

- [95] E. van Rongen, H. D. Thames Jr, E. L. Travis. Recovery from radiation damage in mouse lung: Interpretation in terms of two rates of repair. *Rad Res*, 133(2):225-233, 1993. [cytowanie na str. 41]
- [96] Z. L. Whichard, C. A. Sarkar, M. Kimmel, S. J. Corey. Hematopoiesis and its disorders: a systems biology approach. *Blood*, 115:2339–2347, 2010. [cytowanie na str. 1]
- [97] D. L. Wise, G. Houghton. Diffusion coefficients of neon, krypton, xenon, carbon monoxide and nitric oxide in water at 10-60 C. Chem Eng Sci, 23(10):1211-1216, 1968. [cytowanie na str. 70]
- [98] M. Xin, J. Zhang, E. R. Block, J. M. Patel. Senescence-enhanced oxidative stress is associated with deficiency of mitochondrial cytochrome c oxidase in vascular endothelial cells. *Mech Ageing Dev*, 124(8):911-919, 2003. [cytowanie na str. 16]
- [99] J. Yokota. Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis*, 21(3):497-503, 2000.
 [cytowanie na str. 15]
- [100] A. Young, M. Narita. SASP reflects senescence. EMBO Rep, 10(3):228-230, 2009. [cytowanie na str. 16]

Dodatki

Dodatek A

Procedury eksperymentalne i numeryczne

A.1 Frakcja przeżywających komórek klonogennych

Obliczanie frakcji przeżywających komórek klonogennych jest metodą powszechnie stosowaną do mierzenia wpływu radioterapii i innych środków leczniczych na komórki nowotworowe [50]. Metoda została zaproponowana w połowie lat pięćdziesiątych ubiegłego wieku [78, 79] i opiera się na zliczaniu kolonii, które powstają podczas hodowli komórkowej. Jeżeli niewielka liczba nieleczonych komórek nowotworowych (około 5-10 komórek/cm²) zostanie umieszczona na płytce hodowlanej razem z wystarczającą ilością substancji odżywczych, to część z posianych komórek na drodze kolejnych podziałów uformuje kolonie [36]. Komórkę, wokół której po czasie odpowiadającym około 5-6 cyklom podziału komórkowego (7–14 dni) powstanie kolonia składająca się z co najmniej 50 komórek, nazywamy klonogenną. To właśnie komórki klonogenne są główną siłą napędową rozwoju nowotworu. Ich frakcję w populacji (PE), nazywaną wydajnością klonowania, obliczamy w następujący sposób:

$$PE = \frac{\text{liczba uformowanych kolonii}}{\text{liczba posianych komórek}}$$

gdzie zliczane są kolonie złożone z co najmniej 50 komórek. Po zaaplikowaniu promieniowania jonizującego lub innego potencjalnego środka terapeutycznego, komórki posiewa się na płytki hodowlane i po upływie tego samego czasu co przy wyliczaniu wartości PE dla komórek nieleczonych znów zliczane są kolonie. Frakcję przeżywających komórek klonogennych (SF) po ekspozycji na czynnik określa się poprzez formułę:

```
SF = \frac{\text{liczba ufromowanych kolonii po zastosowaniu leczenia}}{\text{liczba posianych leczonych komórek} \times PE},
```

gdzie PE jest uprzednio wyznaczoną frakcją komórek klonogennych w nieleczonej populacji.

