



UNIWERSYTET
WARSZAWSKI

Wydział Fizyki
Instytut Fizyki Doświadczalnej
Zakład Fizyki Biomedycznej

Rozprawa doktorska

Wpływ egzosomów
na promieniowrażliwość komórek
nowotworowych gruczołu krokowego
w kontekście efektu sąsiedztwa
indukowanego promieniowaniem
jonizującym

Beata Pszczółkowska-Kępa

Promotor: dr hab. Beata Brzozowska, prof. UW

Dyscyplina: nauki fizyczne

Warszawa, maj 2025

Streszczenie

Zgodnie z danymi Światowej Organizacji Zdrowia z 2022 roku, nowotwór gruczołu krokowego jest jednym z najczęściej diagnozowanych nowotworów wśród mężczyzn w wielu krajach, zwłaszcza w Europie i Ameryce Północnej. Pomimo dostępnych terapii (m.in. chirurgii, chemioterapii, radioterapii czy immunoterapii) wciąż poszukuje się nowych metod leczenia pacjentów onkologicznych, co w ostatnich latach przyczyniło się do rosnącego zainteresowania badaniami nad egzosomami.

Głównym tematem projektu doktorskiego było zbadanie wpływu egzosomów na promieniowrażliwość komórek nowotworowych gruczołu krokowego oraz sprawdzenie, czy efekt sąsiedztwa indukowany promieniowaniem X może być aktywowany w komórkach za pomocą egzosomów wyizolowanych z napromienionych komórek. W tym celu przeprowadzono analizę indukcji apoptozy, będącej procesem programowanej śmierci komórki. Dodatkowo dokonano oceny formowania ognisk naprawczych γ H2AX w celu określenia, czy egzosomy indukują uszkodzenia DNA, oraz przeprowadzono analizę ich zawartości molekularnej (tzw. „cargo”) z wykorzystaniem techniki Western blot, co pozwoliło na ich identyfikację. Do zbadania odpowiedzi komórkowej na promieniowanie został również wykorzystany klonogenny test przeżywalności oraz testy cytotoksyczności – LDH i IL-6. Wpływ stresu indukowanego promieniowaniem na koncentrację oraz średnicę egzosomów wyizolowanych z komórek PC3 i DU145 sprawdzono przy użyciu metody NTA. W pracy wykorzystano źródło ^{241}Am i lampę RTG dostępne w Zakładzie Fizyki Biomedycznej na Wydziale Fizyki oraz w Środowiskowym Laboratorium Ciężkich Jonów. Moc dawki promieniowania α została oszacowana w oparciu o symulacje komputerowe z użyciem metod Monte Carlo w środowisku Geant4-DNA. Moc dawki dla X została zmierzona filmami radiochromowymi.

W przeprowadzonych eksperymentach wykazano, że komórki PC3 charakteryzują się wyższą promieniowrażliwością w porównaniu z komórkami DU145. Analiza pomiarów metodą NTA nie wykazała istotnych różnic w rozmiarach egzosomów wyizolowanych z obu linii komórkowych. Uzyskane wyniki potwierdzają, że efekt sąsiedztwa może być inicjowany w komórkach nowotworowych gruczołu krokowego eksponowanych na promieniowanie X i współhodowanych z egzosomami pochodzącymi z komórek napromienionych. Wyniki te poszerzają wiedzę na temat modulacji promieniowrażliwości i wskazują na potencjalne zastosowanie egzosomów w optymalizacji radioterapii.

Słowa kluczowe

promieniowanie jonizujące, egzosomy, komórki nowotworowe gruczołu krokowego, efekt sąsiedztwa indukowany promieniowaniem, promieniowrażliwość

Abstract

According to data from the World Health Organization's 2022 report, prostate cancer is one of the most commonly diagnosed malignancies among men worldwide, particularly in Europe and North America. Although several treatment options are available – including surgery, chemotherapy, radiotherapy, and immunotherapy – there is still a need for new and more effective therapies. In recent years, this has led to growing interest in the role of exosomes in cancer research.

The main objective of this doctoral project was to investigate the influence of exosomes on the radiosensitivity of prostate cancer cells and to determine whether the radiation-induced bystander effect (RIBE) can be activated in recipient cells via exosomes isolated from irradiated cells. To this end, apoptosis induction, a form of programmed cell death, was analyzed. Additionally, γ H2AX foci formation was assessed to determine whether the exosomes induce DNA damage. The molecular content of the exosomes (so-called cargo) was performed using Western blot, which enabled their identification. Cellular responses to radiation were further evaluated using the clonogenic survival assay as well as cytotoxicity assays (LDH and IL-6). The effects of radiation-induced stress on the concentration and size of exosomes isolated from PC3 and DU145 prostate cancer cells were analyzed using NTA. Two radiation sources: a ^{241}Am α particle source and an X-ray tube, available at the Department of Biomedical Physics and the Heavy Ion Laboratory, were used. α radiation dose rate was estimated using Monte Carlo simulations in the Geant4-DNA framework, while X-ray dose measurements were validated using radiochromic film dosimetry.

The experimental results demonstrated that PC3 cells exhibit greater radiosensitivity compared to DU145 cells. NTA measurements revealed no significant differences in the size distribution of exosomes isolated from the two cell lines. The findings support the hypothesis that the bystander effect can be initiated in prostate cancer cells exposed to X-rays and co-cultured with exosomes derived from irradiated cells. These results contribute to a better understanding of radiosensitivity modulation and highlight the potential application of exosomes in the optimization of radiotherapy.

Keywords

ionizing radiation, exosomes, prostate cancer cells, Radiation-Induced Bystander Effects, radiosensitivity

Podziękowania

*W pierwszej kolejności pragnę podziękować **Beacie Brzozowskiej** za nieocenioną pomoc, inspirację i wsparcie, które towarzyszą mi na każdym etapie mojej przygody z fizyką medyczną. Twoja wiedza, doświadczenie i zaangażowanie miały ogromny wpływ na mój rozwój naukowy oraz na kształtowanie mojej pasji do tej dziedziny. Dzięki Twojej motywacji i wsparciu mogłam podejmować nowe wyzwania, zdobywać cenną wiedzę i rozwijać swoje umiejętności. Za każdą radę, inspirowającą rozmowę i nieustanną gotowość dzielenia się wiedzą – dziękuję z całego serca.*

*Serdeczne podziękowania kieruję również do zespołu z pokoju 4.58: **Adrianny Tartas, Mateusza Filipka** oraz **Moniki Kopińskiej**. Wasza życzliwość i nieocenione poczucie humoru każdego dnia tworzyły wyjątkową atmosferę, dzięki której praca stawała się przyjemnością.*

*Dziękuję wszystkim osobom, z którymi miałam przyjemność współpracować podczas tego etapu mojej pracy naukowej, a w szczególności pracownikom **Zakładu Fizyki Biomedycznej**. Możliwość pracy z tak mądrymi i zaangażowanymi ludźmi była dla mnie źródłem nie tylko cennej wiedzy, ale i ogromnej satysfakcji.*

*Pragnę również podziękować tym, którzy, choć nie są bezpośrednio związani z nauką, mieli istotny wpływ na powstanie tej pracy. Moim **Rodzicom** dziękuję za bezwarunkowe wsparcie i wiarę we mnie na każdym etapie tej drogi. Wasza miłość i motywacja były moją największą siłą. Mojemu **Rodzeństwu** dziękuję za to, że mimo dzielącej nas odległości, zawsze jesteście blisko i mogę na Was polegać.*

*Dziękuję także mojemu **Mężowi Miłoszowi** za nieustające wsparcie i wyrozumiałość. Twoja obecność, motywacja i miłość dodawały mi siłę w najtrudniejszych chwilach. Bez Ciebie ta droga byłaby o wiele trudniejsza.*

Spis treści

Streszczenie i słowa kluczowe	III
Abstract and keywords	V
Spis treści	IX
Spis rysunków	XIII
Skróty i akronimy	XVII
1 Wprowadzenie	1
1.1 Cel pracy	2
1.2 Układ pracy	3
1.3 Spis publikacji	4
2 Wstęp teoretyczny	7
2.1 Oddziaływanie promieniowania jonizującego z materią	7
2.1.1 Promieniowanie korpuskularne	7
2.1.2 Promieniowanie elektromagnetyczne	10
2.1.3 Podstawowe wielkości dozymetryczne	15
2.2 Oddziaływanie promieniowania z materiałem biologicznym	20
2.2.1 Kwas deoksyrybonukleinowy	20
2.2.2 Etapy oddziaływań z materiałem biologicznym	21
2.2.3 Uszkodzenia DNA	23
2.2.4 Promieniowrażliwość komórek	28
2.3 Odpowiedź komórkowa i sposoby jej detekcji	29
2.3.1 Badania na poziomie komórkowym	29
2.3.2 Badania na poziomie chromosomalnym	33
2.3.3 Badania na poziomie DNA	36
2.3.4 Badania <i>in silico</i>	37
2.4 Efekt sąsiedztwa	39
2.5 Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (EVs)	41

2.5.1	Rodzaje pęcherzyków zewnątrzkomórkowych	42
2.5.2	Mechanizmy wychwytu EVs przez komórki	45
2.5.3	Metody detekcji EVs	47
3	Materiały i metody	49
3.1	Źródła promieniowania i ich dozymetria	49
3.1.1	Charakterystyka i dozymetria powierzchniowego źródła α : ^{241}Am	50
3.1.2	Źródło promieniowania X i jego weryfikacja dozymetryczna	52
3.2	Charakterystyka promieniowrażliwości komórek PC3 i DU145 . . .	56
3.2.1	Materiał biologiczny	56
3.2.2	Schemat przebiegu eksperymentów	58
3.2.3	Procedury eksperymentalne	61
3.2.4	Izolacja egzosomów i ich charakterystyka	63
3.3	Badania wpływu egzosomów na promieniowrażliwość komórek PC3	66
3.3.1	Oznaczenia egzosomów metodą Western Blot	66
3.3.2	Apoptoza, czyli odpowiedź komórkowa	68
3.4	Modyfikowanie promieniowrażliwości komórek PC3 exoDU145 . . .	69
3.4.1	„Cargo” egzosomów	70
3.4.2	Indukcja uszkodzeń DNA przez egzosomy	71
3.4.3	Zaprogramowana śmierć komórki	72
3.5	Analiza statystyczna	73
3.5.1	Analiza ognisk naprawczych	76
4	Wyniki i dyskusja	77
4.1	Dozymetria	77
4.1.1	Symulacje MC dla źródła cząstek α	77
4.1.2	Określenie mocy dawki lampy RTG i jednorodności roz- kładu dawki	78
4.1.3	Dyskusja i wnioski	80
4.2	Odpowiedź komórkowa na promieniowanie	81
4.2.1	Krzywe przeżywalności	81
4.2.2	Wpływ promieniowania na indukcję apoptozy	83
4.2.3	Ocena cytotoksyczności za pomocą testu LDH i IL-6	88
4.2.4	Dyskusja i wnioski	90
4.3	Charakterystyka egzosomów	93
4.3.1	Analiza koncentracji egzosomów	94
4.3.2	Analiza średnicy egzosomów	95
4.3.3	Dyskusja i wnioski	96
4.4	Efekt sąsiedztwa indukowany przez egzosomy	97
4.4.1	Identyfikacja egzosomów	97

4.4.2	Wnikanie egzosomów do komórek	98
4.4.3	Analiza apoptozy w badanych modelach eksperymentalnych	99
4.4.4	Dyskusja i wnioski	104
5	Podsumowanie i perspektywy	107
	Bibliografia	111
A	Protokół laboratoryjny hodowli komórek PC3 i DU145	133
B	Protokół laboratoryjny izolacji egzosomów	135
C	Materiały uzupełniające	139

Spis rysunków

2.1	Porównanie rozkładu dawki względnej dla fotonów, protonów i jonów węgla w funkcji głębokości w wodzie.	9
2.2	Schemat rozpadu promieniotwórczego ^{241}Am	9
2.3	Obszary zależności Z absorbenta od energii kwantów γ , w których dominują poszczególne procesy oddziaływania fotonów z materią. .	10
2.4	Schemat efektu fotoelektrycznego.	11
2.5	Schemat rozpraszania Comptona.	12
2.6	Kreacja pary pozyton–elektron.	12
2.7	Schemat budowy lampy RTG.	13
2.8	Widmo promieniowania X.	14
2.9	Przestrzenny rozkład aktów jonizacji w jądrze komórkowym po napromienieniu promieniowaniem X i cząstkami α oraz odpowiadające im uszkodzenia DNA.	16
2.10	Zróznicowanie przestrzennej koncentracji uszkodzeń komórkowych w zależności od rodzaju promieniowania jonizującego przy tej samej dawce pochłoniętej.	17
2.11	Względna skuteczność biologiczna w funkcji liniowego przekazu energii.	19
2.12	Poziomy organizacji DNA w jądrze komórkowym od komórki do podwójnej helisy DNA.	21
2.13	Etapy i procesy zachodzące podczas oddziaływania promieniowania jonizującego z systemami biologicznymi.	21
2.14	Przestrzenny rozkład jonizacji w modelowym jądrze limfocyту po napromienieniu dawką 1 Gy promieniowaniem X oraz cząstkami α . .	22
2.15	Rodzaje uszkodzeń DNA powstałych w wyniku działania promieniowania jonizującego.	25
2.16	Mechanizm naprawy DSB w zależności od złożoności DSB oraz fazy cyklu komórkowego.	27
2.17	Krzywa przeżywalności komórek poddanych działaniu promieniowania jonizującego.	31

2.18	Schemat podziału komórek na cztery populacje w badaniu apoptozy.	33
2.19	Rodzaje mutacji chromosomowych.	34
2.20	Zdjęcie mikroskopowe chromosomów w komórce ludzkiej w metafazie poddanej ekspozycji na promieniowanie.	34
2.21	Chromosomy wybarwione metodą m-FISH.	35
2.22	Schemat efektu RIBE.	39
2.23	Biogeneza pęcherzyków zewnątrzkomórkowych.	44
2.24	Zasada działania aparatu wykorzystującego metodę NTA w trybach rozpraszania światła oraz fluorescencji.	47
3.1	Źródło powierzchniowe ^{241}Am : widok od góry z etykietą i od dołu z widoczną warstwą złota.	50
3.2	Schemat układu eksperymentalnego napromieniania komórek cząstkami α	51
3.3	Lampa rentgenowska PW2275/20 z molibdenową anodą oraz generator wysokiego napięcia PW3830.	52
3.4	Geometria układu napromieniania monowarstwy komórek z użyciem lampy rentgenowskiej podczas wykonywania dozymetrii. . . .	54
3.5	Krzywe kalibracyjne filmów radiochromowych Gafchromic TM EBT4 dla kanału R, kanału G oraz kanału B otrzymane na podstawie pomiarów wykonanych w Narodowym Instytucie Onkologii.	55
3.6	Wygląd komórek linii PC3 i DU145 pod mikroskopem.	57
3.7	Wpływ rodzaju promieniowania na odpowiedź komórek o różnej promieniowrażliwości oraz na charakterystykę produkowanych z nich egzosomów.	58
3.8	Płytki 6-dołkowa z wysianymi komórkami nowotworu gruczołu krokowego linii PC3.	59
3.9	Cytometr przepływowy FACSCalibur (Becton Dickinson).	62
3.10	Schematyczny rysunek procesu izolacji egzosomów przy użyciu SEC wraz ze zdjęciem.	64
3.11	Urządzenie ZetaView (Particle Metrix, Niemcy) wraz z przykładowym zdjęciem egzosomów.	65
3.12	Schemat przebiegu oznaczeń Western Blot dla badania wpływu egzosomów (exoPC3) na promieniowrażliwość komórek PC3.	67
3.13	Schemat przebiegu oznaczeń apoptozy w eksperymentach RIBE dla układu eksperymentalnego w badaniach wpływu egzosomów (exoPC3) na promieniowrażliwość komórek PC3 (PC3 + exoPC3). .	69
3.14	Schemat przebiegu oznaczeń ekspresji białek metodą Western Blot dla zbadania roli egzosomów (exoDU145) w modyfikowaniu promieniowrażliwości komórek PC3 (PC3 + exoDU145).	70

3.15	Schemat przebiegu oznaczeń γ H2AX w eksperymentach RIBE badających rolę egzosomów (exoDU145) w modyfikowaniu promieniuwrażliwości komórek PC3 (PC3 + exoDU145).	71
3.16	Schemat przebiegu oznaczeń apoptozy w eksperymentach RIBE badających rolę egzosomów (exoDU145) w modyfikowaniu promieniuwrażliwości komórek PC3 (PC3 + exoDU145).	73
3.17	Zrzut ekranu z programu countPHICS.	74
3.18	Zrzut ekranu z programu Image Lab.	75
4.1	Zeskanowane filmy radiochromowe Gafchromic™ EBT3–Unlaminated poddane działaniu promieniowania α	78
4.2	Zeskanowane filmy radiochromowe Gafchromic™ EBT4 poddane działaniu promieniowania X.	78
4.3	Zależność dawki pochłoniętej w filmach radiochromowych Gafchromic™ EBT4 od czasu napromieniania dla kanału czerwonego. . . .	79
4.4	Zeskanowane filmy radiochromowe Gafchromic™ EBT4 z profilami.	80
4.5	Skany szalek hodowlanych przedstawiające przeżywalność komórek po ekspozycji na różne rodzaje i dawki promieniowania jonizującego.	82
4.6	Krzywe przeżywalności komórek nowotworowych gruczołu krokowego (PC3 i DU145) uzyskane po ekspozycji na promieniowanie α oraz promieniowanie X.	82
4.7	Efekt działania promieniowania α na komórki żywe, wczesnoapoptotyczne oraz późnoapoptotyczne lub nekrotyczne dla komórek PC3.	84
4.8	Efekt działania promieniowania α na komórki żywe, wczesnoapoptotyczne oraz późnoapoptotyczne lub nekrotyczne dla komórek DU145.	85
4.9	Efekt działania promieniowania X na komórki żywe, wczesnoapoptotyczne oraz późnoapoptotyczne lub nekrotyczne dla komórek PC3.	87
4.10	Efekt działania promieniowania X na komórki żywe, wczesnoapoptotyczne oraz późnoapoptotyczne lub nekrotyczne dla komórek DU145.	88
4.11	Wykres uwolnienie LDH dla komórek PC3 i DU145 poddanych działaniu promieniowania α	89
4.12	Stężenie IL-6 zmierzone 96 godzin po napromienieniu dla komórek PC3 i DU145 w zależności od dawki dostarczonej do komórek przez promieniowanie α	90
4.13	Koncentracja egzosomów wyizolowanych 96 godzin po napromienieniu z komórek PC3 oraz DU145 w zależności od dawki promieniowania jonizującego.	94
4.14	Charakterystyka rozmiaru egzosomów wyizolowanych z komórek PC3 oraz DU145 w zależności od dawki promieniowania jonizującego.	95
4.15	Reprezentatywny immunoblot markerów egzosomalnych: CD63, CD81.	97

4.16	Obrazy mikroskopowe jąder komórek kontrolnych PC3 pokazujące indukcję ognisk γ H2AX przez egzosomy wyizolowane z napromienionych komórek PC3 i DU145.	98
4.17	Efekt działania promieniowania X na komórki żywe, wczesnoapoptotyczne oraz późnoapoptotyczne lub nekrotyczne dla komórek PC3 współhodowanych z egzosomami wyizolowanymi z napromienionych i kontrolnych komórek PC3 (exoPC3).	100
4.18	Efekt działania promieniowania X na komórki żywe, wczesnoapoptotyczne oraz późnoapoptotyczne lub nekrotyczne dla komórek PC3 współhodowanych z egzosomami wyizolowanymi z napromienionych i kontrolnych komórek DU145 (exoDU145).	102
4.19	Efekt działania promieniowania X na komórki żywe dla komórek PC3 współhodowanych z egzosomami dla dwóch układów eksperymentalnych: komórek PC3 i egzosomów wyizolowanych z komórek PC3 (PC3 + exoPC3) oraz komórek PC3 i egzosomów wyizolowanych z komórek DU145 (PC3 + exoDU145).	104

Skróty i akronimy

Skrótowiec	Objaśnienie
DDR	odpowiedź na uszkodzenie DNA (z ang. <i>DNA damage response</i>)
DNA	kwask deoksyrybonukleinowy
DSB	podwójnoniciowe uszkodzenie DNA (z ang. <i>double-strand break</i>)
DU145	linia komórkowa nowotworu gruczołu krokowego
EVs	pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (z ang. <i>Extracellular Vesicles</i>)
HR	rekombinacja homologiczna (z ang. <i>homologous recombination</i>)
ICRU	Międzynarodowa Komisja ds. Jednostek Promieniowania i Pomiarów (z ang. <i>International Commission on Radiation Units & Measurements</i>)
IRIF	ogniska naprawcze indukowane promieniowaniem jonizującym (z ang. <i>irradiation-induced foci</i>)
LET	liniowy przekaz energii (z ang. <i>Linear Energy Transfer</i>)
LQ	model liniowo-kwadratowy (z ang. <i>Linear-Quadratic Model</i>)
MC	Monte Carlo
NHEJ	niehomologiczne łączenie końców (z ang. <i>non-homologous end joining</i>)
NTA	analiza śledzenia nanocząstek (z ang. <i>irradiation-induced foci</i>)
PC3	linia komórkowa nowotworu gruczołu krokowego
PE	wydajność klonowania (z ang. <i>Plating Efficiency</i>)
RBE	względna skuteczność biologiczna (z ang. <i>Relative Biological Effectiveness</i>)
RIBE	efekt sąsiedztwa indukowany promieniowaniem (z ang. <i>Radiation-Induced Bystander Effects</i>)
ROS	reaktywne formy tlenu (z ang. <i>Reactive Oxygen Species</i>)
SEM	niepewność standardowa średniej (z ang. <i>Standard Error of the Mean</i>)
SF	frakcja przeżywająca (z ang. <i>Surviving Fraction</i>)
SSB	pojedynczoniciowe uszkodzenie DNA (z ang. <i>single-strand break</i>)

Rozdział 1

Wprowadzenie

Niezwykle ważnym elementem skutecznej terapii nowotworów jest precyzyjne dostarczenie dawki promieniowania do obszaru guza. Dane Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, z ang. *World Health Organization*) z 2022 roku pokazują, że nowotwór gruczołu krokowego zajmuje czwarte miejsce pod względem liczby nowych zachorowań na świecie. Wśród mężczyzn nowotwór gruczołu krokowego jest najczęściej diagnozowanym nowotworem w wielu krajach, zwłaszcza w Europie i Ameryce Północnej. W przypadku pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem gruczołu krokowego wskazanie do leczenia radioterapeutycznego uznawane jest za standardową metodę leczenia (Cornford et al., 2024). Skuteczność terapeutyczna napromieniania zależy jednak od wewnętrznej promieniowrażliwości komórek nowotworowych, która może różnić się pomiędzy poszczególnymi subpopulacjami komórek w obrębie guza (Jayakumar et al., 2014). Wyzwaniem onkologii jest zrozumienie procesu radiooporności, nowotworzenia oraz powstawania przerzutów, co umożliwiłoby zaproponowanie nowych technik leczenia w tej dziedzinie. Aby to osiągnąć, prowadzone są badania różnego rodzaju pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (Yang et al., 2005), które pełnią wiele funkcji w naszym organizmie, między innymi biorą udział w proliferacji, czyli zdolności rozmnażania się komórek. Niekontrolowane podziały komórek prowadzą zwykle do nieograniczonej proliferacji i rozwoju nowotworu. Biorą również udział w procesie angiogenezy, czyli w powstawaniu nowych naczyń krwionośnych i wykorzystaniu ich do wzrostu guza. Są też odpowiedzialne za immunomodulację, czyli regulowanie odpowiedzi odpornościowej organizmu na infekcje o różnego rodzaju etiologii (Ni et al., 2019). Obecnie nanopęcherzyki stają się popularnym kierunkiem badań ze względu na szereg zalet oraz zastosowań. Liczba artykułów o egzosomach oraz ich wykorzystywaniu w medycynie wzrasta z roku na rok, co świadczy o ciągle rosnącym zainteresowaniu tym tematem. Badania naukowe podkreślają znaczenie egzosomów w procesie przenoszenia informacji między komórkami oraz ich rolę w przenoszeniu chorób, a zwłaszcza nowotworów (Wesołowska i Piwocka, 2017). Pęcherzyki zewnątrzko-

mórkowe wykazują duży potencjał w kontekście monitorowania progresji choroby oraz identyfikacji nowych biomarkerów (Chan et al., 2025; Pan et al., 2017). Obecnie egzosomy zaczynają być również testowane pod kątem promieniowania.

W radiobiologii przyjmuje się „teorię tarczy”, która została zaproponowana po raz pierwszy w 1946 roku (Lea, 1955). Teoria ta zakłada, że biologiczne skutki działania promieniowania jonizującego, takie jak niestabilność genetyczna czy obniżona przeżywalność komórek, występują wyłącznie w komórkach, które zostały bezpośrednio poddane ekspozycji na promieniowanie i w wyniku oddziaływania doszło do uszkodzeń DNA (Goodhead, 1994; Katz i Cucinotta, 1999; Ballarini et al., 2002). W ostatnich latach tradycyjny paradygmat wpływu działania promieniowania jonizującego na materiał biologiczny uległ rozszerzeniu. Coraz liczniejsze dane eksperymentalne wskazują na to, że skutki promieniowania jonizującego obejmują również sąsiednie komórki, które nie zostały napromienione, a w których obserwowane są zmiany genetyczne. Wśród tych zmian pojawiają się mutacje genetyczne, uszkodzenia chromosomów, powstawanie mikrojąder oraz indukcja apoptozy (Kirolikar et al., 2018; Karthik et al., 2019; Furlong et al., 2013). Zjawisko to nazwano efektem sąsiedztwa indukowanym promieniowaniem. Pomimo wielu lat badań dokładne mechanizmy leżące u podstaw tego efektu nie zostały wyjaśnione. Przyjęto, że są one wynikiem komunikacji międzykomórkowej oraz wydzielania przez napromienione komórki sygnałów molekularnych, w tym pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Dotychczas niewiele badań koncentrowało się na analizie wpływu roli egzosomów w modulowaniu występowania efektu sąsiedztwa w komórkach nowotworowych gruczołu krokowego. Luka ta stanowi istotne uzasadnienie i punkt wyjścia do realizacji poniższych badań.

1.1 Cel pracy

Głównym celem projektu doktorskiego było zbadanie czy egzosomy są modulatorami promieniowrażliwości komórek nowotworowych gruczołu krokowego w kontekście efektu sąsiedztwa indukowanego promieniowaniem jonizującym. W celu realizacji głównego celu dysertacji w pierwszym kroku został zbadany wpływ promieniowania jonizującego na charakterystykę promieniowrażliwości komórek nowotworowych gruczołu krokowego, PC3 i DU145, oraz egzosomów przez nie wydzielanych. W kolejnym etapie zostało sprawdzone, czy egzosomy wyizolowane z komórek PC3 wnikają do komórek PC3 oraz to, czy egzosomy mają wpływ na promieniowrażliwość tych komórek. W końcowym etapie zostało sprawdzone, czy egzosomy po wnikięciu do komórek są w stanie modulować odpowiedź komórkową innych komórek, czyli czy egzosomy wyizolowane z komórek DU145 są w stanie modulować promieniowrażliwość komórek PC3. Pytania postawione w niniejszej rozprawie dotyczą tego, jak różni się odpowiedź komórkowa dla dwóch linii nowo-

tworowych gruczołu krokowego poddanych ekspozycji na promieniowanie jonizujące, czy w wyniku ekspozycji komórek na promieniowanie jonizujące zmienia się charakterystyka egzosomów, oraz czy obecność danego rodzaju egzosomów (wyizolowanych zarówno z komórek napromienionych, i kontrolnych) w pożywce komórek testowanych powoduje zmiany, czyli czy obserwujemy tak zwany efekt sąsiedztwa.

Dodatkowo, przeprowadzona została dozymetria źródeł promieniowania jonizującego, która umożliwiła scharakteryzowanie sposobu oddziaływania promieniowania α i promieniowania X z materiałem biologicznym. Dozymetria umożliwiła wyznaczenie mocy dawek zaabsorbowanych przez komórki w konkretnych układach eksperymentalnych wraz z weryfikacją jednorodności rozkładu dawki zastosowanych źródeł.

Zbadanie funkcji egzosomów pod kątem modyfikowania promieniowrażliwości komórek stanowi ważny krok w zrozumieniu mechanizmu kancerogenezy oraz optymalizacji metod radioterapeutycznych. Współczesna medycyna nieuchronnie kieruje się w stronę medycyny personalizowanej, która uwzględniania indywidualne cechy pacjenta. Wykorzystanie w projekcie różnych testów komórkowych oraz technik obrazowania umożliwia pozyskiwanie informacji ilościowej i jakościowej w celu zrozumienia i poprawy dokładności prognoz wyników. Warto dodać, że egzosomy są obecne w ludzkich płynach ustrojowych, dzięki czemu w przyszłości mogą zostać wykorzystane do nieinwazyjnych badań diagnostycznych.

1.2 Układ pracy

Rozprawa doktorska składa się z pięciu rozdziałów. Pierwszy rozdział wprowadza czytelnika w tematykę badań, przedstawia motywację do przeprowadzenia zaplanowanych eksperymentów oraz cel pracy. W rozdziale tym został również zaprezentowany układ pracy oraz dorobek naukowy autorki.

Drugi rozdział pracy stanowi wstęp teoretyczny. Zostały w nim omówione podstawy oddziaływania promieniowania jonizującego z materią oraz materiałem biologicznym. Zostały też zaprezentowane parametry oraz wielkości opisujące jakość i efektywność promieniowania w odniesieniu do indukcji uszkodzeń DNA, a także mechanizmy naprawy komórek w przypadku uszkodzeń materiału genetycznego. Rozdział ten jest również poświęcony badaniom odpowiedzi komórkowej z uwzględnieniem promieniowrażliwości komórek i sposobom detekcji tej odpowiedzi na uszkodzenia radiacyjne na poziomie komórkowym, chromosomalnym oraz DNA. W przedostatniej części zostały przedstawione informacje o efekcie sąsiedztwa, metodach badań tego zjawiska oraz jego znaczeniu w kontekście radioterapii. Na końcu rozdziału został umieszczony opis pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z uwzględnieniem metod ich detekcji oraz charakterystyka biogenezy egzosomów – nanopęcherzyków szczególnie istotnych w kontekście niniejszej rozprawy.

W rozdziale trzecim zostały szczegółowo omówione użyte w eksperymentach materiały i metody. Między innymi przedstawione zostały źródła promieniowania wraz z zastosowaną dozymetrią. Została również opisana charakterystyka linii komórkowych nowotworowych gruczołu krokowego PC3 i DU145, oraz wyizolowanych z tych komórek egzosomów. Badania zrealizowane w ramach niniejszej rozprawy zostały podzielone na trzy główne etapy, które zostały szczegółowo opisane w tym rozdziale, z uwzględnieniem schematów przebiegu eksperymentów oraz zastosowanych procedur eksperymentalnych.

Rozdział czwarty prezentuje uzyskane wyniki. W pierwszej kolejności zostały zebrane i omówione wyniki dotyczące dozymetrii źródeł promieniowania jonizującego. Rozdział ten zawiera również wyniki dotyczące odpowiedzi komórkowej oraz egzosomalowej na promieniowanie. Ostatnia część tego rozdziału stanowi kluczowy wynik dysertacji, czyli wynik badania wpływu egzosomów na promieniowrażliwość komórek oraz zostało wykazane, że efekt sąsiedztwa może być inicjowany w komórkach współhodowanych z egzosomami.

Ostatni rozdział przedstawia wnioski płynące z badań, które podsumowują otrzymane rezultaty, oraz zawiera opis możliwych kierunków rozszerzenia badań w przyszłości.

Na końcu pracy załączone zostały protokoły laboratoryjne oraz materiały uzupełniające.

1.3 Spis publikacji

Wyniki prezentowane w niniejszej rozprawie zostały opublikowane w następujących artykułach:

1. **Pszczółkowska-Kępa, B.**, Olejarz, W., Głuszko, A., Wałpuski, G., Lorenc, T., Brzozowska, B. (2025). Exosome-mediated modulation of radioresistance: the radiation-induced bystander effect in prostate cancer cells. *Manuskrypt został wysłany do czasopisma PLOS One, w trakcie recenzji.*
2. Filipek, M., **Pszczółkowska-Kępa, B.**, Kociński, B., Senkowska, M., Szepliński, Z., Brzozowska, B. (2024). From radiobiology to radiotherapy: dose homogeneity in cells after alpha irradiation in measurements and Monte Carlo simulations. *Polish Journal of Medical Physics and Engineering*, 30(2), 79-89. <https://doi.org/10.2478/pjmpe-2024-0009>
3. **Pszczółkowska, B.**, Olejarz, W., Filipek, M., Tartas, A., Kubiak-Tomaszewska, G., Żołnierzak, A., Życieńska, K., Ginter, J., Lorenc, T., Brzozowska, B. (2022). Exosome secretion and cellular response of DU145 and PC3 after exposure to alpha radiation. *Radiation and Environmental Biophysics*, 61(4), 639–650. <https://doi.org/10.1007/s00411-022-00991-5>

Dodatkowo poniżej znajduje się lista publikacji, których autorka rozprawy jest współautorką, ale wyniki tych badań nie dotyczą bezpośrednio zagadnień prezentowanych w rozprawie:

1. Życieńska, K., **Pszczółkowska, B.**, Brzozowska, B., Kamiński, M., Lorenc, T., Olejarz, W., Sęk, S., Ginter, J. (2022). Brownian Motion Influence on AFM Exosomes' Size Measurements. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(17), 10074. <https://doi.org/10.3390/ijms231710074>
2. **Pszczółkowska, B.**, Bijok, M., Brzozowska, B. (2022). The influence of the used applicators on organ and target doses for cervical cancer patients treated with HDR brachytherapy. *Polish Journal of Medical Physics and Engineering*, 28(3), 139-149. <https://doi.org/10.2478/pjmpe-2022-0017>

Autorka rozprawy brała również udział w dwóch projektach badawczych, których realizacja została zakończona. Aktualnie trwają prace nad przygotowaniem manuskryptów do wysłania do publikacji.

Pierwszy projekt dotyczył badania biologicznych skutków działania promieniowania gamma w limfocytach krwi obwodowej. W ramach tego projektu zostało stworzone oprogramowanie typu open source (oprogramowanie o otwartym kodzie źródłowym) do rozpoznawania chromosomów dicentrycznych w ramach współpracy z ośrodkami naukowymi z Japonii, Niemiec i Szwecji. Manuskrypt zostanie wysłany do czasopisma *Radiation Physics and Chemistry*.

Durugi projekty dotyczyły oceny ognisk naprawczych γ H2AX jako markera dwuniciowych pęknięć DNA w komórkach glejaka, U251, poddanych działaniu promieniowania X. Została przeprowadzona analiza wielkości klastrów w teście γ H2AX jako nowatorskie narzędzie do ilościowego oznaczania uszkodzeń DNA w komórkach o zróżnicowanej radiowrażliwości – U251, G88, G44 – w ramach współpracy z Polską Akademią Nauki. Manuskrypt zostanie wysłany do czasopisma *Radiation and Environmental Biophysics*.

Rozdział 2

Wstęp teoretyczny

2.1 Oddziaływanie promieniowania jonizującego z materią

Nazwa „promieniowanie jonizujące” wiąże się z głównym skutkiem, jaki wywołuje przejście promieniowania przez materię, a więc z jonizacją atomów ośrodka. Szczegółowe badania dotyczące podstawowych procesów oddziaływania promieniowania z materią rozpoczęły się po odkryciu promieniotwórczości przez Henri’ego Becquerela w 1896 roku (Becquerel, 1896), a ich głównym celem było zgłębianie natury tego zjawiska i jego mechanizmów. Promieniowanie jonizujące ze względu na specyfikę oddziaływania z materią można podzielić na dwie kategorie: promieniowanie bezpośrednio jonizujące oraz promieniowanie pośrednio jonizujące.

Do pierwszej z nich należą ciężkie cząstki naładowane (na przykład cząstki α , protony), prędkie elektrony lub pozytony. Cząstki te, dzięki swojemu ładunkowi elektrycznemu, oddziałują w sposób ciągły z elektronami obecnymi w materii, przez którą przechodzą, za sprawą sił kulombowskich.

Do drugiej kategorii zalicza się promieniowanie X, γ i neutrony, które nie podlegają siłom kulombowskim, ponieważ nie posiadają ładunku elektrycznego. W tych przypadkach konieczne jest początkowe oddziaływanie, podczas którego część lub cała energia jest przekazywana wtórnej cząstce naładowanej. Jeśli nie dojdzie do oddziaływania, promieniowanie tej kategorii może przeniknąć przez materię, nie pozostawiając śladu, ponieważ dopiero cząstka naładowana wywołuje jonizację ośrodka (Hrynkiewicz, 2001).

2.1.1 Promieniowanie korpuskularne

Ciężkie cząstki naładowane, przechodząc przez materię, oddziałują za pośrednictwem swojego pola elektrycznego z elektronami atomów, prowadząc do ich jonizacji lub wzbudzenia (Strzałkowski, 1979). Ciężka cząstka naładowana oddziałuje

na swojej drodze z wieloma elektronami, tracąc małą część swojej energii w każdym zderzeniu. W sposób ciągły cząstka ulega spowolnieniu, aż do całkowitego zatrzymania się. Oddziaływania tego typu sprawiają, że ciężkie cząstki naładowane posiadają określony zasięg, który zależy zarówno od ich energii początkowej, jak i właściwości fizycznych ośrodka absorbującego. W trakcie niektórych zderzeń elektron może zostać wybity z atomu z tak dużą energią kinetyczną, że jest zdolny do jonizacji kolejnych atomów. Takie wysokoenergetyczne elektrony, znane jako elektrony δ , pełnią rolę cząstek wtórnych i uczestniczą w dalszym przekazywaniu energii od pierwotnej cząstki naładowanej do absorbenta (Hrynkiewicz, 2001).

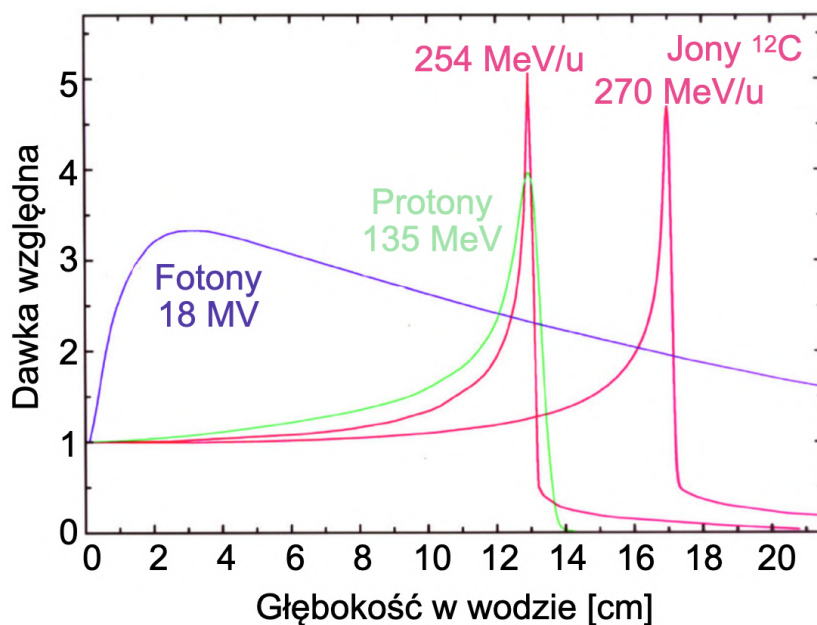
Straty energii kinetycznej ciężkiej cząstki naładowanej przy przechodzeniu przez ośrodek materialny określa wzór 2.1, znany jako równanie Bethgo-Blocha (Bethe, 1930; Skrzypczak i Szepliński, 2012):

$$-\frac{dE}{dx} = 4\pi r_e^2 m_e N_A c^2 z^2 \frac{Z}{A} \frac{1}{\beta^2} \left(\ln \frac{2m_e c^2 \gamma^2 \beta^2}{I} - \beta^2 \right), \quad (2.1)$$

gdzie:

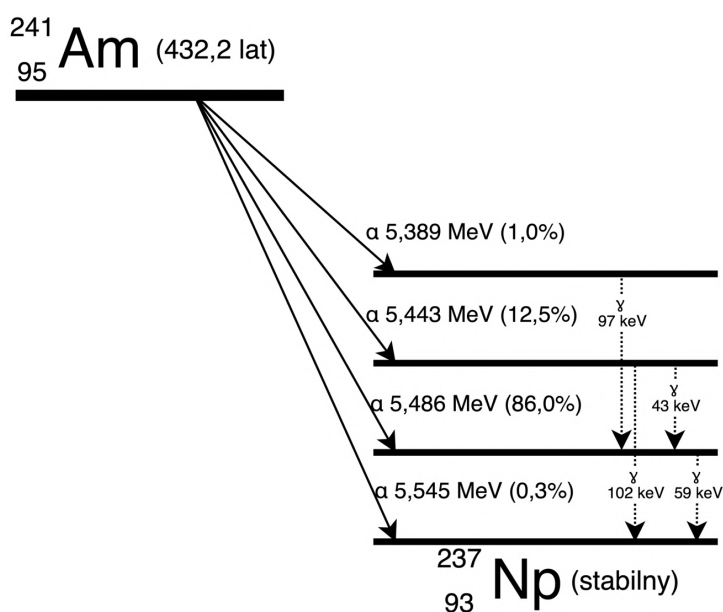
$\frac{dE}{dx}$ – strata energii cząstki dE na jednostkę drogi dx , r_e – klasyczny promień elektronu, m_e – masa elektronu, N_A – stała Avogadro, c – prędkość światła w próżni, z – ładunek cząstki, Z – liczba atomowa ośrodka, A – liczba masowa ośrodka, β – prędkość cząstki, zdefiniowana jako $\beta = \frac{v}{c}$, gdzie v oznacza prędkość cząstki, γ – czynnik Lorentza, zdefiniowany jako $\gamma = (1 - \beta^2)^{-\frac{1}{2}}$, I – stała jonizacji dla danego ośrodka.

Charakterystyczne dla ciężkich cząstek naładowanych zwiększanie się depozycji energii wraz z głębokością odgrywa kluczową rolę w ich zastosowaniu w radioterapii. Gwałtowne maksimum gęstości jonizacji, obserwowane tuż przed końcem toru cząstki, zostało po raz pierwszy zaobserwowane i opisane przez Williama Bragga w 1905 roku podczas badań nad cząstkami α w powietrzu i znane jest jako pik Bragga, natomiast jego przebieg w funkcji głębokości nazywa się krzywą Bragga (Bragg i Kleeman, 1905). Graficzne porównanie profilu dawki względnej dla promieniowania elektromagnetycznego oraz wiązek protonów i jonów węgla w zależności od głębokości zostało zaprezentowane na Rysunku 2.1 (Durante i Paganetti, 2016).



Rysunek 2.1. Porównanie rozkładu dawki względnej dla fotonów, protonów i jonów węgla w funkcji głębokości w wodzie. Na podstawie (Durante i Paganetti, 2016); tłumaczenie własne na język polski.

Przykładem cząstki naładowanej jest cząstka α , która powstaje w wyniku rozpadu jądrowego. Cząstki α składają się z dwóch protonów i dwóch neutronów, co czyni je identycznymi z jądrami atomu helu (${}^4\text{He}^{+2}$). Jednym z typowych izotopów emitujących cząstki α jest ${}^{241}\text{Am}$, którego rozpad promieniotwórczy zaprezentowany został na Rysunku 2.2.

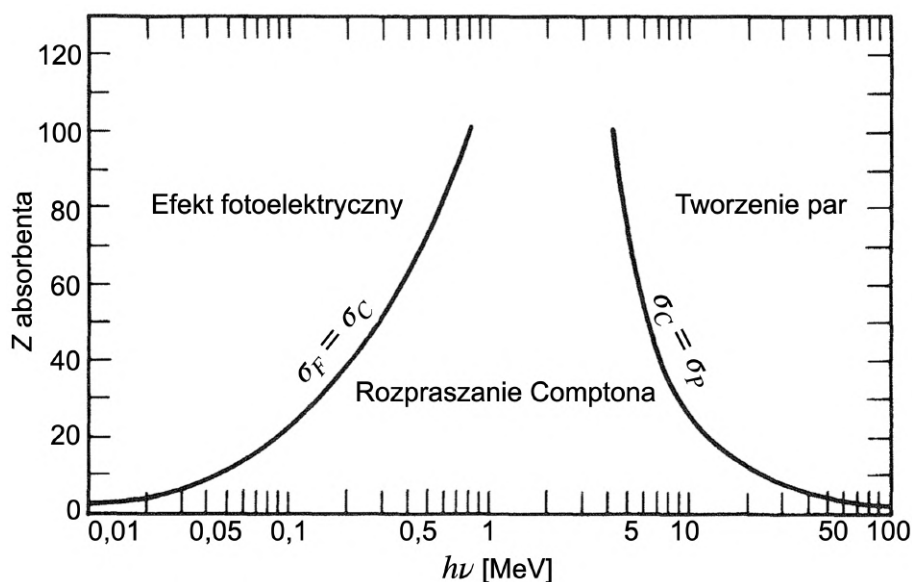


Rysunek 2.2. Schemat rozpadu promieniotwórczego ${}^{241}\text{Am}$. Opracowanie własne na podstawie (Akovali, 1994; PhysicsOpenLab, 2016).

Izotop ten rozpada się do długożyciowego jądra ^{237}Np , emitując monoenergetyczne cząstki α o energiach: 5,389 MeV (1,0%), 5,443 MeV (12,5%), 5,486 MeV (86,0%) i 5,545 MeV (0,3%). Pierwszym trzem wymienionym rozpadom towarzyszy emisja niskoenergetycznych kwantów γ (PhysicsOpenLab, 2016). Czas połowicznego rozpadu ^{241}Am wynosi 432,2 lata (Akovali, 1994).

2.1.2 Promieniowanie elektromagnetyczne

Z kwantowego punktu widzenia, promieniowanie elektromagnetyczne można opisać jako strumień nieposiadających masy cząstek elementarnych – fotonów. W przypadku promieniowania o wysokiej energii, takiego jak promieniowanie γ czy rentgenowskie, jego osłabienie w materii zachodzi głównie na skutek oddziaływań pomiędzy fotonami a elektronami związanymi w atomach danego ośrodka. W zależności od energii fotonu oraz liczby atomowej Z ośrodka, z którym foton oddziałuje, mogą zachodzić różne mechanizmy oddziaływania. Trzema głównymi mechanizmami oddziaływania fotonowego z materią są: efekt fotoelektryczny, rozpraszanie Comptona oraz zjawisko tworzenia par (Franklin et al., 2010). Obszary, w których dominują poszczególne procesy oddziaływania fotonów z materią w funkcji energii fotonów ($h\nu$) i liczby atomowej absorbenta (Z) zostały przedstawione na Rysunku 2.3 (Winch et al., 2017).

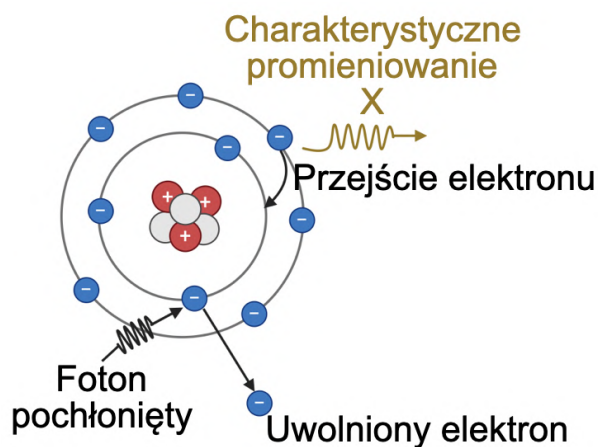


Rysunek 2.3. Obszary zależności Z absorbenta od energii kwantów γ , w których dominują poszczególne procesy oddziaływania fotonów z materią. Linie pokazują wartości Z i $h\nu$, dla których prawdopodobieństwa zajścia odpowiednich procesów są równe (efekt Comptona σ_C z efektem fotoelektrycznym σ_F lub kreacją par σ_P). Rysunek opracowany na podstawie (Winch et al., 2017), z drobnymi zmianami i tłumaczeniem własnym na język polski.