A.2 Funkcje służące do wybierania miejsca dla komórki potomnej

```
function indices = miejscaWOdleglosci(node,dist,n1,n2)
%MIEJSCAWODLEGLOSCI - funkcja zwracająca indeksy wszystkich miejsc na
%siatce, które znajdują się w danej odległości od komórki.
%node - współrzędna komórki na siatce zapisana jako (j-1)*n2+i
%dist - zadana odległość
%n1 i n2 - wymiar siatki (n1-szerokość, n2-wysokość)

i=mod(node-1,n2)+1;
j=ceil(node/n2);
klatka=[i+[-dist*ones(2*dist+1,1); dist*ones(2*dist+1,1);...
repmat((-dist+1):(dist-1),1,2)'],...
j+[repmat(-dist:dist,1,2)'; -dist*ones(2*dist-1,1);...
dist*ones(2*dist-1,1) ]];

klatka=klatka(klatka(:,1)<=n2 & klatka(:,1)>0 & ...
klatka(:,2)<=n1 & klatka(:,2)>0,:);
indices=(klatka(:,1)+n2*(klatka(:,2)-1))';
```

```
end
```

```
function [indx, dist] = znajdzNajblizszeWolneMiejsce(node, cells)
%ZNAJDZNAJBLIZSZEWOLNEMIEJSCE - funkcja zwracająca najbliższe
%wolne miejsce dla danej komórki. Jeśli jest więcej niż jedno
%miejsce w danej odległości, to na drodze losowania wybierane
%jest tylko jedno.
%node - współrzędna komórki na siatce zapisana jako (j-1)*n2+i,
% gdzie n2 to wysokość siatki
%cells - macierz logiczna zawierająca informacje o zajętości
% miejsc na siatce
indx=[];
dist=1;
```

A.2. FUNKCJE SŁUŻĄCE DO WYBIERANIA MIEJSCA DLA KOMÓRKI POTOMNEJ

```
[n2, n1]=size(cells);
        while isempty(indx) %dopóki nie wybrano wolnego miejsca
            %wyznacz miejsca w odleglości dist
            indxW=miejscaWOdleglosci(node,dist,n1,n2);
            if ~isempty(indxW) %jesteśmy jeszcze na siatce
                %wartości z macierzy opisującej stan układu
                zajetosc=cells(indxW);
                inw=find((zajetosc-1)<0);</pre>
                if ~isempty(inw) %jest jakieś wolne miejsce?
                    %wylosuj jedno z miejsc
                    inw=inw(randperm(length(inw),1));
                    indx=indxW(inw);
                else
                    dist=dist+1; %zwiększ odległość poszukiwania
                end
            else %szukamy już poza siatką
                break;
            end
        end
end
function sciezka = znajdzSciezke(nodeM, nodeD, dist, n1, n2)
%ZNJADZSCIEZKIE - funkcja zwracająca losową najkrótszą ścieżkę łączącą
%dwa zadane miejsca.
%nodeM, nodeD - współrzędne miejsc do połączenia zapisane
                jako (j-1)*n2+i
%dist - odległość pomiędzy zadanymi miejscami (MUSI BYĆ PORPAWNA!)
%n1 i n2 - wymiar siatki (n1-szerokość, n2-wysokość)
```

```
sciezka=zeros(1,dist);
```

%

95

```
init=nodeM;
for i=1:(dist-1)
    set1=miejscaWOdleglosci(init,1,n1,n2);
    set2=miejscaWOdleglosci(nodeD,dist-i,n1,n2);
    kandydatki=intersect(set1,set2);
    sciezka(i)=kandydatki(randperm(length(kandydatki),1));
    init=sciezka(i);
end
sciezka(end)=nodeD;
```

```
end
```

A.3 Funkcje generująca macierze i wektory określające układ równań różniczkowych liniowych wynikający z metody elementów skończonych

```
function A=zbudujMacierzAh(c,D,n1,n2,h)
%ZBUDUJMACIERZAH - funkcja zwracająca macierz układu równań liniowych,
%która wynika z zastosowania metody MES z elementami kwadratowymi i
%funkcjami kawałkami liniowymi
%c - tempo degradacji substancji
%D - współczynnik dyfuzji
%n1 - liczba rozważanych elementów w poziomie
%n2 - liczba rozważanych elementów w pionie
%h - długość boku kwadratu
        n1=n1+1; n2=n2+1; %zmieniamy na liczbę węzłów
        N=n1*n2;
        A=zeros(N,9);
        aux=(c*4/9*h^2+D*8/3)*1/2*[1/2 ones(1,n2-2) 1/2];
        A(:,5)=[aux repmat(2*aux,1,n1-2) aux];
        aux=(c/9*h^2-D*1/3)/2*ones(1,n2-1);
        aux2=[aux 0];
        A(:,4)=[aux2 repmat(2*aux2,1,n1-2) aux2];
```

```
A.3. FUNKCJE GENERUJĄCA MACIERZE I WEKTORY OKREŚLAJĄCE
UKŁAD RÓWNAŃ RÓŻNICZKOWYCH LINIOWYCH WYNIKAJĄCY Z METODY
ELEMENTÓW SKOŃCZONYCH 97
A(:,6)=[0 aux2 repmat(2*aux2,1,n1-2) aux];
aux=(c/9*h^2-D*1/3)*[1/2 ones(1,n2-2) 1/2];
A(:,2)=repmat(aux,1,n1);
A(:,8)=repmat(aux,1,n1);
```

```
aux=(c/36*h^2-D*1/3)*ones(1,n2-1);
A(:,1)=repmat([aux 0],1,n1);
A(:,3)=repmat([0 aux],1,n1);
```

```
A(:,7)=A2(:,1);
A(:,9)=A2(:,3);
```

A=spdiags(A2,[-n2-1 -n2 -n2+1 -1 0 1 n2-1 n2 n2+1],N,N);

```
end
```

```
function R=zbudujWektorFh(s,cellsSen,n2,h)
%ZBUDUJWEKTORFH - funkcja
%s - tempo wydzielania substancji przez komórki w stanie senescenji
%cellsSen - wektor zawierający współrzędne komórek w stanie senescencji
            zapisane jako (j-1)*n2+i, gdzie n2 to liczba elementów
%
%
            w pionie
%n2 - liczba rozważanych elementów w pionie
%h - długość boku elementu (kwadrat)
   n1=n1+1; n2=n2+1; %zmieniamy na liczbę węzłów
  N=n1*n2;
       R=zeros(N,1);
       cellsSen2=1+mod(cellsSen-1,n2-1)+floor((cellsSen-1)/(n2-1))*n2;
       ind=[cellsSen2 cellsSen2+1 cellsSen2+n2 cellsSen2+n2+1];
       for it=ind
       R(it)=R(it)+s*h^{2}/4;
       end
```

DODATEK A. PROCEDURY EKSPERYMENTALNE I NUMERYCZNE

end

98

Dodatek B

Wykorzystane narzędzia statystyczne

B.1 Test t-Studenta różnicy pomiędzy średnimi

Mianem testu t-Studenta określamy dowolny test statystyczny, w którym badana statystyka (odwzorowanie przekształcające element losowy w odpowiednią przestrzeń rzeczywistą) ma rozkład t-Studenta, o ile spełniona jest hipoteza zerowa. Test tego typu jest bardzo często wykorzystywany przy sprawdzaniu, czy średnie empiryczne z dwóch niezależnych prób różnią się od siebie w sposób istotny [62]. Mówiąc dokładniej, z testu t-Studenta możemy skorzystać, gdy daną cechę w dwóch badanych populacjach opisują niezależne zmienne losowe o rozkładzie normalnym X oraz Y (o nieznanych parametrach), a hipoteza zerowa mówi o równości pomiędzy średnimi $\langle X \rangle = \langle Y \rangle$. W przypadku eksperymentów na komórkach *in vitro*, najczęściej zakłada się, że różnice pomiędzy wartościami pomiaru w dwóch niezależnych powtórzeniach tego samego eksperymentu są następstwem niedokładności pomiaru. O błędzie pomiaru zakłada się natomiast, że ma rozkład normalny.

Załóżmy, że dysponujemy skończoną liczbą realizacji obu rozważanych zmiennych losowych X i Y, czyli odpowiednio ciągami (próbami) $x_1, ..., x_{n_1}$ oraz $y_1, ..., y_{n_2}$. W przypadku równej długości prób $(n_1=n_2=N)$ i przy założeniu, że wariancje zmiennych X i Y są różne, możemy skonstruować następującą statystykę testową

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{\sqrt{s_x^2/N + s_y^2/N}} \,,$$

gdzie $\overline{\cdot}$ oraz s^2_{\cdot} oznaczają odpowiednio średnią i wariancję empiryczną z danej próby. Jeśli rzeczywiście różnica pomiędzy średnimi wynosi zero (hipoteza zerowa jest spełniona), to statystka t ma rozkład t-Studenta z N-1 stopniami swobody [62]. Odpowiednią statystykę można również skonstruować, gdy wariancje zmiennych X i Y są równe, por. [89]. Po wstępnej analizie danych, dla wszystkich testów istotności wykonanych w niniejszej rozprawie przyjęliśmy założenie o nierównych wariancjach.