W terapii nowotworów wykorzystuje się promieniowanie o energiach rzędu kilku MeV, natomiast w diagnostyce medycznej – w zakresie 10-100 keV. Na podstawie Rysunku 2.3 można stwierdzić, że w terapii dominuje efekt Comptona, a w diagnostyce efekt fotoelektryczny. Na Rysunkach 2.4–2.6 zostały przedstawione schematycznie trzy podstawowe mechanizmy oddziaływania fotonów z materią. Ilustracja ta ukazuje charakterystyczne cechy każdego z tych zjawisk, takie jak całkowite pochłonięcie fotonu, rozproszenie fotonu z przekazaniem części energii elektronowi oraz konwersję energii fotonu w parę cząstka-antycząstka.

Efekt fotoelektryczny

Zjawisko fotoelektryczne przedstawione na Rysunku 2.4, polega na całkowitym pochłonięciu energii fotonu przez elektron związany w atomie, najczęściej z powłoki wewnętrznej. Aby doszło do wybicia elektronu, energia fotonu musi przekraczać energię wiązania elektronu w danej powłoce. Wybity elektron opuszcza atom z energią kinetyczną równą różnicy między energią fotonu a energią wiązania. Pozostawiony w stanie wzbudzonym atom dąży do powrotu do stanu podstawowego poprzez wypełnienie luki elektronem z wyższej powłoki, co skutkuje emisją promieniowania charakterystycznego, lub poprzez emisję elektronu Augera (Malicki i Ślosarek, 2016).

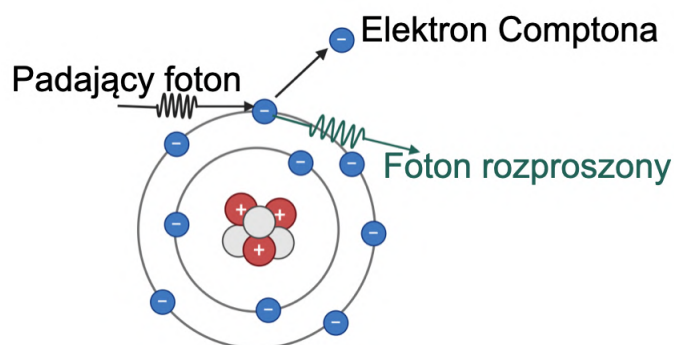


Rysunek 2.4. Schemat efektu fotoelektrycznego. Opracowanie własne na podstawie (Franklin et al., 2010).

Rozpraszanie Comptona

Zjawisko Comptona, którego schemat został przedstawiony na Rysunku 2.5, polega na rozproszeniu fotonu w wyniku zderzenia z elektronem swobodnym lub słabo związanym. Podczas tego procesu część energii fotonu przekazywana jest elektronowi, co skutkuje nadaniem mu energii kinetycznej. Pozostała część energii

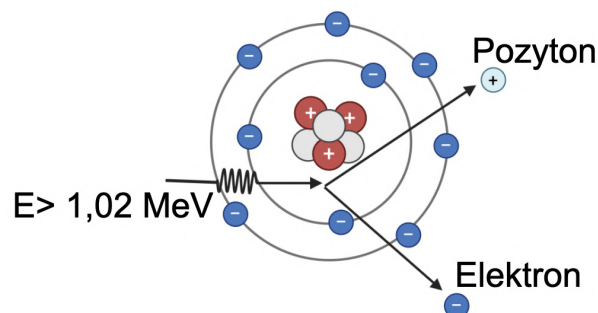
zostaje przekazana nowemu fotonowi, który różni się od pierwotnego fotonu kierunkiem, częstotliwością oraz długością fali. W trakcie tego zdarzenia zachowana jest zasada zachowania energii i pędu. Zmiana długości fali fotonu pierwotnego i rozproszonego nazywana jest przesunięciem komptonowskim (Malicki i Śłosarek, 2016).



Rysunek 2.5. Schemat rozpraszania Comptona. Opracowanie własne na podstawie (Franklin et al., 2010).

Tworzenie par

Zjawisko tworzenia par zachodzi, gdy energia padającego fotonu przekracza 1,02 MeV, co odpowiada sumie energii spoczynkowych elektronu i pozytonu. W wyniku oddziaływania z polem elektrycznym jądra atomowego foton zostaje całkowicie pochłonięty i przekształca się w parę elektron–pozyton, co zostało pokazane na Rysunku 2.6. Jeśli pozyton natrafi na elektron, dochodzi do procesu anihilacji, w wyniku którego powstają dwa fotony o energii 0,511 MeV każdy, poruszające się w przeciwnych kierunkach (Malicki i Śłosarek, 2016).



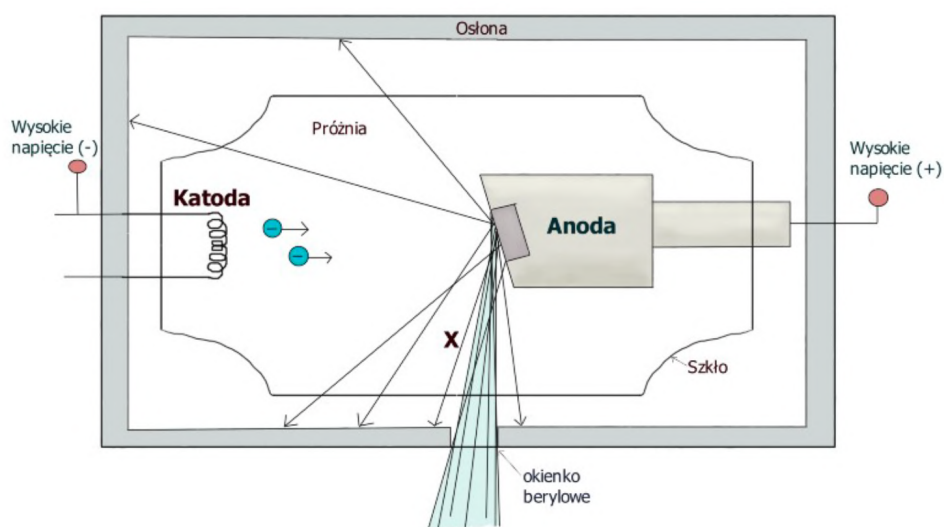
Rysunek 2.6. Kreacja pary pozyton–elektron. Opracowanie własne na podstawie (Franklin et al., 2010).

Od czasu przełomowego odkrycia promieniowania X przez Wilhelma Conrada Röntgena w 1895 roku (Röntgen, 1895), zastosowanie promieniowania X stało

się nieodzownym elementem współczesnej medycyny, zarówno w diagnostyce, jak i w terapii.

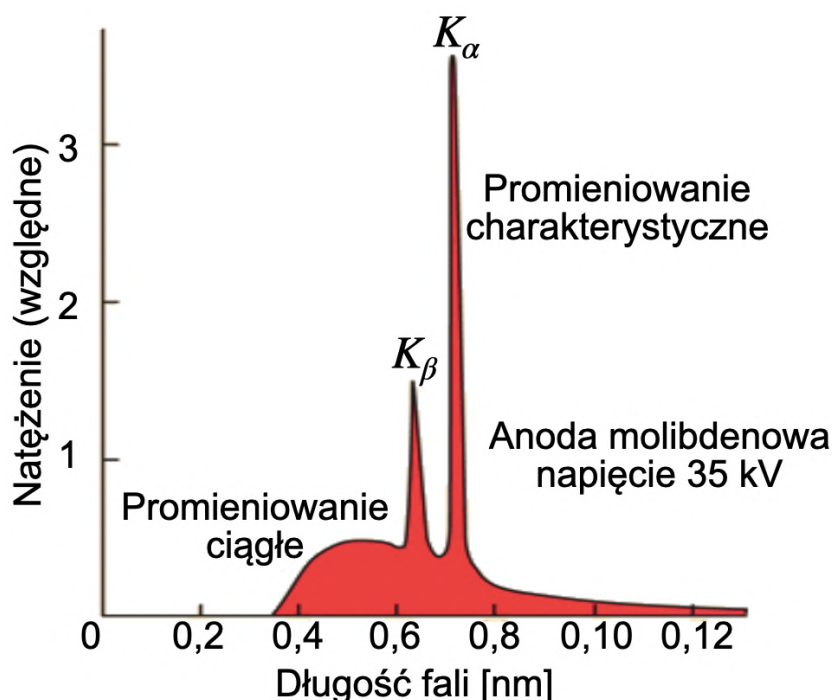
Źródłem promieniowania X jest lampa rentgenowska, której schemat działania jest opisany na Rysunku 2.7. Jej konstrukcja opiera się na szklanej lub metalowej bańce, z której wypompowano powietrze w celu wytworzenia warunków próżniowych. Wewnątrz bańki znajdują się dwie elektrody: katoda (elektroda ujemna) i anoda (elektroda dodatnia). Katoda, zwykle wykonana z wolframowego włókna, jest źródłem swobodnych elektronów. Pod wpływem przepływu prądu katoda nagrzewa się do temperatury rzędu 2200°C , co prowadzi do emisji elektronów w wyniku zjawiska termoemisji. Przy braku dodatkowego napięcia, elektrony emitowane przez katodę utworzyłyby wokół niej chmurę. Pomiedzy katodę a anodę przyłożone jest jednak wysokie napięcie (nawet do 150 kV), które powoduje ruch elektronów w kierunku anody. Anoda, zwykle wykonana z metali o dużej liczbie atomowej i wysokiej temperaturze topnienia (takich jak wolfram, molibden lub stopy miedzi), pełni funkcję celu, w który uderzają rozpędzone elektrony. W wyniku ich gwałtownego wyhamowania dochodzi do emisji promieniowania rentgenowskiego. Energia kinetyczna elektronów przekształcana jest głównie w ciepło, a jedynie niewielka jej część – około 0,8% – w promieniowanie X (dla tarczy wolframowej i napięcia 100 kV (Franklin et al., 2010)). Z tego względu anoda wyposażona jest w system chłodzenia – najczęściej wodny lub olejowy – który umożliwia efektywne odprowadzanie ciepła.

Celem zapewnienia bezpieczeństwa użytkownika i ograniczenia promieniowania rozproszonego, lampa rentgenowska osłonięta jest metalową obudową z ołowianą warstwą ochronną. Jedynym miejscem, przez które promieniowanie opuszcza lampę, jest tak zwane „okienko” – najczęściej wykonane z berylu, który cechuje się bardzo małym współczynnikiem absorpcji promieniowania (Easton, 2009).



Rysunek 2.7. Schemat budowy lampy RTG. Źródło: Pucińska (2021).

Promieniowanie X, zwane również rentgenowskim, powstaje w lampie RTG w wyniku dwóch procesów: w wyniku oddziaływań elektronów zewnętrznych z atomami ośrodka (promieniowanie hamowania) lub w wyniku przejść elektronów między poziomami energetycznymi (promieniowanie charakterystyczne). To skutkuje powstaniem widma rentgenowskiego (Franklin et al., 2010; Jaracz, 2001), przedstawionego na Rysunku 2.8, w którym wyróżnia się: widmo charakterystyczne, mające postać linii widmowych o określonych energiach (widmo monoenergetyczne), oraz widmo promieniowania hamowania, charakteryzujące się ciągłym rozkładem energetycznym.



Rysunek 2.8. Widmo promieniowania X dla anody molibdenowej przy napięciu 35 kV. Na podstawie (Black, 2019); tłumaczenie własne na język polski.

Promieniowanie hamowania (Bremsstrahlung) powstaje w wyniku oddziaływania rozpędzonych elektronów z polem elektrostatycznym jąder atomowych materiału anody. Gwałtowne wyhamowanie elektronów prowadzi do emisji promieniowania X w postaci fotonów, których energia odpowiada utraconej energii. Zakres energii emitowanych fotonów jest ciągły — od wartości bliskich zeru do maksymalnej, która odpowiada energii padających elektronów, a więc napięciu przyłożonemu do lampy (wyrażonemu w kVp, z ang. *kilovoltage peak*) pomnożonemu przez ładunek elementarny (Łobodziec, 1995).

Promieniowanie charakterystyczne powstaje w wyniku jonizacji atomów materiału anody, gdy padający elektron wybija elektron z wewnętrznej powłoki. Wolne miejsce zostaje szybko uzupełnione przez elektron z wyższej powłoki energetycznej, a różnica energii między powłokami zostaje uwolniona w postaci fotonu promienio-

wania X o ściśle określonej energii $h\nu$. Przykładowo, przejście elektronu z powłoki L do powłoki K powoduje emisję promieniowania K_α , natomiast przejście z powłoki M do powłoki K prowadzi do emisji promieniowania K_β . K_α ma niższą energię (większą długość fali) niż K_β , ponieważ różnica energii między powłoką L i K jest mniejsza niż między M i K (Łobodziec, 1995).

W diagnostyce (RTG, CT) oraz radioterapii (akceleratory medyczne) szczególne znaczenie ma promieniowanie hamowania generowane w lampach rentgenowskich (Jaracz, 2001).

2.1.3 Podstawowe wielkości dozymetryczne

Dozymetria stanowi dział fizyki jądrowej koncentrujący się na analizie rozkładu promieniowania jonizującego w otoczeniu źródła (połu promieniowania), jak również na badaniu mechanizmów oddziaływania tego promieniowania z materią oraz powiązań pomiędzy parametrami ekspozycji a skutkami biologicznymi napromieniania (Jaracz, 2001).

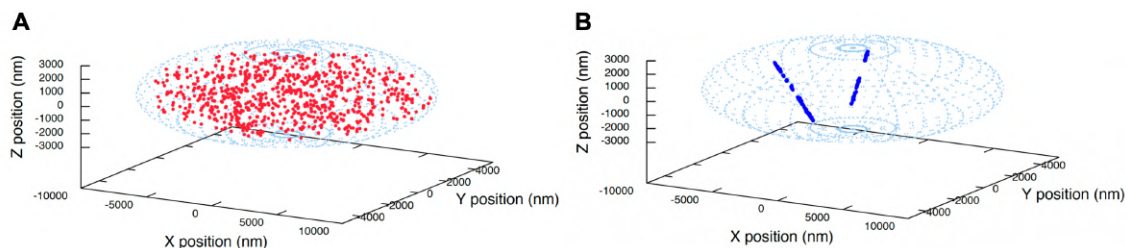
Liniowy przekaz energii

Wśród parametrów opisujących właściwości promieniowania jonizującego szczególnie istotny jest liniowy przekaz energii (LET, z ang. *Linear Energy Transfer*), który odgrywa kluczową rolę w ocenie skutków biologicznych promieniowania. W ujęciu makroskopowym liniowy przekaz energii określa średnią ilość energii dE deponowanej przez cząstkę promieniowania jonizującego w ośrodku na jednostkę przebytej odległości dx . LET jest opisany wzorem (Hrynkiewicz, 2001):

$$\text{LET} = \frac{dE}{dx}. \quad (2.2)$$

Wartość LET jest najczęściej wyrażana w jednostkach keV/ μm lub MeV/cm. Liniowy przekaz energii dostarcza informacji o gęstości jonizacji, co ma istotne znaczenie w ocenie potencjalnych skutków biologicznych promieniowania. Promieniowanie o wysokim LET, deponując znaczną ilość energii w małej objętości, zwiększa prawdopodobieństwo powstania złożonych uszkodzeń molekularnych. W przeciwieństwie do tego rodzaju promieniowania, promieniowanie o niskim LET deponuje energię na większym obszarze, co zmniejsza ryzyko indukcji poważnych uszkodzeń biologicznych (Brzozowska et al., 2020). Na Rysunku 2.9 zostały przedstawione symulowane struktury torów cząstki w jądrze komórkowym poddanym działaniu promieniowania X (LET = 2 keV/ μm) oraz cząstek α (LET = 150 keV/ μm) wraz z odpowiadającymi im uszkodzeniami.

Wartość liniowego przekazu energii dla danej cząstki zależy od jej energii kinetycznej. Tradycyjne podejście polegające na stosowaniu uśrednionych wartości LET budzi wątpliwości oddawania w pełni złożonego charakteru oddziaływania



Rysunek 2.9. Przestrzenny rozkład aktów jonizacji w jądrze komórkowym po napromienieniu promieniowaniem X (panel A) i cząstkami α (panel B) oraz odpowiadające im uszkodzenia DNA. Źródło: Brzozowska et al. (2016).

promieniowania w tkankach. W przypadku planowania leczenia radioterapeutycznego wiązki promieniowania składają się z cząstek o różnych energiach, co skutkuje zmiennością LET w obrębie wiązki. W związku z tym podczas planowania leczenia istotne jest uwzględnienie rozkładu LET, a nie tylko jego średniej wartości, ponieważ różne wartości LET mogą wywoływać odmiennie efekty biologiczne. W odpowiedzi na te ograniczenia rozwijane są nowe modele, takie jak LET_f (średnia zdolność hamowania cząstek ważona po widmie fluencji) (Kalholm et al., 2021) oraz LET_d (średnia zdolność hamowania cząstek ważona po dawce) (Yap et al., 2025; Bertolet et al., 2020). LET_d stanowi istotny wskaźnik jako predyktor względnej skuteczności biologicznej dla protonów (Chaudhary et al., 2014; Grassberger i Paganetti, 2011; Guan et al., 2018). Parametr ten znajduje także zastosowanie w badaniach radiobiologicznych prowadzonych w Clatterbridge Cancer Centre (CCC, Wielka Brytania), w ramach których analizowano odpowiedź komórkową, rodzaje uszkodzeń oraz mechanizmy naprawcze indukowane przez promieniowanie protonowe i fotonowe (Fabbrizi et al., 2024; Carter et al., 2019). Dodatkowo wprowadzane są koncepcje nanodozymetryczne, takie jak parametry opisujące rozkłady jonizacji (ID, z ang. *Ionization Detail*), które umożliwiają bardziej precyzyjne powiązanie rozkładu energii z odpowiedzią biologiczną komórek (Faddegon et al., 2023).

Dawka pochłonięta

Podstawową wielkością fizyczną w dozymetrii jest dawka pochłonięta. Międzynarodowa Komisja ds. Jednostek Promieniowania i Pomiarów (ICRU, z ang. *International Commission on Radiation Units & Measurements*) w Raporcie 85 (ICRU, 2011) podaje następującą definicję dawki (D):

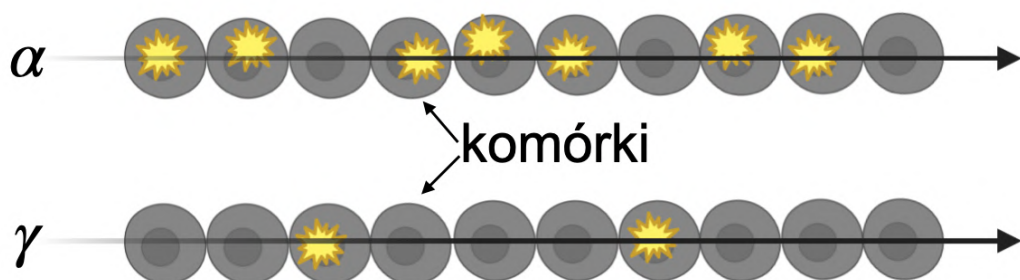
$$D = \frac{E}{m}, \quad (2.3)$$

gdzie E jest uśrednioną wartością energii zdeponowanej w ośrodku przez promieniowanie jonizujące na jednostkę masy m . W układzie SI jednostką dawki pochłoniętej jest J kg^{-1} .

niętej jest grej [Gy]. Nazwa została nadana na cześć angielskiego radiobiologa Louisa Harolda Graya (15th General Conference on Weights and Measures (CGPM), 1975):

$$1 \text{ Gy} = 1 \frac{\text{J}}{\text{kg}}. \quad (2.4)$$

Dawka pochłonięta stanowi istotną makroskopową wielkość fizyczną, ponieważ skutki działania promieniowania w tkankach biologicznych zależą bezpośrednio od jej wartości. Efekty uszkodzające wywołane przez promieniowanie występują wówczas, gdy dochodzi do zerwania wiązań chemicznych w kluczowych cząsteczkach biologicznych lub do powstawania reaktywnych form tlenu (ROS, z ang. *Reactive Oxygen Species*). Oba te procesy wymagają dostarczenia energii, a zatem skala uszkodzeń zależy od ilości energii zdeponowanej w tkance. W okresie, gdy w radioterapii wykorzystywano wyłącznie promieniowanie γ i X, ocena skutków biologicznych opierała się na wartościach dawki pochłoniętej. Wraz z wprowadzeniem dalszych rodzajów promieniowania dostrzeżono, że charakterystyka fizyczna – określana mianem jakości promieniowania – ma istotne znaczenie dla efektów biologicznych napromieniania. Na Rysunku 2.10 zostało zaprezentowane zróżnicowanie przestrzennej koncentracji uszkodzeń komórkowych w zależności od rodzaju promieniowania jonizującego przy tej samej dawce pochłoniętej. Cząstki α deponują znaczną ilość energii w małym obszarze, charakteryzując się dużą gęstością jonizacji. Energia promieniowania fotonowego jest deponowana w większym obszarze, dlatego promieniowanie to indukuje rozproszone, proste uszkodzenia. Należy zauważyć, że różne rodzaje promieniowania jonizującego przekazują energię ośrodkowi w zróżnicowany sposób, co skutkuje odmiennym poziomem uszkodzeń biologicznych, mimo jednakowej wartości dawki pochłoniętej. W celu ilościowego ujęcia tej zależności wprowadzono pojęcie względnej skuteczności biologicznej (RBE, z ang. *Relative Biological Effectiveness*) (Franklin et al., 2010).



Rysunek 2.10. Zróżnicowanie przestrzennej koncentracji uszkodzeń komórkowych w zależności od rodzaju promieniowania jonizującego (α i γ) przy tej samej dawce pochłoniętej. Opracowanie własne na podstawie (Franklin et al., 2010). Przygotowano za pomocą narzędzia BioRender.

Względna skuteczność biologiczna

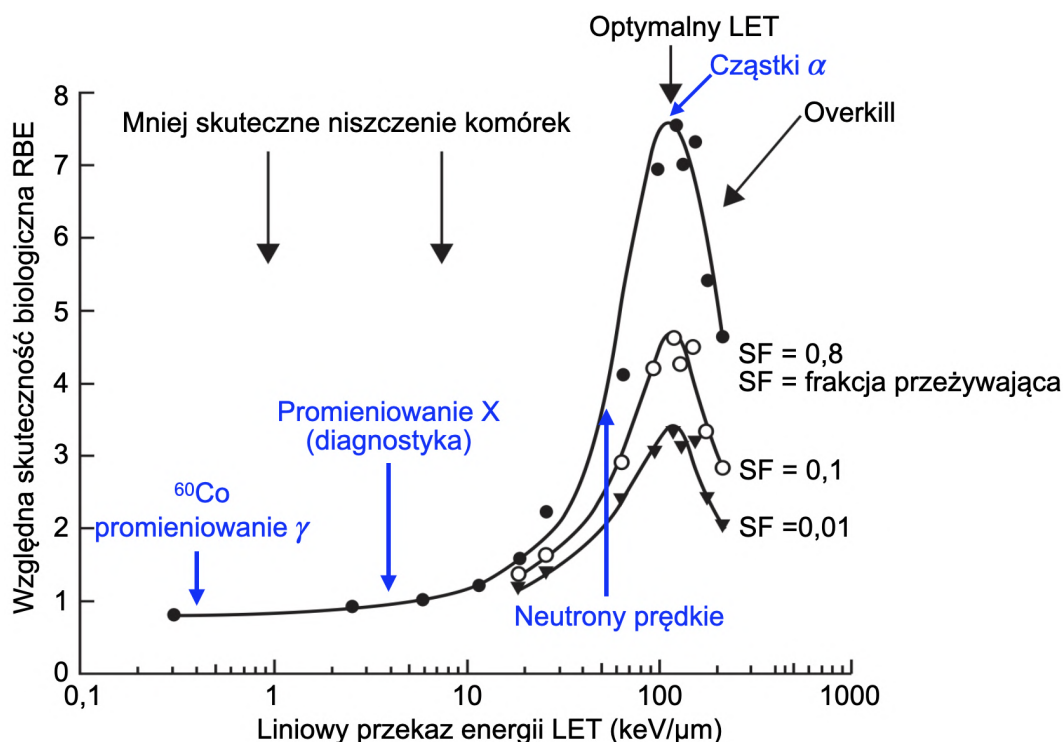
Względna skuteczność biologiczna, zgodnie z definicją podaną przez ICRU (ICRU, 2023) to bezwymiarowa wielkość określana eksperymentalnie, wyrażająca stosunek dawki D_R promieniowania referencyjnego o niskim liniowym przekazie energii (najczęściej promieniowanie X z lampy RTG) do dawki D_T promieniowania testowego, prowadzących do uzyskania takiego samego efektu biologicznego:

$$\text{RBE} = \frac{D_R}{D_T}. \quad (2.5)$$

Należy podkreślić, że RBE nie jest stałym parametrem przypisanym do konkretnego rodzaju promieniowania – jego wartość zależy od wielu czynników. Przede wszystkim, RBE jest silnie uzależnione od rodzaju badanego efektu biologicznego oraz rodzaju tkanki, w której ten efekt jest oceniany. Ponadto, ponieważ zależność między dawką a efektem biologicznym różni się w zależności od rodzaju promieniowania, również wartość zastosowanej dawki, jak i sama moc dawki, oraz sposób frakcjonowania dawki wpływa na wyznaczaną wartość RBE. W praktyce oznacza to, że RBE ma sens wyłącznie w odniesieniu do konkretnego efektu biologicznego określonego w ściśle zdefiniowanych warunkach eksperymentalnych. Tłumaczy to obserwowane w literaturze rozbieżności w wartościach RBE wyznaczanych dla różnych tkanek i rodzajów uszkodzeń (Hrynkiewicz, 2001).

Promieniowanie o wysokim LET (na przykład promieniowanie α), wykazuje wyższą wartość RBE w porównaniu z promieniowaniem o niskim LET (promieniowanie fotonowe). Promieniowanie o wysokim LET deponuje większą ilość energii w niewielkiej objętości jądra komórkowego, co prowadzi do powstawania skondensowanych uszkodzeń w jego obrębie. Taka lokalna kumulacja uszkodzeń utrudnia skuteczną naprawę DNA, co przekłada się na większy efekt biologiczny. Zależność pomiędzy wartością RBE a LET wraz z przykładowym przebiegiem krzywych RBE(LET) dla trzech wartości frakcji przeżywających (SF, z ang. *Surviving Fraction*) została przedstawiona na Rysunku 2.11 (Barendsen, 1968; Bushberg et al., 2002; Joiner i Kogel, 2009). Frakcja przeżywająca to wielkość określająca procent komórek zachowujących zdolność proliferacji po poddaniu działaniu np. promieniowania jonizującego, co zostało opisane w Rozdziale 2.3.1.

Wzrost wartości LET koreluje z rosnącą wartością RBE. Dla promieniowania fotonowego (promieniowania γ oraz promieniowanie X) charakteryzującego się LET na poziomie około 1 keV/ μm , RBE przyjmuje wartość równą 1. W zakresie LET od 10 do 100 keV/ μm obserwujemy wykładniczy wzrost wartości RBE (Bushberg et al., 2002; Joiner i Kogel, 2009). Zależność względnej skuteczności biologicznej od liniowego przekazu energii ilustruje, że promieniowanie jonizujące osiąga maksymalną efektywność biologiczną przy LET ≈ 100 keV/ μm , którego przykładem jest promieniowanie α (Hall i Giaccia, 2018), niezależnie od wybranego efektu



Rysunek 2.11. Względna skuteczność biologiczna w funkcji liniowego przekazu energii wraz z przykładowym przebiegiem krzywych RBE(LET) dla trzech wartości frakcji przeżywających. Rysunek zaadaptowany z (Barendsen, 1968; Bushberg et al., 2002; Joiner i Kogel, 2009), z modyfikacjami i tłumaczeniem własnym na język polski.

biologicznego, dla którego RBE jest obliczane. Prezentuje to przebieg krzywych RBE(LET) dla wybranych frakcji przeżywających (Barendsen, 1968).

Ekspozycja na promieniowanie α , ze względu na wartość LET oraz średnią odległość między aktami jonizacji, która odpowiada średnicy podwójnej helisy DNA (około 20 Å, czyli 2 nm), charakteryzuje się największym prawdopodobieństwem indukcji podwójnoniciowych uszkodzeń DNA przy przejściu pojedynczej naładowanej cząstki. Dla LET niższego niż 100 keV/μm (na przykład 1 keV/μm) gęstość jonizacji jest zbyt mała, by móc skutecznie indukować złożone uszkodzenia DNA, natomiast dla LET wyższego (na przykład 200 keV/μm) występuje efekt „*overkill*”. Zjawisko to występuje, gdy zdeponowana energia przekracza próg letalny komórki, przez co dalszy wzrost dawki nie skutkuje zwiększeniem liczby komórek uśmierconych (Verkhovtsev et al., 2019; Linz, 2011).

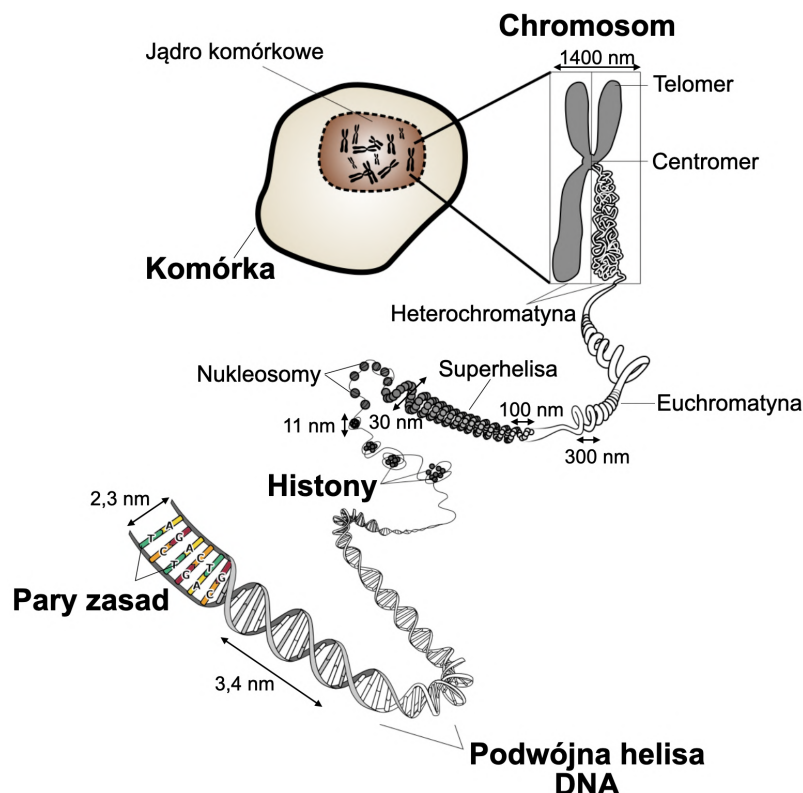
2.2 Oddziaływanie promieniowania z materiałem biologicznym

2.2.1 Kwas deoksyrybonukleinowy

Model przestrzenny kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA) został zaproponowany w 1953 roku przez Jamesa D. Watsona i Francisca Cricka, i do dziś pozostaje podstawą współczesnego rozumienia organizacji materiału genetycznego. Struktura podwójnej helisy składa się z dwóch spiralnych nici zwiniętych wokół wspólnej osi, połączonych komplementarnymi zasadami azotowymi: adeniną (A) z tyminą (T) oraz cytozyną (C) z guaniną (G). Zasady te są rozmieszczone wzdłuż helisy co 3,4 Å (0,34 nm), a pełny obrót helisy obejmuje 10 par zasad, czyli 34 Å (3,4 nm). Kąt między sąsiednimi zasadami wynosi 36°, co nadaje strukturze stabilność przestrzenną i funkcjonalną (Watson i Crick, 1953).

DNA zbudowane jest z powtarzających się jednostek – nukleotydów – złożonych z grupy fosforanowej, cząsteczki deoksyrybozy oraz jednej z czterech zasad azotowych. Nukleotydy połączone są ze sobą wiązaniami fosfodiesterowymi, natomiast nici DNA są stabilizowane przez wiązania wodorowe między zasadami komplementarnymi. Taka organizacja umożliwia wierną replikację materiału genetycznego podczas podziału komórki i zapewnia jego integralność.

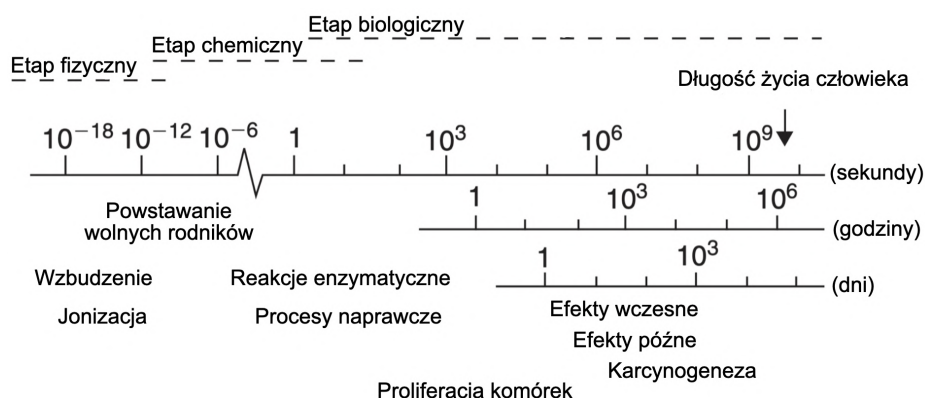
W komórkach eukariotycznych DNA zlokalizowane jest w jądrze komórkowym, gdzie tworzy kompleksy z białkami histonowymi, formując chromatynę. Struktura podwójnej helisy stanowi najniższy poziom organizacji materiału genetycznego, który ulega stopniowemu upakowaniu w bardziej złożone formy. W najbardziej skondensowanym stanie chromatyna przyjmuje postać chromosomów, złożonych z dwóch siostrzanych chromatyd połączonych centromerem. Poziomy organizacji chromatyny zostały przedstawione na Rysunku 2.12. Końce chromosomów są zabezpieczone przez telomery, które chronią DNA przed degradacją i nieprawidłowymi rekombinacjami. Tak zorganizowany materiał genetyczny pełni kluczową rolę w przechowywaniu i przekazywaniu informacji niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania, rozwoju i podziału komórki (Alberts, 1999; Krajewski, 2009).



Rysunek 2.12. Poziomy organizacji DNA w jądrze komórkowym od komórki do podwójnej helisy DNA. Rysunek zaadaptowany z (Wikibooks contributors), z uwzględnieniem nazw i rozmiarów.

2.2.2 Etapy oddziaływań z materiałem biologicznym

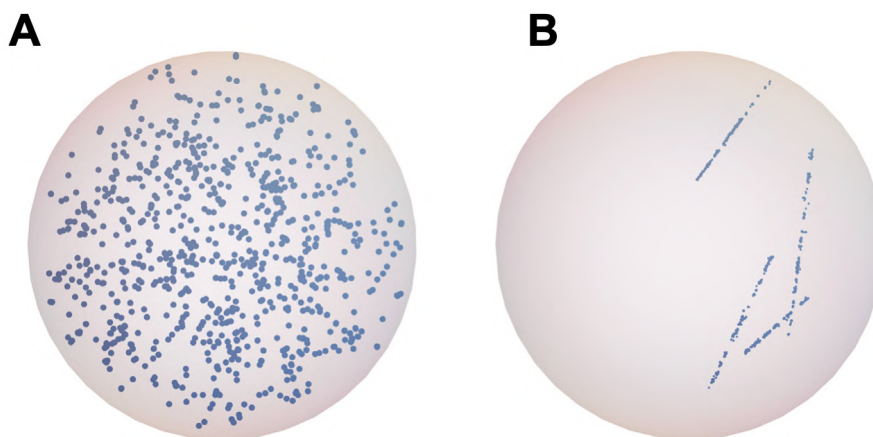
Napromienianie materiału biologicznego inicjuje szereg procesów zachodzących w różnych skalach czasowych. Zgodnie z klasyfikacją zaproponowaną przez Boaga (Boag, 1975), przedstawioną na Rysunku 2.13, wyróżnia się trzy główne etapy tych procesów, które zostały omówione poniżej.



Rysunek 2.13. Etapy i procesy zachodzące podczas oddziaływania promieniowania jonizującego z systemami biologicznymi z uwzględnieniem skali czasowej. Na podstawie (Joiner i Kogel, 2009); tłumaczenie własne na język polski.

Etap fizyczny

Pierwszy etap – etap fizyczny (10^{-18} – 10^{-12} s) – obejmuje bezpośrednie oddziaływania cząstek promieniowania z atomami DNA. Główną rolę odgrywają tu procesy jonizacji i wzbudzenia atomów. W wyniku oddziaływania promieniowania powstają wtórne cząstki jonizujące, które mogą dalej oddziaływać z kolejnymi obszarami komórki. Prowadzi to do zjawiska kaskadowej jonizacji, która może bezpośrednio uszkadzać DNA, wywołując efekty letalne (skutkujące śmiercią komórki) lub subletalne (czyli takie, które przy sprawnym mechanizmie naprawczym mogą zostać skutecznie usunięte). Przy dawce pochłoniętej równej 1 Gy liczba jonizacji wewnątrz komórki o średnicy 10 μm przekracza 10^5 (Joiner i Kogel, 2009). Przestrzenny rozkład aktów oddziaływania silnie zależy od właściwości cząstki pierwotnej. Na Rysunku 2.14 zostało przedstawione rozmieszczenie jonizacji w sferycznych jądrach limfocytów napromienionych promieniowaniem X oraz promieniowaniem α .



Rysunek 2.14. Przestrzenny rozkład jonizacji w modelowym jądrze limfocytu po napromienieniu dawką 1 Gy promieniowaniem X (panel A) oraz cząstkami α (panel B) otrzymany na podstawie symulacji przeprowadzonych z wykorzystaniem metod Monte Carlo (MC). Źródło: Brzozowska et al. (2020).

W przypadku promieniowania fotonowego akty jonizacji pojawiają się równomiernie w całej objętości jądra. Natomiast w przypadku cząstek α jonizacje są wyraźnie skupione wzdłuż wąskiego toru przemieszczania się cząstek, co odzwierciedla wysoką gęstość depozycji energii charakterystyczną dla tego typu promieniowania.

Etap chemiczny

Faza chemiczna (10^{-12} – 10 s) obejmuje procesy radiolizy wody, czyli jonizacji i wzbudzenia jej cząsteczek pod wpływem promieniowania, prowadzące do powstania ROS, w tym wolnych rodników. W wyniku radiolizy dochodzi do utworzenia jonu H_2O^+ oraz wolnego elektronu, po czym jon ten ulega rozpadowi do rod-

nika hydroksylowego ($\bullet\text{OH}$) i protonu (H^+). Powstałe wolne rodniki charakteryzują się wysoką reaktywnością chemiczną i silnymi właściwościami utleniającymi. W obecności tlenu molekularnego zachodzą dalsze reakcje, w wyniku których tworzą się ROS, takie jak nadtlenek wodoru (H_2O_2) oraz rodnik wodoronadtlenkowy ($\text{HO}_2\bullet$). Związki te mogą reagować z DNA i białkami, prowadząc do biologicznie istotnych uszkodzeń. Skala tych uszkodzeń jest silnie zależna od poziomu utleniania komórki – im wyższe stężenie tlenu, tym większa liczba reakcji rodnikowych i związanych z nimi zmian molekularnych (Trzos et al., 2020).

Etap biologiczny

Etap biologiczny (sekundy – lata) obejmuje zarówno wczesne, jak i późne odpowiedzi komórek na uszkodzenia wywołane promieniowaniem. We wczesnej fazie aktywowane są szlaki sygnałowe odpowiedzialne za wykrywanie uszkodzeń DNA, zatrzymanie cyklu komórkowego oraz uruchomienie mechanizmów naprawczych. Kluczową rolę odgrywają tutaj mechanizmy naprawcze, w szczególności enzymatyczna odbudowa uszkodzonego DNA. Choć większość uszkodzeń udaje się skutecznie naprawić, błędna naprawa może prowadzić do mutacji i niestabilności genomu, zwiększając ryzyko mutacji i innych zaburzeń genetycznych. Zmiany te mogą się ujawnić w komórkach potomnych po licznych replikacjach (Joiner i Kogel, 2009). Późne skutki tych procesów, takie jak transformacja nowotworowa, są możliwe, choć organizm dysponuje mechanizmami ochronnymi. Jednym z nich jest apoptoza – programowana śmierć komórki, która eliminuje uszkodzone komórki, zapobiegając utrwaleniu i przekazaniu zmian genetycznych (Pistritto et al., 2016).

2.2.3 Uszkodzenia DNA

Komórka eukariotyczna wypełniona jest cytoplazmą, która wraz ze ścianą komórkową nadaje jej kształt i stabilność, a także utrzymuje w odpowiednim położeniu liczne organella otoczone błonami komórkowymi. Promieniowanie jonizujące może oddziaływać na wszystkie struktury komórkowe, jednak najbardziej wrażliwą na promieniowanie częścią komórki jest jej materiał genetyczny – DNA (Baatout, 2023). Uszkodzenia DNA stanowią poważne zagrożenie dla komórki, ponieważ materiał genetyczny zazwyczaj występuje w jednej kopii, w przeciwieństwie do innych makrocząsteczek, takich jak białka czy kwasy rybonukleinowe, które występują w wielu kopiach. Uszkodzenia tych pozostałych struktur nie stanowią poważnego zagrożenia dla komórki, ponieważ mogą zostać odtworzone na podstawie informacji genetycznej zawartej w DNA. Zmiany w strukturze białek, takie jak denaturacja, tworzenie wiązań krzyżowych czy pękanie wiązań kowalencyjnych, występują zazwyczaj dopiero po zastosowaniu dawek znacznie przekraczających te, które prowadzą do wykrywalnych metodami fizykochemicznymi uszkodzeń DNA (Hrynkiewicz,

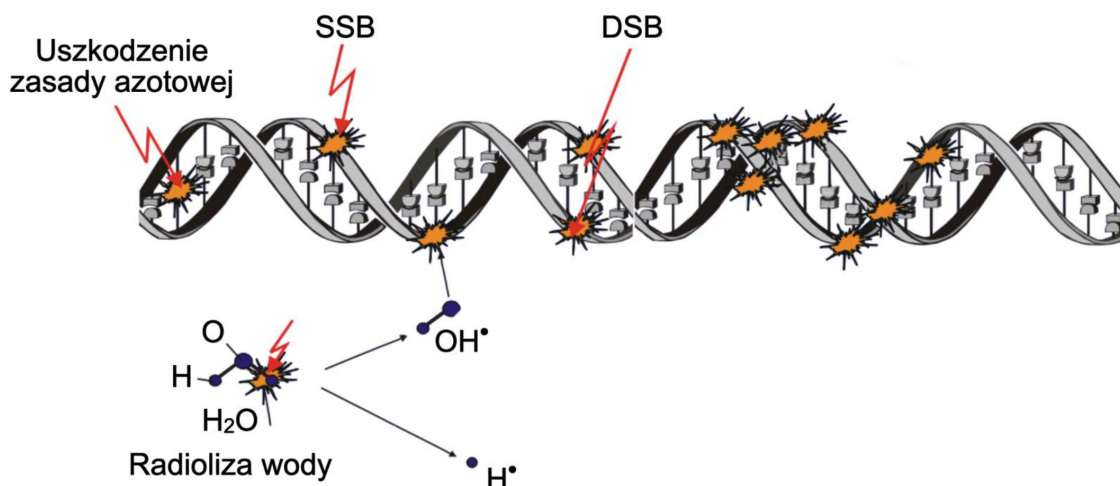
2001).

Nienaprawione lub błędnie naprawione uszkodzenia materiału genetycznego mogą prowadzić do śmierci komórki lub jej transformacji nowotworowej (Durante et al., 2013; Roos i Kaina, 2013). Uszkodzenia DNA mogą powstawać zarówno w wyniku bezpośredniego działania promieniowania jonizującego na cząsteczkę DNA, jak i pośrednio – poprzez produkty radiolizy wody. Proporcje między bezpośrednim a pośrednim mechanizmem uszkodzeń DNA zależą od rodzaju promieniowania jonizującego i jego charakterystyki fizycznej, w szczególności gęstości jonizacji. Dla promieniowania o niskiej gęstości jonizacji (promieniowanie X) dominującym mechanizmem uszkodzeń jest efekt pośredni – szacuje się, że odpowiada on za 70–90% uszkodzeń DNA. Z kolei cząstki α charakteryzujące się wysoką gęstością jonizacji uszkadzają DNA w ponad 90% w sposób bezpośredni (Hrynkiewicz, 2001).

Rodzaje uszkodzeń DNA

Rodzaj uszkodzeń DNA, niezależnie od tego, czy powstały w wyniku bezpośredniego, czy pośredniego działania promieniowania, obejmuje pojedynczonicowe uszkodzenie DNA (SSB, z ang. *single-strand break*), podwójnoniciowe uszkodzenie DNA (DSB, z ang. *double-strand break*), modyfikacje lub utratę zasad azotowych, uszkodzenia reszt cukrowych i fosforanowych, a także tworzenie wiązań krzyżowych w obrębie podwójnej helisy (Hrynkiewicz, 2001). SSB to uszkodzenie DNA polegające na przerwaniu jednej z dwóch nici podwójnej helisy DNA; druga, komplementarna nić, pozostaje nienaruszona. DSB definiuje się funkcjonalnie jako dwa SSB zlokalizowane na przeciwnych niciach w obrębie 10 par zasad (bp, z ang. *base pairs*), a więc w odległości nie większej niż 3,4 nm (Sutherland et al., 2000). To, co różni te uszkodzenia, to ich częstość i rozkład przestrzenny, które zależą od gęstości jonizacji promieniowania. Wraz ze wzrostem gęstości jonizacji obserwuje się większy udział DSB w stosunku do SSB, co znacząco zwiększa potencjał cytotoksyczny takiego promieniowania (Hrynkiewicz, 2001). Na Rysunku 2.15 zostały przedstawione trzy główne rodzaje uszkodzeń DNA.

Zarówno promieniowanie X, jak i cząstki α oddziałują z materiałem biologicznym poprzez emisję elektronów. Choć mechanizm inicjacji uszkodzeń jest zbliżony, oba rodzaje promieniowania znacząco różnią się pod względem przestrzennego rozkładu deponowanej energii, co znajduje odzwierciedlenie w odmiennej odpowiedzi biologicznej napromienianych próbek (Hrynkiewicz, 2001). Różnice te szczególnie uwidaczniają się w częstości występowania kompleksowych uszkodzeń obu nici DNA, które są trudne do naprawy i w większym stopniu determinują los komórki. Promieniowanie X, jako promieniowanie o niskim LET, wywołuje uszkodzenia o niższym stopniu złożoności niż cząstki α , które ze względu na wysoki LET, generują skupiska silnie złożonych uszkodzeń wzdłuż trajektorii jonu (Scholz, 2003;



Rysunek 2.15. Rodzaje uszkodzeń DNA powstałych w wyniku działania promieniowania jonizującego. Rysunek zaadaptowany z (Cheng, 2019), z drobnymi zmianami i tłumaczeniem własnym na język polski.

Goodhead, 1994).

Naprawa uszkodzeń DNA

W odpowiedzi na uszkodzenia DNA komórka uruchamia mechanizmy obronne, których celem jest naprawa materiału genetycznego. Kluczową rolę w tym procesie odgrywa odpowiedź na uszkodzenie DNA (DDR, z ang. *DNA damage response*) – sieć wyspecjalizowanych mechanizmów, odpowiedzialnych za rozpoznanie, sygnalizację oraz naprawę różnych typów uszkodzeń. Dzięki nim możliwe jest utrzymanie integralności i stabilności genomu. Nie jest to zaskakujące, biorąc pod uwagę, że DNA nieustannie podlega spontanicznym uszkodzeniom, będącym naturalnym skutkiem procesów metabolicznych zachodzących w komórce, jak również działaniem czynników zewnętrznych, takich jak promieniowanie jonizujące (Billen, 1990).

Pęknięcia pojedynczej nici DNA, polegające na przerwaniu wiązania fosfodiesterowego, przy zachowaniu grupy 5'-fosforanowej i 3'-hydroksylowej po obu stronach uszkodzenia, mogą być skutecznie naprawiane w procesie naprawy bezpośredniej – ligacji z udziałem ligazy DNA. Uszkodzenia pojedynczych zasad, będące wynikiem oksydacji, alkilacji, hydrolizy lub utraty zasady, są usuwane za pomocą mechanizmu wycinania zasady (BER, z ang. *Base Excision Repair*). Z kolei uszkodzenia obejmujące fragmenty nici DNA o długości od 3 do 20 par zasad naprawiane są poprzez mechanizm wycinania nukleotydów (NER, z ang. *Nucleotide Excision Repair*), który usuwa dłuższe odcinki uszkodzonego DNA i zastępuje je nowo zsyntetyzowanym fragmentem na podstawie komplementarnej matrycy.

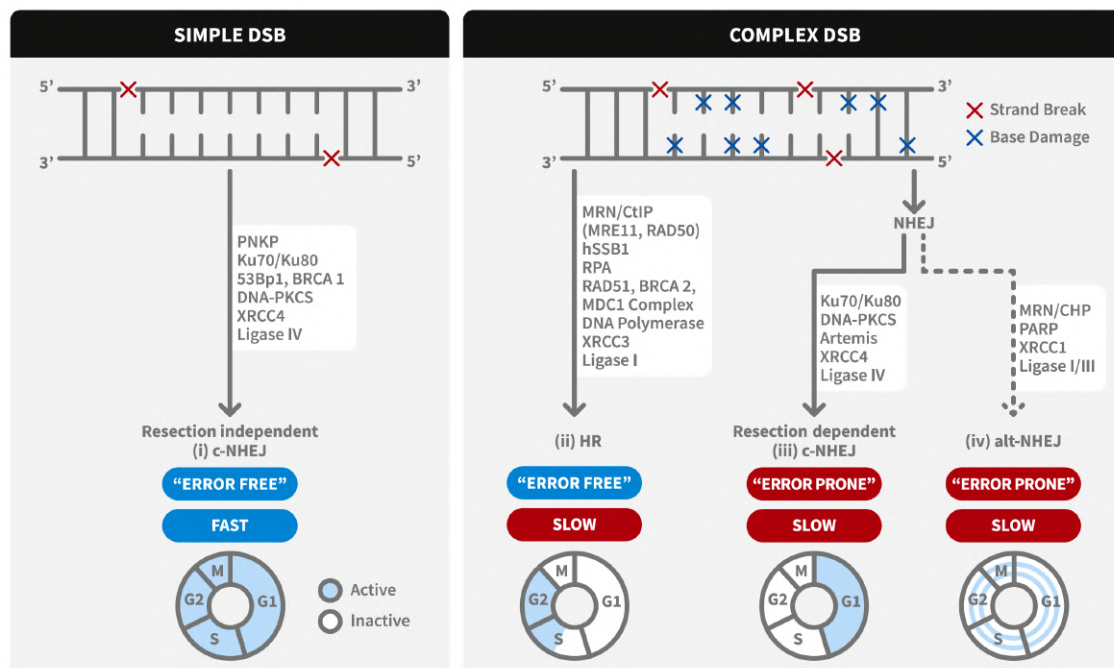
W przypadku podwójnoniciowych pęknięć DNA aktywowane są mechanizmy naprawy rekombinacyjnej, w ramach których wyróżnia się dwa główne szlaki:

rekombinację homologiczną (HR, z ang. *Homologous Recombination*), wykorzystującą nieuszkodzony fragment DNA jako matrycę do precyzyjnej odbudowy uszkodzenia, oraz naprawę niehomologiczną (NHEJ, z ang. *Nonhomologous End-Joining*), polegającą na bezpośrednim łączeniu końców DNA bez udziału matrycy. Mechanizm HR charakteryzuje się wysoką wiernością odbudowy nici i zachodzi głównie w fazach S i G2 cyklu komórkowego, gdy dostępna jest siostrzana chromatyna jako wzorzec naprawy. NHEJ to proces szybszy, aktywowany natychmiast po wykryciu uszkodzenia. Inicjuje on formowanie kompleksu białkowego, który zatrzymuje cykl komórkowy do czasu zakończenia naprawy. Łączenie końców DNA znajdujących się w bliskiej odległości może jednak skutkować utratą fragmentów materiału genetycznego. Jeśli do takiej sytuacji dojdzie w komórkach dzielących się, może to prowadzić do powstania mutacji (Hall i Giaccia, 2018; Santivasi i Xia, 2014).

Na Rysunku 2.16 został przedstawiony schemat ilustrujący zależność między wyborem ścieżki naprawy pęknięć podwójnej nici DNA a ich złożonością (proste – simple, złożone – complex), fazą cyklu komórkowego, szybkością naprawy (szybka – fast, powolna – slow) oraz jej precyzją (dokładna – error-free, podatna na błędy – error-prone).

Proste DSB indukowane promieniowaniem, podobnie jak enzymatycznie wywołane DSB o idealnie komplementarnych końcach (Lieber, 2010), są naprawiane za pomocą szybkiego i standardowego szlaku NHEJ (c-NHEJ, z ang. *classical NHEJ*) (Löbrich i Jeggo, 2017). Mechanizm ten polega na połączeniu pasujących końców przecięcia DNA w ciągu kilku minut, co umożliwia naprawę ponad 80% takich uszkodzeń wywołanych promieniowaniem o niskim LET w ciągu 2-4 godzin. Ponieważ promieniowanie często powoduje chemiczne modyfikacje końców DNA, proces ten obejmuje ich enzymatyczne odtworzenie – przywrócenie grupy 5 -fosforanowej i 3 -hydroksylowej z udziałem kinazy/fosfatazy polinukleotydowej (PNKP, z ang. *polynucleotide kinase 3-phosphatase*) przed etapem ligacji (Weinfeld et al., 2011). Szybka ścieżka c-NHEJ jest dostępna przez cały cykl komórkowy i nie rekonstruuje pierwotnej sekwencji DNA. W wyniku tego może dochodzić do drobnych delecji na końcach uszkodzeń, jeśli pierwotna informacja została utracona (Daley i and, 2005). Niemniej jednak, naprawa większości prostych DSB zazwyczaj przebiega bezbłędnie, a nawet jeśli wystąpią błędy, ograniczają się one zwykle do niewielkich ubytków sekwencji.

Złożone DSB, częściej powstające w wyniku działania promieniowania o wysokim LET, są naprawiane głównie przez mechanizm HR, dostępny jedynie w późnej fazie S oraz w fazie G2 cyklu komórkowego, lub przez wolniejszy, zależny od resekcji wariant szlaku c-NHEJ (Shibata et al., 2011; Ensminger i Löbrich, 2020). W przypadku złożonych DSB, szlak c-NHEJ wymaga wcześniejszego przekształcenia dwuniciowego DNA w jednoniciowe DNA w procesie zwanym resekcją, który



Rysunek 2.16. Mechanizm naprawy DSB w zależności od złożoności DSB oraz fazy cyklu komórkowego. Na uproszczonym schemacie zostały przedstawione cztery główne szlaki naprawy DSB, ich dostępność w różnych fazach cyklu komórkowego oraz kluczowe białka naprawcze. Powszechne białka sygnalizacyjne obecne we wszystkich czterech mechanizmach, takie jak ATM, ATR i H2AX, zostały pominięte dla przejrzystości. Panel lewy: proste DSB są szybko i precyzyjnie naprawiane przez klasyczny szlak c-NHEJ, który nie wymaga resekcji. Enzym PNKP przywraca prawidłowe zakończenia nici, a ligacja przebiega z udziałem kompleksu Ku70/Ku80 i DNA-PKcs. Panel prawy: złożone DSB wymagają wolniejszych, resekcyjnych mechanizmów: c-NHEJ, alt-NHEJ lub HR. Oba wolniejsze szlaki NHEJ są aktywne poza fazą G2 – c-NHEJ w fazie G1, a alt-NHEJ w pozostałych fazach. W fazie G2 złożone DSB są preferencyjnie kierowane na ścieżkę HR, o ile jest ona dostępna. Źródło: Rucinski et al. (2021)

obejmuje utworzenie pośredniej struktury w kształcie spinki do włosów (z ang. *hairpin*). Następnie, zależna od ATM nukleaza Artemis usuwa tę strukturę, umożliwiając końcową ligację z udziałem kompleksu XRCC4–Ligaza IV (Riballo et al., 2004; Löbrich i Jeggo, 2017).

Alternatywny NHEJ (alt-NHEJ, z ang. *alternative NHEJ*,) to inny wariant wolnej naprawy złożonych DSB. Szlak ten stanowi rzadziej wykorzystywany i mniej wydajny mechanizm naprawy DSB w sytuacjach, gdy c-NHEJ jest niedostępny. W alt-NHEJ uczestniczy inny zestaw białek, między innymi Poli (ADP ryboza) polimeraza 1 (PARP-1) (Chiruvella et al., 2013; Löbrich i Jeggo, 2017). Mechanizm alt-NHEJ jest aktywny we wszystkich fazach cyklu komórkowego. Spośród wymienionych mechanizmów naprawy DSB jedynie HR zapewnia bezbłędną naprawę. Wolniejsze szlaki – cNHEJ i alt-NHEJ – często prowadzą do delecji oraz translo-

kacji chromosomowych.

2.2.4 Promieniowrażliwość komórek

Promieniowrażliwość komórek, czyli ich zdolność do reagowania na działanie promieniowania jonizującego, zależy od wielu czynników fizycznych, chemicznych, biologicznych, omówionych poniżej, a także od uwarunkowań technicznych związanych z dokładnością wykonania radioterapii.

Kluczową rolę w tej odpowiedzi odgrywa aktywność proliferacyjna komórek oraz skuteczność mechanizmów naprawy DNA. Komórki proliferujące, które aktywnie przechodzą przez cykl komórkowy, są bardziej wrażliwe na promieniowanie niż komórki nieproliferujące, znajdujące się w fazie spoczynkowej G0. Wrażliwość komórek zmienia się również w zależności od fazy cyklu komórkowego – najwyższa występuje w późnej fazie G2 oraz podczas podziału mitotycznego, natomiast najniższa w fazie S, co wiąże się ze zmianami w organizacji chromatyny (Krajewski, 2009).

Na poziomie fizycznym promieniowrażliwość zależy od dawki, rodzaju i energii promieniowania, jego mocy, sposobu frakcjonowania oraz temperatury (Janiak i Wójcik, 2005). Chemicznie, istotnym czynnikiem jest obecność tlenu w tkance – tlen zwiększa efekty cytotoksyczne promieniowania, podczas gdy warunki hipoksji mogą je ograniczać (Hall i Giaccia, 2018). Istnieją również związki promienioczułające i radioochronne, które modyfikują odpowiedź komórkową. Wśród czynników biologicznych wyróżnia się między innymi typ komórki (macierzysta versus zróżnicowana), wiek organizmu, obecność wrodzonych mutacji oraz zakres napromienienia (całe ciało lub jego część). Promieniowrażliwość wynika także z poziomu konformacji chromatyny oraz stopnia aktywacji szlaków sygnalizacji komórkowej. Równowaga między uszkodzeniami a naprawą DNA determinuje wewnętrzną promieniowrażliwość komórki (Chavaudra et al., 2004). Istnieje bezpośredni związek między molekularnymi zmianami wywołanymi przez promieniowanie w genomowym DNA a konsekwencjami biologicznymi obserwowanymi na poziomie komórkowym (Szumiel, 2008). Zrozumienie tych mechanizmów ma kluczowe znaczenie zarówno w kontekście terapii nowotworowej, jak i ochrony radiologicznej.

Jednym z badanych aspektów nad promieniowrażliwością jest wpływ temperatury. Zostało wykazane, że napromienianie komórek w warunkach hipotermii (na topniejącym lodzie) hamuje procesy naprawy DNA, co może być wykorzystywane w badaniach nad mechanizmami uszkodzeń DSB (Lisowska et al., 2018).

2.3 Odpowiedź komórkowa i sposoby jej detekcji

Radiobiologia zajmuje się badaniem wpływu promieniowania jonizującego na organizmy żywe, ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmów powstawania uszkodzeń materiału genetycznego oraz ich konsekwencji biologicznych. Celem tych badań jest nie tylko poznanie podstaw oddziaływania promieniowania, ale również ocena zagrożeń z nim związanych i opracowanie metod ochrony przed jego negatywnym wpływem. W badaniach wykorzystuje się trzy główne podejścia badawcze: *in vitro* (na komórkach i tkankach poza organizmem), *in vivo* (na żywych organizmach) oraz *in silico* (z użyciem technik komputerowych, algorytmów i symulacji). Coraz większe znaczenie zyskują metody oparte na symulacjach MC, które pozwalają na analizę zjawisk trudnych do zmierzenia w warunkach eksperymentalnych.

W radiobiologii do oceny odpowiedzi komórek na promieniowanie wykorzystuje się zróżnicowane techniki eksperymentalne, które pozwalają analizować odpowiedź komórkową na kilku poziomach organizacji biologicznej. Do badań uszkodzeń radiacyjnych na poziomie komórkowym stosuje się metody oceniające zdolność komórek do przeżycia i proliferacji po napromienianiu, takie jak klonogeny test przeżywalności czy oznaczenia apoptozy. Do badania efektów działania promieniowania jonizującego na poziomie chromosomalnym wykorzystuje się testy cytogenetyczne, które pozwalają wykryć nieprawidłowości strukturalne w chromosomach, na przykład analizę aberracji chromosomowych. Analiza skutków promieniowania na poziomie DNA obejmuje techniki umożliwiające detekcję i ocenę uszkodzeń materiału genetycznego oraz jego naprawy, takie jak test γ H2AX, i-BLESS (z ang. *in situ Breaks Labeling, Enrichment on Streptavidin and next-generation Sequencing*) oraz kwantyfikacja DSB z użyciem mikroskopii sił atomowych (AFM, z ang. *Atomic Force Microscope*). Do badania oceny uszkodzeń indukowanych promieniowaniem na poziomie ekspresji genetycznej analizuje się zmiany w transkrypcji genów oraz produkcji białek jako odpowiedź komórki na stres związany z promieniowaniem. Przykład stanowią badania wykorzystujące reakcję łańcuchową polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR, z ang. *quantitative Polymerase Chain Reaction*).

2.3.1 Badania na poziomie komórkowym

Test klonogeny

Przeżywalność komórkowa w radiobiologii definiowana jest jako zdolność komórek do zachowania funkcji proliferacyjnych i tworzenia kolonii, czyli skupisk co najmniej 50 komórek wywodzących się z pojedynczej komórki, która przeżyła (Franken et al., 2006). Komórki wykazujące tę właściwość określa się mianem klonogeny lub macierzystych. Komórkami klonogeny nazywane są komórki nowotworowe, zdolne do nieograniczonej liczby podziałów. Są one odpowiednikiem

komórek macierzystych wśród komórek prawidłowych (Gasińska, 2006). Pojęcie to ma kluczowe znaczenie w kontekście radioterapii nowotworów, której celem jest eliminacja wszystkich komórek nowotworowych poprzez pozbawienie ich zdolności do dalszych podziałów (Hall i Giaccia, 2018).

Przeżywalność komórek można badać za pomocą klonogenego testu przeżywalności (z ang. *Clonogenic survival assay*). Jest to metoda stosowana do oceny wpływu promieniowania jonizującego (lub czynników zewnętrznych) na komórki *in vitro* polegająca na określeniu frakcji komórek, które zachowały zdolność do tworzenia kolonii po ekspozycji na promieniowanie (SF, z ang. *Surviving Fraction*) (Hrynkiewicz, 2001). W celu jej obliczenia konieczna jest znajomość wydajności klonowania (PE, z ang. *Plating Efficiency*), określającej zdolność komórek do tworzenia kolonii w warunkach kontrolnych:

$$PE = \frac{\text{Liczba powstałych kolonii}}{\text{Liczba wysianych komórek}}. \quad (2.6)$$

Obliczone PE ze wzoru (2.6) wykorzystuje się do obliczenia SF zgodnie z następującą formułą:

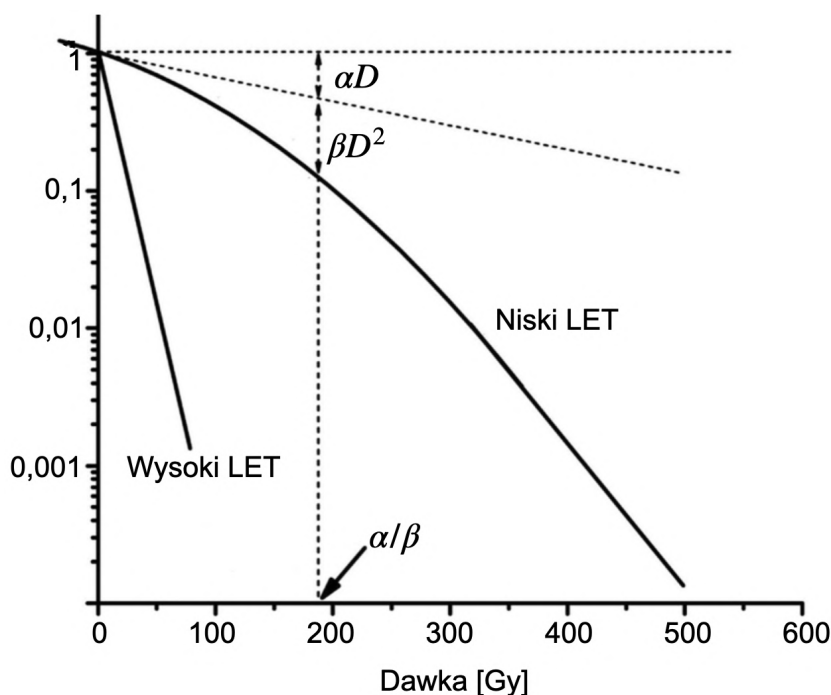
$$SF = \frac{\text{Liczba powstałych kolonii}}{\text{Liczba wysianych komórek} \cdot PE}. \quad (2.7)$$

Umieszczenie frakcji przeżywających komórek na wykresie w funkcji dawki pozwala na uzyskanie charakterystycznych krzywych przeżywalności w skali półlogarytmicznej (Rysunek 2.17).

Do matematycznego opisu krzywych przeżywalności wykorzystuje się model liniowo-kwadratowy (LQ, z ang. *Linear-Quadratic Model*) (Joiner i Kogel, 2009). Model ten opisuje zależność między frakcją przeżywających komórek a dostarczoną dawką promieniowania D i opiera się na dwóch parametrach dopasowania:

$$SF = e^{-\alpha D - \beta D^2}. \quad (2.8)$$

Przy dawce wyrażonej w jednostkach Gy, parametry α i β mają odpowiednio jednostki Gy^{-1} oraz Gy^{-2} . Ramię krzywej w początkowym odcinku odpowiada głównie liniowemu składnikowi oznaczonemu jako α , natomiast przy wyższych wartościach dawek coraz większy udział ma składnik kwadratowy β . Stopień zakrzywienia krzywej można opisać za pomocą stosunku α/β , który określa wrażliwość tkanki na frakcjonowane napromienianie oraz wskazuje dawkę, przy której wpływ komponentu liniowego i kwadratowego są jednakowe. Na wykresie krzywej przeżywalności przedstawionym na Rysunku 2.17 w skali półlogarytmicznej kształt krzywej opisany jest jako początkowe ramię oraz następująca po nim część



Rysunek 2.17. Krzywa przeżywalności komórek poddanych działaniu promieniowania jonizującego o niskim i wysokim LET opisana modelem liniowo-kwadratowym. Na podstawie (Kassis, 2008); tłumaczenie własne na język polski.

liniowa. Obecność ramienia przypisuje się pośrednim efektom działania promieniowania, natomiast liniowy przebieg krzywej związany jest z oddziaływaniami bezpośrednimi. W przypadku promieniowania o wysokim LET (na przykład cząstki α), gdzie dominują oddziaływania bezpośrednie krzywa przeżywalności przyjmuje przebieg czysto wykładniczy w funkcji dawki, natomiast dla promieniowania o niskim LET (na przykład promieniowanie X) – liniowo-kwadratowy (Ostashevsky, 1990; McMahon, 2018)

Apoptoza

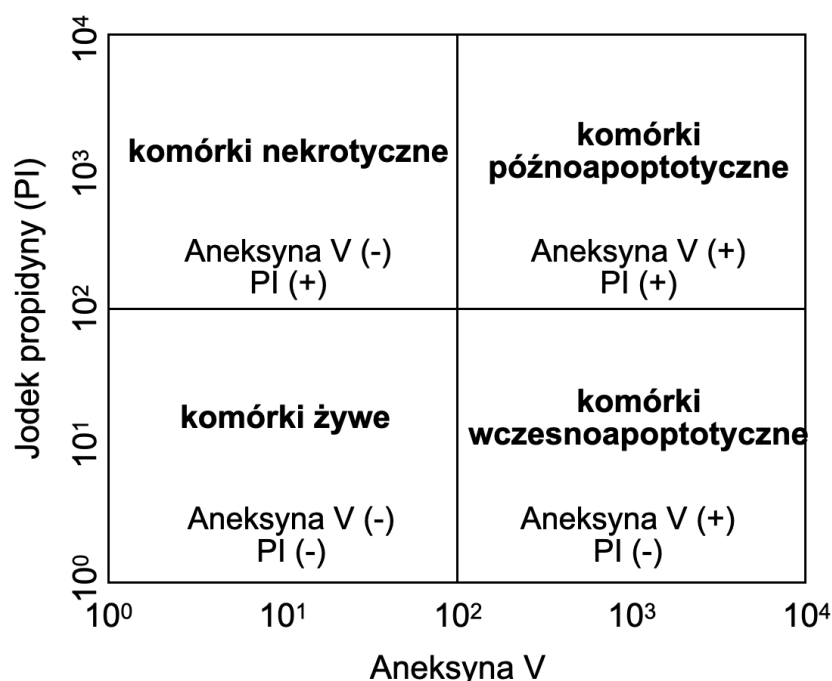
Komórki po napromienieniu mogą umrzeć w wyniku różnych mechanizmów. W zależności od fazy cyklu, w której dochodzi do śmierci, wyróżnia się śmierć interfazalną oraz śmierć mitotyczną (Janiak i Wójcik, 2005). Śmierć interfazalna komórek może wystąpić na każdym etapie cyklu komórkowego i zazwyczaj następuje w ciągu kilku do kilkudziesięciu godzin po ekspozycji na promieniowanie. Ten rodzaj śmierci może nastąpić albo w formie apoptozy, albo nekrozy (Hryniewicz, 2001).

Apoptoza stanowi genetycznie kontrolowany mechanizm programowanej śmierci komórki, aktywowany między innymi w odpowiedzi na uszkodzenia DNA. Uznaje się ją za naturalny proces obronny organizmu, który zapobiega rozwojowi nowotworów. W przeciwieństwie do nekrozy, apoptoza jest procesem uporządkowa-

nym i aktywnym, często określanym jako „samobójstwo komórki”. Komórka poddana apoptozie przechodzi charakterystyczne zmiany morfologiczne: początkowo się kurczy, jej chromatyna ulega kondensacji i fragmentacji, a błona komórkowa formuje pęcherzyki. W efekcie komórka dzieli się na ciała apoptotyczne, które są szybko usuwane przez sąsiednie komórki lub makrofagi bez wywoływania reakcji zapalnej (Roos i Kaina, 2013). Z kolei nekroza to forma śmierci komórkowej wynikająca z utraty integralności błony komórkowej i zaburzeń homeostazy wodno-elektrolitowej. Prowadzi to do napływu wody i jonów do wnętrza komórki, co skutkuje jej obrzękiem, rozpadem organelli oraz lizy komórki, często z towarzyszącym stanem zapalnym. Jest to proces nagły, niekontrolowany i chaotyczny, który znacząco różni się od precyzyjnie regulowanej apoptozy (Okada i Mak, 2004).

Cytometria przepływowa (FC, z ang. *Flow Cytometry*) to technika analityczna umożliwiająca jednoczesne badanie i sortowanie pojedynczych komórek lub cząstek zawartych w próbce. Metoda ta wykorzystuje właściwości optyczne, immunologiczne oraz genetyczne komórek, co pozwala na ich identyfikację, szczegółową charakterystykę oraz ocenę ilościową. Dzięki swojej wszechstronności, cytometria przepływowa znajduje zastosowanie w licznych dziedzinach nauki, między innymi w immunologii, biologii komórki, onkologii, mikrobiologii czy biotechnologii. Polega ona na tym, że próbka wprowadzana jest do wąskiego strumienia płynu, który kieruje komórki pojedynczo przez wiązkę lasera. W trakcie tego procesu światło ulega rozproszeniu, a zastosowane fluorochromy emitują sygnały proporcjonalne do cech fizycznych i biochemicznych komórek. Zarejestrowane sygnały są przetwarzane przez detektory i analizowane komputerowo z użyciem zaawansowanego oprogramowania, co pozwala na precyzyjne profilowanie populacji komórkowych (Cossarizza et al., 2019; Bendall et al., 2012).

Cytometria przepływowa wykorzystywana jest w oznaczeniach apoptozy przy użyciu dwóch fluorochromów: aneksyny V sprzężonej z izotiocyjanianem fluoresceiny (FITC, z ang. *Fluorescein Isothiocyanate*), która wiąże się z fosfatydyloseryną eksponowaną na powierzchni błony oraz jodku propidyny (PI, z ang. *Propidium Iodide*), który barwi wyłącznie DNA martwych komórek. Zastosowanie takiej kombinacji barwników pozwala na wyodrębnienie czterech populacji komórkowych: żywych, we wczesnej apoptozie, późnej apoptozie oraz w nekrozie (Cossarizza et al., 2019; Bendall et al., 2012) (Rysunek 2.18).

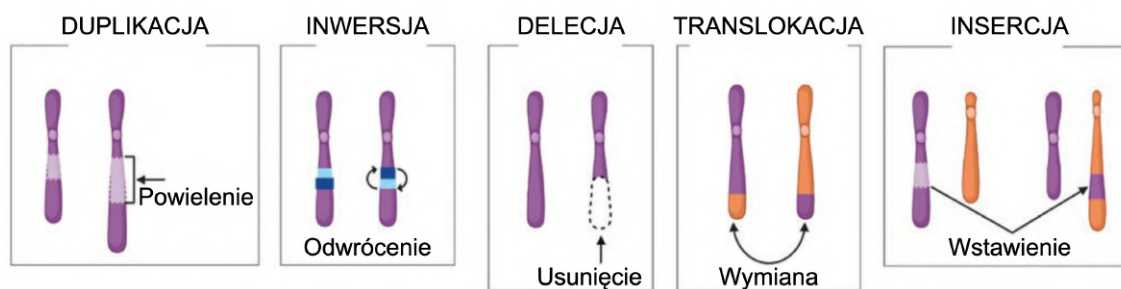


Rysunek 2.18. Schemat podziału komórek na cztery populacje w badaniu apoptozy.

2.3.2 Badania na poziomie chromosomalnym

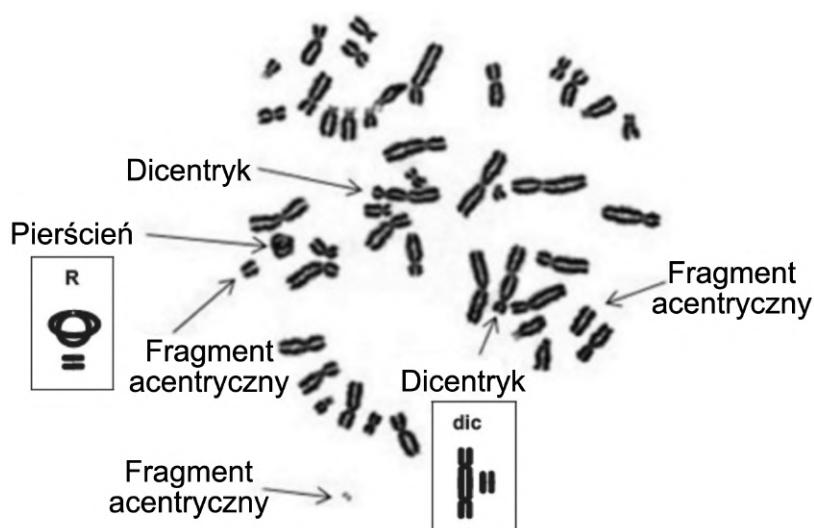
Aberracje chromosomowe

Mutacje chromosomowe, zwane również aberracjami chromosomowymi, są obserwowane podczas pierwszej mitozy po napromienieniu komórek i obejmują różne zmiany strukturalne chromosomów, takie jak delecje, inwersje, insercje, substytucje, duplikacje czy translokacje fragmentów chromosomów. Duplikacja to mutacja genetyczna, w wyniku której powstaje jedna lub więcej kopii fragmentu DNA lub regionu chromosomu. W przypadku inwersji fragment chromosomu odłamuje się i wstawia w odwrotnej orientacji w ramach tego samego chromosomu. Delecja to aberracja chromosomowa, w której część chromosomu lub jeden lub więcej nukleotydów z fragmentu DNA zostaje utraconych. Translokacja dotyczy dwóch chromosomów, w których fragment jednego chromosomu odłamuje się i przyłącza do innego chromosomu. Insercja to mutacja genetyczna, w której fragment jednego chromosomu jest usuwany i wstawiany do innego chromosomu lub tego samego chromosomu (Baatout, 2023). Rodzaje mutacji zostały przedstawione na Rysunku 2.19.



Rysunek 2.19. Rodzaje aberracji chromosomowych. Na podstawie (Baatout, 2023); tłumaczenie własne na język polski.

Mutacje, które zostały przedstawione na Rysunku 2.19, mogą prowadzić również do innych aberracji chromosomowych, które są efektem wymiany fragmentów pomiędzy dwoma różnymi chromosomami, a nie wyłącznie rekombinacji wewnątrz jednego chromosomu. Trzy, o których warto wspomnieć, to chromosomy dicentryczne (dicentryki) i fragmenty acentryczne oraz chromosomy pierścieniowe (pierścienie) (Baatout, 2023) (Rysunek 2.20).



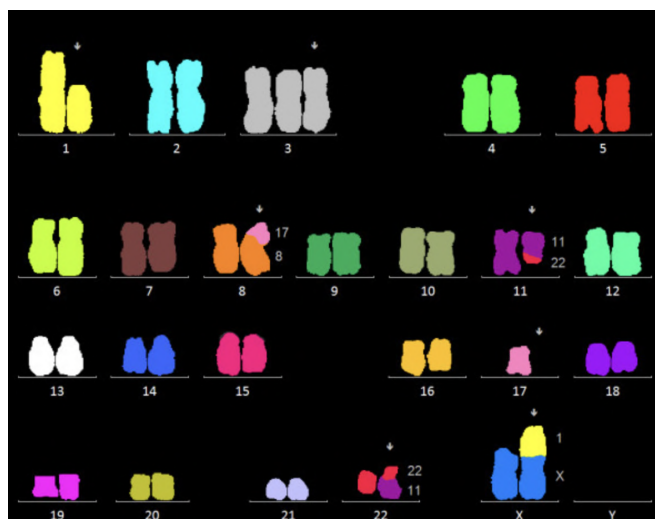
Rysunek 2.20. Zdjęcie mikroskopowe chromosomów w komórce ludzkiej w metafazie podanej ekspozycji na promieniowanie γ o dawce 5 Gy. Na podstawie (Baatout, 2023; Gałecki et al., 2019); tłumaczenie własne na język polski.

Chromosomy dicentryczne są to takie chromosomy, które posiadają dwa centromery zamiast jednego, powstające na skutek połączenia się dwóch odcinków chromosomów z centromerami. W metafazie są widoczne jako jeden chromosom z dwoma centromerami. Tego typu aberracja najprawdopodobniej ulegnie eliminacji podczas mitozy. Fragmenty acentryczne to fragmenty pojedynczego chromosomu lub połączone części różnych chromosomów, które nie zawierają centromeru. Chromosom pierścieniowy to chromosom, który ma dwa pęknięcia na przeciwnych końcach i łączy się, tworząc pierścień. Obie te aberracje nie mogą zostać zachowane

w komórkach potomnych i w większości przypadków prowadzą do ich śmierci (Baatout, 2023).

Test chromosomów dicentrycznych jest jednym z najczęściej stosowanych testów w celu oszacowania dawek w zakresie od 0,2 Gy do około 5 Gy. Polega on na zliczeniu częstości występowania chromosomów dicentrycznych powstających w wyniku napromienienia żywych komórek (Kanda, 2000). Do oceny otrzymanej dawki promieniowania jonizującego wykorzystuje się krzywe wzorcowe, które zostają wykonane w laboratoriach radiobiologicznych. Napromieniony materiał biologiczny umieszcza się, zgodnie z protokołami, na szkiełkach, które później są analizowane pod mikroskopem celem zliczenia powstałych aberracji chromosomowych (w tym chromosomów dicentrycznych). Następnie zostaje wykreślona krzywa przedstawiająca zależność liczby dicentryków od dawki promieniowania jonizującego. Liczba powstających dicentryków wzrasta wraz ze wzrostem dawki pochłoniętej (Bhavani et al., 2014; De Amicis et al., 2014). Test dicentryków jest rekomendowanym przez Europejską Sieć Biodozymetrii RENEb narzędziem radiacyjnej dozymetrii biologicznej (Wojcik et al., 2017).

Aberracje chromosomowe mogą być również badane przy użyciu cytogenetycznej metody fluorescencyjnej hybrydyzacji (FISH, z ang. *Fluorescent In Situ Hybridization*). Technika ta pozwala na zabarwienie konkretnych par chromosomów homologicznych (Lucas et al., 1993). Technika, która obecnie jest wykorzystywana podczas badań aberracji chromosomowych i umożliwia wybarwienie wszystkich chromosomów na różne kolory to wielokolorowa analiza FISH (m-FISH, z ang. *multicolor FISH*). Metoda ta zapewnia precyzyjną identyfikację translokacji (Krings Rocha et al., 2011), co zostało przedstawione na Rysunku 2.21.



Rysunek 2.21. Chromosomy wybarwione metodą m-FISH ilustrujące delecję w obrębie chromosomu 1, trisomię chromosomu 3, niezrównoważoną translokację między chromosomami (8;17) i (X;1), zrównoważoną translokację między chromosomami (11;22) oraz stratę jednego chromosomu 17. Źródło: Krings Rocha et al. (2011).

2.3.3 Badania na poziomie DNA

Test γ H2AX

W badaniach radiobiologicznych detekcja ognisk naprawczych indukowanych przez promieniowanie jonizujące (IRIF, z ang. *Ionizing Radiation-Induced Foci*) stanowi powszechnie stosowaną metodę oceny dynamiki powstawania oraz naprawiania DSB (Belyaev, 2010). Ogniska naprawcze to wyspecjalizowane obszary w jądrze komórkowym, w których – w odpowiedzi na uszkodzenie materiału genetycznego – dochodzi do lokalnej akumulacji białek uczestniczących w procesach naprawczych DNA.

Jedną z najbardziej czułych i precyzyjnych metod wykrywania DSB jest test γ H2AX, oparty na technikach immunocytochemicznych umożliwiających detekcję zmodyfikowanej postaci histonu H2AX. γ H2AX powstaje w wyniku fosforylacji seryny w pozycji 139 histonu H2AX, procesu inicjowanego przez kinazy ATM, ATR oraz DNA-PK (Reindl et al., 2017). Modyfikacja ta zachodzi w ciągu kilku minut od powstania DSB i obejmuje region chromatyny o długości około 2 milionów par zasad wokół miejsca uszkodzenia. Tak rozległa zmiana struktury chromatyny umożliwia mikroskopową wizualizację IRIF w postaci wyraźnych, kompaktowych sygnałów o średnicy 400–600 nm (Baatout, 2023).

Po napromienieniu komórek obserwuje się dynamiczny wzrost liczby ognisk γ H2AX, osiągający maksimum zazwyczaj w ciągu godziny od ekspozycji. Następnie liczba ta stopniowo maleje, co odzwierciedla postępujący proces naprawy uszkodzeń DNA. Zakłada się, że ogniska γ H2AX można wiarygodnie zliczać w komórkach napromienionych dawką do około 10 Gy – przy wyższych dawkach nakładające się sygnały utrudniają ich jednoznacznie rozróżnienie (Sherin et al., 2013). Typowy przedział czasowy detekcji maksymalnej liczby ognisk γ H2AX mieści się między 30 a 60 minutą po napromienieniu. W przypadku komórek nowotworowych, ze względu na często występujące zaburzenia w mechanizmach naprawy DNA, czas maksymalnego nagromadzenia ognisk γ H2AX może ulec wydłużeniu (Baatout, 2023).

Co istotne, naturalna amplifikacja sygnału – wynikająca z intensywnej akumulacji γ H2AX oraz innych białek naprawczych w miejscach DSB (na przykład 53BP1, BRCA1, RAD51, DNA-PKcs, które pojawiają się podczas naprawy uszkodzeń DNA, co zostało przedstawione na Rysunku 2.16)) – umożliwia wyjątkowo czułe oszacowanie pochłoniętej dawki promieniowania. Estymację tę można przeprowadzić na podstawie prostego zliczania IRIF na obrazach uzyskanych metodą immunofluorescencji (Moquet et al., 2017). Mikroskopia fluorescencyjna to zaawansowana technika obrazowania umożliwiająca selektywną wizualizację wybranych struktur komórkowych z wykorzystaniem specyficznych barwników fluorescencyjnych lub genetycznie kodowanych białek, takich jak zielone białko fluorescencyjne

(GFP, z ang. *Green Fluorescent Protein*). Te znaczniki wiążą się selektywnie z docelowymi strukturami wewnątrz komórki. Po naświetleniu światłem wzbudzającym fluorofory emitują światło, które jest rejestrowane przez układ optyczny mikroskopu (Jakob i Durante, 2012). Dzięki temu, że tylko wzbudzone fluorofory emitują światło, możliwe jest uzyskanie obrazów o wysokiej rozdzielczości i kontraście, przy jednoczesnym ograniczeniu sygnału tła.

i-BLESS

i-BLESS to metoda biologii molekularnej wykorzystywana do precyzyjnego mapowania podwójnoniciowych pęknięć DNA w całym genomie. Metoda ta łączy proces wzbogacenia fragmentów DNA zawierających pęknięcia z sekwencjonowaniem nowej generacji, umożliwiając identyfikację oraz szczegółową analizę regionów genomu, w których dochodzi do uszkodzeń. Technika umożliwia szczegółową analizę uszkodzeń DNA oraz dynamiki naprawy w obrębie całego genomu (Biernacka et al., 2018).

Kwantyfikacja DSB za pomocą AFM

W pracy (Sofińska et al., 2022) przedstawiono nowatorską metodę ilościowej oceny uszkodzeń DSB za pomocą mikroskopii sił atomowych. Tradycyjne metody detekcji DSB, takie jak elektroforeza żelowa czy test kometowy, charakteryzują się ograniczoną rozdzielczością w zakresie krótkich fragmentów DNA, co ma wpływ na dokładne określenie liczby i lokalizacji uszkodzeń. AFM pozwala na bezpośrednie i precyzyjne zobrazowanie pojedynczych cząsteczek DNA z nanometrową precyzją, umożliwiając określenie liczby DSB poprzez statystyczną analizę rozkładu długości powstałych fragmentów DNA po ich uszkodzeniu (Sofińska et al., 2022).

2.3.4 Badania *in silico*

Metody MC stosowane są do modelowania matematycznego złożonych procesów. Symulacje MC odegrały kluczową rolę w modelowaniu reakcji układów fizycznych i biologicznych w skali od setek mikrometrów do nanometrów, co potwierdzają liczne badania (Olko i Booz, 1990; Nikjoo et al., 1999; Conte et al., 2012; Francis et al., 2011; Friedland et al., 2017; Barbieri et al., 2018; Bancer et al., 2020; Sakata et al., 2020). Metody Monte Carlo śledzenia (struktury toru) cząstek krok po kroku znajdują szerokie zastosowania w badaniach uszkodzeń DNA, symulacjach chemii radiacyjnej oraz w planowaniu leczenia radioterapeutycznego. Większość kodów MC umożliwia symulację kolejnych etapów oddziaływań – fizycznego, fizykochemicznego i chemicznego – z fotonami, elektronami, protonami, atomami wodoru, cząstkami alfa i ciężkimi jonami w wodzie. Dalsze procesy fizykochemiczne i chemiczne, prowadzące od jonizacji i wzbudzeń do powstania reaktywnych cząsteczek

chemicznych modelowane są krok po kroku lub przy zastosowaniu bardziej wydajnych metod. Wstępna ocena uszkodzeń DNA opiera się na analizie rozmieszczenia punktów zdeponowanej energii (dla efektów bezpośrednich) oraz przestrzennego rozkładu reaktywnych form tlenu (dla efektów pośrednich) w uproszczonych modelach geometrycznych struktur biologicznych, takich jak włókna chromatyny, plazmidy, bakterie czy komórki. Modelowanie oddziaływań promieniowania z materiałem biologicznym z wykorzystaniem metod MC stanowi cenne narzędzie w badaniach radiobiologicznych. Metoda ta umożliwia symulację procesów zachodzących w nanoskali, dostarczając szczegółowych informacji na temat rozkładu depozycji energii oraz powstających w jego wyniku efektów biologicznych. W literaturze dostępnych jest wiele narzędzi opartych na metodzie MC, wykorzystywanych do analizy skutków promieniowania w materiale biologicznym. Przegląd wybranych narzędzi został przedstawiony w publikacji (Kyriakou et al., 2022).

Metody Monte Carlo są obecnie stosowane w klinicznej dozymetrii wiązek elektronowych i fotonowych o energiach rzędu MeV. W związku z tym opracowano oraz wdrożono do zastosowań klinicznych szereg systemów opartych na symulacjach MC służących do planowania leczenia pacjentów w radioterapii (między innymi PEREGRINE, DPM, VMC++, MCV, MMC, ORANGE) (Chetty et al., 2007). Oprogramowanie służące do obliczania dawek promieniowania bazuje na kodach opartych na metodzie MC, takich jak MCNP, EGS, GEANT, FLUKA oraz PENLOPE (Briesmeister et al., 2000; Liu et al., 1999; Allison et al., 2016; Ferrari et al., 2005; Baró et al., 1995).

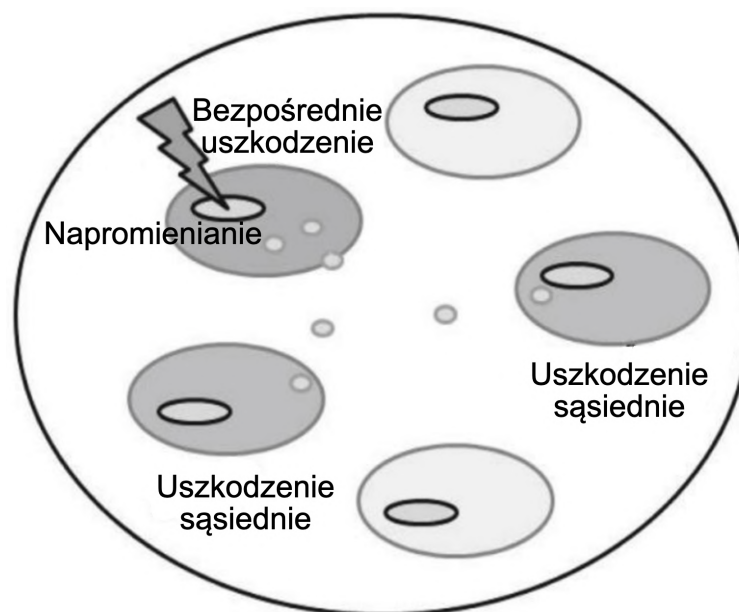
Przykładem narzędzia wykorzystującego metody MC jest SRIM (z ang. *Stopping and Range of Ions in Matter*) to pakiet przeznaczony do symulacji strat energii cząstek przechodzących przez absorbent oraz do określania ich zasięgu (Ziegler et al., 2010). Do symulacji należy zdefiniować parametry początkowe cząstek, takie jak ich rodzaj, energia, kąt emisji oraz typ cząstki. Absorbent może składać się z jednej lub kilku warstw. Dla każdej warstwy należy zdefiniować grubość oraz skład chemiczny. W przypadku standardowych materiałów skład stechiometryczny jest dostępny w bazie danych SRIM, jednak istnieje możliwość tworzenia swoich własnych materiałów. Wyniki symulacji obejmują straty energii dla zdefiniowanej wcześniej liczby cząstek w uprzednio wybranej jednostce (na przykład $\frac{\text{MeV}}{\text{mm}}$ lub $\frac{\text{MeV}\cdot\text{cm}^2}{\text{mg}}$), ich końcowe położenie w absorbencie oraz odchylenie ich trajektorii od początkowej.

Geant4 (Agostinelli et al., 2003), podobnie jak SRIM, jest pakietem służącym do śledzenia trajektorii cząstek przechodzących przez warstwy absorbenta, jednak oferuje znacznie szersze możliwości. Oprogramowanie to umożliwia nie tylko śledzenie toru cząstek pierwotnych, lecz także symulację procesów wtórnych oraz ich skutków. W 2001 roku został zainicjowany projekt Geant4-DNA jako rozszerzenie uniwersalnego pakietu narzędzi Geant4. Projekt ten został opracowany z myślą

o modelowaniu procesów związanych z uszkodzeniami biologicznymi na poziomie DNA wywołanymi promieniowaniem jonizującym (Incerti et al., 2010). Rozszerzenie Geant4-DNA jest integralną częścią pakietu Geant4 o otwartym kodzie źródłowym. Umożliwia ono nie tylko modelowanie procesów na poziomie molekularnym, lecz także wyznaczanie dawek pochłoniętych przez struktury komórkowe, takie jak cytoplazma czy jądro komórkowe (Incerti et al., 2006).

2.4 Efekt sąsiedztwa

„Teoria tarczy” zakłada, że uszkodzenia genetyczne w komórkach są wynikiem bezpośredniego oddziaływania promieniowania jonizującego na DNA lub pośredniego działania reaktywnych form tlenu powstających podczas napromieniania środowiska wodnego w komórce (Gasińska, 2006; Hamada, 2014). Jednak coraz liczniejsze dowody sugerują, że to podejście nie obejmuje pełnej skali biologicznych skutków promieniowania. Jednym z kluczowych zjawisk podważających tę klasyczną koncepcję jest efekt sąsiedztwa indukowany promieniowaniem (RIBE, z ang. *Radiation-Induced Bystander Effects*), w którym komórki nienapromienione wykazują uszkodzenia typowe dla komórek napromienionych – mimo braku bezpośredniej ekspozycji na promieniowanie (Blyth i Sykes, 2011). Schemat tego efektu został przedstawiony na Rysunku 2.22.



Rysunek 2.22. Schemat efektu RIBE. Na podstawie (Nasir i Mohd Siam, 2019); tłumaczenie własne na język polski.

Zjawisko to po raz pierwszy opisano w 1954 roku, gdy Parsons Jr et al. (1954) wykazał obecność czynników klastogennych we krwi pacjentów po napromienianiu,

zdolnych do indukowania uszkodzeń chromosomowych. Od tego czasu RIBE stało się przedmiotem intensywnych badań, które ujawniły, że odpowiedź biologiczna może obejmować nie tylko śmierć komórek, ale także niestabilność genetyczną, uszkodzenia DNA, aberracje chromosomowe, mutacje, transformacje nowotworowe czy zmiany ekspresji genów (Joiner i Kogel, 2009). Co istotne, zmiany te są wywoływane przez sygnały emitowane przez komórki napromienione i mogą obejmować zarówno komórki sąsiadujące, jak i te bardziej odległe.