Po obliczeniu wartości powyższej statystyki dla zebranych danych doświadczalnych należy określić p-wartość testu, czyli teoretyczne prawdopodobieństwo otrzymania takiej lub większej (co do modułu, jeśli tak jak w naszym przypadku test jest dwustronny) wartości statystyki, gdy spełnione są założenia hipotezy zerowej. Wartość tego prawdopodobieństwa możemy obliczyć na podstawie dystrybuanty rozkładu t-Studenta, por. [62]. Jeśli p-wartość jest odpowiednio mała (najczęściej przyjmuje się wartość graniczną równą 0,05) należy odrzucić hipotezę zerową mówiącą o równości średnich. W przeciwnym przypadku nie mamy podstaw, aby twierdzić, że różnice w średnich pomiędzy badanymi próbami są istotne.

B.2 Zależność pomiędzy zmiennymi

Najczęściej wykorzystywaną miarą zależności pomiędzy badanymi zmiennymi jest współczynnik korelacji Pearsona (klasycznie nazywany po prostu współczynnikiem korelacji) zdefiniowany jako

$$\rho = \frac{\langle X \cdot Y \rangle - \langle X \rangle \langle Y \rangle}{\sqrt{\operatorname{Var}\left(X\right) \cdot \operatorname{Var}\left(Y\right)}} \,,$$

gdzie $\langle \cdot \rangle$ oznacza wartość oczekiwaną, a Var(\cdot) wariancję danej zmiennej losowej. Wartość tego współczynnika, która mieści się w przedziale [-1,1], określa stopień liniowej zależności pomiędzy badanymi zmiennymi X oraz Y [62, 89]. Dla $\rho = 1$ ($\rho = -1$) zależność pomiędzy zmiennymi jest idealnie liniowa i dodatnia (ujemna), czyli wraz ze wzrostem wartości jednej zmiennej rośnie (maleje) wartość tej drugiej. W przypadku $\rho = 0$ mówimy o braku liniowej zależności pomiędzy badanymi zmiennymi. Należy jednak pamiętać, że $\rho = 0$ nie wyklucza istnienia zależności.

Gdy mamy do dyspozycji jedynie n niezależnych par (x_i, y_i) realizacji zmiennych X oraz Y, możemy estymować teoretyczny współczynnik korelacji ρ w następujący sposób

$$R = \frac{\sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x}) (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^{n} (y_i - \bar{y})^2}},$$

gdzie $\bar{\cdot}$ oznacza średnią empiryczną z próbki. Co ważne, jeśli obie zmienne losowe mają rozkład normalny, istnieje nieskomplikowana transformacja empirycznego

współczynnika korelacji R, która ma rozkład t-Studenta, o ile zmienne X i Y są nieskorelowane. Zatem, tak jak w przypadku testu różnicy pomiędzy średnimi, możemy określić istotność otrzymanego wyniku (hipoteza zerowa mówi o braku korelacji, czyli $\rho = 0$), por. [89].

B.3 Współczynnik determinacji modelu

Załóżmy, że na podstawie pomiarów eksperymentalnych skonstruowano ciąg danych dwucechowych $(x_1, y_1), ..., (x_n, y_n)$, do którego dopasowano następnie ciągłą krzywą opisaną równaniem y = f(x). Współczynnik determinacji, oznaczany jako R^2 , wskazuje jak dobrze do danych eksperymentalnych dopasowuje się badana krzywa $f(x) \pmod{89}$. W przypadku ogólnej postaci dopasowywanej krzywej f(x), współczynnik determinacji definiuje się jako

$$R^{2} = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{n} (y_{i} - f(x_{i}))^{2}}{\sum_{i=1}^{n} (y_{i} - \bar{y})^{2}}.$$

gdzie \bar{y} jest średnią empiryczną z próby $y_1, ..., y_n$. Drugi człon powyższego równania interpretowany jest jako część wariancji w wartościach zmiennej zależnej y, której dopasowany model nie jest w stanie wyjaśnić na podstawie wartości zmiennej niezależnej x.