Mimo wielu lat badań, mechanizmy leżące u podstaw efektu sąsiedztwa oraz jego znaczenie biologiczne nie zostały jeszcze w pełni poznane. Jednocześnie wciąż brakuje jednej, powszechnie przyjętej definicji tego zjawiska. W niektórych pracach termin „komórki sąsiednie” odnosi się do komórek znajdujących się w bezpośrednim kontakcie lub bliskim sąsiedztwie komórek napromienionych (Zhou et al., 2000; Hei et al., 2008; Little, 2006; Osterreicher et al., 2003), podczas gdy inne badania nie precyzują lokalizacji przestrzennej komórek nienapromienionych (Lorimore i Wright, 2003; Gow et al., 2010; Ballarini et al., 2002). Coraz częściej sugeruje się, że sygnały odpowiedzialne za RIBE mogą rozprzestrzeniać się również na większe odległości, obejmując komórki położone z dala od obszaru bezpośredniego napromieniania (Morgan, 2003; E. Feinendegen, 2003; Yang et al., 2007).

W badaniach nad efektem sąsiedztwa stosuje się różnorodne podejścia eksperymentalne, które zasadniczo można podzielić na dwie główne grupy (Hamada et al., 2007):

1. „Modele kontaktowe” – obejmują hodowle monowarstwowe, w których komórki napromienione i nienapromienione współlistnieją na tej samej powierzchni naczynia hodowlanego. W takich układach komórki są fizycznie połączone, co umożliwia analizę sygnalizacji za pośrednictwem kanałów międzykomórkowych (Hickman et al., 1994; Azzam et al., 1998; M. Prise et al., 2003).
2. „Modele bez kontaktu fizycznego” – wykluczają bezpośrednie oddziaływanie komórek napromienionych na nienapromienione. W tego typu eksperymentach bada się wpływ rozpuszczalnych czynników wydzielanych do pożywki hodowlanej przez komórki napromienione. Grupa ta dzieli się na:
 - „Układy współhodowli bez kontaktu” – komórki sąsiednie obecne są w tym samym naczyniu podczas napromieniania, lecz fizycznie oddzielone od komórek napromienionych, np. przez barierę przestrzenną (Gerard et al., 2002; Zhou et al., 2002) lub napromienione komórki wysiewane do szalek z komórkami kontrolnymi.
 - „Układy z odroczonym wpływem” – komórki analizowane pod kątem efektu sąsiedztwa hodowane są osobno, bez kontaktu i bez wcześniejszej ekspozycji na promieniowanie. Przenosi się do nich podłoże z hodowli

komórek napromienionych (Seymour i Mothersill, 1997a) lub stosuje systemy hodowli z membranami, które umożliwiają wymianę czynników rozpuszczalnych przy jednoczesnym fizycznym rozdzieleniu komórek (Yang et al., 2005).

W mechanizmie działania efektu sąsiedztwa istotną rolę mogą odgrywać komórkowe szlaki sygnalizacyjne. Uważa się, że w procesie transdukcji sygnału dochodzi do przekazywania pomiędzy komórkami napromienionymi a nienapromienionymi drobnocząsteczkowych mediatorów, takich jak białka, peptydy czy inne czynniki sygnałowe. Ponieważ jednak konkretne molekuly odpowiedzialne za inicjację i propagację tego zjawiska nie zostały dotąd jednoznacznie zidentyfikowane, trudne pozostaje wyraźne rozgraniczenie pomiędzy etapem emisji sygnału przez komórki napromienione a reakcją odbiorczą ze strony komórek sąsiadujących (Seymour i Mothersill, 2004).

Komórki nienapromienione, pozostające w sąsiedztwie komórek poddanych działaniu promieniowania, wykazują szczególną wrażliwość na tak zwane efekty opóźnione, w tym niestabilność genomową – zjawisko, które może zwiększać ryzyko rozwoju chorób nowotworowych (Seymour i Mothersill, 1997b; Lorimore et al., 1998; Huo et al., 2001). Efekty te nabierają szczególnego znaczenia w kontekście niskich dawek promieniowania, zarówno w warunkach środowiskowych, jak i podczas procedur medycznych, takich jak radioterapia czy diagnostyka obrazowa. Dotyczy to zwłaszcza komórek znajdujących się na obrzeżach pola napromieniania, gdzie ekspozycja na promieniowanie jest pośrednia lub minimalna. Zjawisko to tłumaczy się tym, że przy wyższych dawkach przeważają bezpośrednie uszkodzenia komórkowe, natomiast efekty sąsiedztwa osiągają swoje maksimum już przy niskim poziomie ekspozycji, a ich znaczenie względne stopniowo maleje wraz ze wzrostem dawki (Seymour i Mothersill, 2004).

2.5 Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (EVs)

Opisanie w 1967 roku przez Petera Wolfa (Wolf, 1967) obecności w ludzkiej krwi małych struktur wytwarzanych przez aktywowane płytki krwi, wykazujących działanie prokoagulacyjne i określonych mianem „pyłu płytkowego” (z ang. *platelet dust*), zapoczątkowało intensywny rozwój badań nad powstawaniem oraz rolą mikropęcherzyków błonowych, znanych dziś jako pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (EVs, z ang. *Extracellular Vesicles*) (Wolf, 1967). Dalsze badania nad EVs doprowadziły do ich wizualizacji w 1983 roku podczas obserwacji różnicowania retikulocytów, czyli niedojrzałych erytrocytów. Zaobserwowano wówczas, że podczas ich dojrzewania receptory transferyny i inne białka związane z błoną komórkową są wydzielane na drodze nieznanego wówczas procesu w postaci małych pęcherzy-

ków (Wesołowska i Piwocka, 2017; Pan et al., 1985a; Zhang et al., 2015). Obecnie wiadomo, że większość komórek posiada zdolność do uwalniania EVs, a ich obecność została potwierdzona między innymi w krwi, moczu, płynie owodniowym, ślinie, żółci, mleku matki oraz płynie mózgowo-rdzeniowym (Wójtowicz et al., 2014; Huebner et al., 2015; Nonaka i Wong, 2017).

2.5.1 Rodzaje pęcherzyków zewnątrzkomórkowych

Zewnątrzkomórkowe pęcherzyki błonowe tworzą heterogenną populację pęcherzyków wydzielanych przez komórki zarówno w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro* (Wesołowska i Piwocka, 2017; Lee et al., 2012; Raposo i Stoorvogel, 2013). Różnią się one między sobą rozmiarem, gęstością, pochodzeniem, biogenezą oraz składem molekularnym. Każda subpopulacja pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wyróżnia się charakterystycznym zestawem markerów oraz tak zwanym „cargo”, czyli zawartymi w nich biologicznie aktywnymi substancjami, ulegającymi transportowi. Dlatego ze względów praktycznych, egzosomy oraz inne pęcherzyki o średnicy zbliżonej do wirusów (poniżej 200 nm) określa się łącznie jako małe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (sEVs, z ang. *small EVs*) (Théry et al., 2018). Zgodnie z przyjętą klasyfikacją, wśród sEVs wyróżnia się trzy główne subpopulacje: egzosomy, mikropęcherzyki oraz ciała apoptotyczne (Baatout, 2023; Zhang et al., 2019; Mathivanan et al., 2010; Biancone et al., 2012; Koniusz et al., 2016; Wesołowska i Piwocka, 2017). Charakterystyka trzech populacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych została przedstawiona w Tabeli 2.1.

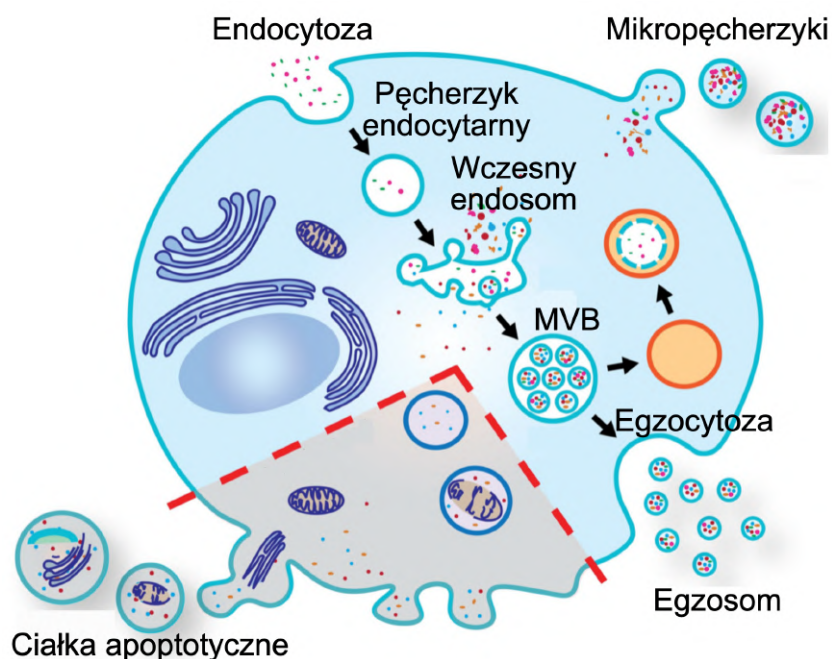
Egzosomy

Egzosomy to sferyczne nanopęcherzyki błonowe o wielkości od 40 nm do 150 nm (Baatout, 2023), otoczone dwuwarstwową błoną lipidową, która zapewnia im sztywność (Borzdziłowska i Bednarek, 2021). Gęstość optyczna egzosomów wynosi od 1,13 g/cm³ do 1,19 g/cm³ (Zhang et al., 2019). Egzosomy charakteryzują się obecnością szerokiego spektrum białek: tetraspanin (na przykład CD63, CD81, CD9), białek szoku cieplnego (Hsp60, Hsp70, Hsp80), białek transportowych i fuzyjnych (GTPazy, aneksyny, flotylina), białek biorących udział w tworzeniu ciałek wielopęcherzykowatych: Alix (z ang. *ALG-2-interacting protein X*) i TSG101 (z ang. *tumor susceptibility gene 101*) oraz białek typowych dla komórek, z których zostały wyizolowane (Biancone et al., 2012; Koniusz et al., 2016; Borzdziłowska i Bednarek, 2021). Pęcherzyki te są również bogate w charakterystyczne dla nich lipidy, między innymi składniki trójglicerydów lipidowych, takie jak GM1 gangliozyd, cholesterol, sfingomielinę oraz fosfatydyloserynę (Subra et al., 2007). W egzosomach wykazano również obecność kwasów nukleinowych, w tym mRNA i miRNA (Mathivanan et al., 2010).

Tabela 2.1. Charakterystyka trzech populacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (Baatout, 2023; Zhang et al., 2019; Mathivanan et al., 2010; Biancone et al., 2012; Koniusz et al., 2016; Wesołowska i Piwocka, 2017).

Parametr	Egzosomy	Mikropęcherzyki	Ciałka apoptotyczne
Wielkość [nm]	40–150	100–1000	500–2000
Gęstość [g/cm ³]	1,13–1,19	1,25–1,30	1,16–1,28
Pochodzenie	Ciałka wielopęcherzykowe	Błona komórkowa	Błona komórkowa
Biogeneza	Egzocytoza ciałek wielopęcherzykowych	Pączkowanie błony plazmatycznej	Procesy apoptozy
Markery	Tetraspaniny (CD63, CD81, CD9, CD82), białka szoku cieplnego (Hsp60, Hsp70, Hsp90), TSG101, Alix	Integriny, flotyliny, selektyny, CD40	Aneksyna V, fosfatydyloseryna, histony
„Cargo”	Białka i kwasy nukleinowe (fragmenty DNA, mRNA, miRNA)	Białka i kwasy nukleinowe (fragmenty DNA, mRNA, miRNA)	Fracje jądrowe, organelle komórkowe

Proces biogenezy egzosomów, który został zaprezentowany na Rysunku 2.23, rozpoczyna się od endocytozy, czyli wpuklania błony komórkowej do wnętrza komórki, co prowadzi do powstania wczesnych endosomów. Te endosomy ulegają dalszym przekształceniom w kierunku późnych endosomów, w których dochodzi do wewnętrznego pączkowania błony endosomalnej. W efekcie powstają pęcherzyki zdefiniowane jako pęcherzyki światła endosomu (ILVs, z ang. *IntraLuminal Vesicles*), stanowiące prekursory egzosomów. Endosomy gromadzące w swoim wnętrzu pęcherzyki ILVs określa się mianem ciałek wielopęcherzykowych (MVBs, z ang. *MultiVesicular Bodies*). MVBs mogą przemieszczać się w kierunku błony komórkowej, gdzie dochodzi do ich fuzji z błoną cytoplazmatyczną komórki, czego efektem jest uwolnienie ILVs do przestrzeni zewnątrzkomórkowej (Grzybowska et al., 2019). Pęcherzyki te, po opuszczeniu komórki, określane są mianem egzosomów (Harding et al., 1983; Johnstone et al., 1987; Pan et al., 1985b). Podsumowując, egzosomy powstają na drodze endocytozy, a wydzielane są poprzez proces egzocytozy.



Rysunek 2.23. Biogeneza pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Na podstawie (Shahi et al., 2024); tłumaczenie własne na język polski.

Mikropęcherzyki

Mikropęcherzyki (inaczej nazywane ektosomami lub onkosomami) są pęcherzykami o wielkości od 100 nm do 1000 nm (Baatout, 2023) i gęstości optycznej od 1,25 g/cm³ do 1,30 g/cm³ (Zhang et al., 2019). Ektosomy powstają w wyniku procesu pączkowania, polegającego na tworzeniu się wypukłości błony komórkowej. Do ich wnętrza transportowane są biologicznie czynne cząsteczki, takie jak kwasy nukleinowe, białka i inne składniki. Następnie dojrzałe pęcherzyki oddzielają się od powierzchni komórki i uwalniane są do przestrzeni zewnątrzkomórkowej (Grzybowska et al., 2019). Mechanizm biogenezy mikropęcherzyków pokazany został na Rysunku 2.23. Mikropęcherzyki są uwalniane zarówno przez komórki w stanie spoczynku, jak i w odpowiedzi na bodźce stresowe, takie jak stres oksydacyjny, hipoksja czy uszkodzenie komórki. W przeciwieństwie do egzosomów, mikropęcherzyki nie zawierają białek związanych z endocytozą, lecz charakteryzują się obecnością takich białek jak integryny, flotyliny, selektyny oraz CD40. Podobnie jak egzosomy, przenoszą one w swoim wnętrzu kwasy nukleinowe, w tym mRNA i miRNA (Mathivanan et al., 2010; Koniusz et al., 2016).

Ciałka apoptotyczne

Trzecią subpopulację pęcherzyków zewnątrzkomórkowych stanowią ciała apoptotyczne o wielkości od 500 nm do 2000 nm (Baatout, 2023) i gęstości od 1,16 g/cm³ do 1,28 g/cm³ (Zhang et al., 2019). W odróżnieniu od egzosomów i mikropęche-

ryzków, które powstają fizjologicznie z żywych komórek, ciała apoptotyczne są uwalniane z komórek, które znajdują się w późnym stadium procesu apoptozy. Proces ich powstawania jest zaprezentowany na Rysunku 2.23. Cechują się wysoką zawartością fosfatydyloseryny. Zawierają wewnątrz histony oraz fragmenty organelli komórkowych (Koniusz et al., 2016).

2.5.2 Mechanizmy wychwytu EVs przez komórki

Zewnątrzkomórkowe pęcherzyki odgrywają kluczową rolę w komunikacji międzykomórkowej. Znaczenie tego zjawiska zostało podkreślone w 2013 roku, kiedy za wkład w odkrycie mechanizmów regulujących transport pęcherzykowy została przyznana nagroda Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny (Mellman i Emr, 2013). Zawartość egzosomów może być przekazywana nie tylko komórkom znajdującym się w bezpośrednim sąsiedztwie, lecz również komórkom zlokalizowanym w odległych tkankach. W niektórych przypadkach przekaz ten może prowadzić do aktywacji odpowiedzi ogólnoustrojowej (Grzybowska et al., 2019). Złożoność i wielokierunkowość komunikacji międzykomórkowej z udziałem egzosomów sprawiają, że jej mechanizmy nadal pozostają częściowo niepoznane. W literaturze wyróżnia się trzy podstawowe mechanizmy interakcji egzosomów z komórkami docelowymi (Zhang et al., 2015):

1. Bezpośrednie oddziaływanie białek transbłonowych obecnych na powierzchni egzosomów z receptorami sygnałowymi komórek docelowych (Munich et al., 2012).
2. Fuzję błony egzosomu z błoną cytoplazmatyczną komórki docelowej, prowadzącą do uwolnienia zawartości egzosomu do cytoplazmy (Mulcahy et al., 2014).
3. Internalizację egzosomów do wnętrza komórki docelowej poprzez różne szlaki endocytarne (Mulcahy et al., 2014; Tian et al., 2013).

Egzosomy wykazują wysoką swoistość względem określonych typów komórek, zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*. Proces ich przyłączania do komórki docelowej jest regulowany przez obecność białek adhezyjnych, takich jak integryny czy cząsteczki adhezji międzykomórkowej (ICAM, z ang. *InterCellular Adhesion Molecule*), które odgrywają istotną rolę w komunikacji międzykomórkowej. W zależności od typu komórki docelowej, internalizacja egzosomów może zachodzić za pośrednictwem endocytozy klatrynozależnej, z udziałem kaweoli, bądź poprzez mechanizmy takie jak pinocytoza czy fagocytoza (Falcone et al., 2015; Mulcahy et al., 2014). Na uwagę zasługuje również opisywany w literaturze mechanizm transcytozy, polegający na transportowaniu pobranych egzosomów przez cytoplazmę

z jednej strony komórki na drugą, co umożliwia ich przekazanie komórkom sąsiadującym (Zhang et al., 2015).

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe stanowią istotny element komunikacji międzykomórkowej, umożliwiając przekazywanie cząsteczek biologicznie czynnych do komórek docelowych. Mechanizm ich działania obejmuje zarówno bezpośrednie łączenie się z błoną komórkową, jak i internalizację lub aktywację szlaków sygnałowych poprzez interakcję z receptorami powierzchniowymi komórek docelowych (Baatout, 2023). EVs odgrywają kluczową rolę w regulacji licznych procesów fizjologicznych, w tym odpowiedzi immunologicznej, sygnalizacji nerwowej oraz nowotworowej (Gutiérrez-Fernández et al., 2021). Regulują zarówno wewnętrzne procesy w komórkach nowotworowych, jak i ich interakcje z komórkami mikrośrodowiska guza, w tym z komórkami układu odpornościowego. Mogą oddziaływać na komórki w sposób parakrynnny (na sąsiednie komórki), autokrynnny (na tę samą komórkę) i dokrewny (na komórki w odległych narządach poprzez krążenie krwi), co jest możliwe dzięki specyficznemu składowi ich białek i lipidów. Białka obecne na powierzchni egzosomów wykazują podobieństwo do białek błony komórkowej oraz endosomalnej komórki źródłowej, przy jednoczesnej niewielkiej zawartości białek pochodzących z jądra komórkowego lub z aparatu Golgiego. Natomiast skład lipidowy egzosomów odróżnia się od składu błony plazmatycznej – zawierają więcej sfingomieliny, cholesterolu, ceramidu oraz fosfatydyloseryny, a mniej fosfatydylocholino (Baatout, 2023). EVs, uczestnicząc w interakcjach między guzem a jego mikrośrodowiskiem, przyczyniają się między innymi do promowania angiogenezy, przekształcenia fibroblastów w fibroblasty związane z nowotworem (CAF, z ang. *Cancer-Associated Fibroblasts*) oraz do modulacji odpowiedzi immunologicznej, która sprzyja wzrostowi i kolonizacji komórek nowotworowych w odległych narządach jako przerzuty (Baatout, 2023; Kalluri i LeBleu, 2020). Po dotarciu do komórki docelowej ich zawartość może zostać zaabsorbowana i wpłynąć na wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe (Ratajczak i Ratajczak, 2020).

Biorąc pod uwagę szeroki zakres funkcji EVs, zarówno w fizjologii, jak i patologii, w tym ich istotny udział w progresji nowotworów, są one obecnie uznawane za cenne źródło biomarkerów wielu chorób, w tym nowotworów (Assunção et al., 2025; Urabe et al., 2020). Zważywszy na kluczową rolę promieniowania jonizującego w terapii onkologicznej, istotne jest zrozumienie, w jaki sposób ekspozycja na promieniowanie jonizujące może wpływać na skład, funkcję oraz właściwości biologiczne EVs, a tym samym na ich rolę w odpowiedzi komórek nowotworowych na leczenie.

2.5.3 Metody detekcji EVs

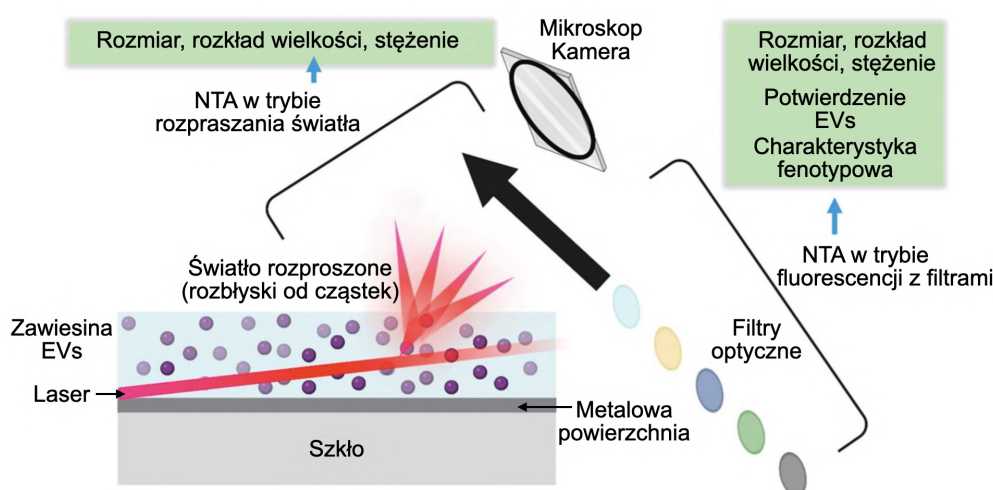
Metoda śledzenia nanocząstek (NTA)

Metoda analizy śledzenia nanocząstek (NTA, z ang. *Nanoparticle Tracking Analysis*) jest powszechnie stosowaną metodą wizualizacji i charakterystyki pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Metoda ta pozwala zbadać rozmiar, wysokorozdzielczy rozkład wielkości, stężenie oraz obecność markerów powierzchniowych (Comfort et al., 2021). NTA opiera swoje działanie na analizie ruchów Browna cząstek. W metodzie tej światło lasera oświetla zawieszone w roztworze nanocząstki, a pojawiające się rozbłyski rejestruje w czasie rzeczywistym połączona z mikroskopem kamera o wysokiej czułości. Współczynnik dyfuzji wyznaczany jest poprzez śledzenie trajektorii ruchu pojedynczych cząstek na kolejnych klatkach filmu w określonym przedziale czasowym (Kowkabany i Bao, 2024). Przy użyciu równania Stokesa–Einsteina wyznaczana jest średnica hydrodynamiczna nanocząstek (Einstein, 1905; Srivastava i Khanna, 2009):

$$D = \frac{k_B T}{3\pi\eta d_{hydr}}, \quad (2.9)$$

gdzie: D – współczynnik dyfuzji, k_B – stała Boltzmanna, T – temperatura, η – lepkość cieczy, d_{hydr} – średnica hydrodynamiczna.

Na Rysunku 2.24 została przedstawiona zasada działania aparatu wykorzystującego metodę NTA.



Rysunek 2.24. Zasada działania aparatu wykorzystującego metodę NTA w trybach rozpraszania światła oraz fluorescencji, wraz z przykładowymi informacjami możliwymi do uzyskania na temat pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Zaznaczone kolorowe okręgi symbolizują możliwość detekcji emisji światła o różnych długościach fali dzięki zastosowaniu odpowiednio dobranych filtrów optycznych. Na podstawie (Kowkabany i Bao, 2024); tłumaczenie własne na język polski.

Obecnie wyróżnia się dwa tryby pomiarowe w analizie NTA: tryb rozpraszania światła, oparty na detekcji sygnałów generowanych przez EVs, oraz tryb fluorescencyjny, w którym rejestrowana jest emisja światła z cząstek znakowanych fluorochromami. Dostępne konfiguracje aparatury NTA umożliwiają zastosowanie jednej z czterech długości fali lasera: 405 nm, 488 nm, 532 nm oraz 642 nm (Kowkabany i Bao, 2024).

Dynamiczne rozpraszanie światła (DLS)

Technika dynamicznego rozpraszania światła (DLS, z ang. *Dynamic Light Scattering*) umożliwia pomiar hydrodynamicznej średnicy nanocząstek, współczynnik dyspersyjności (PDI, z ang. *Polydispersity Index*) oraz potencjał Zeta, czyli potencjał elektrokinetyczny. Pomiar ten jest realizowany poprzez naświetlanie próbki, która jest umieszczona w specjalnej kuwecie, wiązką lasera, a światło rozproszone rejestrowane jest pod kątem 173° . Metoda ta swoje działanie opiera również na analizie ruchów Browna poruszających się nanocząstek (Bhattacharjee, 2016). Technika DLS precyzyjnie określa rozmiar cząstek w próbkach monodispersyjnych. Jednak obecność większych cząsteczek lub agregatów w przypadku próbek zawierających egzosomy i mikropęcherzyki prowadzi do zawyżania otrzymywanych wyników (Lyu et al., 2021).

Rozdział 3

Materiały i metody

Rozdział ten zawiera opis materiałów i metod zastosowanych do uzyskania wyników przedstawionych w niniejszej pracy. Rozpoczyna się od charakterystyki i dozymetrii wybranych źródeł promieniowania jonizującego: cząstek α oraz promieniowania X. Następnie uwzględniono opisy eksperymentów z wykorzystaniem linii komórkowej PC3 i DU145 oraz z wyizolowanymi z tych komórek egzosomów. Eksperymenty zostały podzielone na trzy główne etapy. W pierwszej części badań skupiono się na charakterystyce promieniowrażliwości komórek nowotworowych gruczołu krokowego poddanych ekspozycji na promieniowanie α i promieniowanie X oraz analizie egzosomów przez nie wydzielanych. W dalszej części opisano drugi etap badań, czyli serię eksperymentów dotyczących zbadania wpływu egzosomów na promieniowrażliwość komórek PC3 poddanych działaniu promieniowania fotonowego. Ostatni etap badań poświęcony był efektowi sąsiedztwa, w którym podjęto próbę zmodyfikowania promieniowrażliwości komórek PC3 za pomocą egzosomów wyizolowanych z komórek DU145.

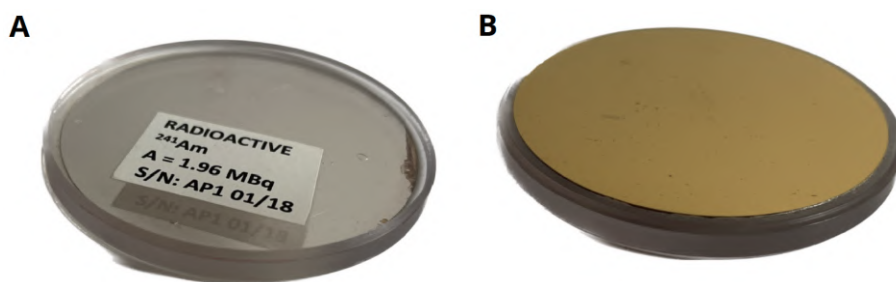
3.1 Źródła promieniowania i ich dozymetria

Pomiar dawki promieniowania odgrywa kluczową rolę w precyzyjnej ocenie efektów biologicznych dostarczenia jej do komórek. W niniejszej pracy zostały wykonane badania eksperymentalne z wykorzystaniem cząstek α oraz promieniowania X. Wybór tych dwóch rodzajów promieniowania został podyktowany ich odmiennymi mechanizmami oddziaływania z materią, co skutkuje różnicami w indukcji uszkodzeń materiału genetycznego w komórkach. W celu analizy mocy dawki promieniowania α z materiałem biologicznym zostały wykorzystane symulacje oparte na metodach Monte Carlo. Do oceny jednorodności rozkładu dawki powierzchniowego źródła α została wykonana dozymetria doświadczalna z wykorzystaniem filmów radiochromowych. Filmy radiochromowe zostały również wykorzystane do określenia mocy dawki i jednorodności promieniowania fotonowego generowanego

przez lampę rentgenowską. W eksperymentach przeprowadzonych na komórkach nowotworowych gruczołu krokowego został wykorzystany izotop ^{241}Am jako emiter cząstek α oraz lampa RTG jako źródło promieniowania X. Oba źródła są dostępne w Pracowni RTG oraz Pracowni Klasy Z w Zakładzie Fizyki Biomedycznej na Wydziale Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego. Eksperymenty przeprowadzone w ramach niniejszej pracy dla cząstek α zostały wykonane przy użyciu bliźniaczego źródła ^{241}Am , które jest dostępne w Środowiskowym Laboratorium Ciężkich Jonów (ŚLCJ).

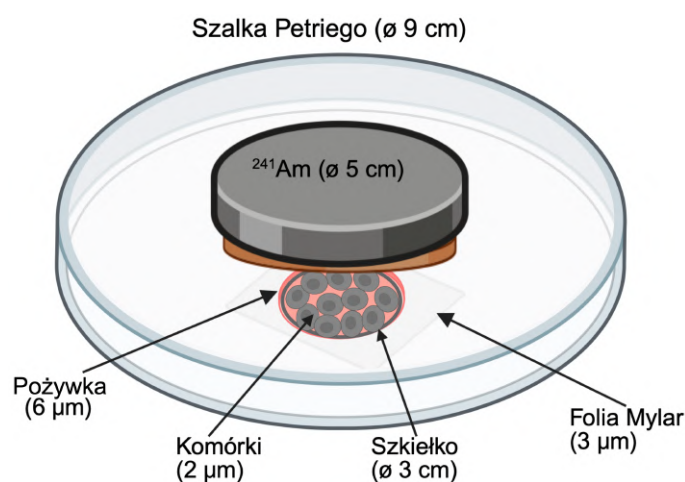
3.1.1 Charakterystyka i dozymetria powierzchniowego źródła α : ^{241}Am

Na Rysunku 3.1 zostało przedstawione płaskie źródło ^{241}Am (model AM1AP1 0053U, Eckert & Ziegler), które zostało użyte w eksperymentach do napromieniania komórek z wykorzystaniem promieniowania α . Aktywność źródła, zgodnie z certyfikatem, wynosi 1,96 MBq. Źródło składa się z dwóch warstw: aktywnej (AmO_2), osadzonej na szklanej podstawce, o średnicy 5 cm i grubości 0,4 μm , oraz ochronnej warstwy złota o grubości 1 μm . Zmierzona aktywność powierzchniowa źródła wynosi 100 $\frac{\text{kBq}}{\text{cm}^2}$. Charakterystyka widma promieniowania α była analizowana za pomocą krzemowego detektora półprzewodnikowego aktywowanego borem, będącego na wyposażeniu ŚLCJ, w ramach wspólnego projektu naukowego. W ramach tej pracy wykonano również walidację danych uzyskanych z pomiarów z wykorzystaniem detektora półprzewodnikowego za pomocą symulacji MC w środowisku Geant4-DNA. Uzyskane widma energetyczne były ze sobą porównane, a na podstawie dopasowania krzywych Gaussa potwierdzono zgodność statystyczną pomiarów energii zmierzonych za pomocą detektora z wynikami symulacji MC. Wyniki zostały opisane w pracy (Filipek et al., 2024). Dzięki tej współpracy opracowano kod, który symuluje źródło uwzględniające jego charakterystykę, umożliwiając wykonanie przeze mnie symulacji MC w celu określenia mocy dawki tego źródła dla geometrii układu eksperymentalnego zastosowanego w ramach niniejszych eksperymentów.



Rysunek 3.1. Źródło powierzchniowe ^{241}Am : widok od góry z etykietą (panel A) i od dołu z widoczną warstwą złota (panel B).

Dozymetria źródła ^{241}Am została wykonana z wykorzystaniem pakietu Geant4-DNA, umożliwiającego obliczanie dawek pochłoniętych w komórkach z uwzględnieniem ich budowy, obejmującej zarówno cytoplazmę, jak i jądro komórkowe (Incerti et al., 2006). Geometria napromieniania komórek cząstkami α zastosowana w symulacjach MC odzwierciedlała rzeczywiste warunki eksperymentalne i została zaprezentowana na Rysunku 3.2. Komórki, wysiane na szkiełku nakrywkowym o średnicy 3 cm, były napromieniane od góry, a emitowane cząstki α przechodziły kolejno przez warstwę folii Mylar o grubości 3 μm , a następnie przez warstwę pożywki o grubości 6 μm . Warstwę komórek zdefiniowano na podstawie składu komórek gruczołu krokowego przyjętego w pracy (Zaichick i Zaichick, 2016). Gęstość tej warstwy wynosiła: $1,04 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$.



Rysunek 3.2. Schemat układu eksperymentalnego napromieniania komórek cząstkami α przygotowany za pomocą narzędzia BioRender: <https://www.biorender.com>. Skala na rysunku nie jest zachowana. Szalka Petriego na czas napromieniania komórek jest zamykana, aby zachować sterylne warunki podczas pracy z materiałem biologicznym.

Dodatkowo w celu weryfikacji jednorodności rozkładu dawki powierzchniowego źródła α wykonano pomiary z wykorzystaniem filmów radiochromowych Gafchromic™ EBT3 – Unlaminated films (Ashland Inc., Bridgewater, NJ; 11022001P1). Filmy te zbudowane są z przezroczystej warstwy poliestrowej o grubości 125 μm pokrytej warstwą aktywną o grubości 14 μm , której procentowy skład chemiczny przedstawiono w Tabeli 3.1 (Grilj i Brenner, 2018).

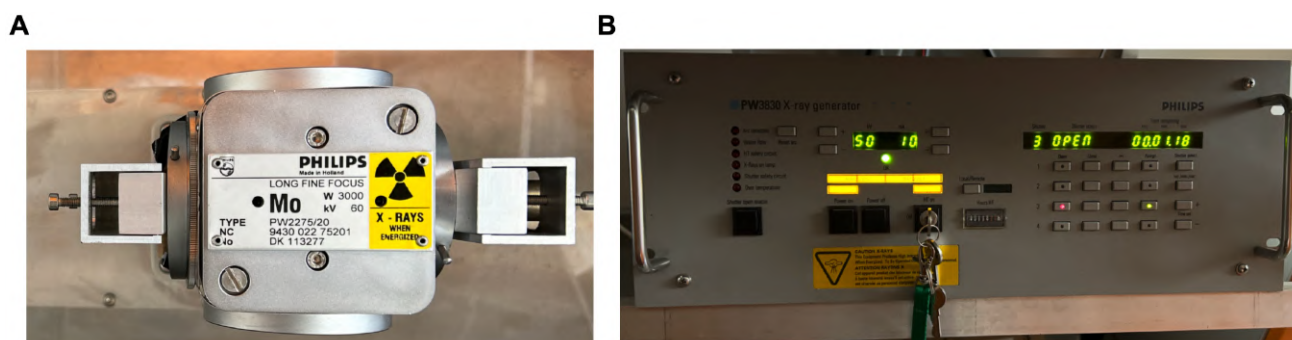
Pomiary dozymetryczne przeprowadzono dla dwóch konfiguracji układu: źródło ^{241}Am umieszczone bezpośrednio na filmie radiochromowym oraz folia Mylar o grubości 3 μm umieszczona pomiędzy źródłem ^{241}Am a filmem radiochromowym. Napromienianie każdego filmu radiochromowego trwało 3 minuty i 33 sekundy i dla każdego układu wykonano po 5 pomiarów. Jednorodność rozkładu dawki została również sprawdzona za pomocą kodów Geant4-DNA w celu walidacji wyników uzyskanych eksperymentalnie.

Tabela 3.1. Procentowy skład warstwy aktywnej filmów radiochromowych Gafchromic™ EBT3 – Unlaminated (Grilj i Brenner, 2018).

Pierwiastek	Zawartość (%)
H	55,8
C	31,1
O	10,5
Li	0,6
N	0,4
Al	0,1
Cl	0,1
Na	0,1
S	0,1

3.1.2 Źródło promieniowania X i jego weryfikacja dozymetryczna

Źródłem promieniowania X w przeprowadzonych eksperymentach była lampa rentgenowska. Zdjęcia lampy RTG oraz generatora wysokiego napięcia zostały przedstawione na Rysunku 3.3. Lampa RTG marki Philips, model PW2275/20 (Philips Analytical X-ray, 1998), wyposażona jest w anodę molibdenową i zasilana przez generator wysokiego napięcia PW3830. Lampa została zaprojektowana do pracy przy maksymalnym napięciu 60 kV (Philips Analytical B.V., 2001).



Rysunek 3.3. Lampa rentgenowska PW2275/20 z molibdenową anodą (panel A), generator wysokiego napięcia PW3830 (panel B).

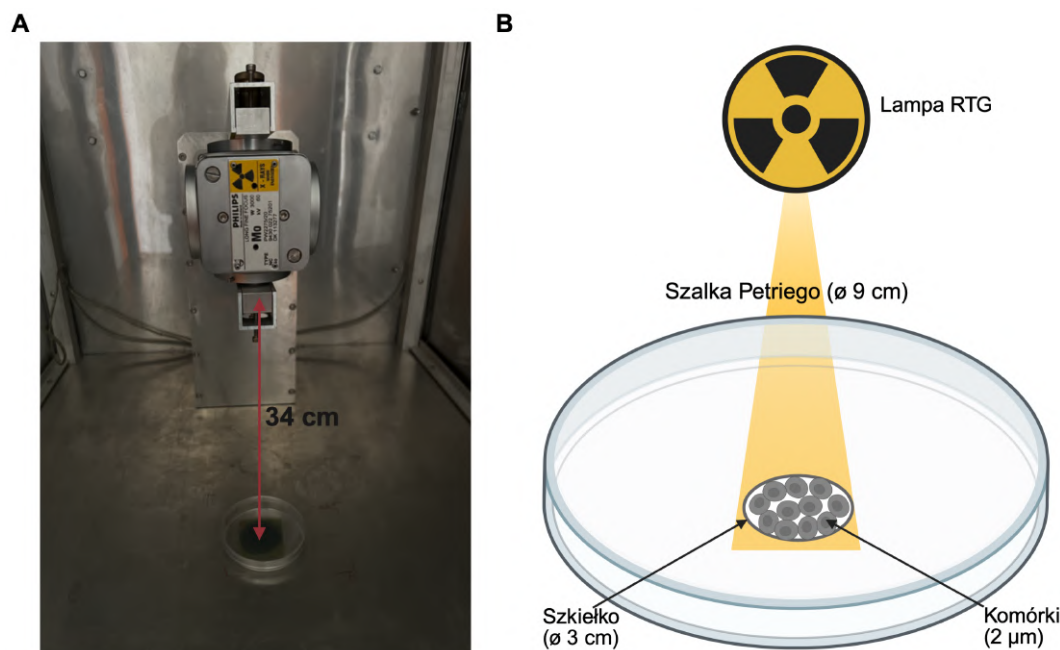
Dozymetrię lampy rentgenowskiej przeprowadzono z wykorzystaniem filmów radiochromowych w celu określenia mocy dawki oraz weryfikacji jednorodności

rozkładu dawki generowanego przez lampę promieniowania. W niniejszym badaniu zastosowano filmy radiochromowe Gafchromic™ EBT4 films (Ashland Inc., Bridgewater, NJ; 973857), które zbudowane są z trzech warstw, warstwy aktywnej o grubości 28 μm , znajdującej się pomiędzy dwoma przezroczystymi zabezpieczającymi warstwami poliestrowymi o grubości 125 μm każda. Procentowy skład chemiczny warstwy aktywnej przedstawiono w Tabeli 3.2. Filmy te umożliwiają precyzyjną weryfikację dawek w zakresie od 0,2 do 10 Gy (<https://www.ashland.com/industries/medical/radiotherapy-films/ebt4>).

Tabela 3.2. Procentowy skład warstwy aktywnej filmów radiochromowych Gafchromic™ EBT4 (Clements i Bazalova-Carter, 2024).

Pierwiastek	Zawartość (%)
C	51,1
O	32,8
H	8,8
Al	6,7
Li	0,6

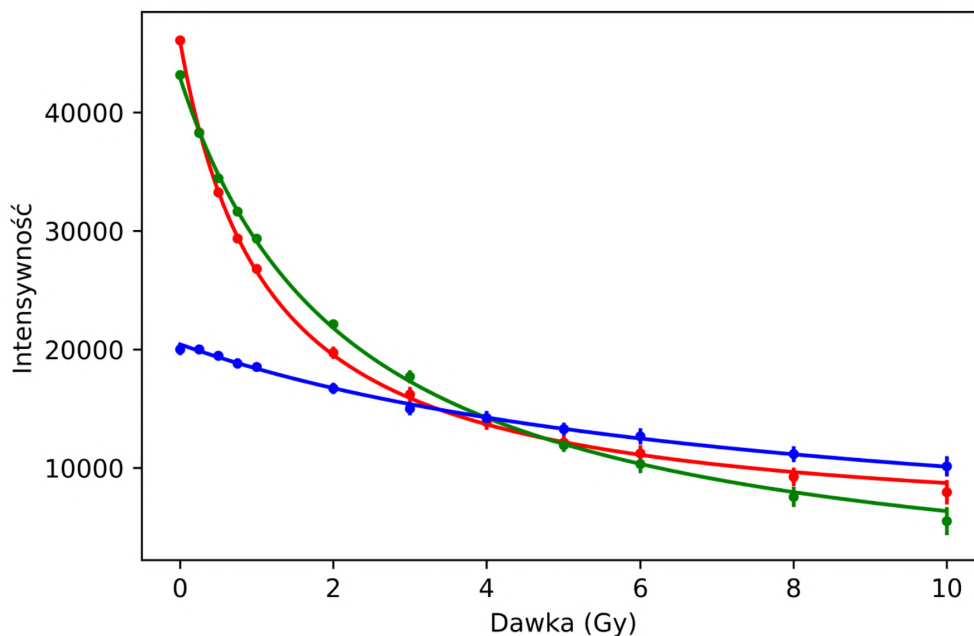
Pomiary dozymetryczne oraz napromienianie komórek wykonywane były dla napięcia na lampie równego 50 kV oraz dla natężenia prądu, które wynosiło 10 mA. Po zakończeniu procedury rozgrzewania lampy przygotowano filmy radiochromowe, wycinając z arkusza filmu kwadratowe próbki o wymiarach około 5 cm. Następnie w szalce Petriego o średnicy 90 mm i wysokości 16,2 mm umieszczono szklane szkiełko nakrywkowe o średnicy 30 mm i grubości 0,13 – 0,16 mm (na szkiełkach w dalszej części eksperymentów wysiewano komórki do napromieniania). Na szkiełku umieszczono film radiochromowy, a następnie szalkę zamknięto. Przygotowaną szalkę Petriego umieszczono wewnątrz obudowy, w której znajduje się lampa rentgenowska w odległości 34 cm od źródła, co jest widoczne na Rysunku 3.4A. Następnie przeprowadzano napromienianie filmów radiochromowych, które trwało kolejno: 5, 10, 15, 20, 30, 45 i 60 sekund. Dodatkowo wykonano pomiar kontrolny – film radiochromowy umieszczono w tym samym miejscu, co filmy napromienione, na 60 sekund, lecz bez włączenia lampy RTG. Dla każdego czasu napromieniania wykonano 5 niezależnych pomiarów. Zdjęcie oraz schemat układu eksperymentalnego przedstawiono na Rysunku 3.4.



Rysunek 3.4. Geometria układu napromieniania monowarstwy komórek z użyciem lampy rentgenowskiej podczas wykonywania dozymetrii: film radiochromowy umieszczony na dnie obudowy lampy RTG po napromienieniu, widoczne zaczernienie filmu (panel A). Schemat układu eksperymentalnego napromieniania komórek promieniowaniem rentgenowskim przygotowany za pomocą narzędzia BioRender. Skala na rysunku nie jest zachowana (panel B).

Po ekspozycji filmów radiochromowych na działanie promieniowania rentgenowskiego, filmy przechowywano w ciemnym miejscu, co miało na celu ochronę przed potencjalnym wpływem światła. Po upływie 24 godzin filmy zeskanowano przy pomocy skanera Epson Expression 12000XL (Epson Seiko Epson Corp., Nagano, Japonia), rekomendowanego przez producenta zastosowanych filmów radiochromowych. Skany wykonywano przy 48-bitowej głębi kolorów (16 bitów na każdy kanał) oraz rozdzielczości 1200 DPI (liczba punktów przypadających na cal, z ang. *Dots Per Inch*). Zeskanowane obrazy zapisywano w formacie pliku TIFF. Przy użyciu oprogramowania ImageJ (wersja 1.54k, National Institutes of Health, USA; <https://imagej.net/software/imagej/>) skany rozdzielano na 3 podstawowe kanały – czerwony (R, z ang. *Red*), zielony (G, z ang. *Green*) i niebieski (B, z ang. *Blue*). Po rozdzieleniu kolorów na poszczególne kanały RGB na każdym filmie zaznaczano napromieniony obszar (koło o średnicy 3 cm), zachowując odpowiednie marginesy. Do dalszych analiz wykorzystywano wartości uzyskane na podstawie kanału czerwonego, który wykazuje najwyższą czułość na dawkę promieniowania, szczególnie w zakresie niskich dawek (Stevens et al., 1996; Ohuchi, 2007). Następnie z wyznaczonych obszarów odczytano wartość średnią oraz odchylenie standardowe intensywności piksela. Na ich podstawie oraz dostępnej krzywej kalibracyjnej, uzyskanej w wyniku napromieniania filmów radiochromowych ak-

celeratorem liniowym Elekta Synergy w Narodowym Instytucie Onkologii - Państwowym Instytucie Badawczym im. Marii Skłodowskiej-Curie (filia Wawelska), obliczono wartości dawki wraz z jej niepewnością. Krzywe kalibracyjne przedstawiono na Rysunku 3.5.



Rysunek 3.5. Krzywa kalibracyjna filmów radiochromowych Gafchromic™ EBT4 dla kanału R (krzywa czerwona), kanału G (krzywa zielona) oraz kanału B (krzywa niebieska) otrzymana na podstawie pomiarów wykonanych w Narodowym Instytucie Onkologii.

Zależność intensywności piksela od dawki opisuje wzór:

$$I(D) = a + \frac{b}{D - c}, \quad (3.1)$$

gdzie: I - intensywność piksela, D - dawka, a, b, c - współczynniki dopasowania krzywej kalibracyjnej.

Parametry dopasowania krzywych kalibracyjnych dla każdego kanału umieszczono w Tabeli 3.3.

Tabela 3.3. Parametry dopasowania krzywych kalibracyjnych filmów radiochromowych Gafchromic™ EBT4.

Parametr	kanal R (10 ³)	kanal G (10 ³)	kanal B (10 ³)
a	$4,49 \pm 0,28$	$-1,8 \pm 1,6$	$1,7 \pm 1,6$
b	$47,2 \pm 1,2$	100 ± 35	152 ± 35
c	$-0,001137 \pm 0,000023$	$-0,0022 \pm 0,0012$	$-0,0081 \pm 0,0012$

Podczas analizy filmów radiochromowych dawka D obliczana jest na podstawie wzoru 3.1 przekształconego do postaci:

$$D = \frac{b}{I - a} + c. \quad (3.2)$$

Niepewności dawek obliczono z propagacji małych błędów, uwzględniając zarówno niepewności intensywności piksela, jak i niepewności parametrów dopasowania krzywych kalibracyjnych:

$$\sigma_D = \sqrt{\left(\frac{b}{(I - a)^2} \sigma_a\right)^2 + \left(\frac{1}{I - a} \sigma_b\right)^2 + \sigma_c^2 + \left(\frac{b}{(I - a)^2} \sigma_I\right)^2}, \quad (3.3)$$

gdzie: σ_I , σ_a , σ_b , σ_c to niepewności intensywności piksela oraz współczynników kalibracyjnych.

Do wartości dawek odczytanych dla różnych punktów czasowych dopasowano parametry regresji liniowej, umożliwiając oszacowanie mocy dawki:

$$D = \dot{D}t + c, \quad (3.4)$$

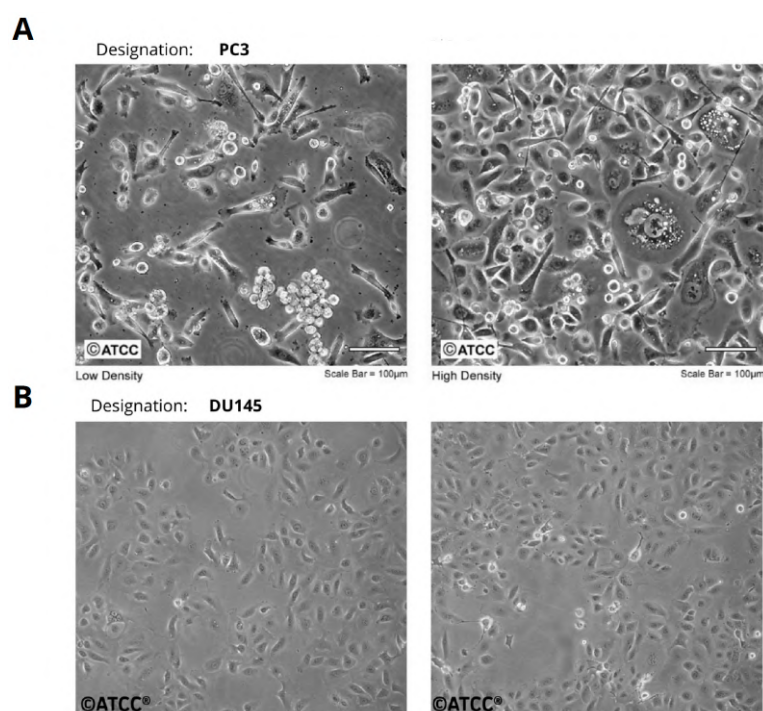
gdzie: D - dawka, $\dot{D}$ - współczynnik kierunkowy prostej, stanowiący poszukiwaną moc dawki, t - czas napromieniania, c - wyraz wolny.

3.2 Charakterystyka promieniowrażliwości komórek PC3 i DU145 oraz egzosomów przez nie wydzielanych

3.2.1 Materiał biologiczny

Badania zostały przeprowadzone z wykorzystaniem komórek nowotworowych gruczolu krokowego linii PC3 i DU145. Linia PC3 to komórki, które zostały opi-

sane po raz pierwszy w literaturze w 1979 roku (Kaighn et al., 1979). Komórki te zostały wyizolowane z przerzutów do kręgu lędźwiowego u 62-letniego mężczyzny rasy kaukaskiej (Sobel i Sadar, 2005). Linia DU145 to komórki, które zostały wyizolowane po raz pierwszy w 1975 roku z przerzutów do ośrodkowego układu nerwowego i pochodziły od 69-letniego mężczyzny rasy kaukaskiej (Stone et al., 1978). Średnica komórek nowotworowych gruczołu krokowego wynosi $(15,1 \pm 2,6) \mu\text{m}$ dla linii PC3 i $(12,5 \pm 2,5) \mu\text{m}$ dla linii DU145 (Park et al., 2014). Czas podwojenia populacji dla komórek PC3 jest równy 33 godziny (Sobel i Sadar, 2005) i 34 godziny dla komórek DU145 (Webber et al., 1997). Zdjęcia mikroskopowe komórek PC3 i DU145 zostały przedstawione na Rysunku 3.6A i na Rysunku 3.6B, odpowiednio dla różnych konfluencji.



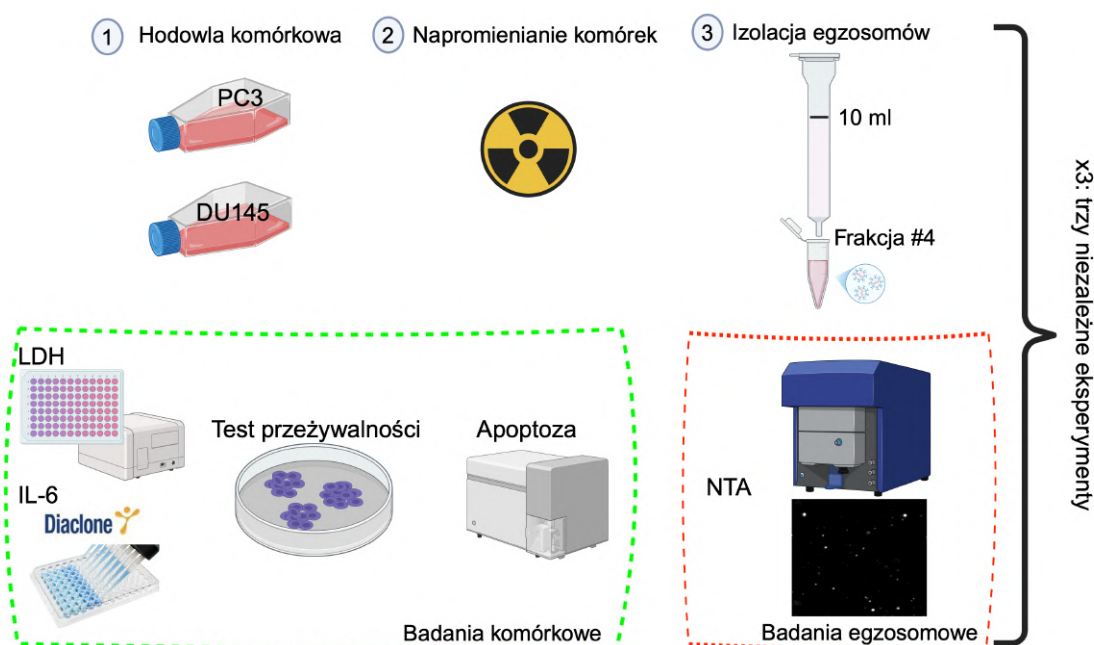
Rysunek 3.6. Wygląd komórek linii PC3 (panel A) i DU145 (panel B) pod mikroskopem. Na lewym panelu zostały przedstawione szalki z komórkami o mniejszej konfluencji, a na prawym panelu – o większej. Zdjęcie pochodzi z bazy American Type Culture Collection (ATCC): <https://www.atcc.org/products/crl-1435> (PC3) i <https://www.atcc.org/products/htb-81> (DU145).

Prace związane z hodowlą komórkową zostały wykonane w Laboratorium Radiobiologicznym w Zakładzie Fizyki Biomedycznej na Wydziale Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego. Komórki były przechowywane w inkubatorze (SafeGrow Pro, EuroClone) w temperaturze 37°C , przy zawartości 5% CO_2 oraz wilgotności powietrza na poziomie 95%. Hodowla komórkowa była prowadzona w zmodyfikowanej pożywce Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM-F12, VWR, nr kat. 392-0411), wzbogaconej 10% płodową surowicą bydlęcą (FBS, z ang. *Fetal Bo-*

vine Serum, Biowest, nr kat. S1810), która dostarczała niezbędnych składników do wzrostu i proliferacji komórek, a także 2% antybiotykiem w postaci mieszaniny penicyliny i streptomycyny (Gibco, nr kat. 15140122), zapobiegającym wystąpieniu kontaminacji bakteryjnej. W przypadku wykonywania procedur związanych z badaniami egzosomowymi, hodowla komórkowa była prowadzona w tej samej zmodyfikowanej pożywce DMEM-F12, jednak wzbogaconej 5% płodową surowicą bydlęcą, pozbawioną egzosomów (FBS EXO(-), z ang. *Fetal Bovine Serum, exosome-depleted*, Gibco, nr kat. A2720801) oraz 2% antybiotykiem. Szczegóły dotyczące pasażowania komórek zostały opisane w Dodatku A: Protokół laboratoryjny hodowli komórek PC3 i DU145.

3.2.2 Schemat przebiegu eksperymentów

Badania wykonane w pierwszym etapie realizacji projektu doktorskiego koncentrowały się na charakterystyce promieniowrażliwości komórek PC3 i DU145 oraz egzosomów przez nie wydzielanych. W tym celu wykonano analizę wpływu rodzaju promieniowania jonizującego na odpowiedź komórkową nowotworowych komórek gruczołu krokowego oraz na charakterystykę produkowanych przez nie egzosomów. Schemat pojedynczego eksperymentu został przedstawiony na Rysunku 3.7. Przeprowadzono porównawczą analizę odpowiedzi komórkowej na promieniowania jonizujące o niskim i wysokim LET.



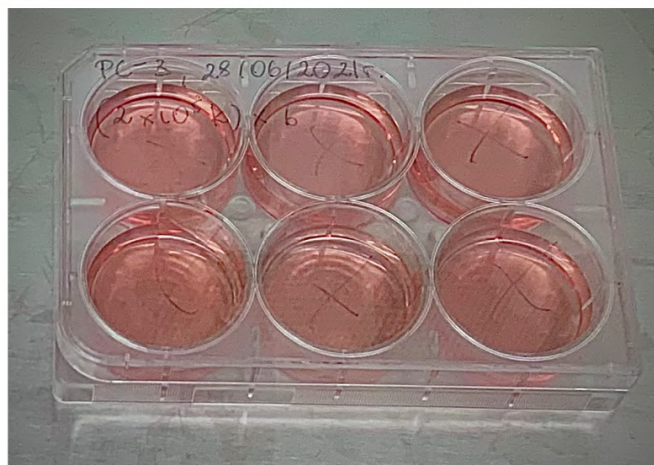
Rysunek 3.7. Zbadanie wpływu rodzaju promieniowania jonizującego na odpowiedź komórek nowotworowych gruczołu krokowego o różnej promieniowrażliwości oraz na charakterystykę produkowanych z nich egzosomów, przygotowany za pomocą narzędzia BioRender.

Przygotowanie komórek przed napromienianiem

Dwa dni przed napromienianiem komórki wysiewano na szklane szkiełka nakrywkowe o średnicy 3 cm, które następnie umieszczano w płytkach 6-dołkowych (Rysunek 3.8). Liczba wysiewanych komórek wynosiła $2,0 \cdot 10^5$ komórek w jednym dołku szalki w 5 ml pożywki. Przed wysianiem liczba komórek była precyzyjnie określana za pomocą automatycznego licznika komórek EVE™ (NanoEnTek Inc.) na podstawie czterech niezależnych pomiarów dla każdej próbki.

Dla każdej dawki promieniowania, w tym dla grupy kontrolnej, wykonywano co najmniej dwa powtórzenia (dwa replikanty) w ramach pojedynczego eksperymentu. Każdy eksperyment przeprowadzano niezależnie w trzech powtórzeniach.

Liczba szkiełek oraz liczba replikantów były dostosowywane indywidualnie do rodzaju wykonywanego testu, zgodnie z jego specyficznymi wymaganiami metodologicznymi. Szczegółowy opis procedur związanych z poszczególnymi testami znajduje się w Rozdziale 3.2.3.



Rysunek 3.8. Płytką 6-dołkowa z wysianymi komórkami nowotworu gruczołu krokowego linii PC3.

Napromienianie z wykorzystaniem ^{241}Am

Podczas napromieniania każde szkiełko nakrywkowe z wysianymi komórkami umieszczono w szalce Petriego o średnicy 9 cm. Na powierzchnię komórek dodawano 4 μl pożywki, co odpowiadało warstwie o grubości około 6 μm . Następnie warstwę komórek (o grubości 2 μm) przykrywano folią Mylar o grubości 3 μm , po czym na jej powierzchni umieszczono źródło promieniowania α . W celu zachowania sterylnych warunków podczas pracy z materiałem biologicznym szalkę Petriego zamykano i umieszczono w inkubatorze na określony czas, zgodnie z oszacowaną mocą dawki.

Komórki nowotworowe gruczołu krokowego poddano ekspozycji na dawkę 1 Gy i 2 Gy w celu przeprowadzenia klonogenego testu przeżywalności. Czas napromieniania komórek wynosił 1 minutę i 40 sekund (dla 1 Gy) i 3 minuty i 20 sekund (dla 2 Gy). W przypadku wykonywania pozostałych testów komórkowych (oznaczenia apoptozy, test LDH, IL-6) oraz testów egzosomowych (pomiar wielkości i koncentracji egzosomów) do komórek dostarczono dawkę o wartości 2 Gy (3 minuty i 20 sekund) oraz 6 Gy (10 minut). We wszystkich eksperymentach prowadzono również hodowle komórek kontrolnych, które nie były poddawane działaniu promieniowania jonizującego.

Ekspozycja na promieniowanie X

Analogicznie do napromieniania cząstkami α , dla promieniowania X każde szkiełko nakrywkowe z wysianymi komórkami również umieszczono w szalce Petriego. W tym przypadku szalka została od razu zamknięta i umieszczona pod lampą RTG na określony czas, zgodnie z oszacowaną mocą dawki.

Dla promieniowania X i klonogenego testu przeżywalności do komórek dostarczono szereg dawek: 0,5 Gy (9 sekund), 1 Gy (18 sekund), 2 Gy (36 sekund), 4 Gy (1 minuta i 12 sekund), 6 Gy (1 minuta i 48 sekund) i 8 Gy (2 minuty i 24 sekundy). Do oznaczeń apoptozy oraz badań egzosomowych komórki poddano ekspozycji na dawkę 2 Gy i 6 Gy, z kolei dla testu γ H2AX tylko na dawkę 2 Gy. Każdej serii napromieniania towarzyszyły również próbki kontrolne, które nie były ekspozowane na promieniowanie fotonowe.

W przypadku klonogenego testu przeżywalności, przeprowadzonego w Laboratorium Radiobiologicznym Zakładu Fizyki Biomedycznej, po napromienieniu komórki poddawano czternastodniowej inkubacji, umożliwiającej tworzenie kolonii.

W Centrum Badań Przedklinicznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wykonano także analizy komórkowe oceniające apoptozę – programowaną śmierć komórki – z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Dodatkowo, w przypadku komórek poddanych działaniu cząstek α oznaczono procent uwalnianej dehydrogenazy mleczanowej (LDH, z ang. *lactate dehydrogenase*) oraz stężenie interleukiny-6 (IL-6).

Po czterech dniach inkubacji pobrano supernatanty hodowli komórkowych (inaczej nadsącz komórkowy), z których następnie izolowano egzosomy. Ich koncentrację oraz średnicę mierzono metodą NTA w Centrum Badań Przedklinicznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego zgodnie z procedurami opisanymi w Rozdziale 3.2.4.

3.2.3 Procedury eksperymentalne

Klonogeny test przeżywalności

W celu określenia przeżywalności komórek dla linii PC3 i DU145 przeprowadzono klonogeny test przeżywalności, który umożliwił wyznaczenie frakcji przeżywających komórek (SF, z ang. *Surviving Fraction*) eksponowanych na cząstki α (zakres dawek: 0–2 Gy) oraz na promieniowanie X (zakres dawek: 0–8 Gy).

Dla każdej dawki przed napromienianiem komórki wysiewano na pojedyncze szkiełko nakrywkowe zgodnie z informacjami zawartymi w Rozdziale 3.2.2. Po napromienieniu i odklejeniu komórek od podłoża za pomocą trypsyny, komórki liczono i rozdzielano do dalszej inkubacji, przygotowując po trzy replikanty na każdą dawkę (w tym kontrolną). Komórki wysiewano w odpowiedniej gęstości (Tabela 3.4) na szalki Petriego o średnicy 9 cm, zawierające po 15 ml pożywki hodowlanej.

Tabela 3.4. Liczba wysiewanych komórek nowotworowych gruczołu krokowego do klonogenego testu przeżywalności.

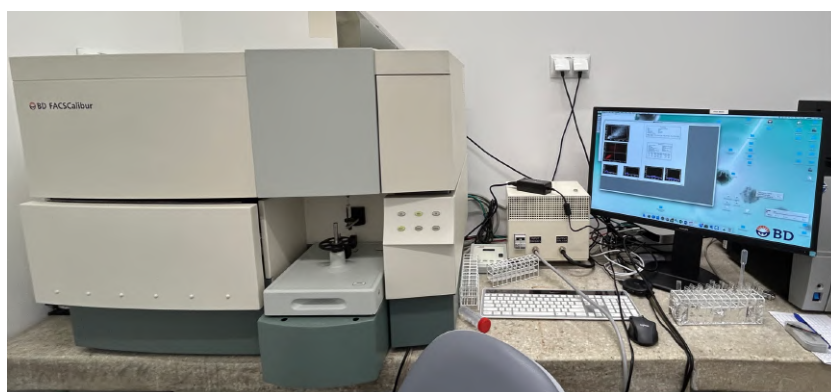
Komórki	PC3		DU145	
	X	α	X	α
Kontrolne	9000	11000	6000	11000
Napromienione	11000–40000	17000–70000	8000–20000	17000–70000

Po wysianiu komórki inkubowano przez 14 dni w warunkach standardowej hodowli, umożliwiając tworzenie kolonii. Następnie kolonie zostały utrwalone i wybarwione roztworem Giemsy. Skany szalek z wybarwionymi koloniami poddano analizie ilościowej w celu określenia liczby powstałych kolonii. Wykorzystano do tego narzędzie countPHICS (z ang. *count and Plot Histograms of Colony Size*) (Brzozowska et al., 2019). Na podstawie uzyskanej liczby kolonii, korzystając ze wzoru (2.6) obliczono wydajność klonowania. Obliczone PE wykorzystano do obliczenia SF z wzoru (2.7). Uzyskane wartości przedstawiono na wykresie zależności frakcji komórek przeżywających od dawki promieniowania, co pozwoliło na wyznaczenie krzywych przeżywalności. Do ich analizy zastosowano model liniowo–kwadratowy, powszechnie wykorzystywany w radiobiologii do opisu zależności przeżywalności komórek od dawki promieniowania.

Apoptoza

W celu oceny apoptozy po ekspozycji komórek na promieniowanie, dla każdej wartości dawki oraz dla komórek kontrolnych, dwa szkiełka nakrywkowe (napro-

mienione tą samą dawką) przenoszono do jednej szalki Petriego o średnicy 9 cm, zawierającej 18 ml pożywki hodowlanej. Tak przygotowane komórki inkubowano przez 96 godzin. Efekt apoptotyczny oceniano metodą podwójnego barwienia Annexin V:FITC oraz jodkiem propidyny, wykorzystując zestaw do detekcji apoptozy FITC:Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences Pharmingen, nr kat. 556420) zgodnie z protokołem producenta. Analizę przeprowadzano na próbkach zawierających po 10 000 komórek każda, przy użyciu cytometru przepływowego FACSCalibur (Becton Dickinson) oraz oprogramowania CellQuest. Zdjęcie wykorzystywanego cytometru oraz ekranu przedstawiającego okno programu CellQuest zostało zaprezentowane na Rysunku 3.9.



Rysunek 3.9. Cytometr przepływowy FACSCalibur (Becton Dickinson).

Za komórki żywotne uznawano populację niewykazującą sygnału fluorescencyjnego zarówno dla aneksyny V, jak i PI. Komórki wykazujące dodatnią fluorescencję aneksyny V i ujemną PI klasyfikowano jako komórki we wczesnej fazie apoptozy, natomiast komórki wykazujące jednoczesną dodatnią fluorescencję aneksyny V i PI identyfikowano jako komórki w późnej fazie apoptozy. Komórki nekrotyczne wykazywały ujemną fluorescencję aneksyny V i dodatnią PI.

Test LDH

Ocenę stopnia cytotoksyczności oraz poziomu uszkodzenia komórek przeprowadzono na podstawie pomiaru aktywności dehydrogenazy mleczanowej, uwalnianej do supernatantu komórkowego przez komórki ulegające lizie. Pomiar ten wykonano z wykorzystaniem zestawu LDH Cytotoxicity Detection Kit (TaKaRa Bio Inc., MK401) zgodnie z protokołem producenta (TaKaRa Bio Inc., 2020). Supernatanty hodowli komórkowych (po 3 objętości 50 μ l z każdej próbki), pochodzące z napromienionych komórek oraz z komórek kontrolnych, przeniesiono do płytek 96-dółkowych, a następnie dodano zalecane odczynniki. Reagenty, niezbędne do przeprowadzenia testu, przygotowywano bezpośrednio przed użyciem, tworząc mieszaninę reakcyjną na 100 testów, poprzez połączenie 125 μ l odczynnika

Catalyst z 5,625 ml odczynnika INT. Do każdego dołka dodano po 50 μ l przygotowanej mieszaniny reakcyjnej, a następnie inkubowano w ciemności w temperaturze pokojowej (RT, z ang. *Room Temperature*) przez 30 minut.

Absorbancję powstałego barwnego produktu zmierzono przy długości fali 490 nm, korzystając z czytnika mikropłytek Epoch (BioTek Inc., USA), wyposażonego w oprogramowanie Gen5 (BioTech Instruments, Inc., Biokom). Dla każdej próbki wykonano dwa niezależne pomiary, po czym obliczono średnią wartość absorbancji. Maksymalne uwolnienie LDH ($A_{wysokiej\ kontroli}$) oznaczano dla komórek kontrolnych poddanych lizie przy użyciu 1% roztworu Tritonu X-100, uzyskując wartość równą 2. Minimalne uwalnianie LDH ($A_{niskiej\ kontroli}$) określono na podstawie pomiarów wykonanych dla komórek kontrolnych, które nie były traktowane Tritonem X-100. Cytotoksyczność (C) obliczono na podstawie wartości absorbancji uzyskanych dla napromienianych komórek $A_{próbki\ badanej}$ według poniższego wzoru:

$$C = \frac{A_{próbki\ badanej} - A_{niskiej\ kontroli}}{A_{wysokiej\ kontroli} - A_{niskiej\ kontroli}} \cdot 100\%, \quad (3.5)$$

gdzie A oznacza wartość absorbancji. Kontrola niska ($A_{niskiej\ kontroli}$) obejmowała komórki hodowane w DMEM-12 z dodatkiem 10% FBS i 2% antybiotyku, natomiast kontrola wysoka ($A_{wysokiej\ kontroli}$) obejmowała komórki inkubowane w tych samych warunkach, lecz z dodatkiem 1% Tritonu X-100, co odpowiadało 100% uwolnienia LDH. Detergent Triton X-100 był stosowany jako kontrola pozytywna w teście LDH w celu określenia maksymalnego uwolnienia enzymu z komórek.

Interleukina 6

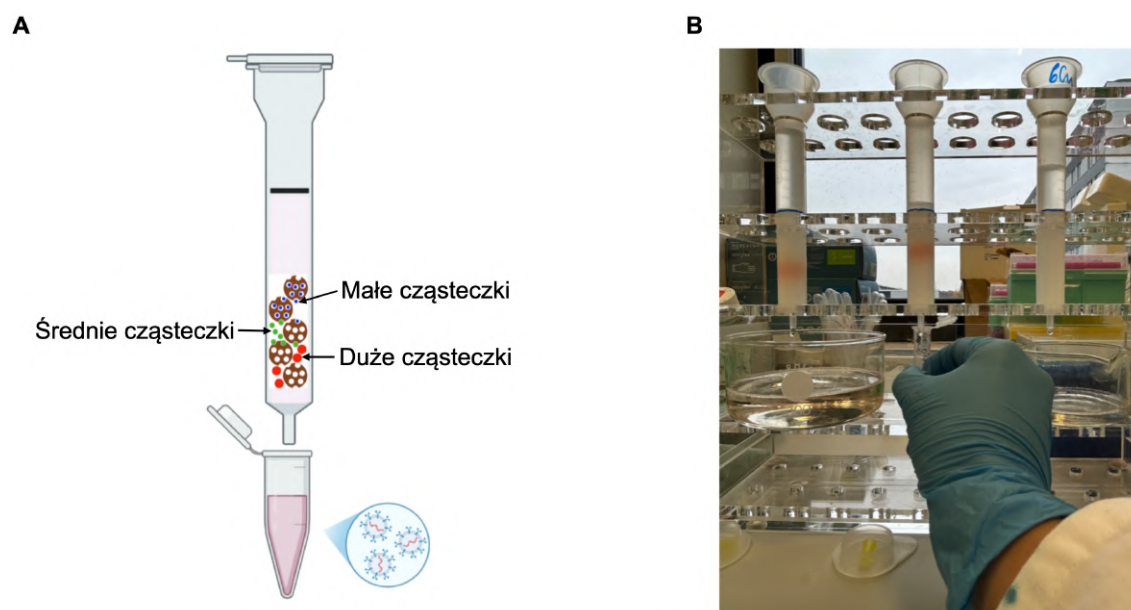
Stężenie interleukiny 6 (IL-6) w hodowlach komórek nowotworowych gruczołu krokowego, zarówno w komórkach napromienionych cząstkami α , jak i w komórkach kontrolnych, oznaczano metodą ELISA (Diacclone SAS, Besancon Cedex, Francja, 950.030.048). Analizę przeprowadzono dla supernatantu hodowli komórkowej, pobierając po 150 μ l z każdej szalki Petriego. Oznaczenia poziomu IL-6 wykonano z wykorzystaniem testu immunoenzymatycznego ELISA zgodnie z protokołem producenta (Diacclone SAS, 2020).

3.2.4 Izolacja egzosomów i ich charakterystyka

Zewnątrzkomórkowe pęcherzyki (egzosomy) uwalniane przez komórki nowotworowe gruczołu krokowego PC3 i DU145 izolowano z ich nadsączy hodowlanych.

Komórki hodowano w medium DMEM-F12 uzupełnione 5% surowicą bydlęcą pozbawioną egzosomów oraz 2% antybiotykiem. W przypadku analiz Western Blot (opisane szczegółowo w Rozdziale 3.3.1) komórki PC3 i DU145 hodowano w butelkach T-175 (powierzchnia wzrostu 175 cm², GenoPlast Biotech S.A., GoogLab;

G77090033), stosując 20 ml pożywki na butelkę i po dwie butelki na każdą próbkę. Na potrzeby pozostałych badań, zarówno dla komórek napromienionych, jak i kontrolnych, umieszczono po dwa szklane szkiełka nakrywkowe ($2,0 \cdot 10^5$ komórek na szkiełko) w jednej szalce Petriego o średnicy 9 cm, zawierającej 18 ml pożywki. Po 96 godzinach hodowli nadsącz zbierano do falkonów. Proces izolacji rozpoczynał się od usunięcia zanieczyszczeń komórkowych. W tym celu supernatant poddawano sekwencyjnemu odwirowaniu: początkowo przez 10 minut przy $2000g$ w temperaturze pokojowej, a następnie przez 30 minut przy $10000g$ w temperaturze 4°C . Kolejnym etapem była filtracja supernatantu przy użyciu sterylnego filtra strzykawkowego o rozmiarze porów $0,22 \mu\text{m}$ (Millex, MilliporeSigma; SLGP033RS), co pozwalało na eliminację większych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, w tym ciałek apoptotycznych. Przefiltrowane supernatanty komórkowe zatężano do objętości 1 ml przy użyciu koncentratorów Vivacell100 (100 000 MWCO, Sartorius; VS2041). Egzosomy izolowano metodą chromatografii wykluczeniowej (SEC, z ang. *size exclusion chromatography*). Kolumna chromatograficzna została przedstawiona na Rysunku 3.10.



Rysunek 3.10. Schematyczny rysunek procesu izolacji egzosomów przy użyciu SEC, ukazujący, że największe cząsteczki opuszczają kolumnę jako pierwsze, a za nimi – średnie i najmniejsze, opracowanie własne na podstawie (Ludwig et al., 2019) przygotowane za pomocą narzędzia BioRender (panel A). Zdjęcie ilustrujące zbieranie frakcji #4 (panel B).

1 ml skoncentrowanego supernatantu dodawano do kolumny chromatograficznej Econo-Pac (Bio-Rad; 7321010), wypełnionej 10 ml sefarozy (Sephacrose CL-2B, Cytiva; GE17-0140-01), celem elucji frakcji #0. W kolejnym etapie do kolumny dodawano 1 ml soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS, z ang. *Phosphate Buffered Saline*), aby wypłukać frakcję #1. Procedurę tę powtarzano dwukrot-

nie, co pozwalało na elucję frakcji #2 i #3. Frakcja #4, zawierająca najwyższe stężenie egzosomów, była zbierana do probówek typu Eppendorf i przeznaczona do analizy NTA. Szczegółowy opis procedury izolacji egzosomów przedstawiono w Dodatku B: Protokół laboratoryjny izolacji egzosomów, zgodnie z metodologią opisaną w pracy (Ludwig et al., 2019).

Analizę śledzenia nanocząstek przeprowadzono przy użyciu aparatu ZetaView (Rysunek 3.11), wyposażonego w oprogramowanie (wersja 2.3, Particle Metrix GmbH, Inning am Ammersee, Niemcy), w celu zmierzenia rozmiaru (średnicy hydrodynamicznej) oraz koncentracji egzosomów uwalnianych przez napromienione i kontrolne komórki nowotworowe gruczołu krokowego. Analizie poddano próbki pochodzące zarówno z komórek ekspozowanych na promieniowanie α , jak i na promieniowanie X. Przed wykonaniem pomiarów próbek urządzenie skalibrowano przy użyciu standardowych nanocząstek polistyrenowych o średnicy 100 nm. Parametry akwizycji ustawiono na czułość 85 (zakres od 0 do 100), szybkość rejestracji 30 klatek na sekundę (fps) oraz czas otwarcia migawki wynoszący 100, co odpowiada czasowi ekspozycji światła rzędu 1–3 ms. Średnia liczba nanocząstek zliczanych w jednej klatce wyniosła 275, co przekracza wcześniej sugerowany zakres 140–200 cząstek na klatkę (Bachurski et al., 2019), lecz zapewnia wyższą czułość detekcji. Aby wyeliminować wpływ tła, jako bufor rozcieńczający zastosowano PBS, którego czystość w komorze NTA sprawdzano przed każdym pomiarem (Gardiner et al., 2013). W tym celu do komory wstrzykiwano 1 ml PBS, a następnie weryfikowano brak sygnału rozpraszania światła, co potwierdzało brak zanieczyszczeń cząsteczkowych w odczynniku.



Rysunek 3.11. Urządzenie ZetaView (Particle Metrix, Niemcy) wraz z przykładowym zdjęciem egzosomów.

3.3 Badania wpływu egzosomów na promieniowrażliwość komórek PC3

W drugim etapie badań eksperymentalnych zbadano efekt sąsiedztwa (RIBE) w kontekście wpływu egzosomów na promieniowrażliwość komórek nowotworowych gruczołu krokowego PC3 poddanych działaniu promieniowania rentgenowskiego, a także na komórki kontrolne. W tym celu zmodyfikowano układ eksperymentalny przedstawiony na Rysunku 3.7, wprowadzając niezależny scenariusz badawczy: Rysunek 3.12 przedstawia schemat przebiegu oznaczeń białek, a Rysunek 3.13 – badania apoptozy. Eksperymenty w tej części badań przeprowadzono wyłącznie na linii komórkowej PC3. W eksperymentach związanych z efektem sąsiedztwa komórki były wysiewane wielokrotnie w obrębie jednego eksperymentu: początkowo w celu izolacji egzosomów, a następnie do współhodowli.

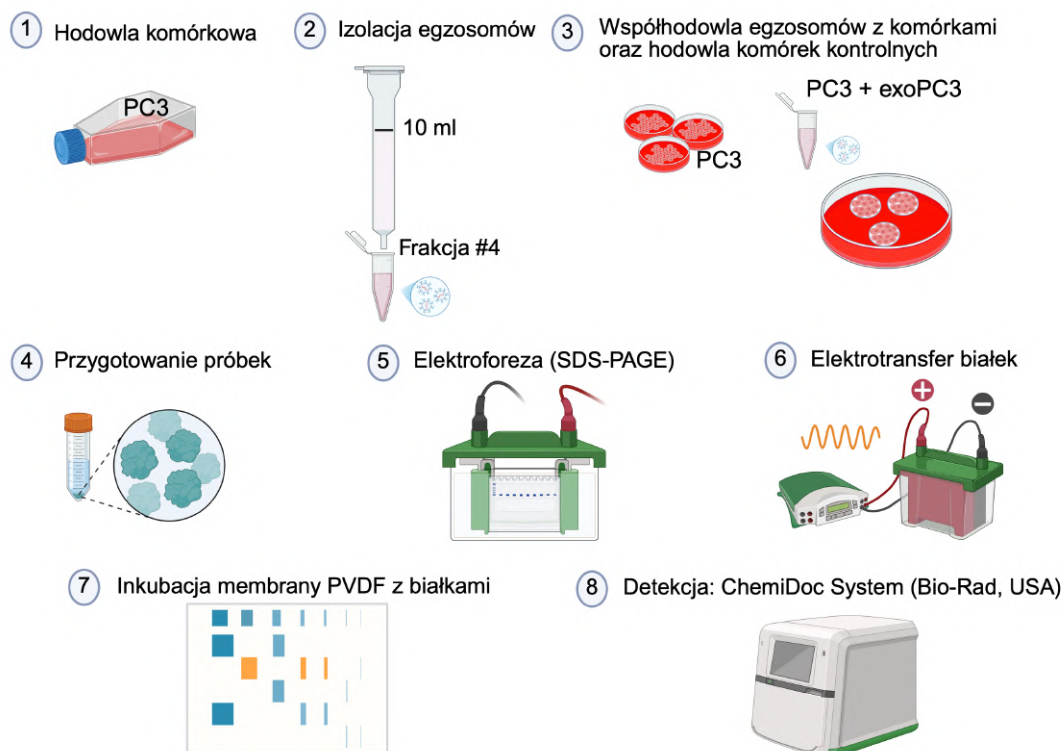
W celu zbadania wpływu egzosomów na promieniowrażliwość komórek PC3 została przeprowadzona ocena ekspresji białek należących do rodziny tetraspanin (CD63, CD81; białka charakterystyczne dla egzosomów) i kalneksyny metodą Western Blot wykonaną na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego w celu potwierdzenia wniknięcia „cargo” egzosomalowego do komórek nowotworowych gruczołu krokowego. Oznaczenia te przeprowadzono wyłącznie dla komórek kontrolnych oraz komórek kontrolnych współhodowanych z egzosomami wyizolowanymi z komórek kontrolnych. W tym przypadku inkubacja trwała 42 godziny. Dokładny przebieg oznaczeń Western Blot w eksperymentach RIBE został opisany w Rozdziale 3.3.1.

Komórki PC3 poddano ekspozycji tylko na promieniowanie X, a także przygotowano próbki kontrolne (bez napromieniania). Po 96 godzinach inkubacji z supernatantu komórkowego wyizolowano egzosomy (exoPC3), które następnie dodano do komórek PC3 (zarówno napromienionych, jak i kontrolnych). Po czterech dniach inkubacji egzosomów z komórkami (PC3 + exoPC3) wykonano oznaczenia apoptozy. Dokładny przebieg oznaczeń apoptozy w eksperymentach RIBE został opisany w Rozdziale 3.3.2.

3.3.1 Oznaczenia egzosomów metodą Western Blot

W celu przeprowadzenia analizy Western Blot komórki PC3 wysiewano na szklane szkiełka nakrywkowe o średnicy 30 mm, które następnie umieszczano w szalkach Petriego o średnicy 3,5 cm. Liczba wysiewanych komórek PC3 wynosiła $2,6 \cdot 10^5$ komórek na jedno szkiełko. Do przygotowania jednej próbki wykorzystywano trzy szalki Petriego, z których każda zawierała 3 ml pożywki hodowlanej. Tak przygotowane próbki służyły do analizy Western Blot opartej na lizacie komórkowym. W eksperymentach RIBE komórki PC3 wysiewano w sposób analo-

giczny, z tą różnicą, że na każdą próbkę przypadają trzy szkiełka nakrywkowe umieszczane łącznie w jednej szalce Petriego o średnicy 9 cm, zawierającej 18 ml pożywki. Komórki PC3 inkubowano przez 42 godziny z wcześniej wyizolowanymi egzosomami (exoPC3), pozyskanymi z komórek kontrolnych. Procedura izolacji egzosomów została przeprowadzona zgodnie z protokołem opisanym w Dodatku B: Protokół laboratoryjny izolacji egzosomów, z uwzględnieniem objętości supernatantu wskazanych w Rozdziale 3.2.4. Schemat przebiegu oznaczeń białek został zaprezentowany na Rysunku 3.12.



Rysunek 3.12. Schemat przebiegu oznaczeń białek CD63, CD81 i kalneksyny metodą Western Blot dla badania wpływu egzosomów (exoPC3) na promieniowrażliwość komórek PC3, przygotowany za pomocą narzędzia BioRender.

Stężenie białek CD63, CD81 i kalneksyny w lizatach komórkowych oraz w próbkach komórek inkubowanych z egzosomami określano za pomocą testu Bradforda (Bradford, 1976). Ekstrakty białkowe (20 μ g białka), zarówno z komórek kontrolnych, jak i z komórek współhodowanych z egzosomami, rozcieńczano w stosunku 1:1 buforem denaturującym zawierającym 0,25 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,4% SDS, 10 M mocznika, 2% 2-merkaptioetanolu i 20% glicerolu, a następnie denaturowano w temperaturze 75°C przez 10 minut. Próbkę rozdzielano metodą elektroforezy w 12% żelu poliakrylamidowym w obecności SDS (SDS-PAGE), a następnie przenoszono na membrany PVDF (Merck, nr kat. IPVH00010) metodą mokrego transferu. Po etapie blokowania w 5% roztworze surowiczej albuminy bydlęcej (BSA, z ang. *Bovine Serum Albumin*, frakcja V) w TBS (20 mM Tris-HCl,

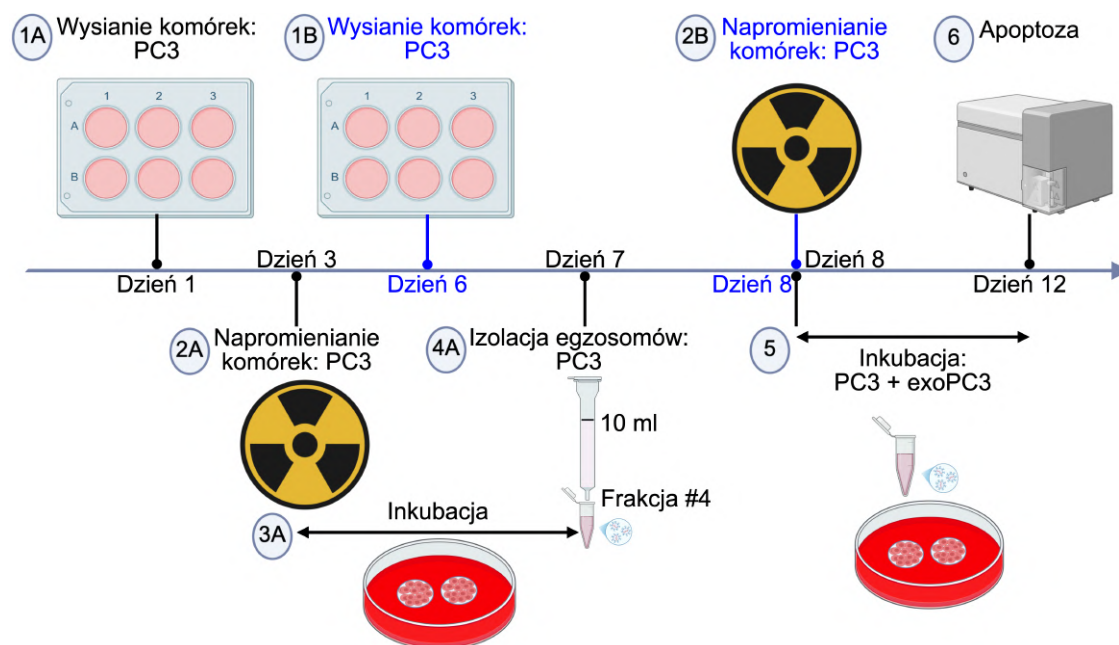
pH 7,5; 0,5 M NaCl), prowadzonym w temperaturze pokojowej przez 2 godziny, membrany inkubowano ze specyficznymi przeciwciałami I-rzędowymi w 1% BSA w TBST (TBS; 0,05% Tween 20): anty-CD63 (1:1500, Thermo Fisher Scientific, Invitrogen; 10628D), anty-CD81 (1:500, Thermo Fisher Scientific, Invitrogen; 10630D) oraz anty-kalnekksyna (1:1000, Thermo Fisher Scientific, Invitrogen; MA3-027) przez noc w temperaturze 4°C. Następnego dnia membrany płukano, a następnie inkubowano je przez godzinę z przeciwciałem II-rzędowych skoniugowanym z peroksydazą chrzanową (HRP, z ang. *horseradish peroxidase*), rozcieńczonymi w buforze TBST zawierającym 1% BSA (HRP, 1:5000, Agrisera Antibodies, AS11 1772) w temperaturze pokojowej. Po wypłukaniu membran przeprowadzono detekcję w buforze ECL (100 mM Tris-HCl, pH 8,5), do którego na każde 10 ml dodawano 50 µl 250 mM luminolu, 22 µl 90 mM kwasu kumarynowego oraz 3 µl 30% H₂O₂. Membrany inkubowano w przygotowanym roztworze przez 2 minuty, po czym umieszczano je w systemie do wizualizacji białek. Uzyskane sygnały były rejestrowane metodą chemiluminescencji przy użyciu systemu ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, USA) oraz oprogramowania Image Lab (wersja 6.0.1) zgodnie z ustalonym protokołem (Bio-Rad Laboratories, 2020).

3.3.2 Apoptoza, czyli odpowiedź komórkowa

Oznaczanie poziomu apoptozy w eksperymentach dotyczących efektu sąsiedztwa, a konkretnie w badaniu wpływu egzosomów na promieniowrażliwość komórek PC3, przeprowadzono zgodnie z wcześniej opisaną metodyką (Rozdział 3.2.3), z pewnymi modyfikacjami wynikającymi ze specyfiki układu eksperymentalnego w tej części doświadczeń.

Schemat przebiegu został zaprezentowany na Rysunku 3.13. Aby ułatwić zrozumienie przedstawionego schematu, poszczególne etapy procedury oznaczania apoptozy w eksperymentach RIBE zostały szczegółowo opisane poniżej. W pierwszym dniu eksperymentu odbyło się wysianie komórek PC3 (1A), które dwa dni później zostały napromienione promieniowaniem fotonowym (2A). Następnie komórki zostały poddane 96 godzinnej inkubacji (3A) w celu wyizolowania z supernatantu komórkowego egzosomów (4A). Procedura izolacji egzosomów została przeprowadzona zgodnie z protokołem opisanym w dodatku B: Protokół laboratoryjny izolacji egzosomów, z uwzględnieniem objętości supernatantu wskazanych w Rozdziale 3.2.4. Dzień przed izolacją egzosomów komórki PC3, do których dodawane były egzosomy, wysiewano na szklane szkiełka nakrywkowe (1B). Następnie, dzień po izolacji egzosomów, czyli dwa dni po wysianiu tych komórek poddano je ekspozycji na promieniowanie X (2B). W eksperymencie zostały również uwzględnione próbki kontrolne. Po napromienieniu, dwa szkiełka z tymi komórkami umieszczano do jednej szalki Petriego zawierającej 18 ml medium. Do pożywki hodowlanej dodano egzosomy wyizolowane z wcześniejszych komórek PC3 (exoPC3), zarówno

kontrolnych, jak i napromienionych. Po czterech dniach współhodowli komórek PC3 z egzosomami dawcy (PC3 + exoPC3) (5) przeprowadzono oznaczenia poziomu apoptozy (6).



Rysunek 3.13. Schemat przebiegu oznaczeń apoptozy w eksperymentach RIBE dla układu eksperymentalnego w badaniach wpływu egzosomów (exoPC3) na promieniowrażliwość komórek PC3 (PC3 + exoPC3), przygotowany za pomocą narzędzia BioRender.

3.4 Modyfikowanie promieniowrażliwości komórek PC3 za pomocą egzosomów DU145

W trzecim etapie badań eksperymentalnych zbadano efekt sąsiedztwa w kontekście modyfikowania promieniowrażliwości komórek PC3 za pomocą egzosomów DU145. W tym celu zmodyfikowano układ eksperymentalny przedstawiony na Rysunku 3.7, wprowadzając trzy niezależne scenariusze badawcze przedstawione na Rysunkach 3.14–3.16. Analogicznie jak w eksperymentach RIBE dotyczących badania wpływu exoPC3 na promieniowrażliwość komórek PC3 (PC3 + exoPC3), komórki były wysiewane wielokrotnie w obrębie jednego eksperymentu: początkowo do izolacji egzosomów (DU145), a następnie do współhodowli (PC3).

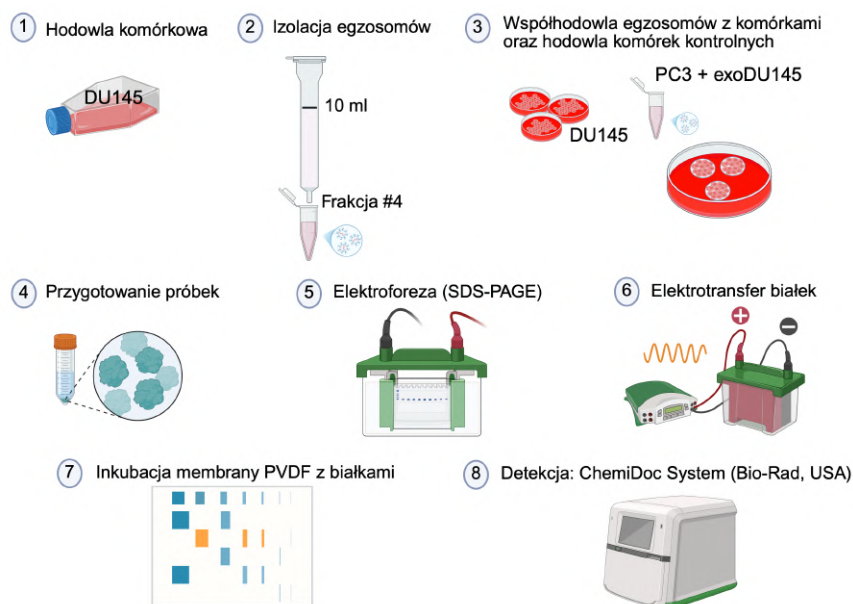
W celu zbadania, czy egzosomy wyizolowane z komórek DU145 (exoDU145) mogą wpływać na efekt działania promieniowania fotonowego na komórki PC3 (PC3 + exoDU145) w pierwszej kolejności została przeprowadzona ocena ekspresji białek (CD63, CD81 i kalneksyny) metodą Western Blot (procedura opisana

w Rozdziale 3.3.1) w celu potwierdzenia wnikięcia „cargo” egzosomów wyizolowanych z komórek DU145 do komórek PC3. Test γ H2AX przeprowadzono w celu wizualizacji uszkodzeń DNA w komórkach kontrolnych, powstałych w wyniku inkubacji z egzosomami wyizolowanymi z komórek napromienionych. Celem tego eksperymentu było również pośrednie potwierdzenie wnikania egzosomów do komórek PC3, co zostało ocenione na podstawie analizy uszkodzeń DNA. Oznaczenia γ H2AX wykonano w Laboratorium Radiobiologicznym Zakładu Fizyki Biomedycznej. Dokładny przebieg oznaczeń γ H2AX został opisany w Rozdziale 3.4.2.

Komórki DU145 poddano ekspozycji tylko na promieniowanie X oraz przygotowano próbki kontrolne. Po 96 godzinach inkubacji z supernatantu komórkowego wyizolowano egzosomy (exoDU145), które następnie dodano do komórek PC3 (zarówno napromienionych, jak i kontrolnych). Po czterech dniach inkubacji egzosomów z komórkami (PC3 + exoDU145) wykonano oznaczenia poziomu apoptozy zgodnie z przebiegiem opisanym dokładnie w Rozdziale 3.3.2.