W przypadku prostej regresji liniowej (f(x) = ax + b) całkowitą wariancję próby $y_1, ..., y_n$ można zapisać jako

$$\sum_{i=1}^{n} (y_i - \bar{y})^2 = \sum_{i=1}^{n} (y_i - f(x_i))^2 + \sum_{i=1}^{n} (f(x_i) - \bar{y})^2 ,$$

co pozwala wyrazić współczynnik determinacji w postaci

$$R^{2} = \frac{\sum_{i=1}^{n} \left(f(x_{i}) - \bar{y}\right)^{2}}{\sum_{i=1}^{n} \left(y_{i} - \bar{y}\right)^{2}},$$

którą można zinterpretować wprost jako część wariancji w wartościach zmiennej zależnej y wyjaśnianą przez dopasowany model na podstawie wartości zmiennej niezależnej x. Co więcej, w przypadku prostej regresji liniowej współczynnik determinacji to współczynnik korelacji Pearsona podniesiony do kwadratu [89].
Spis rysunków

2.1	Schematyczne przedstawienie odpowiedzi komórki na powstanie dwu- niciowego pęknięcia DNA. Białka detektorowe wykrywają powstałe pęknięcie i przekazują sygnał dalej do białek mediatorowych. Róż- norakie kaskady sygnałowe prowadzą do zmian w regulacji różnych	
	aspektów funkcjonowania komórki	9
2.2	Podział efektów popromiennych w zależności od sposobu napromienia- nia. Klasyczny efekt sąsiedztwa (A) występuje, gdy jedynie niektóre komórki z napromienianej populacji otrzymują niezerową dawkę pro-	
	mieniowania. Efekt widza (B) ma miejsce, gdy dochodzi do zmian w ko- mórkach, które były poza napromienianym rejonem. Efekt kohorty (C)	
	obejmuje zmiany, jakie wywołują pomiędzy sobą komorki, ktore otrzy- mały pewną dawkę promieniowania. Szary kolor na rysunkach oznacza	
	komórkę, która otrzymała niezerową dawkę promieniowania, a strzałki	
	— możliwą sygnalizację międzykomórkową.	10
2.3	Przestrzenne wzorce napromieniania rozważane przez E. C. Mackonis	
	i in. [63]. Ciemnoszare fragmenty przedstawiają obszary butelek ho-	
	dowlanych, które były osłonięte przed promieniowaniem	12
2.4	Komórki raka jelita grubego HCT116 p53 $+/+$ w stanie senescencji (A) oraz HCT116 p53 $-/-$ wykazujące morfologiczne cechy apoptozy	
	$({\rm B})$ po ekspozycji na dawkę 8 Gy promieniowania X. Komórka w stanie	
	senescencji charakteryzuje się dużo większą objętością oraz znacząco	
	powiększonym jądrem. Zdjęcia z eksperymentów własnych	15
2.5	W wyniku działania promieniowania jonizującego (obszar w czerwo- nym okregu) w populacji indukowana jest pewna liczba komórek w sta-	
	nie senescencji (kolor zielony). Komórki te zaczynaja wydzielać sub-	
	stancje o ograniczonym zasiegu działania i mogace uszkodzić DNA in-	
	nych komórek (czarne okręgi wyznaczają zasięg) oraz substancje o da-	
	lekim zasięgu działania i mogące pobudzić komórki do podziałów (zie-	
	lone gwiazdki).	17