3.4.1 „Cargo” egzosomów

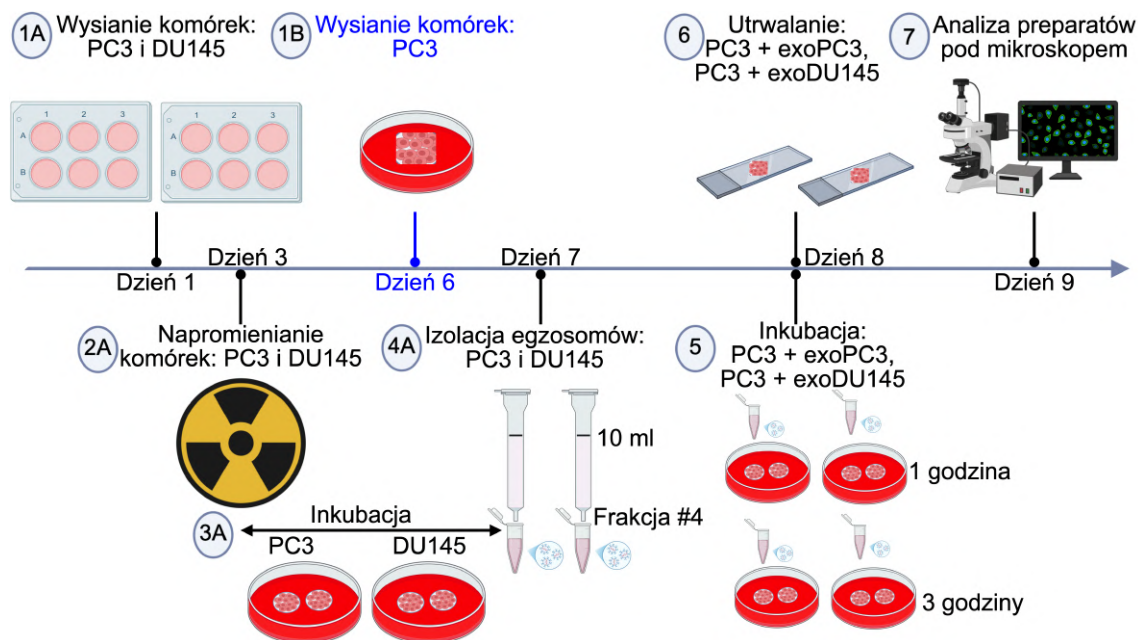
Analizę Western Blot w tej części eksperymentów przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną w Rozdziale 3.3.1. W procedurze zmieniono jedynie konfigurację układu eksperymentalnego, w której egzosomy były izolowane z komórek DU145 (exoDU145) i dodawane do komórek biorców PC3, co prezentuje Rysunek 3.14.



Rysunek 3.14. Schemat przebiegu oznaczeń ekspresji białek metodą Western Blot dla zbadania roli egzosomów (exoDU145) w modyfikowaniu promieniowrażliwości komórek PC3 (PC3 + exoDU145) podanych działaniu promieniowania X, przygotowany za pomocą narzędzia BioRender.

3.4.2 Indukcja uszkodzeń DNA przez egzosomy

Schemat przebiegu oznaczeń γ H2AX został przedstawiony na Rysunku 3.15, a jego szczegółowy opis wraz z odnośnikami do poszczególnych etapów znajduje się w dalszej części tekstu.



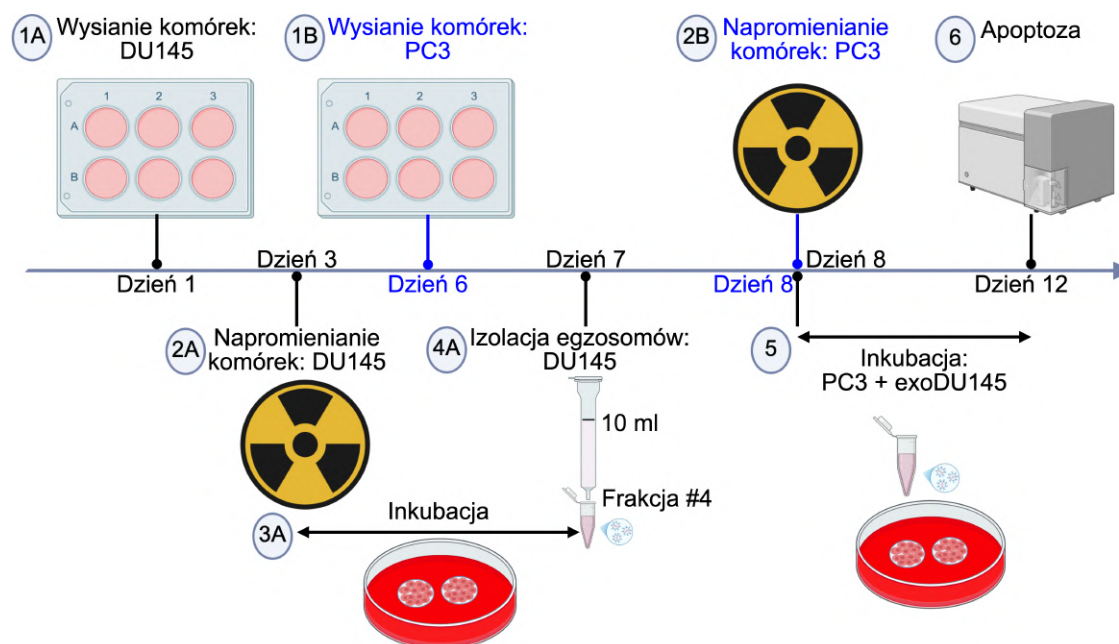
Rysunek 3.15. Schemat przebiegu oznaczeń γ H2AX w eksperymentach RIBE badających rolę egzosomów (exoDU145) w modyfikowaniu promieniowrażliwości komórek PC3 (PC3 + exoDU145) poddanych działaniu promieniowania fotonowego, przygotowany za pomocą narzędzia BioRender.

W dniu rozpoczęcia eksperymentu komórki nowotworowe gruczołu krokowego, PC3 i DU145, zostały wysiane na szklane szkiełka nakrywkowe o średnicy 3 cm, które zostały umieszczone w płytkach 6-dołkowych (1A). Gęstość wysiewu wynosiła $2 \cdot 10^5$ komórek na szkiełko. Dwa dni później komórki zostały poddane ekspozycji na promieniowanie X (2A). Po napromienieniu, komórki były inkubowane na szalkach Petriego przez 96 godzin (3A) w celu izolacji egzosomów (4A). Procedura izolacji egzosomów została przeprowadzona zgodnie z protokołem opisanym w dodatku B: Protokół laboratoryjny izolacji egzosomów, z uwzględnieniem objętości supernatantu wskazanych w Rozdziale 3.2.4. Dzień przed izolacją egzosomów wysiewano 10^5 komórek PC3 na kwadratowe szklane szkiełka nakrywkowe o boku 22 mm (CHEMLAND; 298.202.08), które następnie umieszczano w szalkach Petriego o średnicy 3,5 cm, zawierających 3 ml pożywki hodowlanej (1B). Po upływie dwóch dni do wysianych komórek PC3 zostały dodane wyizolowane egzosomy. Inkubację egzosomów wyizolowanych z napromienionych komórek PC3 (exoPC3) i DU145 (exoDU145) z komórkami kontrolnymi PC3 przeprowadzono przez 1 i 3 godziny (5), aby umożliwić powstanie i detekcję ognisk naprawczych γ H2AX – mar-

kera uszkodzeń DSB. Po zakończeniu inkubacji komórki współhodowane z egzosomami trzykrotnie przepłukano PBS, a następnie utrwalono w 1 ml 70% zimnego etanolu przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Po trzech kolejnych przepłukaniach PBS komórki poddano permeabilizacji w roztworze 0,2% Tritonu X-100 przez 5 minut w RT, a następnie ponownie trzykrotnie przepłukano PBS. W celu zablokowania niespecyficznego wiązania przeciwciał komórki inkubowano w 3% roztworze BSA (CARL ROTH, nr kat. 9401.2; rozcieńczonym w PBS, 3%BSA/PBS) przez 30 minut w RT, po czym ponownie trzykrotnie przepłukano PBS. Preparaty inkubowano z przeciwciałem I-rzędowym anty-P-Ser139-H2A.X (1:400, Cell Signaling Technology; 9718S) w roztworze 3% BSA/PBS przez 45 minut w temperaturze 37°C, po czym trzykrotnie przepłukano PBS. Następnie komórki inkubowano z przeciwciałem II-rzędowym skoniugowanym z FITC (1:1000, Abcam; ab67147-1) w 2% roztworze BSA/PBS przez 45 minut w 37°C. Komórki po zakończeniu inkubacji z II-rzędowym przeciwciałem przepłukano trzykrotnie PBS. Na szkiełko mikroskopowe podstawowe (76 mm × 26 mm × 1 mm, CHEMLAND; 296.202.07) dodano kroplę (< 5 µl) VECTASHIELD® PLUS Antifade Mounting Medium zawierającego DAPI (BIOKOM; H-2000-10) i umieszczono na nim odwrócone szkiełko nakrywkowe, na którym wysiewano komórki (6). Indukcję ognisk γ H2AX wywołaną dodaniem egzosomów wyizolowanych z napromienionych komórek wizualizowano za pomocą odwróconego mikroskopu optycznego Olympus IX83 (Cellvivo, oprogramowanie CellSens) przy powiększeniu 100× (7). Podczas wykonywania zdjęć używano takich samych ustawień mikroskopu, aby dane uzyskane ze zdjęć mogły zostać ze sobą porównane ilościowo oraz jakościowo. Czasy ekspozycji utrzymywano dla kanału w kontraście fazowym (PH, z ang. *Phase Contrast*) w granicach 160-200 ms, kanału DAPI: 40 ms, kanału FITC: 800-850 ms. Wykonane zdjęcia analizowano za pomocą programu ImageJ (wersja 1.54k).

3.4.3 Zaprogramowana śmierć komórki

Oznaczanie poziomu apoptozy w eksperymentach dotyczących modyfikowania promieniowrażliwości komórek PC3 za pomocą egzosomów DU145 przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną w Rozdziale 3.3.2. Zmieniono jedynie konfigurację układu eksperymentalnego, w której egzosomy były izolowane z komórek DU145 (exoDU145) i dodawane do komórek PC3, zgodnie z Rysunkiem 3.16.



Rysunek 3.16. Schemat przebiegu oznaczeń apoptozy w eksperymentach RIBE badających rolę egzosomów (exoDU145) w modyfikowaniu promieniowrażliwości komórek PC3 (PC3 + exoDU145) poddanych działaniu promieniowania fotonowego, przygotowany za pomocą narzędzia BioRender.

3.5 Analiza statystyczna

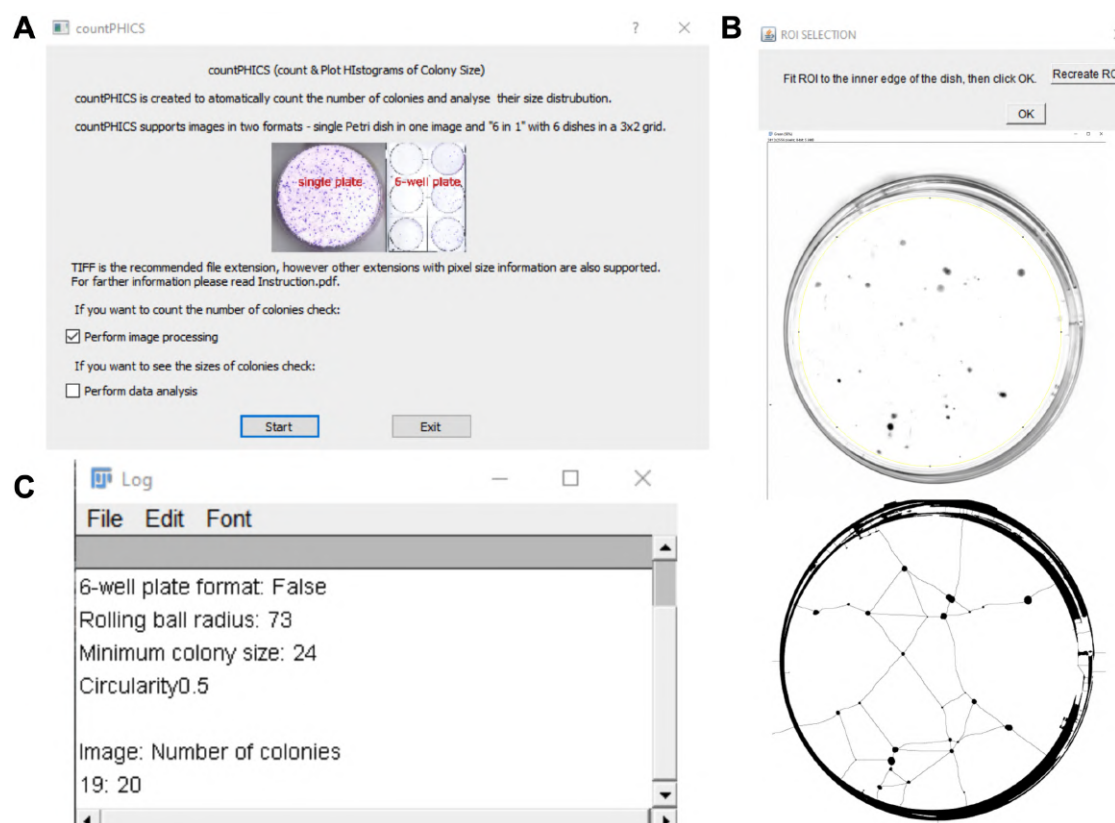
Dozymetria

W przypadku danych uzyskanych z pomiarów dozymetrycznych niepewności otrzymanych wartości dawek zostały wyznaczone metodą propagacji małych błędów, uwzględniając zarówno niepewności intensywności piksela, jak i niepewności parametrów dopasowania krzywych kalibracyjnych w celu oszacowania mocy dawki. Do otrzymanych wartości dawek zostały dopasowane parametry regresji liniowej przy pomocy metody najmniejszych kwadratów, a dopasowanie zostało ocenione na podstawie współczynnika determinacji R^2 (z ang. *Coefficient of Determination*). Jednorodność źródeł została obliczona na podstawie średnich wartości intensywności pikseli oraz ich odchyłeń standardowych. W przypadku promieniowania X został również wyznaczony maksymalny jednorodny rozmiar pola promieniowania.

Analiza obrazów z użyciem countPHICS

Skany szalek z wybarwionymi koloniami poddano analizie ilościowej w celu określenia SF w funkcji dawki. Wykorzystano do tego narzędzie countPHICS stworzone przez zespół badawczy z Zakładu Fizyki Biomedycznej (Brzozowska et al., 2019). Podstawowe informacje o programie zostały przedstawione na Rysunku 3.17.

Oprogramowanie to składa się z dwóch modułów, umożliwiających obliczenie liczby powstałych kolonii oraz ich wielkości, co widać na Rysunku 3.17A. Pierwszym z nich jest makro w programie ImageJ, przeznaczone do analizy obrazów komputerowych (na przykład skanów) pojedynczych (Rysunek 3.17B) lub 6-dółkowych szalek. Algorytm umożliwia zliczenie kolonii ze standardowymi parametrami: promień, minimalny rozmiar kolonii oraz okrągłość (Rysunek 3.17C).



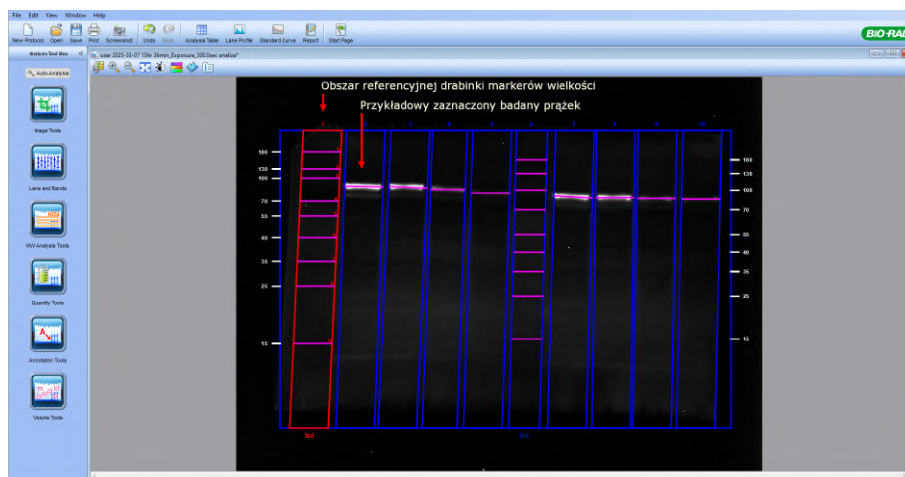
Rysunek 3.17. Zrzut ekranu z programu countPHICS z reprezentatywną szalką z wybarwionymi koloniami: okno startowe (Panel A), okno dopasowania ROI do obrazu (Panel B), okno z wybranymi parametrami analizy wraz z obliczoną liczbą kolonii (panel C).

Do danych eksperymentalnych pochodzących z klonogenego testu przeżywalności został dopasowany model liniowo-kwadratowy (LQ) za pomocą metody najmniejszych kwadratów, a jakość dopasowania została oceniona na podstawie wartości współczynnika determinacji R^2 .

Analiza Western Blot z użyciem Image Lab

Prążki analizowano densytometrycznie za pomocą narzędzi dostępnych w programie Image Lab 6.0.1 (Bio-Rad Laboratories, 2020), umożliwiających precyzyjne określenie ich masy cząsteczkowej na podstawie porównania z markerem wielkości molekularnej. Analizę intensywności sygnału przeprowadzono poprzez pomiar

gęstości optycznej z uwzględnieniem automatycznej korekty tła oraz weryfikacji poprawności zaznaczenia obszaru prążka, co zapewniało rzetelność i porównywalność uzyskanych wyników. Przykładową analizę, z zaznaczonymi markerami wielkości oraz wybranymi prążkami w programie Image Lab, przedstawiono na Rysunku 3.18.



Rysunek 3.18. Zrzut ekranu z programu Image Lab (wersja 6.0.1) z reprezentatywnym badanym prążkiem oraz obszarem referencyjnej drabinki markerów wielkości.

Wyniki badań odpowiedzi komórkowej oraz charakterystyki egzosomów

Badanie odpowiedzi komórkowej zostało przeprowadzone z wykorzystaniem klonogenego testu przeżywalności, oznaczeń apoptozy, testu LDH i IL-6. Dla otrzymanych danych uzyskanych na podstawie klonogenego testu przeżywalności wykonano porównanie wartości frakcji komórek przeżywających oraz parametrów dopasowania modelu LQ pomiędzy badanymi liniami nowotworowymi gruczołu krokowego. Dane z cytometrii przepływowej zostały pogrupowane na trzy zestawy danych: komórki żywe, wczesnoapoptotyczne oraz późnoapoptotyczne lub nekrotyczne. Dla testów cytotoksyczności (LDH i IL-6) sprawdzono istotność statystyczną dla komórek kontrolnych w porównaniu z komórkami napromienionymi oraz pomiędzy komórkami PC3 i DU145. Dla charakterystyki egzosomów została sprawdzona korelacja pomiędzy koncentracją i średnicą egzosomów a dawką promieniowania α i promieniowania X oraz pomiędzy badanymi liniami komórek nowotworowych gruczołu krokowego.

Wszystkie testy statystyczne danych uzyskanych na drodze wykonanych eksperymentów zostały wykonane z wykorzystaniem samodzielnie napisanych skryptów w języku Python 3 (wersja Python 3.10.12, Python Software Foundation) z wykorzystaniem dodatkowych bibliotek, takich jak SciPy i Matplotlib. W celu oceny statystycznej dane zostały porównane za pomocą testu t-Studenta. Wartość p mniejsza niż 0,05 była uznawana za istotnie statystyczną. Dane zostały

przedstawione jako średnie wartości z niepewnością standardową średniej (SEM, z ang. *Standard Error of the Mean*).

3.5.1 Analiza ognisk naprawczych

Wykonane zdjęcia analizowano za pomocą programu ImageJ (wersja 1.54k) z wykorzystaniem dedykowanego makra do analizy ognisk γ H2AX. Średnia liczba ognisk naprawczych na jądro komórkowe została obliczona dla losowo wybranych 50 jąder komórkowych. W celu oceny statystycznej dane zostały porównane za pomocą testu t-Studenta. Różnice dla wartości p mniejszych niż 0,05 były uznawane za istotnie statystyczne.

Rozdział 4

Wyniki i dyskusja

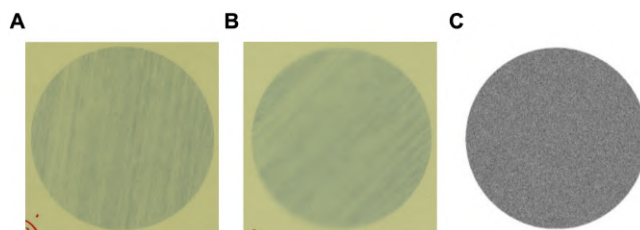
4.1 Dozymetria

4.1.1 Symulacje MC dla źródła cząstek α

W celu określenia mocy dawki dla płaskiego źródła ^{241}Am zostały wykonane symulacje oparte na metodach MC z wykorzystaniem narzędzia Geant4-DNA z uwzględnieniem geometrii napromieniania komórek zastosowanej w doświadczeniach realizowanych w ramach niniejszej pracy. Obliczona na podstawie symulacji moc dawki promieniowania α emitowanego ze źródła ^{241}Am wynosiła $(0,6000 \pm 0,0050)$ Gy/min. Oznacza to, że dawka 1 Gy była deponowana w monowarstwie komórek w czasie 1 minuty i 40 sekund. Uzyskana jednorodność dawki dla monowarstwy komórek nowotworowych gruczołu krokowego, przy zastosowanej w eksperymentach geometrii napromieniania, wynosiła około 99%.

Dodatkowo w celu weryfikacji jednorodności powierzchniowego źródła α zostały wykonane pomiary z wykorzystaniem filmów radiochromowych dla dwóch konfiguracji układu. Wybrane przykładowe skany napromienionych filmów radiochromowych wraz z rozkładem dawki uzyskanym w symulacjach za pomocą kodów Geant4-DNA zostały przedstawione na Rysunku 4.1.

Średnia intensywność piksela wraz odchyleniem standardowym dla wybranych dwóch filmów radiochromowych wynosiła odpowiednio: (39000 ± 1500) dla źródła umieszczonego bezpośrednio na źródle oraz (41000 ± 1200) dla konfiguracji z folią Mylar. Zostało zaobserwowane, że umieszczenie źródła bezpośrednio na filmie radiochromowym spowodowało pogorszenie jednorodności źródła w porównaniu z wynikami uzyskanymi zarówno w dozymetrii *in silico* dla monowarstwy komórek, jak i w pomiarach z użyciem filmów radiochromowych, dla których zastosowano folię Mylar. Uzyskana jednorodność źródła dla konfiguracji z folią Mylar wynosiła około 97%. Folia Mylar, działając jako filtr, poprawia jednorodność rozkładu dawki promieniowania α poprzez częściowe rozproszenie i pochłanianie cząstek,

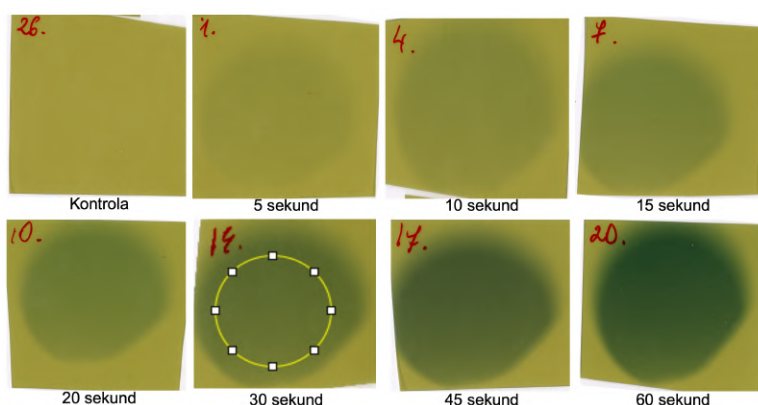


Rysunek 4.1. Zeskanowane filmy radiochromowe Gafchromic™ EBT3-Unlaminated poddane działaniu promieniowania α . Przedstawione zostały dwie konfiguracje układów napromieniania filmów radiochromowych z użyciem źródła ^{241}Am : źródło umieszczone bezpośrednio na filmie radiochromowym (panel A), pomiędzy źródłem a filmem umieszczona folia Mylar o grubości $3\text{ }\mu\text{m}$ (panel B). Rozkład dawki otrzymany na drodze dozymetrii *in silico* (panel C).

co skutkuje zarówno wygładzeniem przestrzennego rozkładu dawki, jak i redukcją energii cząstek α .

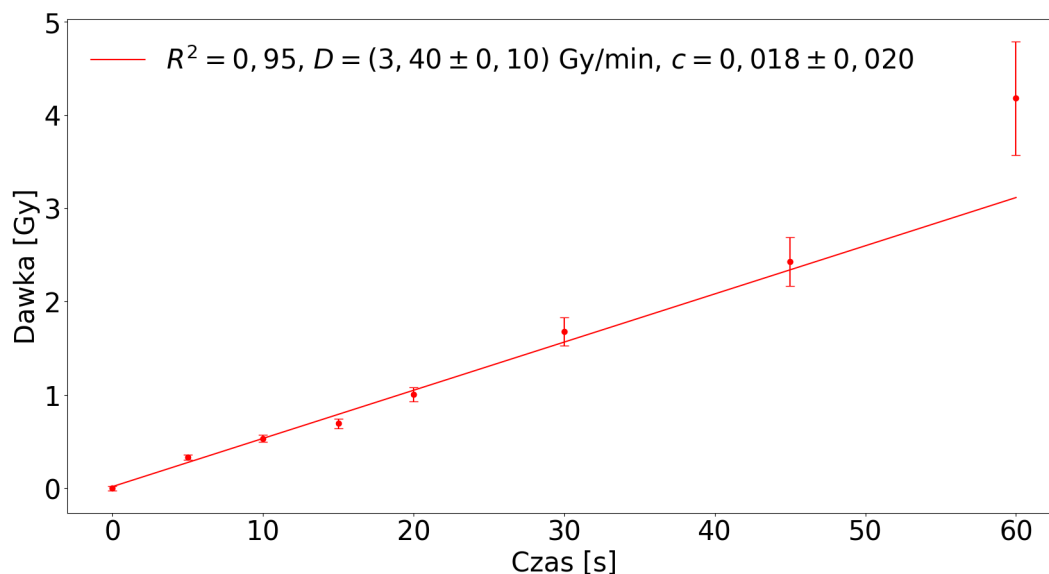
4.1.2 Określenie mocy dawki lampy RTG i jednorodności rozkładu dawki

W celu weryfikacji dozymetrycznej lampy RTG zostały wykonane pomiary dawki z wykorzystaniem filmów radiochromowych dla układu eksperymentalnego zastosowanego w pracy. Wybrane przykładowe skany napromienionych filmów radiochromowych, reprezentujące każdy punkt czasowy, zostały przedstawione na Rysunku 4.2. Dla każdego filmu radiochromowego został zaznaczony obszar zainteresowania (ROI, z ang. *Region of Interest*), odpowiadający rozmiarowi szkiełka, na którym wysiewano komórki. Pomiar w każdym punkcie czasowym został powtórzony pięciokrotnie.



Rysunek 4.2. Zeskanowane filmy radiochromowe Gafchromic™ EBT4 poddane działaniu promieniowania X. Pierwszy film (nr 26) stanowi film nienapromieniony (próba kontrolna), natomiast pozostałe siedem filmów zostało napromienianych w różnym czasie (ułożone w kolejności coraz dłuższego czasu napromieniania). Na jednym z filmów reprezentatywnie zaznaczono ROI.

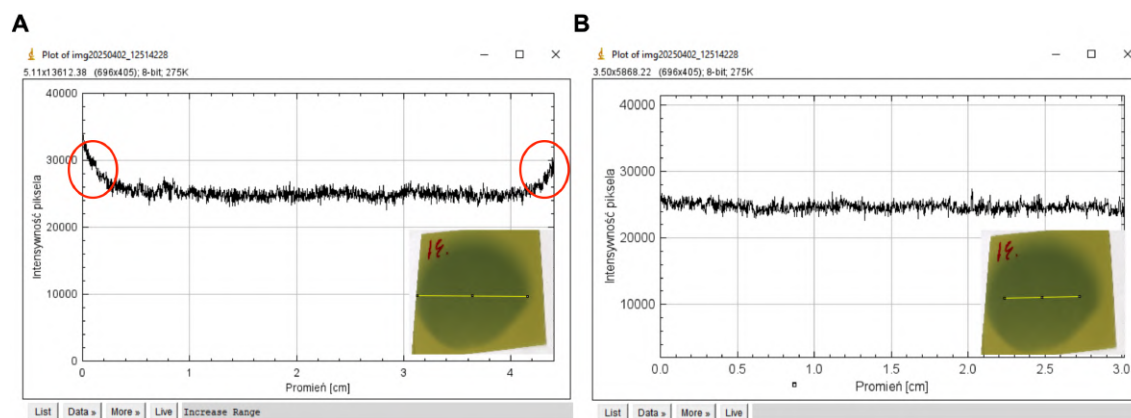
W oparciu o średnie wartości intensywności pikseli w pierwszym kroku została obliczona moc dawki. Wartości dawki dla każdego pomiaru zostały obliczone za pomocą wzoru (3.2), a następnie uśrednione ($\bar{D}$) dla każdego punktu czasowego. Wyniki obliczeń średnich wartości intensywności piksela i dawki promieniowania dla różnych czasów napromieniania zostały przedstawione w Dodatku C: Materiały uzupełniające. Otrzymane wartości dawek w funkcji czasu zostały zaprezentowane na Rysunku 4.3.



Rysunek 4.3. Zależność dawki pochłoniętej w filmach radiochromowych Gafchromic™ EBT4 od czasu napromieniania dla kanału czerwonego. Słupki błędów zostały wyznaczone metodą propagacji małych błędów.

Na podstawie dopasowania parametrów regresji liniowej została oszacowana moc dawki (współczynnik kierunkowy prostej): $(3,40 \pm 0,10)$ Gy/min. Uzyskana jednorodność dawki na powierzchni koła o średnicy 3 cm wynosiła około 97%.

W oparciu o średnie wartości intensywności pikseli została również sprawdzona jednorodność promieniowania emitowanego przez lampę RTG. Weryfikację przeprowadzono poprzez analizę profili rozkładu intensywności promieniowania, które zostały przedstawione na Rysunku 4.4. Analiza profili rozkładu intensywności promieniowania została przeprowadzona dla wybranego filmu radiochromowego w celu optymalizacji doboru maksymalnego rozmiaru szkiełek nakrywkowych, na których wysiewano i napromieniano komórki. Zostało zaobserwowane, że rozmiar pola promieniowania X wyniósł około 4 cm. Uwzględniając pojawiające się niejednorodności w brzegowych obszarach zdecydowano, że komórki będą wysiewane na szklanych szkiełkach nakrywkowych o średnicy 3 cm. Uzyskana jednorodność źródła dla tej geometrii napromieniania wynosiła około 98%.



Rysunek 4.4. Zeskanowane filmy radiochromowe Gafchromic™ EBT4 poddane działaniu promieniowania X z profilami. Została przedstawiona całkowita wielkość pola promieniowania, uwzględniając spadek jednorodności dawki w rejonach brzegowych (panel A) oraz jednorodność promieniowania w obszarze o średnicy odpowiadającej rozmiarowi szkiełka nakrywkowego używanego do napromieniania komórek (panel B).

4.1.3 Dyskusja i wnioski

Głównym wyzwaniem w napromienianiu materiału biologicznego cząstkami α jest niejednorodność dawki w obrębie napromienianej monowarstwy komórek. W ramach doświadczalnej weryfikacji dozymetrycznej została sprawdzona jednorodność dawki promieniowania α za pomocą filmów radiochromowych. Wyniki, które zostały otrzymane dla pomiarów jednorodności dawki, zostały zwalidowane przy użyciu dozymetrii *in silico* z wykorzystaniem narzędzia Geant4-DNA i wykazały zgodność obu charakterystyk. Geometria napromieniania komórek została dobrana w sposób optymalny, aby zminimalizować niejednorodności źródła.

Dla promieniowania X została wykonana dozymetria doświadczalna, w ramach której została sprawdzona jednorodność dawki promieniowania emitowanego przez lampę RTG. Analiza wyników pomiarów, wykonanych w pięciokrotnym powtórzeniu w różnych punktach czasowych, pozwoliła na oszacowanie wartości mocy dawki, którą można uzyskać z lampy RTG oraz rozmiaru szkiełka, na którym wysiewano komórki – rozmiar ten został dobrany w celu zapewnienia jednorodnego pola promieniowania.

Dozymetria stanowi kluczowy element eksperymentów radiobiologicznych, pozwalając na optymalizację warunków napromieniania materiału biologicznego. Odpowiedź komórkowa na promieniowanie jonizujące jest uśrednionym efektem populacji komórek, dlatego równomierne dostarczenie dawki do każdej komórki jest istotne. Napromienianie komórek jednorodną dawką oznacza, że średnia ilość energii zdeponowanej w jądrze komórkowym jest taka sama niezależnie od rodzaju promieniowania jonizującego. Jednak sposób jej dostarczenia może różnić się pod względem rozkładu przestrzennego (Friedland et al., 2011). W przypadku pro-

mieniowania rentgenowskiego uzyskanie jednorodności dawki jest łatwiejsze, ze względu na jego sposób oddziaływania z materią. Natomiast dla cząstek α , charakteryzujących się wysokim LET i niewielkim zasięgiem, rozkład dawki oraz efekt biologiczny w pojedynczych komórkach mogą być silnie zróżnicowane w zależności od zastosowanej geometrii napromieniania oraz warunków eksperymentalnych. W związku z tym precyzyjna charakterystyka parametrów wiązki jest kluczowa, gdyż nawet przy porównywalnej dawce zdeponowanej odpowiedź biologiczna może się istotnie różnić (Wojcik et al., 2024).

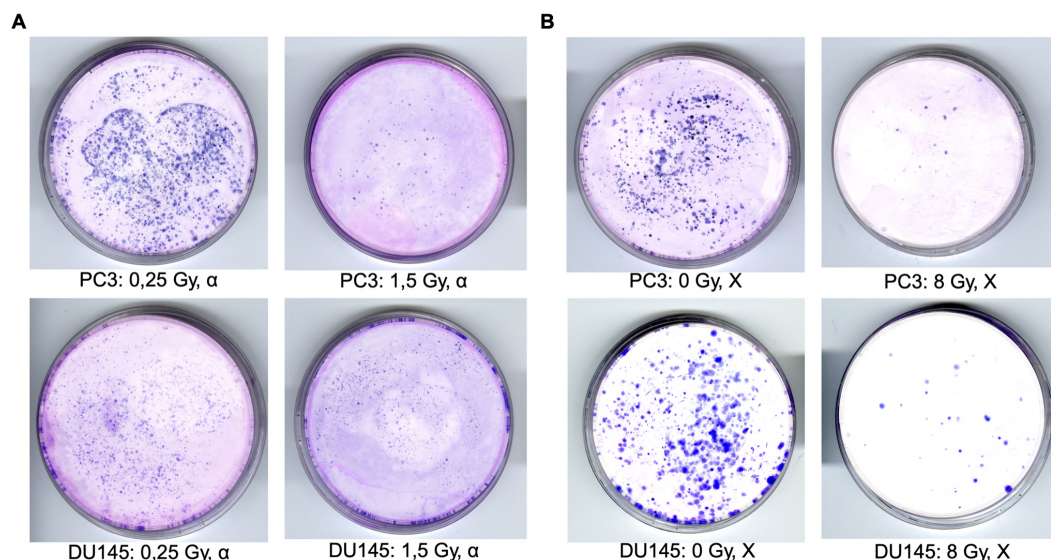
W dozymetrii kluczowe znaczenia mają zarówno teoretyczna, jak i doświadczalna weryfikacja dawek promieniowania (Filipek et al., 2024; Czub et al., 2020; Van et al., 2023). Eksperymenty i symulacje MC wzajemnie się uzupełniają. Dane eksperymentalne stanowią podstawę do weryfikacji i kalibracji modeli teoretycznych, podczas gdy symulacje MC wspierają planowanie oraz optymalizację przebiegu eksperymentów. Takie komplementarne podejście przyczynia się do doskonalenia metod dozymetrycznych.

4.2 Odpowiedź komórkowa na promieniowanie

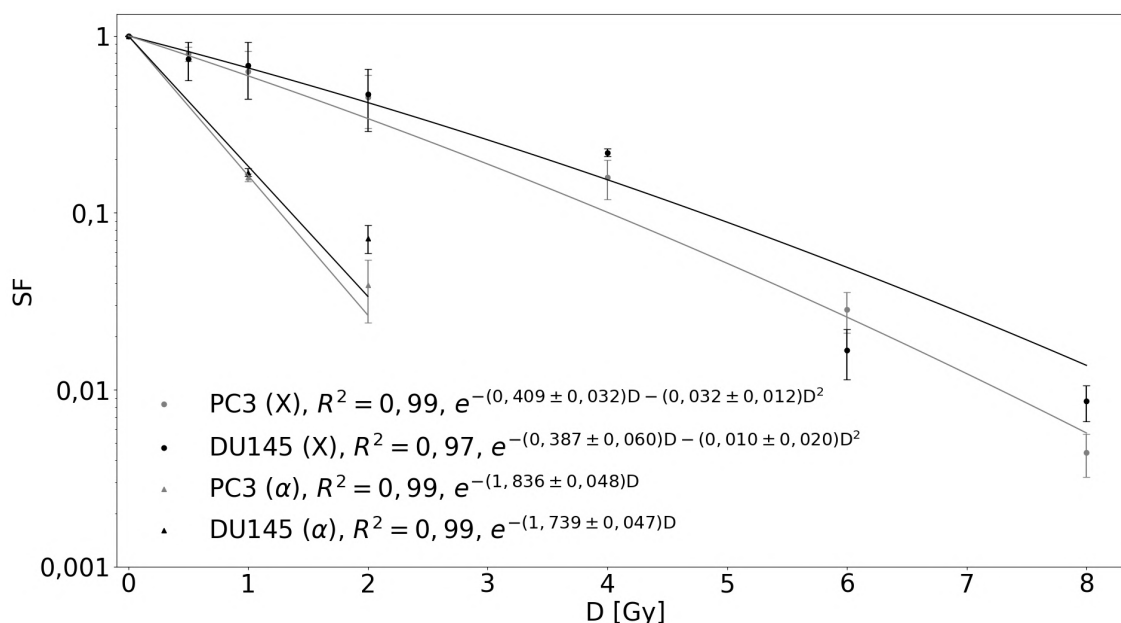
4.2.1 Krzywe przeżywalności

Na Rysunku 4.5 zostały przedstawione skany szalek hodowlanych z wybarwionymi komórkami po ekspozycji na dawkę 0,25 Gy i 1,5 Gy (dla cząstek α), oraz dawkę 0 Gy i 8 Gy (dla promieniowania X). Dobór wartości dawek został celowo tak zaplanowany, aby uwidocznić zasadnicze różnice w skutkach biologicznych indukowanych przez promieniowanie o niskim (promieniowanie X) i wysokim LET (cząstki α). Zaprezentowane skany jednoznacznie pokazują, że liczba powstałych kolonii znacząco maleje wraz ze wzrostem dawki, jednak dla niższej wartości dawki w przypadku cząstek α obserwuje się silniejsze działanie cytotoksyczne niż przy znacznie wyższej dawce promieniowania X. Ilustruje to, że promieniowanie o wysokim LET indukuje bardziej złożone, trudniejsze do naprawy uszkodzenia DNA, co skutkuje obniżoną przeżywalnością komórek.

Otrzymane obrazy szalek hodowlanych zostały poddane analizie ilościowej w ramach określenia liczby powstałych kolonii komórkowych. Na podstawie obliczonej liczby kolonii oraz wzoru (2.6) została wyznaczona średnia wydajność klonowania, natomiast ze wzoru (2.7) frakcje przeżywalności dla każdej z dawek. Wyniki zostały przedstawione w postaci wykresu zależności frakcji przeżywających komórek od dawki promieniowania jonizującego na Rysunku 4.6.



Rysunek 4.5. Skany szalek hodowlanych przedstawiające przeżywalność komórek po ekspozycji na różne rodzaje i dawki promieniowania jonizującego. Kolonie komórkowe powstałe po napromienieniu komórek promieniowaniem α o dawce 0,25 Gy oraz 1,5 Gy (panel A). Po prawej stronie widoczne są kolonie po ekspozycji na promieniowanie X o dawce 8 Gy, natomiast lewa strona przedstawia kolonie z próby kontrolnej (panel B).



Rysunek 4.6. Krzywe przeżywalności komórek nowotworowych gruczołu krokowego (PC3 i DU145) uzyskane po ekspozycji na różne dawki promieniowania α oraz promieniowania X. Dane dopasowano do modelu liniowo-kwadratowego. Punkty na wykresie przedstawiają średnią wartość frakcji przeżywalności obliczoną na podstawie trzech niezależnych eksperymentów, z których każdy obejmował po trzy replikanty wraz z odchyleniem standardowym średniej (SEM).

Na podstawie dopasowania modelu liniowo-kwadratowego do uzyskanych danych zostały wyznaczone równania opisujące odpowiedź komórkową na promieniowanie α . Wartości współczynnika α wynoszą odpowiednio: $(1,836 \pm 0,048) \text{ Gy}^{-1}$ dla komórek PC3 oraz $(1,739 \pm 0,047) \text{ Gy}^{-1}$ dla komórek DU145. Silną odpowiedź komórkową na napromienianie cząstkami α potwierdzają wartości frakcji przeżywalności przy dawce 2 Gy ($SF2$), które wynoszą $(0,039 \pm 0,015)$ dla komórek PC3 oraz $(0,072 \pm 0,013)$ dla komórek DU145. Przeprowadzony test t-Studenta wykazał, że różnica ta jest istotna statystycznie ($p \leq 0,05$), co potwierdza większą wrażliwość komórek PC3 na uszkodzenia indukowane przez promieniowanie o wysokim LET.

W oparciu o dopasowanie modelu liniowo-kwadratowego do uzyskanych danych zostały również wyznaczone równania opisujące zależność przeżywalności komórek poddanych ekspozycji na promieniowanie X. W przypadku komórek PC3 wartości współczynników α oraz β wynoszą odpowiednio: $(0,409 \pm 0,032) \text{ Gy}^{-1}$ i $(0,032 \pm 0,012) \text{ Gy}^{-2}$, natomiast dla komórek DU145 odpowiednio: $(0,387 \pm 0,060) \text{ Gy}^{-1}$ i $(0,010 \pm 0,020) \text{ Gy}^{-2}$. Efektywność promieniowania X wyrażają także wartości frakcji przeżywalności przy dawce frakcyjnej 2 Gy ($SF2$), które wyniosły $(0,45 \pm 0,15)$ dla komórek PC3 i $(0,47 \pm 0,18)$ dla komórek DU145 oraz przy największej zastosowanej w eksperymencie dawce 8 Gy ($SF8$), które wyniosły $(0,0044 \pm 0,0012)$ dla komórek PC3 oraz $(0,0086 \pm 0,0020)$ dla komórek DU145. W przypadku promieniowania X, dla komórek nowotworowych gruczołu krokowego została zaobserwowana istotnie statystycznie różnica w przeżywalności między komórkami DU145 a PC3 po ekspozycji na dawkę 8 Gy ($p \leq 0,05$), co również potwierdza większą promieniowrażliwość komórek PC3 w porównaniu z komórkami DU145.

Na podstawie porównania wartości parametru α w modelu LQ została wykazana statystycznie istotna różnica pomiędzy promieniowaniem X a promieniowaniem α dla obu analizowanych linii nowotworowych gruczołu krokowego ($p \leq 0,05$), co potwierdza wyższą skuteczność biologiczną promieniowania o wysokim LET w indukowaniu uszkodzeń komórkowych.

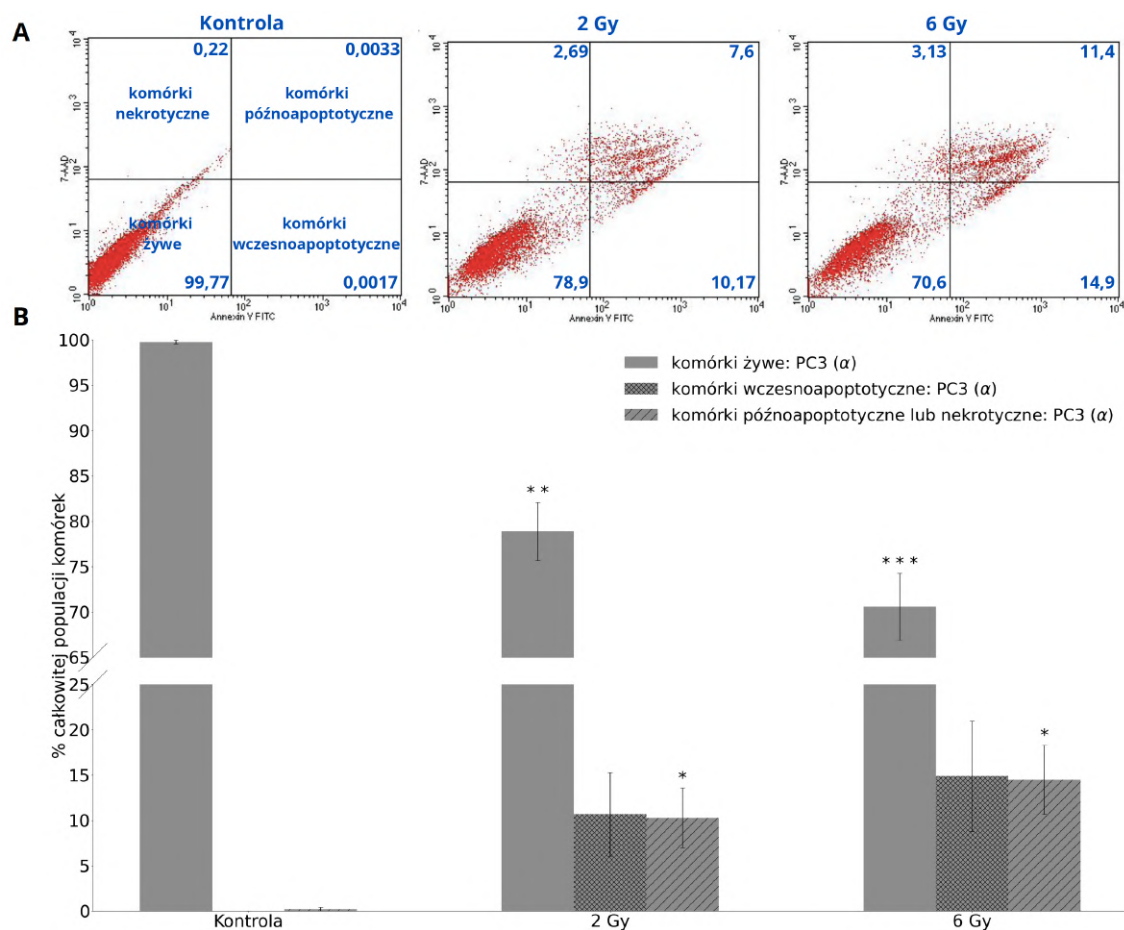
4.2.2 Wpływ promieniowania na indukcję apoptozy

W celu zbadania wpływu promieniowania jonizującego na indukcję programowanej śmierci komórkowej została przeprowadzona analiza cytometrii przepływowej z wykorzystaniem barwienia fluorescencyjnego aneksyną V-FITC i jodkiem propidyny. Został zbadany wpływ promieniowania cząstek α oraz promieniowania X na komórki żywe, a także na komórki wczesnoapoptotyczne, późnoapoptotyczne i nekrotyczne. Efekt działania promieniowania jonizującego został sprawdzony 96 godzin po napromienieniu komórek nowotworowych gruczołu krokowego. Wyniki, uśrednione z trzech niezależnych eksperymentów (każdy wykonany w dwóch po-

wtórzeniach), dla cząstek α zostały przedstawione na Rysunku 4.7 dla komórek PC3 i na Rysunku 4.8 dla komórek DU145. Otrzymane wyniki dla ekspozycji na promieniowanie X zostały pokazane na Rysunku 4.9 dla komórek PC3 i na Rysunku 4.10 dla komórek DU145. Diagramy przedstawione w panelu A na wszystkich Rysunkach stanowią reprezentatywny przykład i pochodzą od jednego replikanta z pojedynczego eksperymentu.