3.1	Zestaw wykorzystany do badania efektu sąsiedztwa. Do poszczegól- nych dołków zawierających napromieniane komórki, wstawiane są in- serty, w których znajdują się komórki nie wystawione na działanie promieniowania.	20
3.2	Układ eksperymentalny wykorzystany do badania efektu sąsiedztwa. Komórki po 20 godzinach od posiania w dołkach poddawane są działa- niu promieniowania jonizującego. Po upływie około 10 minut do doł- ków wstawiane sa inserty z komórkami posianymi również 20 godzin wcześniej	91
3.3	Przykładowe zdjęcie fragmentu płytki hodowlanej po przeprowadze- niu wybarwiania komórek odznaczających się zwiększoną ekspresją β - galaktorydazy (komórek w stanie senescencji)	21 93
3.4	Zmierzony eksperymentalnie stosunek liczby komórek znajdujących się w dołkach po 48 godzinach koinkubacji do ich liczby przed napromie- nianiem. Przedstawione są średnia i odchylenie standardowe z czterech niezależnych eksperymentów.	20
3.5	Zmierzony eksperymentalnie stosunek liczby komórek w insertach po 48 godzinach koinkubacji do ich liczby przed koinkubacją. Przedsta- wione są średnia i odchylenie standardowe z czterech niezależnych eks-	
3.6	perymentów	26 27
3.7	Odsetek komórek w stanie senescencji w populacji komórek znajdu- jących się w insertach sąsiadujących z napromienionymi dołkami. Po- miar został wykonany po 48 godzinach koinkubacji. Przedstawione są średnia i odchylenie standardowe z ośmiu niezależnych eksperymentów.	28
3.8	Odsetek komórek w stanie senescencji zmierzony w populacji nietrans- formowanych ludzkich fibroblastów (NHDF) bezpośrednio napromie- nianych w dołku oraz koinkubowanych w sąsiadujących insertach. Po- miar został wykonany po 48 godzinach koinkubacji. Przedstawione są	
3.9	średnia i odchylenie standardowe z czterech niezależnych eksperymentów. Odsetek komórek apoptotycznych w populacji bezpośrednio napromie- nianej w dołkach. Pomiar został wykonany po 48 godzinach koinku- bacji. Przedstawione są średnia i odchylenie standardowe z czterech	29
3.10	niezależnych eksperymentów	30
	niezależnych eksperymentów.	31

104

3.11	Zmierzona eksperymentalnie frakcja przeżywających komórek klono- gennych dla populacji komórek bezpośrednio napromienianych. Przed- stawione są średnia i odchylenie standardowe z czterech niezależnych eksperymentów.	32
3.12	Zmierzona eksperymentalnie frakcja przeżywających komórek klono- gennych dla populacji komórek koinkubowanych z komórkami bezpo- średnio napromienianymi. Przedstawione są średnia i odchylenie stan- dardowe z czterech niezależnych eksperymentów	33
3.13	Zależność pomiędzy względnymi liczbami komórek w stanie senescencji w populacjach bezpośrednio napromienianej oraz sąsiadującej. Ciągła linia przedstawia najlepiej odpowiadający danym eksperymentalnym model liniowy (podane jest również odpowiadające modelowi równa- nie wraz z wyliczonym współczynnikiem determinacji R^2). Przerywane linie opisują 95% przedział ufności dla modelu. Symbol *** oznacza p-wartość dla korelacji (R) wynoszącą mniej niż 0,001	34
3.14	Zależność pomiędzy względną liczbą komórek w stanie senescencji w po- pulacji bezpośrednio napromienianej i frakcją przeżywających komórek klonogennych w populacji sąsiadującej. Ciągła linia przedstawia naj- lepiej odpowiadający danym eksperymentalnym model liniowy (poda- ne jest również odpowiadające modelowi równanie wraz z wyliczonym współczynnikiem determinacji R^2). Przerywane linie opisują 95% prze- dział ufności dla modelu. Symbol ** oznacza p-wartość dla korelacji (R) wynoszącą mniej niż 0,01.	35
3.15	Zależność pomiędzy względną liczbą komórek w stanie senescencji w po- pulacji bezpośrednio napromienianej i względną wielkością populacji sąsiadującej po zakończeniu koinkubacji. Ciągła linia przedstawia naj- lepiej odpowiadający danym eksperymentalnym model liniowy (poda- ne jest również odpowiadające modelowi równanie wraz z wyliczonym współczynnikiem determinacji R^2). Przerywane linie opisują 95% prze- dział ufności dla modelu. Symbol ** oznacza p-wartość dla korelacji (R) wynoszącą mniej niż 0,01	36
4.1	Krzywe wynikające z modelu liniowo-kwadratowego (4.2) dla komórek bezpośrednio napromienianych i otrzymane w wyniku dopasowywa- nia modelu do danych eksperymentalnych. Parametry odpowiadające	
4.2	krzywym na wykresie przedstawione zostały w tabeli 4.2 Krzywe wynikające z rozszerzonego modelu liniowo-kwadratowego (4.9) dla komórek bezpośrednio napromienianych (A) oraz sąsiadujących (B), które zostały otrzymane w wyniku dopasowywania modelu do da- nych eksperymentalnych. Parametry odpowiadające krzywym na wy-	42
	kresach przedstawione zostały w tabeli 4.4.	49

4.3	Porównanie przebiegu funkcji $g(s)$ (4.8) dla parametrów przedstawio- nych w tabeli 4.4 z jej skokowym przybliżeniem $\tilde{g}(s)$ (4.10). Za punkt nieciągłości $\tilde{g}(s)$ przyjęto punkt przegięcia funkcji $g(s)$	52
5.1	Podstawowe założenia modelu. (A) Każda komórka może zajmować tylko jedno miejsce na skończonej dwuwymiarowej regularnej siatce kwadratowej. Na różowo i zielono zaznaczone są miejsca znajdujące się w odległości odpowiednio 1 i 2 od komórki znajdującej się w miejscu (2,3). (B) Nowo powstała komórka potomna umieszczana jest w bezpo- średnim otoczeniu komórki macierzystej. W przypadku braku miejsca, losowane jest jedno z miejsc w najmniejszej odległości od komórki ma- cierzystej (jedno z tych zaznaczonych na zielono), a następnie komórki	
	są na nie kolejno przesuwane, aby zrobić miejsce dla komórki potomnej.	57
5.2	Cykl komórkowy jest podzielony na kilka następujących po sobie faz: G ₁ , S, G ₂ i M, przy czym faza G ₁ może przejść w fazę spoczynkową G ₀ .	58
5.3	Przykładowe wykresy gęstości rozkładu log-normalnego $f(t; \mu, \sigma^2)$ opi- sującego czas trwania fazy G ₁ cyklu komórkowego dla różnych wartości parametru μ i przy ustalonym $\sigma^2 = 1$	59
5.4	Uproszczony schemat blokowy algorytmu wykorzystanego do symulo-	
	wania proponowanego automatu komórkowego.	61
5.5	Zależność odsetka komórek klonogennych w populacji od wielkości pa- rametru μ , czyli wspólnego dla każdej komórki parametru opisującego rozkład długości trwania fazy spoczynkowej cyklu komórkowego, por. równania (5.1) i (5.2). Zaprezentowane są średnia i odchylenie stan-	
	dardowe z 50 symulacji.	62
5.6	Przykładowe wizualizacje układu po przyjętych 7 dniach hodowli dla różnych wartości parametru μ . Symulacje rozpoczęły się od 100 komó- rek posianych w losowe miejsca siatki. W czerwone okręgi wzięte są te kolonie, które składaja się z wiecej niż 50 komórek	63
5.7	kolonic, które składają się 2 więcej m2 so kolnorek. Trach i które składają się 2 więcej m2 so kolnorek. Trach i które i lustracja krzywych wykorzystanych do ekstrapolacji danych eksperymentalnych dotyczących linii komórkowej HCT116 p53 $+/+$. (A) Krzywa wykładnicza (5.3) opisująca względną wielkość populacji na koniec koinkubacji, por. rys. 3.4. (B) Krzywa wykładnicza (5.5) opisująca odsetek komórek w stanie senescencji na koniec koinkubacji, por.	00
5.8	rys. 3.6	65
	hodowli	66