Promieniowanie α

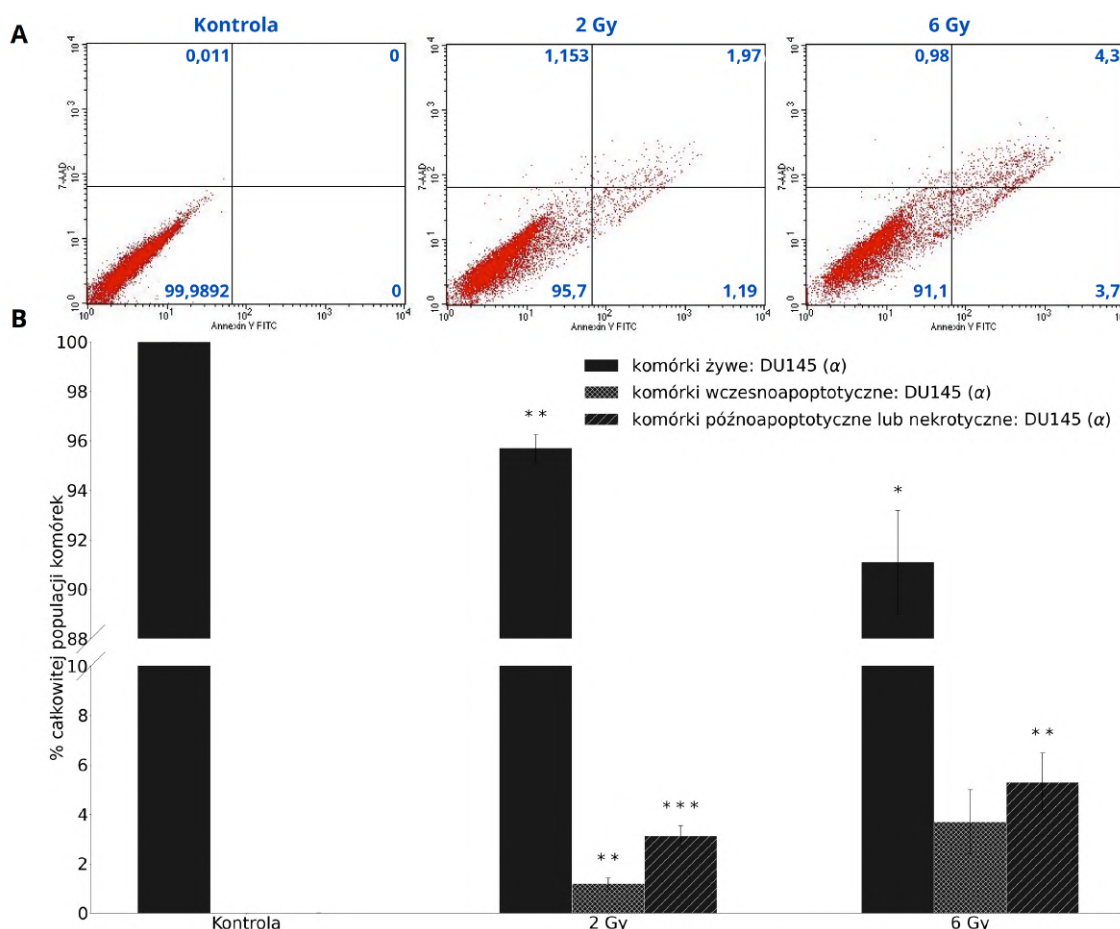
W przypadku cząstek α wpływ promieniowania jonizującego na indukcję apoptozy jest szczególnie widoczny dla komórek PC3, u których został zaobserwowany istotny spadek procentowy komórek żywych w porównaniu z grupą kontrolną (Rysunek 4.7).



Rysunek 4.7. Efekt działania promieniowania α na komórki żywe, wczesnoapoptotyczne oraz późnoapoptotyczne lub nekrotyczne dla komórek PC3 oceniany metodą cytometrii przepływowej 96 godzin po napromienianiu: diagramy cytometrii przepływowej FITC-Annexin V/7-AAD dla wybranego jednego replikanta z pojedynczego eksperymentu dla komórek PC3 (panel A). Uśrednione wyniki ze słupkiem błędów SEM (panel B). Istotność statystyczną oznaczono jako *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, obliczona w porównaniu do komórek kontrolnych.

Statystycznie znacząca różnica została zaobserwowana dla dawki 2 Gy ($p \leq 0,01$) i 6 Gy ($p \leq 0,001$). Jednocześnie procentowy udział komórek apoptotycznych i nekrotycznych wzrastał wraz ze wzrostem dawki dostarczonej do komórek PC3. Istotność statystyczna dla komórek późnoapoptotycznych lub nekrotycznych pomiędzy próbką kontrolną a napromienioną została wykazana na poziomie ($p \leq 0,05$) dla obydwu wartości dawek. Z kolei w przypadku komórek znajdujących się we wczesnej fazie apoptozy nie została zaobserwowana istotnie statystycznie różnica zarówno dla dawki 2 Gy, jak i dla 6 Gy.

Podobny trend został zaobserwowany na Rysunku 4.8 dla komórek DU145.



Rysunek 4.8. Efekt działania promieniowania α na komórki żywe, wczesnoapoptotyczne oraz późnoapoptotyczne lub nekrotyczne dla komórek DU145 oceniany metodą cytometrii przepływowej 96 godzin po napromienianiu: diagramy cytometrii przepływowej FITC-Annexin V/7-AAD dla wybranego jednego replikanta z pojedynczego eksperymentu dla komórek DU145 (panel A). Uśrednione wyniki ze słupkiem błędów SEM (panel B). Istotność statystyczną oznaczono jako *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, obliczona w porównaniu do komórek kontrolnych.

Istotność statystyczna dla komórek żywych w porównaniu z komórkami kontrolnymi została zaobserwowana zarówno dla dawki 2 Gy ($p \leq 0,01$), jak i dla 6 Gy ($p \leq 0,05$). Dla komórek DU145 zostały zaobserwowane również istotnie statystycz-

nie różnice pomiędzy komórkami kontrolnymi a eksponowanymi na dawkę 2 Gy zarówno dla wczesnej apoptozy ($p \leq 0,01$), jak i późnej apoptozy lub nekrozy ($p \leq 0,001$). Dla dawki 6 Gy statystycznie istotna różnica została odnotowana w przypadku komórek późnoapoptotycznych lub nekrotycznych ($p \leq 0,01$).

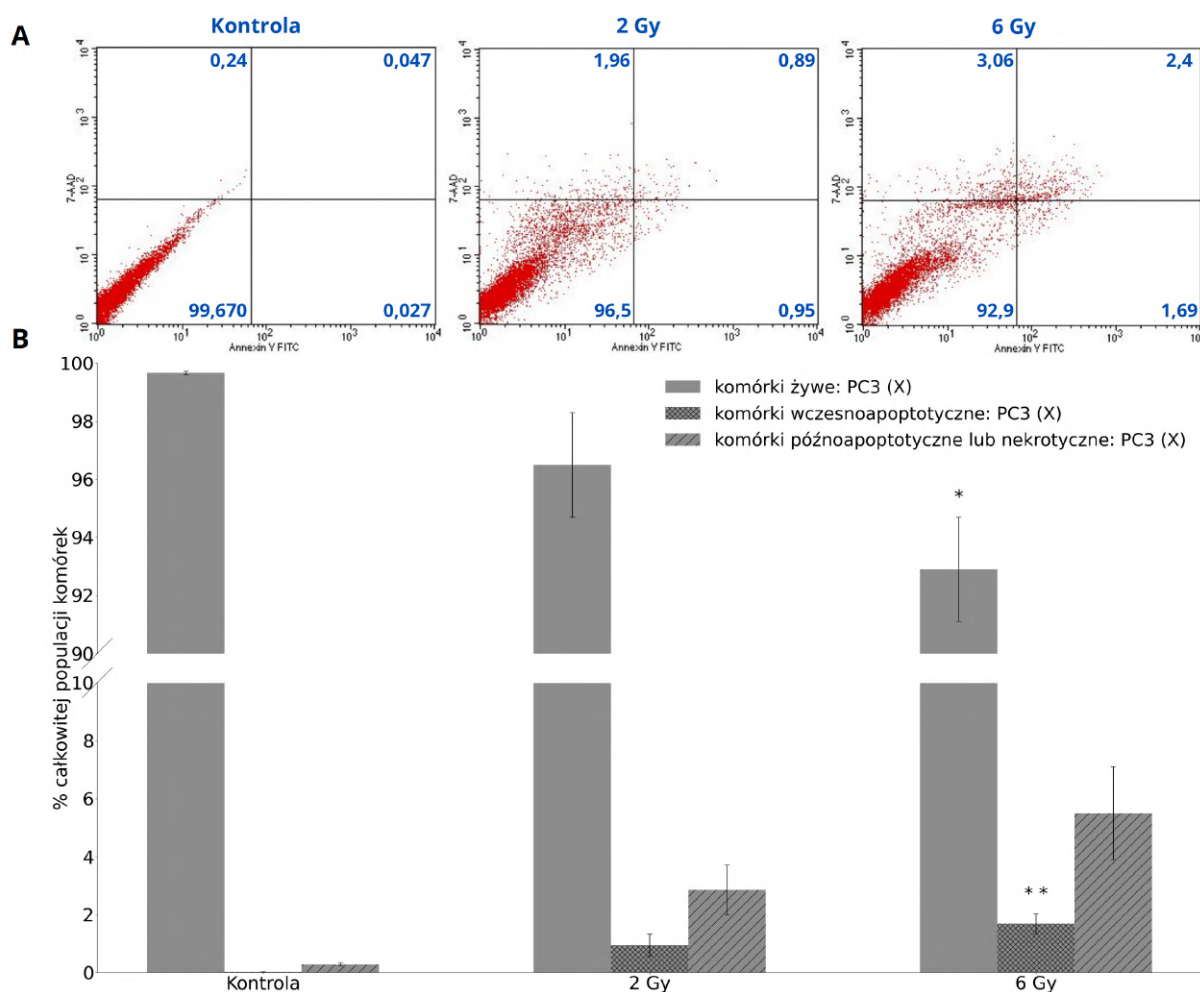
Różnica w procentowym udziale komórek żywych w populacji była większa dla linii PC3 ($78,9 \pm 3,2\%$ i $70,6 \pm 3,7\%$) niż dla komórek DU145 ($95,7 \pm 0,56\%$ i $91,1 \pm 2,1\%$) po zastosowaniu dawek 2 Gy i 6 Gy, odpowiednio. Procent komórek wczesnoapoptotycznych był wyższy w przypadku komórek PC3 ($10,17 \pm 4,6\%$) po 2 Gy oraz ($14,9 \pm 6,1\%$) po 6 Gy w porównaniu do komórek DU145 ($1,19 \pm 0,24\%$ i $3,7 \pm 1,3\%$), odpowiednio dla dawek 2 Gy i 6 Gy. Podobną zależność zaobserwowano dla komórek znajdujących się w późnej fazie apoptozy lub nekrozy: po ekspozycji na dawkę 2 Gy wartości te wynosiły ($10,3 \pm 3,3\%$) dla komórek PC3 oraz ($3,12 \pm 0,42\%$) dla komórek DU145, natomiast po ekspozycji na dawkę 6 Gy odpowiednio ($14,5 \pm 3,8\%$) oraz ($5,3 \pm 1,2\%$). Istotność statystyczna dla komórek żywych w przypadku porównania komórek PC3 z komórkami DU145 została zaobserwowana zarówno dla dawki 2 Gy ($p \leq 0,01$), jak i dla 6 Gy ($p \leq 0,01$).

Promieniowanie X

W przypadku promieniowania X dla komórek PC3 również został zaobserwowany na Rysunku 4.9 istotny spadek procentowy komórek żywych w porównaniu z grupą kontrolną. Statystycznie istotna różnica została odnotowana jedynie przy dawce 6 Gy ($p \leq 0,05$). Jednocześnie procentowy udział komórek apoptotycznych i nekrotycznych PC3 wzrastał wraz ze wzrostem dawki promieniowania. Istotność statystyczna pomiędzy próbką kontrolną a po dostarczeniu do komórek dawki 6 Gy została wykazana wyłącznie w odniesieniu do wczesnej apoptozy ($p \leq 0,01$). Komórki znajdujące się w późnej fazie apoptozy lub w nekrozie wykazywały podobną tendencję wzrostową, jednak nie został osiągnięty poziom istotności statystycznej.

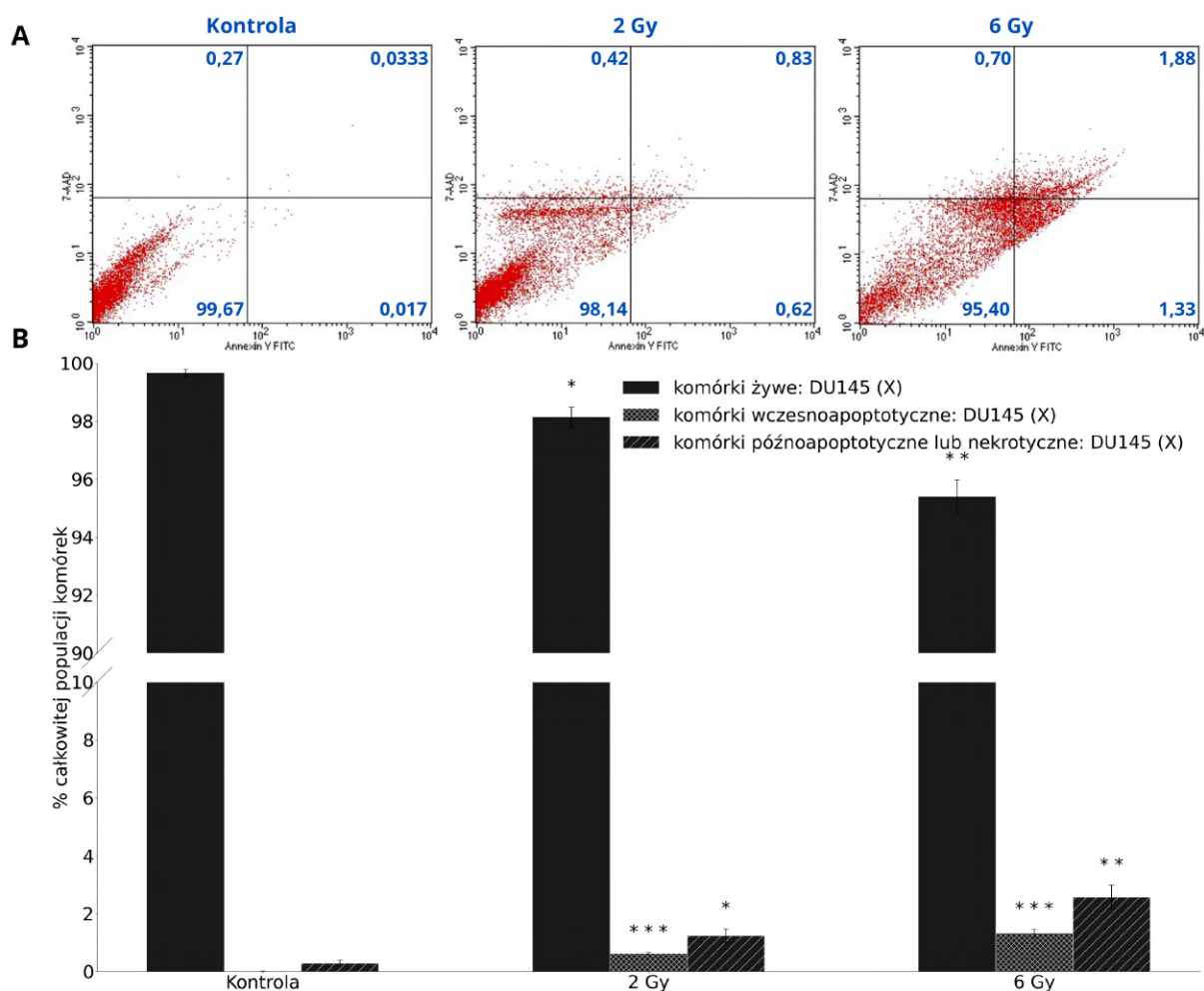
Podobny trend został zaobserwowany na Rysunku 4.10 w przypadku komórek DU145. Istotność statystyczna dla komórek żywych została odnotowana przy dawkach 2 Gy ($p \leq 0,05$) oraz 6 Gy ($p \leq 0,01$) w porównaniu do komórek kontrolnych. Istotność statystyczna pomiędzy próbkami kontrolnymi a poddanymi ekspozycji na dawkę 6 Gy została wykazana zarówno dla wczesnej apoptozy ($p \leq 0,001$), jak i późnej apoptozy lub nekrozy ($p \leq 0,01$). Dla komórek DU145 zostały zaobserwowane również istotnie statystycznie różnice pomiędzy komórkami kontrolnymi a eksponowanymi na dawkę 2 Gy – odpowiednio ($p \leq 0,001$) dla wczesnej apoptozy oraz ($p \leq 0,05$) dla późnej apoptozy.

Różnica w liczbie komórek żywych była większa dla linii PC3 ($96,5 \pm 1,8\%$ i $92,9 \pm 1,8\%$) niż dla komórek DU145 ($98,14 \pm 0,62\%$ i $95,40 \pm 1,33\%$) po zastosowaniu dawek 2 Gy i 6 Gy, odpowiednio. Liczba komórek we wczesnej fazie apoptozy była wyższa w przypadku komórek PC3 ($0,95 \pm 0,38\%$) po 2 Gy



Rysunek 4.9. Efekt działania promieniowania X na komórki żywe, wczesnoapoptotyczne oraz późnoapoptotyczne lub nekrotyczne dla komórek PC3 oceniany metodą cytometrii przepływowej 96 godzin po napromienianiu: diagramy cytometrii przepływowej FITC-Annexin V/7-AAD dla wybranego jednego replikanta z pojedynczego eksperymentu dla komórek PC3 (panel A). Uśrednione wyniki ze słupkiem błędów SEM (panel B). Istotność statystyczną oznaczono jako ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, obliczona w porównaniu do komórek kontrolnych.

oraz $(1,69 \pm 0,34)\%$ po 6 Gy w porównaniu do komórek DU145 $(0,62 \pm 0,05)\%$ i $(1,33 \pm 0,14)\%$, odpowiednio dla dawek 2 Gy i 6 Gy. Podobną zależność zaobserwowano dla komórek znajdujących się w późnej fazie apoptozy lub nekrozy: po ekspozycji na dawkę 2 Gy wartości te wynosiły $(2,85 \pm 0,86)\%$ dla komórek PC3 oraz $(1,25 \pm 0,24)\%$ dla komórek DU145, natomiast po ekspozycji na dawkę 6 Gy – odpowiednio $(5,5 \pm 1,6)\%$ oraz $(2,58 \pm 0,41)\%$. W przypadku promieniowania X nie zostały zaobserwowane istotnie statystycznie różnice pomiędzy procentowym udziałem komórek żywych, wczesnoapoptotycznych oraz późnoapoptotycznych lub nekrotycznych pomiędzy badanymi liniami nowotworowymi gruczołu krokowego ($p > 0,05$).



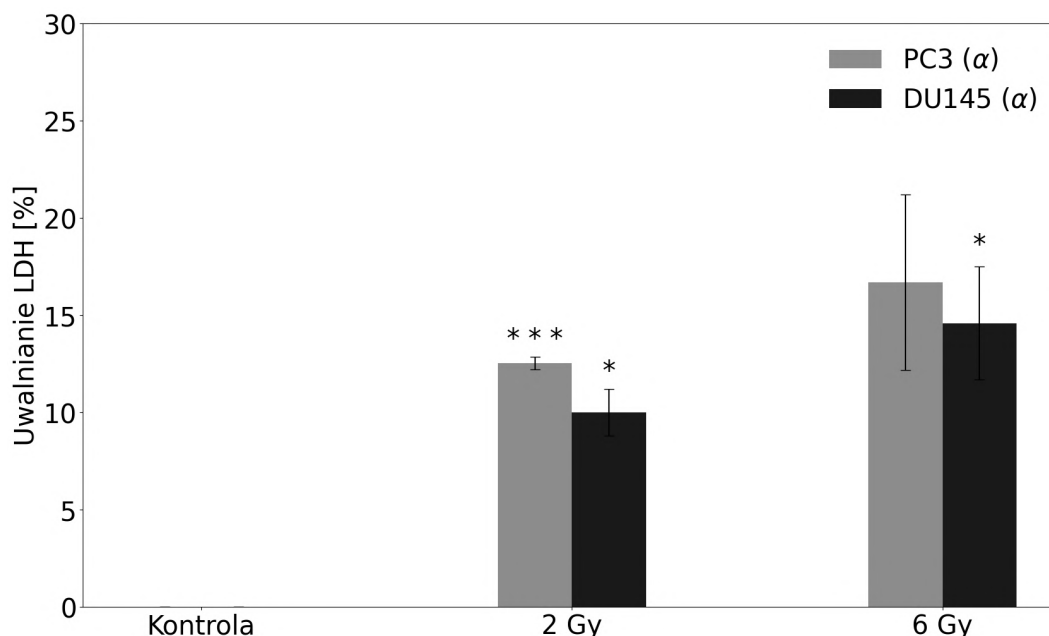
Rysunek 4.10. Efekt działania promieniowania X na komórki żywe, wczesnoapoptotyczne oraz późnoapoptotyczne lub nekrotyczne dla komórek DU145 oceniany metodą cytometrii przepływowej 96 godzin po napromienianiu: diagramy cytometrii przepływowej FITC-Annexin V/7-AAD dla wybranego jednego replikanta z pojedynczego eksperymentu dla komórek DU145 (panel A). Uśrednione wyniki ze słupkiem błędów SEM (panel B). Istotność statystyczną oznaczono jako *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, obliczona w porównaniu do komórek kontrolnych.

4.2.3 Ocena cytotoksyczności za pomocą testu LDH i IL-6

Dodatkowo różnice w promieniowrażliwości komórek PC3 i DU145 zostały zaobserwowane przy użyciu testów LDH i IL-6. Eksperymenty zostały przeprowadzone tylko z użyciem promieniowania α ze względu na większe różnice zarówno frakcji przeżywających komórek, jak i w procentowym udziale komórek apoptotycznych i nekrotycznych obserwowanych po ekspozycji na ten rodzaj promieniowania, w porównaniu do promieniowania X.

Uwolnienie LDH, enzymu obecnego w cytoplazmie komórek, do pożywki hodowlanej stanowi wskaźnik integralności błony komórkowej i zostało wykorzystane w niniejszych badaniach jako marker śmierci komórkowej oraz radiooporności dla

komórek PC3 i DU145. Wyniki testu LDH przeprowadzonego dla komórek PC3 i DU145, które zostały poddane ekspozycji na promieniowanie α , zostały przedstawione na Rysunku 4.11.



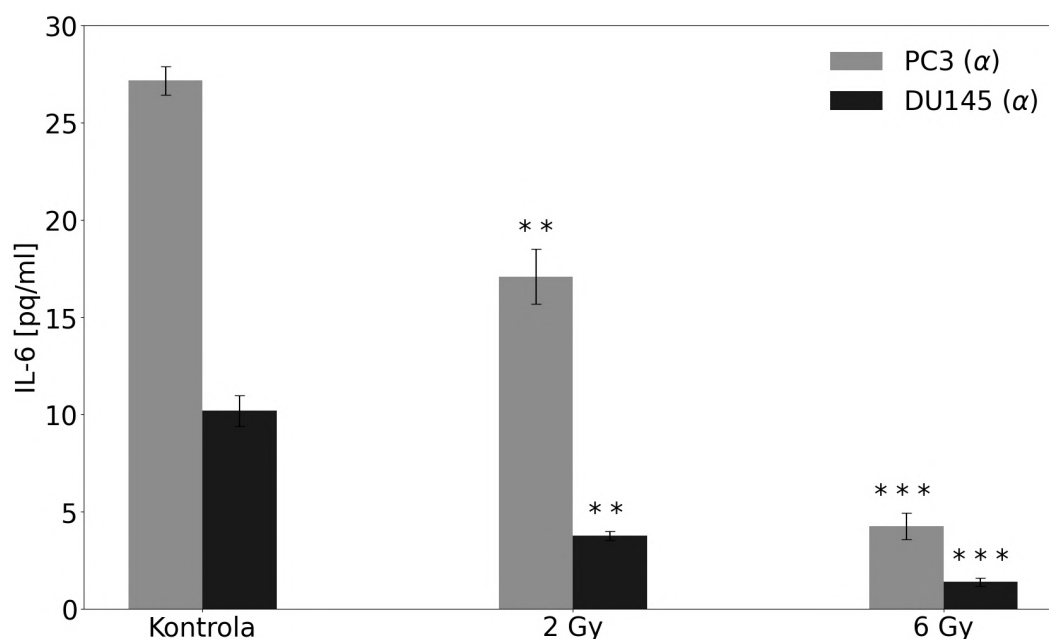
Rysunek 4.11. Określenie śmierci komórek zmierzonej 96 godzin po napromienianiu za pomocą testu LDH dla komórek PC3 (oznaczone na szaro) i DU145 (oznaczone na czarno) w zależności od dawki dostarczonej przez cząstki α . Słupki błędów przedstawiają SEM. Istotność statystyczną oznaczono jako *** $p \leq 0,001$ oraz * $p \leq 0,05$ w porównaniu do komórek kontrolnych.

Wyniki wykazały, że uszkodzenie błony komórkowej wzrastało wraz ze wzrostem dawki promieniowania jonizującego dostarczanego do komórek. Statystycznie istotny wzrost aktywności LDH w komórkach DU145 został zaobserwowany dla obu dawek promieniowania ($p \leq 0,05$), natomiast w przypadku komórek PC3 istotność statystyczną odnotowano jedynie po ekspozycji na dawkę 2 Gy ($p \leq 0,001$). Zaobserwowany brak istotności statystycznej w przypadku komórek PC3 po ekspozycji na dawkę 6 Gy może być związany z relatywnie wysoką wartością błędu standardowego średniej.

Poziom uwolnionego LDH był wyższy w komórkach PC3 ($12,53 \pm 0,32\%$) i ($16,7 \pm 4,5\%$) w porównaniu do komórek DU145 ($10,0 \pm 1,2\%$) i ($14,6 \pm 2,9\%$) odpowiednio po dawkach 2 Gy i 6 Gy, co świadczy o większej promieniowrażliwości komórek PC3. Jednak nie zostały zaobserwowane istotnie statystycznie różnice pomiędzy procentowym poziomem uwolnionego LDH pomiędzy badanymi liniami nowotworowymi gruczołu krokowego ($p > 0,05$).

Stężenie IL-6 w supernatancie komórkowym zostało zmierzone dla komórek PC3 i DU145 po ekspozycji na promieniowanie α . Uzyskane wyniki zostały przed-

stawione na Rysunku 4.12. Stężenie interleukiny 6 (IL-6), uznawanej za marker stanu zapalnego, wykazywało tendencję spadkową wraz ze wzrostem dawki promieniowania α dla obu badanych linii komórkowych – PC3 i DU145. Zaobserwowane różnice pomiędzy komórkami napromienionymi a kontrolnymi były statystycznie istotne ($p \leq 0,01$ dla 2 Gy oraz $p \leq 0,001$ dla 6 Gy). Stężenie IL-6 było istotnie wyższe dla komórek PC3 w porównaniu do komórek DU145, osiągając około 3-krotnie wyższy poziom dla dawek 0 Gy ($p \leq 0,001$) i 6 Gy ($p \leq 0,05$) oraz około 4,5-krotnie wyższy po ekspozycji na dawkę 2 Gy ($p \leq 0,001$).



Rysunek 4.12. Stężenie IL-6 zmierzone 96 godzin po napromienieniu dla komórek PC3 (oznaczone na szaro) i DU145 (oznaczone na czarno) w zależności od dawki dostarczonej do komórek przez promieniowanie α . Słupki błędów przedstawiają SEM. Istotność statystyczną oznaczono jako *** $p \leq 0,001$ oraz ** $p \leq 0,01$ w porównaniu do komórek kontrolnych.

4.2.4 Dyskusja i wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że promieniowanie α charakteryzuje się wyższą skutecznością w uśmiercaniu komórek nowotworowych w porównaniu z promieniowaniem X. Obserwowana redukcja liczby kolonii wraz ze wzrostem dawki, jak również różnice wynikające z rodzaju zastosowanego promieniowania, odzwierciedlają zróżnicowaną skuteczność biologiczną promieniowania o wysokim (promieniowania α) i niskim (promieniowanie X) LET (Cheng et al., 2018).

W analizie przeżywalności komórek, opartej na modelu LQ, parametry opisujące odpowiedź komórkową na promieniowanie α wyniosły odpowiednio:

$(1,836 \pm 0,048)$ Gy⁻¹ dla komórek PC3 oraz $(1,739 \pm 0,047)$ Gy⁻¹ dla komórek DU145. Dla porównania, w pracy (Nilsson et al., 2015) współczynniki α dla cząstek α wynosiły odpowiednio $1,820$ Gy⁻¹ dla komórek PC3 oraz $1,864$ Gy⁻¹ dla komórek DU145, natomiast wartość $SF2$, niezależnie od linii komórkowej, została określona na poziomie $(0,020 \pm 0,010)$. Z kolei w badaniu, Elgqvist et al. (2016), uzyskano wartości $SF2$ równe $(0,015 \pm 0,005)$ dla komórek PC3 oraz $(0,018 \pm 0,006)$ dla komórek DU145. Otrzymane w niniejszym badaniu wartości współczynnika α są zgodne z danymi literaturowymi, co potwierdza wiarygodność zastosowanego modelu oraz przyjętej metodyki eksperymentalnej. Pomimo pewnych różnic w wartościach $SF2$ względem wcześniej opublikowanych danych, obserwowany trend biologiczny – większa radiooporność komórek DU145 w porównaniu z komórkami PC3 – pozostaje spójny z wynikami przedstawionymi w literaturze.

W przypadku promieniowania X uzyskane wartości parametrów modelu LQ wyniosły dla komórek PC3: $(0,409 \pm 0,032)$ Gy⁻¹ (współczynnik α) i $(0,032 \pm 0,012)$ Gy⁻² (współczynnik β), natomiast dla komórek DU145 odpowiednio: $(0,387 \pm 0,060)$ Gy⁻¹ i $(0,010 \pm 0,020)$ Gy⁻². Otrzymane wartości także potwierdzają zgodność z danymi literaturowymi. W pracy (Suetens et al., 2015) wartości współczynników dla komórek PC3 wynosiły: $(0,59 \pm 0,12)$ Gy⁻¹ dla parametru α oraz $(0,01 \pm 0,05)$ Gy⁻² dla parametru β . Natomiast w badaniu (Saga et al., 2019) parametry te dla komórek PC3 wyniosły: $(0,551 \pm 0,012)$ Gy⁻¹ dla α i $(0,021 \pm 0,001)$ Gy⁻² dla β , a dla komórek DU145: $(0,658 \pm 0,005)$ Gy⁻¹ dla α i $(0,002 \pm 0,001)$ Gy⁻² dla β . Wyniki uzyskane w niniejszym badaniu mieszczą się w granicach błędów raportowanych w literaturze. Różnice liczbowe mogą wynikać z odmiennych warunków eksperymentalnych, takich jak specyfikacja źródła promieniowania czy sama metodologia analizy przeżywalności, w tym sposób zliczania kolonii.

Porównując obie linie komórkowe, komórki PC3 okazały się bardziej promieniowrażliwe, co znajduje odzwierciedlenie zarówno w wynikach niniejszego badania, jak i w dostępnych danych literaturowych. W badaniu (Oorschot et al., 2013) autorzy zastosowali promieniowanie X o energii 250 keV generowane przez aparat Siemens Stabilipan i wykazali, że wartość frakcji przeżywających komórek dla dawki 2 Gy $SF2$ była wyższa dla komórek DU145 niż dla komórek PC3, co wskazuje, na większą promieniowrażliwość komórek PC3. W pracy (Jayakumar et al., 2014) wykorzystano promieniowanie gamma pochodzące z izotopu ⁶⁰Co. Autorzy tej pracy również wykazali większą promieniowrażliwość komórek PC3 w porównaniu do komórek DU145 na podstawie testu przeżywalności oraz testu apoptozy. Parametry dopasowanych krzywych przeżywalności oraz wartość ($SF2$) wyznaczone w niniejszej pracy i przeanalizowane z wykorzystaniem kryterium 3σ mogą być bezpośrednio porównywane z wynikami uzyskanymi przez Oorschot et al. (2013), co dodatkowo potwierdza spójność i rzetelność uzyskanych wyników.

Barwienie aneksyną V-FITC i jodkiem propidyny komórek nowotworowych gruczołu krokowego wykazało zależny od dostarczonej dawki promieniowania spadek procentowego udziału komórek żywych, przy jednoczesnym wzroście procentowego udziału komórek wczesnoapoptotycznych oraz komórek późnoapoptotycznych lub nekrotycznych zarówno w przypadku linii PC3, jak i DU145. W pracy Zhao et al. (2019) przeanalizowano odpowiedź apoptotyczną komórek HeLa w funkcji dawki promieniowania X, oceniając efekt po 48 i 72 godzinach od napromienienia. Zastosowany przez autorów punkt czasowy 72 godziny odpowiada harmonogramowi eksperymentalnemu niniejszego badania, a uzyskane wyniki również wykazały wzrost procentowego udziału komórek apoptotycznych w sposób zależny od dawki. Analiza eksperymentalna wykazała, że komórki PC3 charakteryzują się wyższą promieniowrażliwością w porównaniu do komórek DU145, co potwierdza większy procentowy udział komórek PC3 znajdujących się w późnej fazie apoptozy lub nekrozy. Różnica ta była szczególnie wyraźna po napromienieniu cząstkami α , gdzie procentowy udział komórek martwych dla linii PC3 był około trzykrotnie wyższy niż dla linii DU145. Dla promieniowania X również została zaobserwowana istotna różnica, przy czym udział komórek apoptotycznych lub nekrotycznych był dwukrotnie wyższy dla komórek PC3. Wyniki te potwierdzają zróżnicowaną odpowiedź radiobiologiczną analizowanych linii komórkowych.

Otrzymany efekt jest zgodny z przewidywaniami i aktualnym stanem wiedzy, według którego promieniowanie jonizujące indukuje apoptozę poprzez aktywację szlaków sygnalizacyjnych odpowiedzialnych za śmierć komórkową (Friesen et al., 2013). W badaniach (Friesen et al., 2013) wykazano, że radiobiokoniugat [^{213}Bi]-anty-CD33 selektywnie indukował apoptozę w komórkach ostrej białaczki szpikowej wykazujących ekspresję CD33, a analiza molekularna potwierdziła aktywację wewnętrznego, mitochondrialnego szlaku apoptozy prowadzącą do uruchomienia kaspazy-9. Mechanizm ten wpisuje się w szerszy kontekst badań nad opornością nowotworów na leczenie. Jednym z kluczowych czynników odpowiedzialnych za oporność komórek nowotworowych na radioterapię lub chemioterapię jest właśnie zaburzenie szlaków sygnalizacyjnych prowadzących do apoptozy, co zostało szczegółowo opisane przez Vucic et al. (2006).

W wyniku przeprowadzonych eksperymentów zostało stwierdzone, że uwalnianie enzymu LDH było zwiększone w komórkach napromienianych w porównaniu do komórek kontrolnych w obu badanych liniach nowotworowych gruczołu krokowego. Zaobserwowany procentowy wzrost aktywności LDH może być związany z obecnością procesów martwiczych w obrębie tkanki nowotworowej, co sugerują wyniki przedstawione przez (Forkasiewicz et al., 2020). W pracy (Forkasiewicz et al., 2020), stwierdzono, że zwiększona aktywność LDH u pacjentów onkologicznych może odzwierciedlać procesy martwicze uszkodzenia komórek w obrębie guza, prowadzące do uwalniania wewnątrzkomórkowego LDH do krwiobiegu. Różnice w ak-

tywności LDH pomiędzy komórkami PC3 i DU145 zostały wcześniej odnotowane w warunkach bez ekspozycji na promieniowanie (Cavallari et al., 2020). W pracy (Cavallari et al., 2020), zaobserwowano wyższe stężenie LDH w komórkach PC3 w porównaniu do komórek DU145, co jest zgodne z wynikami uzyskanymi w niniejszym badaniu. Należy również podkreślić, że komórki PC3 charakteryzują się wyższym poziomem metabolizmu glikolitycznego, co może wpływać na zwiększoną aktywność LDH w porównaniu do komórek DU145. W pracy (Liu et al., 2021) zostało stwierdzone, że wysoka ekspresja LDH w kontekście radioterapii uznawana jest za niekorzystny czynnik prognostyczny, przyczyniający się do rozwoju radiooporności poprzez mechanizmy metaboliczne i immunologiczne. Wzrost aktywności LDH indukowany promieniowaniem jonizującym o niskim LET był opisywany między innymi w komórkach Jurkat napromienionych izotopem ^{137}Cs (Ferranti et al., 2020) oraz w ekstraktach z grasicy myszy poddanych ekspozycji na promieniowanie X (Hori et al., 1968). Jednak wpływ promieniowania jonizującego – zarówno o niskim, jak i wysokim LET – na poziom LDH w komórkach nowotworowych gruczołu krokowego nie był dotąd analizowany. Zastosowanie testu LDH dla komórek PC3 i DU145 napromienionych cząstkami α emitowanymi z płaskiego źródła ^{241}Am pozwoliło na uzyskanie pierwszych wyników dotyczących poziomu uwolnienia LDH w zależności od dawki promieniowania dostarczonej do komórek nowotworowych gruczołu krokowego. Obserwowane zmiany w procentowym udziale uwalnianego enzymu stanowią pośredni wskaźnik uszkodzeń błon komórkowych, a jednocześnie występujące różnice w odpowiedzi pomiędzy komórkami PC3 i DU145 mogą wskazywać na zróżnicowaną promieniowrażliwość oraz potencjalne mechanizmy radiooporności specyficzne dla danego typu nowotworu.

Wcześniejsze badania wykazały, że ekspresja IL-6, oznaczana metodami Western Blot oraz ELISA, była zwiększona w komórkach nowotworowych gruczołu krokowego o wysokiej oporności (HR, z ang. *Highly Resistant*) po napromienieniu komórek promieniowaniem rentgenowskim (Wu et al., 2013). Co więcej, Matsuoka et al. (2016) wykazali, że zwiększone stężenie IL-6 ograniczało indukowaną promieniowaniem o niskim LET śmierć komórkową w nowotworach płaskonabłonkowych jamy ustnej, co podkreśla istotną rolę IL-6 w regulacji wrażliwości komórek nowotworowych na promieniowanie jonizujące. W kontekście uzyskanych wyników, obniżenie poziomu sekrecji IL-6 w odpowiedzi na promieniowanie α może być konsekwencją zmniejszonej liczby żywych komórek, które przeżyły ekspozycję na promieniowanie o wysokim LET.

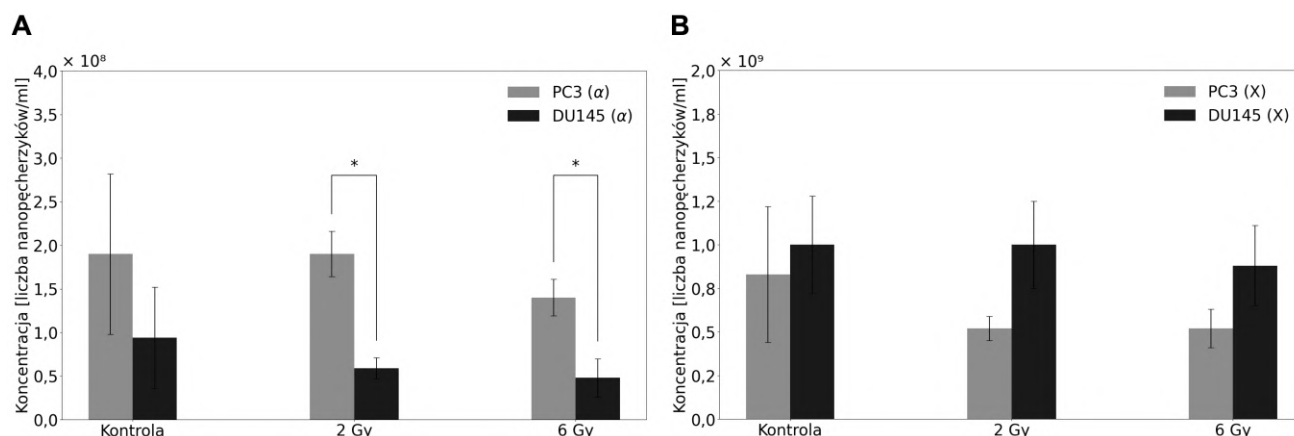
4.3 Charakterystyka egzosomów

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu stresu indukowanego promieniowaniem jonizującym na koncentrację oraz średnicę egzosomów wydzie-

lanych przez komórki nowotworowe gruczołu krokowego.

4.3.1 Analiza koncentracji egzosomów

Koncentracja egzosomów została obliczona jako liczba wykrytych nanopęcherzyków na 1 ml supernatantu komórkowego. Uzyskane wyniki zostały przedstawione na Rysunku 4.13A (dla cząstek α) i na Rysunku 4.13B (dla promieniowania X).



Rysunek 4.13. Koncentracja egzosomów wyizolowanych 96 godzin po napromienieniu z komórek PC3 (oznaczone na szaro) oraz DU145 (oznaczone na czarno) w zależności od dawki promieniowania α (panel A) i promieniowania X (panel B). Istotność statystyczną oznaczono jako * $p \leq 0,05$ w porównaniu między komórkami PC3 i DU145 dla danej dawki promieniowania.

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów został zaobserwowany stopniowy spadek koncentracji egzosomów wyizolowanych z komórek poddanych działaniu promieniowania α w porównaniu do egzosomów wyizolowanych z komórek kontrolnych. W przypadku promieniowania X nie została zaobserwowana korelacja pomiędzy koncentracją egzosomów a dawką promieniowania dostarczoną do komórek.

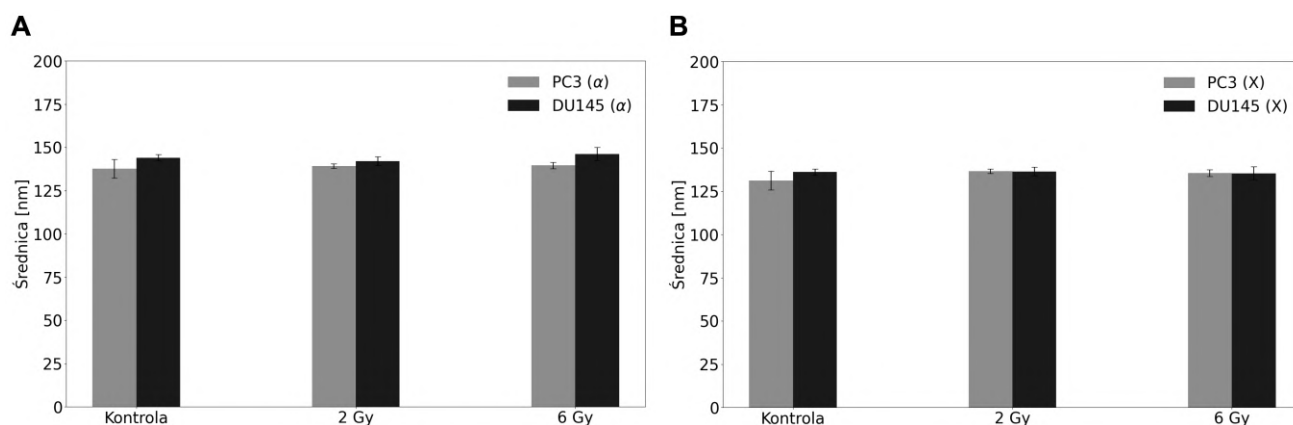
W przypadku cząstek α koncentracja egzosomów wyizolowanych z komórek PC3 była wyższa niż w przypadku egzosomów wyizolowanych z komórek DU145 – dwukrotnie dla próbek kontrolnych, a trzykrotnie dla próbek napromienionych. Odwrotny trend został zaobserwowany dla egzosomów wyizolowanych z komórek poddanych działaniu promieniowania X: koncentracja egzosomów wyizolowanych z komórek DU145 była dwukrotnie wyższa niż koncentracja egzosomów wyizolowanych z komórek PC3.

Zostały stwierdzone statystycznie istotne różnice w koncentracji egzosomów wyizolowanych z komórek PC3 w porównaniu do egzosomów wyizolowanych z komórek DU145 ($p \leq 0,05$) dla obu dawek promieniowania α . Dla egzosomów wyizolowanych z komórek napromienionych przy użyciu lampy RTG nie zostały zaob-

serwowane statystycznie istotne różnice w koncentracji egzosomów, zarówno pomiędzy poszczególnymi dawkami promieniowania, jak i pomiędzy obiema liniami komórkowymi gruczołu krokowego. W przypadku komórek kontrolnych, pochodzących z obu linii nowotworowych gruczołu krokowego, nie zostały również wykazane statystycznie istotne różnice w liczbie produkowanych egzosomów między porównywanymi grupami niezależnie od zastosowanego rodzaju promieniowania jonizującego.

4.3.2 Analiza średnicy egzosomów

Rozmiary (średnica hydrodynamiczna) egzosomów wyizolowanych z komórek nowotworowych gruczołu krokowego (PC3 i DU145), które zostały poddane ekspozycji na promieniowanie jonizujące, zostały zmierzone z wykorzystaniem aparatu ZetaView i przedstawione na Rysunku 4.14A (dla promieniowania α) i na Rysunku 4.14B (dla promieniowania X).



Rysunek 4.14. Charakterystyka rozmiaru egzosomów wyizolowanych z komórek PC3 (oznaczone na szaro) oraz DU145 (oznaczone na czarno) w zależności od dawki promieniowania α (panel A) i promieniowania X (panel B). Średnie wartości $\pm$ SEM zostały obliczone dla średnicy hydrodynamicznej egzosomów na podstawie trzech niezależnych eksperymentów z dwoma powtórzeniami dla każdej dawki promieniowania.

Na podstawie otrzymanych wyników zostało stwierdzone, że egzosomy wyizolowane z nowotworowych komórek gruczołu krokowego (PC3 i DU145) mają średnicę od 137 nm do 146 nm (dla cząstek α) oraz 131 nm do 137 nm (dla promieniowania X), co odpowiada rozmiarowi egzosomów.

Niezależnie od zastosowanego rodzaju promieniowania jonizującego nie została zaobserwowana korelacja pomiędzy rozmiarem nanopęcherzyków a dawką promieniowania dostarczoną do komórek.

W przypadku egzosomów wyizolowanych z komórek kontrolnych wartości wynosiły: $(137,8 \pm 5,4)$ nm dla komórek PC3 oraz $(144,1 \pm 1,8)$ nm dla komórek

DU145. W przypadku egzosomów wyizolowanych z komórek poddanych ekspozycji na promieniowanie α wartości te wynosiły odpowiednio dla dawki 2 Gy i 6 Gy: $(139,2 \pm 1,3)$ nm i $(139,6 \pm 1,9)$ nm dla komórek PC3 oraz $(142,1 \pm 2,5)$ nm i $(146,2 \pm 3,8)$ nm dla komórek DU145.