5.9	Otrzymane numerycznie stacjonarne rozwiązania równania (5.7) dla	
	substancji n_s (A) i n_n (B) dla parametrów przedstawionych w tabe-	
	li 5.2	70
5.10	Tempo zbieżności rozwiązania równania (5.7) startującego z zerowe-	
	go warunku początkowego do stanu stacjonarnego przedstawionego na	
	rys. 5.9 dla substancji n_s (A) i n_n (B). Na wykresach przedstawio-	
	na jest zależna od czasu dyskretna norma infimum różnicy pomiędzy	
	rozwiązaniem $n(x,t)$ a rozwiązaniem stacjonarnym n_{stac}	71
5.11	Stan systemu po 24 godzinach od napromienienia dawką 6 Gy. (Po	
	lewej) Układ, w którym 75% obszaru znajduje się pod osłoną. (Po	
	prawej) Układ bez osłony. Czerwonymi kropkami oznaczone są komór-	
	ki w stanie senescencji, których liczba (\mathbf{N}_s) oraz odsetek w populacji	
	podany jest nad wykresem.	75
5.12	Stan systemu po 7 dniach od napromieni enia dawką 6 Gy. (Po ${\rm lewej})$	
	Układ, w którym 75% obszaru znajduje się pod osłoną. (Po prawej)	
	Układ bez osłony. Czerwonymi kropkami oznaczone są komórki w sta-	
	nie senescencji, których liczba (\mathbf{N}_s) oraz odsetek w populacji podany	
	${\rm jest \ nad \ wykresem}. \ . \ . \ . \ . \ . \ . \ . \ . \ . \$	76
5.13	Stan układu po 7 dniach od napromieni enia ćwiartki obszaru dawką 12	
	Gy. Czerwonymi kropkami oznaczone są komórki w stanie senescencji,	
	których liczba (N_s) oraz odsetek w populacji podany jest nad wykresem.	78

Spis tabel

2.1	Podsumowanie wyników eksperymentalnych przedstawionych w [63]. Kolorami zaznaczone są zestawy wartości, które wskazują na pozytyw- ny (zwiększający przeżywalność) wpływ sygnałów wysyłanych przez komórki napromienione.	14
4.1	Błąd dopasowania modelu liniowo-kwadratowego do danych ekspery- mentalnych opisujących frakcję przeżywających komórek klonogennych.	41
4.2	Parametry modelu liniowo-kwadratowego (4.2) otrzymane w wyni- ku dopasowywania modelu do danych eksperymentalnych opisujących frakcję komórek przeżywających.	43
4.3	Błąd dopasowania rozszerzonego modelu liniowo-kwadratowego (4.9) do danych eksperymentalnych opisujących frakcję przeżywających ko- mórek klonogennych.	50
4.4	Parametry zmodyfikowanego modelu liniowo-kwadratowego (4.9) otrzy- mane w wyniku dopasowywania modelu do danych eksperymentalnych opisujących frakcję komórek przeżywających.	51
4.5	Błąd dopasowania rozszerzonego modelu liniowo-kwadratowego (4.9), gdy funkcja $g(s)$ przybliżana jest przez funkcję przełączeniową	53
5.1	Wartości parametru μ oszacowane przez porównanie predykcji modelu (por. rys. 5.5) z eksperymentalnymi pomiarami frakcji komórek klono- gennych (PE).	63
5.2	Przyjęte wartości parametrów równania (5.7) opisującego czasową i prze- strzenną ewolucję stężeń substancji prowzrostowych (n_s) oraz uszka- dzających DNA (n_n) , które wydzielane są przez komórki w stanie se- nesconcji	70
		10

5.3	Przewidywane przez model frakcje przeżywających komórek klonogen-	
	nych w poszczególnych obszarach siatki, w przypadku gdy stosowana	
	była dawka 6 Gy promieniowania. Podana są średnie \pm odchylenia	
	standardowe.	74
5.4	Przewidywana przez model frakcja przeżywających komórek klonogen-	
	nych dla populacji znajdującej się pod osłoną, w przypadku gdy nie-	
	osłonięta ćwiartka została napromieniona dawką 12 Gy. Podana jest	
	średnia \pm odchylenie standardowe.	77