Wartości średnic dla egzosomów wyizolowanych z komórek poddanych ekspozycji na promieniowanie X o wartościach dawki równych 2 Gy i 6 Gy wynosiły $(136,7 \pm 1,3)$ nm i $(135,6 \pm 1,9)$ nm dla komórek PC3 oraz $(136,5 \pm 2,5)$ nm i $(135,4 \pm 3,8)$ nm dla komórek DU145. W przypadku komórek kontrolnych wartości wynosiły: $(131,2 \pm 5,4)$ nm dla komórek PC3 i $(136,1 \pm 1,8)$ nm dla komórek DU145.

Zarówno w przypadku promieniowania α , jak i promieniowania X, nie zostały zaobserwowane statystycznie istotne różnice w średnicach hydrodynamicznych egzosomów – ani pomiędzy poszczególnymi dawkami promieniowania, ani pomiędzy obiema liniami komórkowymi gruczołu krokowego ($p > 0,05$).

4.3.3 Dyskusja i wnioski

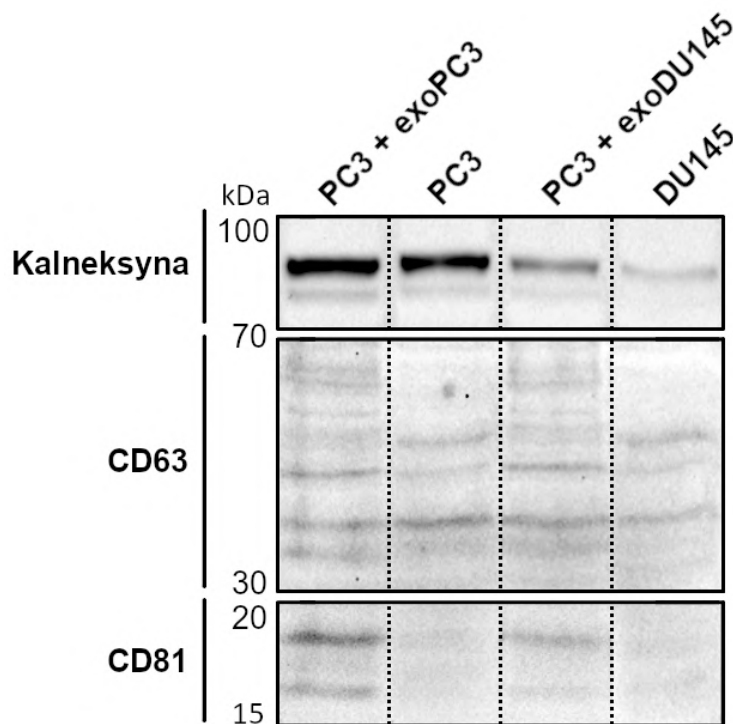
Podsumowując, w niniejszych badaniach został oceniony wpływ stresu wywołanego promieniowaniem jonizującym na koncentrację oraz średnicę hydrodynamiczną egzosomów wyizolowanych z komórek nowotworowych gruczołu krokowego poddanych ekspozycji na ten czynnik. Wpływ promieniowania jonizującego na uwalnianie egzosomów po raz pierwszy został zaobserwowany w pracy (Yu et al., 2006), w której linię komórkową niedrobnokomórkowego raka płuc H460 poddano działaniu promieniowania gamma.

Na podstawie uzyskanych wyników pomiarów metodą NTA stwierdzono, że ze względu na dużą wartość błędu standardowego średniej nie wykazano statystycznie istotnych różnic w koncentracji ani w średnicy hydrodynamicznej egzosomów wydzielanych przez komórki PC3 i DU145 w odpowiedzi na wzrastające dawki promieniowania rentgenowskiego. Dla cząstek α został natomiast zanotowany stopniowy spadek wydzielania egzosomów wraz ze wzrostem dawki promieniowania. Wynik ten jest zgodny z obserwacjami przedstawionymi w pracy (Elbakrawy et al., 2021), w której fibroblasty płucne (HF19) zostały napromienione izotopem ^{238}Pu jako źródło cząstek α . Autorzy tej pracy również wykazali istotny wzrost koncentracji egzosomów po zastosowaniu promieniowania X oraz brak istotnych różnic w ich rozmiarach pomiędzy grupami napromienionymi a kontrolnymi. Z kolei w badaniach dotyczących komórek glejaka U87 (Mrowczyński et al., 2018), przeprowadzonych z wykorzystaniem aparatu Zetasizer, wykazano brak zmian w rozmiarze egzosomów w odpowiedzi na promieniowanie, co pozostaje zgodne z wynikami uzyskanymi w niniejszym badaniu. Brak zależności pomiędzy rozmiarem egzosomów a dawką po napromienieniu komórek śródbłonna laserem niskiej mocy wykazano także w pracy (Bagheri et al., 2018).

4.4 Efekt sąsiedztwa indukowany przez egzosomy

4.4.1 Identyfikacja egzosomów

Egzosomy zostały scharakteryzowane pod kątem obecności typowych biomarkerów egzosomalnych, takich jak CD63 i CD81, które zostały potwierdzone za pomocą analizy Western Blot. Charakterystyka egzosomów została przeprowadzona zarówno dla komórek PC3 inkubowanych z egzosomami wyizolowanymi z komórek nowotworowych gruczołu krokowego PC3 (PC3 + exoPC3) i DU145 (PC3 + exoDU145), jak i dla lizatów komórkowych (Rysunek 4.15). Inkubacja komórek z wyizolowanymi egzosomami trwała 42 godziny. Dodatkowo została przeprowadzona detekcja kalneksyny – białka obecnego na błonach komórkowych.



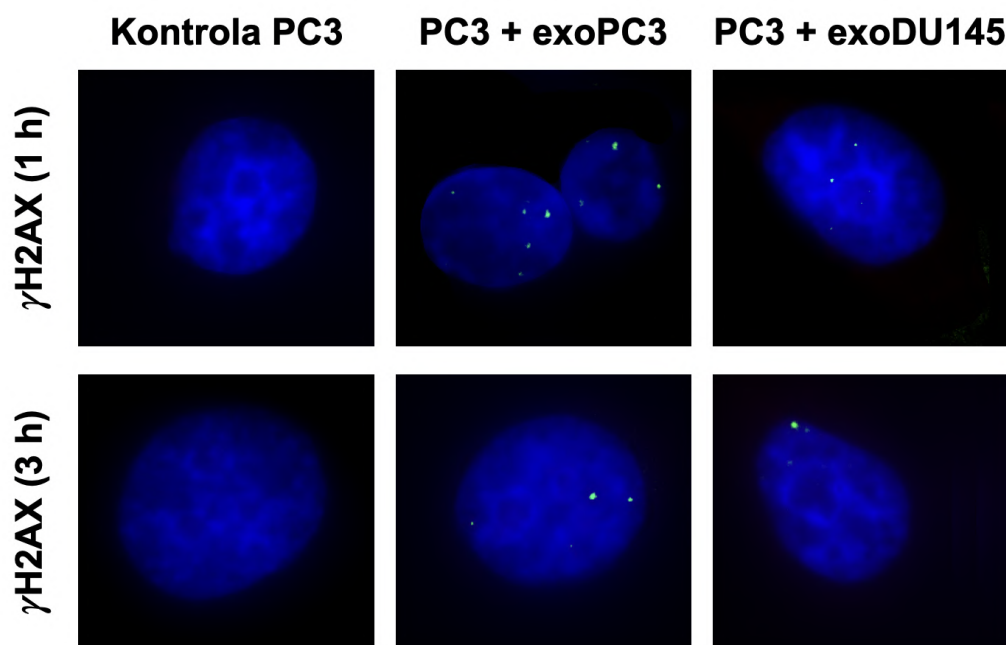
Rysunek 4.15. Reprezentatywny immunoblot markerów egzosomalnych: CD63, CD81; oraz kalneksyny w lizatach komórkowych z dodanymi egzosomami wyizolowanymi z komórek PC3 (PC3 + exoPC3) oraz DU145 (PC3 + exoDU145) zebranych po 42 godzinach współhodowli z komórkami PC3 oraz w lizatach komórkowych (PC3 i DU145).

Analiza densytometryczna intensywności sygnału dla CD63 i CD81 wykazała, że próbki PC3 + exoPC3 zawierały średnio 32% więcej CD63 oraz 73% więcej CD81 niż lizaty komórek PC3. Podobny trend został zaobserwowany dla PC3 + exoDU145, w których zostało stwierdzone 65% więcej CD63 i 61% więcej CD81 w porównaniu do lizatów komórek DU145. Podsumowując, lizaty komórkowe

wykazały niższe poziomy CD63 i CD81 w porównaniu do próbek inkubowanych z egzosomami.

4.4.2 Wnikanie egzosomów do komórek

Aby zbadać, czy hipotetyczny efekt RIBE może być aktywowany w komórkach biorcy (komórki kontrolne PC3) za pomocą egzosomów wyizolowanych z komórek napromienionych (exoPC3 i exoDU145), przeanalizowana została obecność ognisk γ H2AX w jądrach komórek biorcy. Rysunek 4.16 przedstawia obrazy mikroskopowe ognisk γ H2AX w jądrach komórek kontrolnych PC3 inkubowanych przez 1 godzinę i 3 godziny z egzosomami wyizolowanymi z napromienionych komórek dawcy PC3 (exoPC3) i DU145 (exoDU145).



Rysunek 4.16. Obrazy mikroskopowe jąder komórek kontrolnych PC3 pokazujące indukcję ognisk γ H2AX przez egzosomy wyizolowane z napromienionych komórek PC3 i DU145. Wizualizacja ognisk γ H2AX w komórkach kontrolnych PC3 inkubowanych przez 1 i 3 godziny z egzosomami wyizolowanymi z komórek PC3 i DU145 poddanych napromienieniu dawką 2 Gy promieniowania X (PC3 + exoPC3 i PC3 + exoDU145). Komórki PC3 (Kontrola PC3) stanowiły grupę kontrolną, nie zostały napromienione.

Na podstawie analizy zdjęć mikroskopowych zostało wykazane, że liczba ognisk γ H2AX w jądrach komórek współhodowanych z egzosomami była wyższa niż w jądrach komórek kontrolnych PC3. Średnia liczba ognisk naprawczych na jądro komórkowe w przypadku komórek kontrolnych PC3 wynosiła odpowiednio: $0,914 \pm 0,076$ po 1 godzinie oraz $0,890 \pm 0,081$ po 3 godzinach. W przypadku próbek współhodowanych z egzosomami (PC3 + exoPC3 i PC3 + exoDU145) wartości

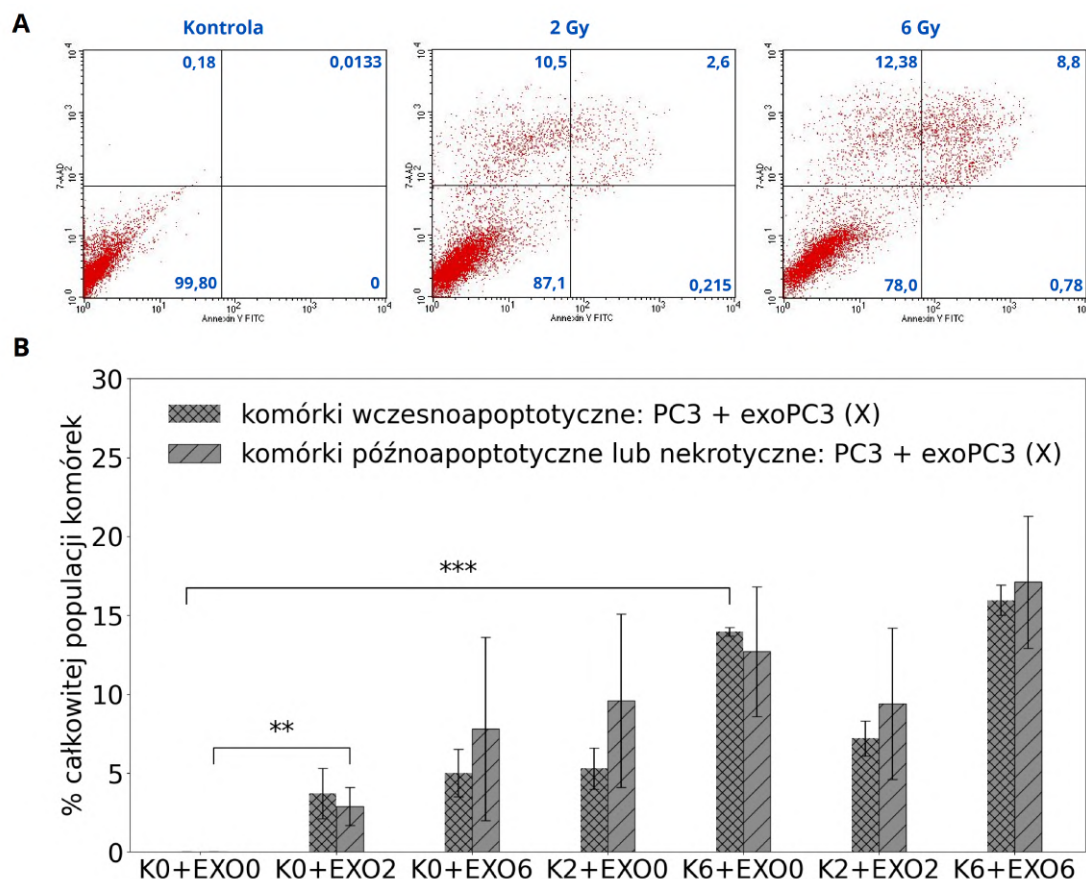
te po 1 godzinie inkubacji wynosiły odpowiednio $4,37 \pm 0,73$ i $3,87 \pm 0,89$, natomiast po 3 godzinach inkubacji: $3,22 \pm 0,70$ i $2,43 \pm 0,21$. Zostały stwierdzone statystycznie istotne różnice w średniej liczbie ognisk naprawczych na jądro komórkowe między komórkami kontrolnymi PC3 a komórkami PC3 współhodowanymi przez 1 godzinę i 3 godziny z egzosomami wyizolowanymi z napromienionych komórek PC3 (PC3 + exoPC3) oraz DU145 (PC3 + exoDU145) ($p \leq 0,05$). Nie zaobserwowano natomiast istotnych różnic pomiędzy próbkami PC3 + exoPC3 i PC3 + exoDU145.

Wykazana wyższa średnia liczba ognisk naprawczych na jądro komórkowe w komórkach współhodowanych z egzosomami sugeruje, że egzosomy wyizolowane z napromienionych komórek gruczołu krokowego mogą wnikać do komórek kontrolnych i indukować uszkodzenia DNA. Więcej ognisk γ H2AX zostało zaobserwowane w układzie PC3 + exoPC3 w porównaniu do układu PC3 + exoDU145, co dodatkowo wskazuje, że komórki DU145 są bardziej odporne na promieniowanie niż komórki PC3.

4.4.3 Analiza apoptozy w badanych modelach eksperymentalnych

Aby zbadać potencjalną aktywację RIBE w komórkach stymulowanych egzosomami została przeprowadzona analiza apoptozy. Procentowy udział całkowitej populacji komórek żywych, wczesnoapoptotycznych oraz późnoapoptotycznych lub nekrotycznych został poddany analizie apoptozy dla dwóch scenariuszy inkubacji komórek nowotworowych gruczołu krokowego PC3: komórki PC3 współhodowane z egzosomami wyizolowanymi z komórek PC3 (PC3 + exoPC3, Rysunek 4.17) oraz komórki PC3 inkubowane z egzosomami wyizolowanymi z komórek DU145 (PC3 + exoDU145, Rysunek 4.18).

W przypadku napromienionych komórek PC3 stymulowanych egzosomami wyizolowanymi z komórek kontrolnych PC3 (K2+EXO0 i K6+EXO0) został zaobserwowany na Rysunku 4.17 wzrost procentowego udziału komórek wczesnoapoptotycznych oraz późnoapoptotycznych lub nekrotycznych w populacji w porównaniu do komórek kontrolnych PC3 z dodanymi egzosomami wyizolowanymi z komórek kontrolnych PC3 (K0+EXO0). Dla komórek PC3 poddanych ekspozycji na dawkę 6 Gy i współhodowanych z egzosomami izolowanymi z komórek kontrolnych PC3 (K6+EXO0) został wykazany istotnie statystycznie zwiększony procentowy udział komórek wczesnoapoptotycznych ($p \leq 0,01$) w porównaniu z kontrolą (K0+EXO0).



Rysunek 4.17. Efekt działania promieniowania X na komórki żywe, wczesnoapoptotyczne oraz późnoapoptotyczne lub nekrotyczne dla komórek PC3 współhodowanych z egzosomami wyizolowanymi z napromienionych i kontrolnych komórek PC3 (exoPC3) oceniony metodą cytometrii przepływowej 96 godzin po napromienieniu. Diagramy cytometrii przepływowej FITC-Annexin V/7-AAD dla wybranego jednego replikanta z pojedynczego eksperymentu dla komórek PC3 hodowanych w medium z dodatkiem płodowej surowicy bydlęcej pozbawionej egzosomów dla 0 Gy (kontrola), 2 Gy i 6 Gy (panel A). Uśrednione dane wraz ze słupkiem błędów SEM. Istotność statystyczną oznaczono jako *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$ w porównaniu do odpowiednich kontroli (panel B).

W kolejnym etapie zostały porównane komórki kontrolne PC3 inkubowane z egzosomami izolowanymi z napromienionych komórek PC3 (K0+EXO2 i K0+EXO6) z próbkami kontrolnymi (K0+EXO0). Został zaobserwowany zwiększony procentowy udział komórek we wczesnej oraz późnej fazie apoptozy lub nekrozy w próbkach K0+EXO2 i K0+EXO6 w porównaniu do kontroli K0+EXO0. W próbkach K0+EXO2 został wykazany istotnie statystycznie wzrost procentowy komórek późnoapoptotycznych lub nekrotycznych ($p \leq 0,01$) w porównaniu do próbek K0+EXO0.

Ostatnią grupą porównawczą były napromienione komórki PC3 współhodowane z egzosomami izolowanymi z komórek kontrolnych PC3 (K2+EXO0 oraz

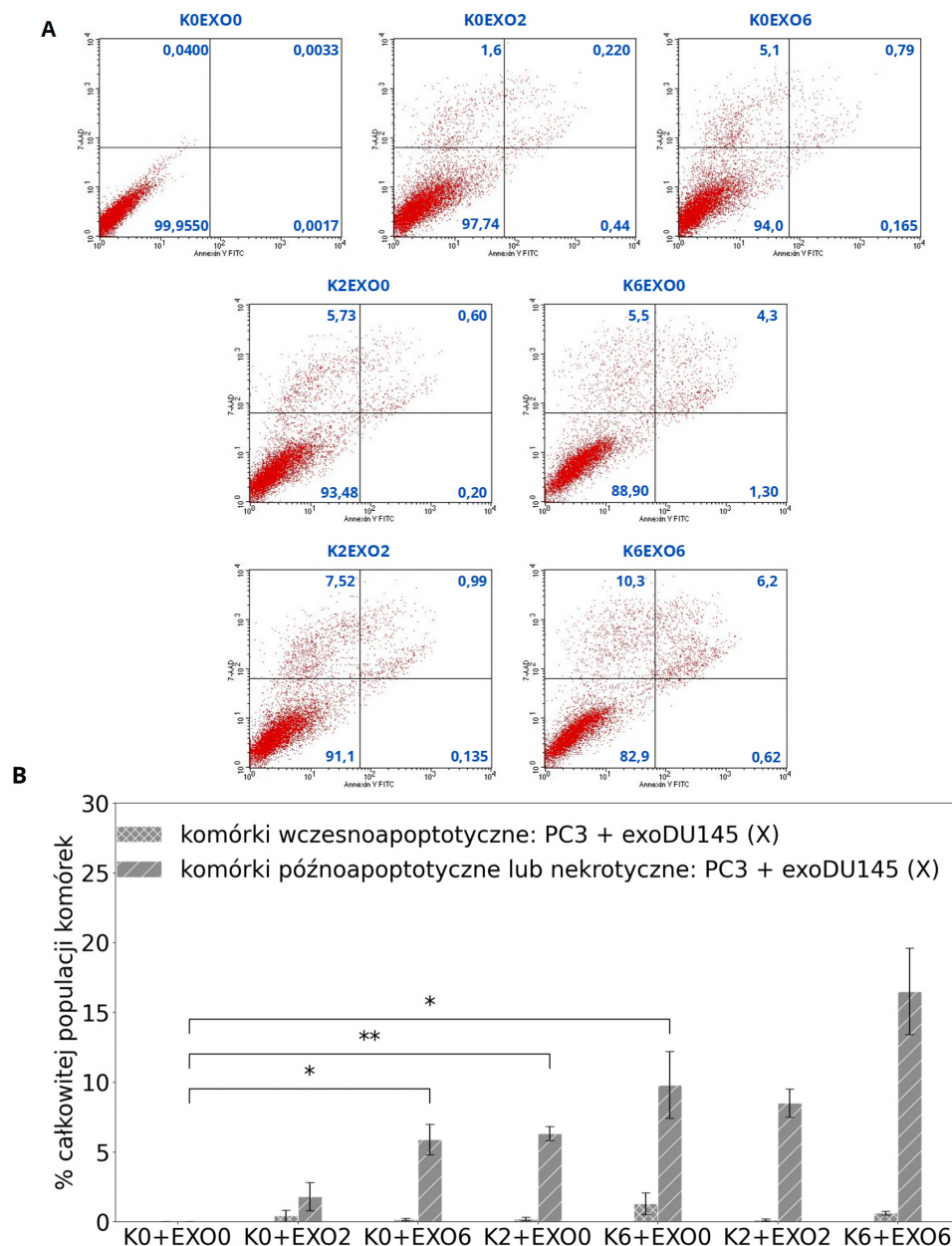
K6+EXO0) oraz napromienione komórki PC3 inkubowane z egzosomami izolowanymi z napromienionych komórek PC3 (K2+EXO2 oraz K6+EXO6). W tej grupie nie zostały zaobserwowane statystycznie istotne różnice. Jednakże, analizując procent komórek apoptotycznych i nekrotycznych, została zaobserwowana tendencja wzrostu procentowego udziału komórek ulegających apoptozie w zależności od dawki promieniowania. Ponieważ wszystkie komórki w tej grupie były napromieniane, tendencja ta była widoczna przy porównaniu egzosomów izolowanych z komórek kontrolnych do egzosomów pochodzących z komórek napromienionych.

Dodatkowo, porównując wyniki zaprezentowane na Rysunku 4.9 z wynikami pokazanymi na Rysunku 4.17 można stwierdzić, że różnica w procentowym udziale komórek żywych, komórek wczesnoapoptotycznych oraz późnoapoptotycznych lub nekrotycznych w populacji była bardziej wyraźna w przypadku napromienionych komórek PC3 hodowanych w medium wzbogaconym 5% surowicą bydlęcą pozbawioną egzosomów. Porównanie uzyskanych wartości dla komórek żywych i późnoapoptotycznych lub nekrotycznych zostało przedstawione w Tabeli 4.1.

Tabela 4.1. Procentowy udział komórek żywych i późnoapoptotycznych oraz nekrotycznych poddanych ekspozycji na promieniowanie X w zależności od zastosowanego rodzaju pożywki.

Parametr	Komórki żywe (%)		Późna apoptoza lub nekroza (%)	
	2 Gy	6 Gy	2 Gy	6 Gy
Rysunek 4.9	96,5 ± 1,8	92,9 ± 1,8	2,85 ± 0,86	5,5 ± 1,6
Rysunek 4.17	87,1 ± 2,4	78,0 ± 4,2	13,1 ± 1,8	21,2 ± 3,8

W drugim układzie eksperymentalnym (PC3 + exoDU145), którego wyniki zostały przedstawione na Rysunku 4.18 komórki PC3 były współhodowane z egzosomami wyizolowanymi z komórek DU145. W pierwszej grupie porównawczej, komórki PC3 zostały napromienione, a egzosomy wyizolowane z komórek kontrolnych DU145 (K2+EXO0 i K6+EXO0). W obrębie tej grupy został zaobserwowany wzrost procentowego udziału komórek wczesnoapoptotycznych oraz późnoapoptotycznych lub nekrotycznych w populacji w porównaniu do próbek kontrolnych (K0+EXO0). Ponadto różnica w procentowym udziale komórek wczesnoapoptotycznych oraz późnoapoptotycznych lub nekrotycznych była większa dla K6+EXO0 niż dla K2+EXO0. Istotność statystyczna dla późnej apoptozy lub nekrozy została wykazana dla próbek K2+EXO0 ($p \leq 0,01$) oraz K6+EXO0 ($p \leq 0,05$) w porównaniu do kontroli (K0+EXO0).



Rysunek 4.18. Efekt działania promieniowania X na komórki żywe, wczesnoapoptotyczne oraz późnoapoptotyczne lub nekrotyczne dla komórek PC3 współhodowanych z egzozomami wyizolowanymi z napromienionych i kontrolnych komórek DU145 (exoDU145) oceniony metodą cytometrii przepływowej 96 godzin po napromienieniu. Diagramy cytometrii przepływowej FITC-Annexin V/7-AAD dla wybranego jednego replikanta z pojedynczego eksperymentu (panel A). Uśrednione dane wraz ze słupkiem błędów SEM. Istotność statystyczną oznaczono jako ** $p \leq 0,01$ i * $p \leq 0,05$ w porównaniu do odpowiednich kontroli (panel B).

W drugiej grupie zostały porównane komórki kontrolne PC3 współhodowane z egzozomami wyizolowanymi z napromienionych komórek DU145 (K0+EXO2 i K0+EXO6) z próbkami kontrolnymi (K0+EXO0). Został zaobserwowany zwiększony procentowy udział komórek we wczesnej oraz późnej fazie apoptozy lub ne-

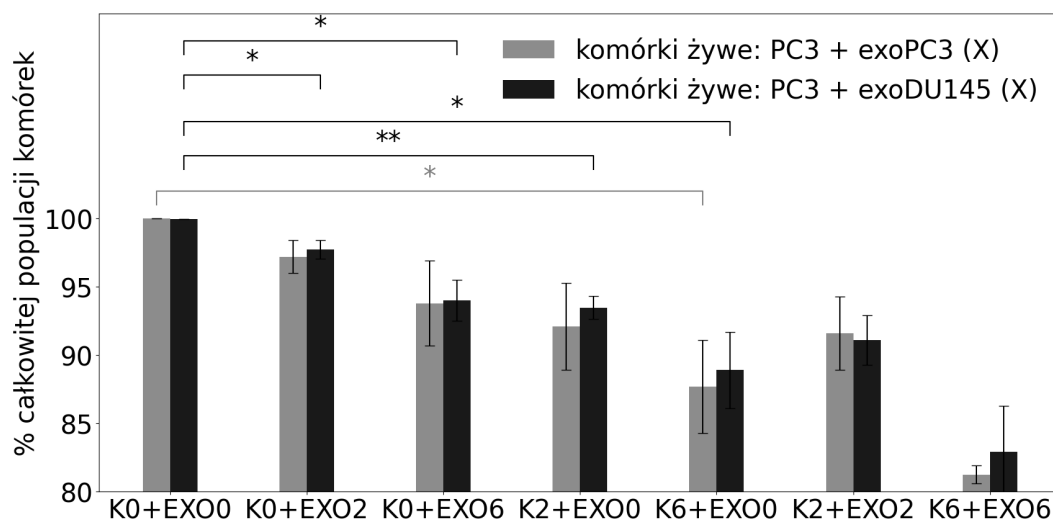
krozy, przy czym efekt ten nasilał się wraz ze wzrostem dawki promieniowania, której poddano komórki DU145, z których izolowano egzosomy. Dla próbek K0+EXO6 został wykazany istotnie statystycznie wzrost procentowy komórek późnoapoptotycznych lub nekrotycznych ($p \leq 0,05$) w porównaniu do próbek K0+EXO0.

W trzeciej grupie do napromienionych komórek PC3 dodano egzosomy wyizolowane z komórek kontrolnych DU145 (K2+EXO0 i K6+EXO0) i porównano je z napromienionymi komórkami PC3 z dodanymi egzosomami wyizolowanymi z napromienionych komórek DU145 (K2+EXO2 i K6+EXO6). Podobnie jak w pierwszym układzie (PC3 + exoPC3) nie zostały zaobserwowane różnice statystycznie istotne. Jednakże została zauważona tendencja, w której procent udziału komórek apoptotycznych i nekrotycznych w populacji wzrastał w zależności od dawki promieniowania. Ponieważ wszystkie komórki w tej grupie porównawczej były napromieniane, tendencja ta była szczególnie widoczna przy porównywaniu egzosomów wyizolowanych z komórek kontrolnych i egzosomów pochodzących z napromienionych komórek DU145.

Podsumowując, w pierwszym układzie eksperymentalnym (PC3 + exoPC3), procentowy udział komórek wczesnoapoptotycznych oraz późnoapoptotycznych lub nekrotycznych był wyższy dla próbek K6+EXO0 odpowiednio: $(13,96 \pm 0,27)\%$ i $(12,7 \pm 4,1)\%$ niż dla próbek K2+EXO0 odpowiednio: $(5,3 \pm 1,3)\%$ i $(9,6 \pm 5,5)\%$. W drugim układzie eksperymentalnym (PC3 + exoDU145), procentowy udział komórek we wczesnej i późnej fazie apoptozy lub nekrozy w populacji był również wyższy dla próbek K6+EXO0 $(1,30 \pm 0,77)\%$ i $(9,8 \pm 2,4)\%$, odpowiednio, w porównaniu do próbek K2+EXO0 $(0,20 \pm 0,13)\%$ i $(6,33 \pm 0,50)\%$, odpowiednio. Różnica w procentowym udziale komórek apoptotycznych i nekrotycznych była większa w układzie PC3 + exoPC3 w porównaniu do układu PC3 + exoDU145.

Został zaobserwowany również zwiększony procentowy udział komórek wczesnoapoptotycznych w układzie PC3 + exoPC3, z wartościami $(3,7 \pm 1,6)\%$ dla próbek K0+EXO2 i $(5,0 \pm 1,5)\%$ dla K0+EXO6, a także w układzie PC3 + exoDU145, gdzie wartości wynosiły $(0,43 \pm 0,40)\%$ dla K0+EXO2 i $(0,165 \pm 0,072)\%$ dla K0+EXO6. Ponadto, procentowy udział komórek w późnej fazie apoptozy lub nekrozy był większy zarówno w przypadku PC3 + exoPC3, gdzie wartości wynosiły $(2,9 \pm 1,2)\%$ dla K0+EXO2 i $(7,8 \pm 5,8)\%$ dla K0+EXO6, jak i w przypadku PC3 + exoDU145 $(1,8 \pm 1,0)\%$ dla K0+EXO2 i $(5,9 \pm 1,1)\%$ dla K0+EXO6. Wyniki te wskazują na procentowy wzrost populacji komórek apoptotycznych i nekrotycznych w porównaniu do komórek kontrolnych, które były inkubowane z egzosomami wyizolowanymi z komórek kontrolnych (K0+EXO0).

W celu porównania żywotności pomiędzy pierwszym układem eksperymentalnym (PC3 + exoPC3) a drugim (PC3 + exoDU145) został przygotowany Rysunek 4.19.



Rysunek 4.19. Efekt działania promieniowania X na komórki żywe dla komórek PC3 współhodowanych z egzosomami dla dwóch układów eksperymentalnych: komórki PC3 i egzosomów wyizolowanych z komórek PC3 (PC3 + exoPC3, oznaczone na szaro) oraz komórek PC3 i egzosomów wyizolowanych z komórek DU145 (PC3 + exoDU145, oznaczone na czarno) oceniony metodą cytometrii przepływowej 96 godzin po napromienieniu. Uśrednione dane wraz ze słupkiem błędów SEM. Istotność statystyczną oznaczono jako ** $p \leq 0,01$ i * $p \leq 0,05$, w porównaniu do odpowiedniej grupy kontrolnej.

Różnica w procentowym udziale komórek żywych była większa w układzie PC3 + exoPC3 niż w układzie PC3 + exoDU145 (Rysunek 4.19). W pierwszej grupie, dla próbek K2+EXO0 i K6+EXO0 w porównaniu do K0+EXO0, poziom istotności statystycznej dla procentowego udziału komórek żywych był wyższy dla próbek K2+EXO0 ($p \leq 0,01$) niż dla próbek K6+EXO0 ($p \leq 0,05$) w układzie PC3 + exoDU145, podczas gdy dla próbek PC3 + exoPC3 istotność statystyczna została zaobserwowana jedynie dla K6+EXO0 ($p \leq 0,05$) w porównaniu do K0+EXO0. Dla próbek K0+EXO2 i K0+EXO6 w porównaniu do K0+EXO0, istotność statystyczna dla komórek żywych została zaobserwowana tylko w układzie PC3 + exoDU145 (K0+EXO2 i K0+EXO6, $p \leq 0,05$). Otrzymane wyniki potwierdzają wcześniejszą hipotezę, że komórki DU145 są bardziej radiooporne niż komórki PC3, a egzosomy wyizolowane z tych komórek mogą odgrywać rolę w procesie uodparniania komórek nowotworowych gruczołu krokowego na promieniowanie.

4.4.4 Dyskusja i wnioski

W niniejszej pracy zostało wykazane, że promieniowanie jonizujące oddziałuje nie tylko na komórki bezpośrednio napromienione, lecz także na sąsiednie komórki, które nie były wystawione na jego działanie. Zjawisko to określa się mianem efektu

sąsiedztwa indukowanego promieniowaniem (RIBE). Mechanizm ten zostaje zapoczątkowany przez komunikację molekularną zachodzącą pomiędzy komórkami (Kadhim et al., 2013; Mothersill et al., 2019). W pracy (Kadhim et al., 2013) wykazano, że sygnały odpowiedzialne za efekt RIBE są przekazywane zarówno poprzez połączenia szczelinowe (z ang. *gap junctions*), jak i za pośrednictwem czynników dyfuzyjnych obecnych w medium hodowlanym napromienionych komórek. Z kolei w badaniach przedstawionych w pracy (Mothersill et al., 2019) podkreślono, że mechanizmy komunikacji komórkowej leżące u podstaw efektu sąsiedztwa są szeroko analizowane w literaturze, a jako główne drogi przekazywania tych sygnałów wyróżnia się czynniki rozpuszczalne oraz komunikację międzykomórkową za pośrednictwem połączeń szczelinowych.

W niniejszej pracy zbadana została rola egzosomów jako mediatorów uszkodzeń indukowanych promieniowaniem fotonowym, wykorzystując analizę immunoblottingu, immunobarwienie γ H2AX oraz ocenę programowanej śmierci komórkowej (apoptozy) w komórkach nowotworowych gruczołu krokowego inkubowanych z egzosomami. Na podstawie przeprowadzonych analiz Western Blot zostało wykazane, że lizaty komórkowe charakteryzowały się niższym poziomem tetraspanin CD63 i CD81 w porównaniu z próbkami komórek współhodowanych z egzosomami.

W komórkach kontrolnych PC3 inkubowanych z egzosomami wyizolowanymi z napromienionych komórek PC3 i DU145 została zaobserwowana obecność ognisk naprawczych γ H2AX świadczących o występowaniu podwójnoniciowych uszkodzeń DNA. Uzyskane wyniki wskazują, że egzosomy uwalniane przez komórki poddane ekspozycji na promieniowanie jonizujące mogą indukować efekt RIBE w komórkach, które nie były bezpośrednio napromieniane. W pracy (Smolarz et al., 2022) egzosomy wyizolowano z komórek płaskonabłonkowego raka regionu głowy i szyi (linia komórkowa FaDu). Komórki FaDu stymulowano uprzednio wyizolowanymi egzosomami pochodzącymi z komórek napromienionych lub poddanych pozorowanemu napromienianiu (z ang. *mock-irradiated*). Smolarz et al. (2022), wykazali, że poziom ognisk γ H2AX w jądrach komórek bezpośrednio napromienionych dawką 2 Gy (po jednej godzinie od napromienienia) oraz w jądrach komórek stymulowanych egzosomami (po jednej godzinie inkubacji) był porównywalnie wysoki.

Na podstawie analizy porównawczej z wykorzystaniem klonogenego testu przeżywalności, LDH i IL-6 zostało wykazane, że linia komórkowa DU145 charakteryzuje się wyższą radioopornością w porównaniu do komórek PC3. W związku z tym w kolejnych etapach badań podjęto próbę oceny wpływu egzosomów wyizolowanych z komórek DU145 na promieniowrażliwość komórek PC3. Uzyskane wyniki sugerują, że egzosomy wyizolowane z bardziej radioopornych komórek (exoDU145) mogą modulować odpowiedź komórek promieniowrażliwych (PC3) na promieniowanie jonizujące, osłabiając jego efekt. Udział komórek żywych w populacji był większy w przypadku konfiguracji PC3 + exoDU145 niż w konfiguracji PC3 +

exoPC3. Dla nienapromienionych komórek PC3 inkubowanych z egzosomami pochodzącymi z napromienionych komórek PC3 zaobserwowano wyższy procent komórek wczesnoapoptotycznych oraz komórek późnoapoptotycznych lub nekrotycznych w porównaniu do komórek PC3 stymulowanych egzosomami pochodzącymi z nienapromienionych komórek PC3. Podobna tendencja została zaobserwowana również w konfiguracji PC3 + exoDU145, jednakże udział procentowy całkowitej populacji komórek wykazujących cechy apoptozy był w tym przypadku niższy.

Przeprowadzone w niniejszej pracy eksperymenty, obejmujące zarówno analizę uwalniania, jak i wychwyty egzosomów przez komórki nowotworowe gruczołu krokowego, potwierdzają, że efekt RIBE może być inicjowany w komórkach stymulowanych egzosomami. Uzyskane wyniki są zgodne z doniesieniami literaturowymi, które wskazują, że egzosomy wyizolowane z napromienionych komórek są zdolne do wywoływania efektów charakterystycznych dla promieniowania jonizującego w sąsiednich komórkach, które nie były bezpośrednio eksponowane na promieniowanie: wyniki uzyskane dla keratynocytów (Jella et al., 2014) i dla komórek nowotworowych piersi (Al-Mayah et al., 2015). Promieniowanie jonizujące wpływa na skład molekularnego ładunku egzosomów, co – jak wykazano w licznych badaniach *in vitro* – może przyczyniać się do indukcji efektu RIBE w komórkach sąsiednich (Ariyoshi et al., 2019) (fibroblasty). Co więcej, egzosomy zostały powiązane zarówno z mechanizmem RIBE w komórkach nowotworowych, jak i z rozwojem oporności na radioterapię (Arscott et al., 2013; Mutschelknaus et al., 2017; Boelens et al., 2014), odpowiednio w przypadku komórek glejaka, płaskonabłonkowego raka regionu głowy i szyi oraz piersi. Warto podkreślić, że dotychczasowe badania nad efektem sąsiedztwa indukowanym promieniowaniem jonizującym nie obejmowały komórek nowotworowych gruczołu krokowego.

Rozdział 5

Podsumowanie i perspektywy

Reakcja komórek na uszkodzenia DNA wywołane promieniowaniem jonizującym zależy zarówno od charakterystyki zastosowanego promieniowania, opisanej między innymi parametrem LET, jak i od indywidualnej promieniowrażliwości komórek. Promieniowanie X, jako promieniowanie o niskim LET, powoduje uszkodzenia DNA o niższym stopniu złożoności niż cząstki α , które ze względu na wysoki LET tworzą skupiska silnie złożonych uszkodzeń DNA (Goodhead, 1994).

Istotnym elementem badań radiobiologicznych jest dozymetria źródeł promieniowania jonizującego, umożliwiającą określenie dawki pochłoniętej przez materiał biologiczny. Znajomość dawki jest niezbędna do prawidłowej interpretacji wyników eksperymentalnych. Wyniki dozymetrii doświadczalnej oparte na pomiarach z wykorzystaniem detektorów pasywnych – filmów radiochromowych, oraz na przeprowadzonych symulacjach MC w środowisku Geant4-DNA potwierdziły, że ^{241}Am oraz lampa RTG dla wykorzystywanego układu eksperymentalnego wykazują jednorodność rozkładu dawki promieniowania, co czyni je użytecznymi podczas przeprowadzania eksperymentów prezentowanych w niniejszej rozprawie.

Jednym z celów badań było zbadanie promieniowrażliwości komórek nowotworowych gruczołu krokowego, PC3 i DU145, na działanie promieniowania o niskim (promieniowanie X) i wysokim (cząstki α) liniowym przekazie energii. Na podstawie klonogenego testu przeżywalności oraz oznaczeń apoptozy można stwierdzić, że promieniowanie α charakteryzuje się większą skutecznością w niszczeniu komórek nowotworowych gruczołu krokowego niż promieniowanie X.

Egzosomy są uwalniane zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych. Obecnie wiadomo, że większość komórek wydziela pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, w tym egzosomy, które wykryto między innymi w krwi, moczu płynie owodniowym, ślinie, żółci, mleku matki oraz płynie mózgowo-rdzeniowym (Wójtowicz et al., 2014; Huebner et al., 2015; Nonaka i Wong, 2017). Do izolacji egzosomów z komórek wykorzystywane są różne metody, takie jak ultrawirowanie różnicowe, wirowanie w gradiencie gęstości, kulki magnetyczne oraz chromatografia wykluczeniowa (SEC). Jedną z technik umożliwiających zmierzenie rozmiaru

średnicy hydrodynamicznej oraz koncentracji egzosomów wyizolowanych z komórek jest analiza śledzenia nanocząstek. Na podstawie wyników NTA nie stwierdzono zależności wielkości wydzielanych nanopęcherzyków od dostarczonej do komórek dawki (Pszczołkowska-Kępa et al., 2022).

Dotychczasowe przekonanie, że skutki promieniowania są proporcjonalne do dawki – zgodnie z hipotezą liniową bezprogową (LNT, z ang. *Linear No-Threshold*) – może nie być wystarczające do opisu realnych zagrożeń radiacyjnych. Coraz więcej danych wskazuje, że efekty biologiczne zależą nie tylko od ilości zdeponowanej energii, ale również od indywidualnej odpowiedzi komórkowej oraz interakcji w obrębie mikrośrodowiska komórkowego (Seymour i Mothersill, 2004). W tym kontekście ryzyko związane z promieniowaniem nie ogranicza się wyłącznie do bezpośrednio napromienionych komórek, lecz obejmuje także ich otoczenie, co znacząco zmienia perspektywę oceny bezpieczeństwa ekspozycji na promieniowanie jonizujące. W celu odpowiedzi na pytanie, jak obecność uszkodzeń w komórkach sąsiednich wpływa na ogólną reakcję komórki, zbadano efekta sąsiedztwa indukowanego promieniowaniem jonizującym z wykorzystaniem egzosomów jako mediatorów przekazywania uszkodzeń komórkowych.

W eksperymentach przeprowadzonych dla dwóch konfiguracji układu doświadczalnego (PC3 + exoPC3 i PC3 + exoDU145), zostało wykazane, że wpływ promieniowania fotonowego jest zauważalny nie tylko w komórkach bezpośrednio napromienionych, lecz także oddziałuje w komórkach sąsiednich, które nie zostały poddane ekspozycji na promieniowanie. Do zbadania występowania efektu sąsiedztwa oraz jego wpływu na odpowiedź komórkową została wykorzystana apoptoza. Obserwacje wskazywały na to, że egzosomy mogą inicjować RIBE. W przypadku kontrolnych komórek nowotworowych gruczołu krokowego współhodowanych z egzosomami wyizolowanymi z komórek kontrolnych procentowy udział komórek żywych był wyższy niż dla komórek kontrolnych współhodowanych z egzosomami wyizolowanymi z komórek napromienionych. Odwrotny efekt obserwowano w przypadku komórek wczesnoapoptotycznych oraz późnoapoptotycznych lub nekrotycznych. Tutaj procentowy udział komórek ulegających apoptozie wzrastał dla komórek kontrolnych współhodowanych z egzosomami wyizolowanymi z napromienionych komórek względem próbek z komórkami kontrolnymi oraz egzosomami wyizolowanymi z komórek kontrolnych. Wykazano również, że egzosomy są w stanie modulować promieniowrażliwość komórek nowotworowych gruczołu krokowego, ponieważ otrzymana różnica w procentowym udziale komórek żywych była większa w układzie PC3 + exoPC3 niż w układzie PC3 + exoDU145. Dodatkowo analiza Western Blot i ognisk naprawczych potwierdziła również wnikanie „carga” egzosomalnego do komórek nowotworowych gruczołu krokowego, potwierdzając obecność komunikacji międzykomórkowej za pośrednictwem egzosomów.

Niniejsze badania wskazują na istotną rolę egzosomów w pośredniczeniu w efek-

cie sąsiedztwa indukowanym promieniowaniem jonizującym w komórkach nowotworowych gruczołu krokowego. Komunikacja międzykomórkowa za pośrednictwem pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w odpowiedzi na promieniowanie jonizujące ma znaczenie w kontekście skuteczności terapii przeciwnowotworowej. Rola promieniowania jonizującego w sygnalizacji egzosomalowej stanowi kluczowy mechanizm dla zrozumienia głównych regulatorów radiooporności, co może przyczynić się do poprawy bezpieczeństwa klinicznego i efektywności radioterapii. Aby móc pogłębić wiedzę na temat wpływu egzosomów na radiooporność konieczne są dalsze badania mające na celu wyjaśnienie mechanizmów leżących u podstaw efektów wywołanych promieniowaniem w komórkach nowotworowych gruczołu krokowego za pośrednictwem wyizolowanych egzosomów. Ponadto, badanie wpływu egzosomów i ich zawartości na mikrośrodowisko guza może rzucić światło na szlaki związane z opornością na promieniowanie i pomóc w opracowaniu skuteczniejszych strategii opartych na egzosomach w radioterapii nowotworów.

Podsumowując, liczne badania wskazują na funkcjonalną rolę egzosomów w odpowiedzi komórek nowotworowych na ekspozycję na promieniowanie w zakresie dawek terapeutycznych. Pojawiające się wyniki zachęcają do uznania egzosomów za użyteczne obiekty badań w celu lepszego zrozumienia odpowiedzi nowotworu na promieniowanie jonizujące. Dalsze badania nad samymi mechanizmami tej sygnalizacji mogą dostarczyć istotnych informacji wspierających rozwój skuteczniejszych rozwiązań w radioterapii.

Bibliografia

- [15th General Conference on Weights and Measures (CGPM) 1975] 15TH GENERAL CONFERENCE ON WEIGHTS AND MEASURES (CGPM): *The gray, unit of absorbed dose (Resolution 9 of the 15th CGPM, 1975)*. <https://www.bipm.org/en/committees/cg/cgpm/15-1975/resolution-9>, 1975. – Resolution 9: Adoption of the gray as the SI unit for absorbed dose
- [Agostinelli et al. 2003] AGOSTINELLI, S.; ALLISON, J.; AMAKO, K.; APOSTOLAKIS, J.; ARAUJO, H. et al.: Geant4—a simulation toolkit. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* 506(3), 2003, str. 250–303. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-9002\(03\)01368-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-9002(03)01368-8)
- [Akovali 1994] AKOVALI, Y.A.: Nuclear Data Sheets Update for A = 241. *Nuclear Data Sheets* 72(1), 1994, str. 191–219. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/ndsh.1994.1024>
- [Al-Mayah et al. 2015] AL-MAYAH, Ammar; BRIGHT, Scott; CHAPMAN, Kim; IRONS, Sarah; LUO, Ping et al.: The non-targeted effects of radiation are perpetuated by exosomes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 772, 2015, str. 38–45. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2014.12.007>
- [Alberts 1999] ALBERTS, Bruce: *Podstawy biologii komórki: wprowadzenie do biologii molekularnej*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1999
- [Allison et al. 2016] ALLISON, J.; AMAKO, K.; APOSTOLAKIS, J.; ARCE, P.; ASAI, M. et al.: Recent developments in Geant4. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* 835, 2016, str. 186–225. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nima.2016.06.125>
- [Ariyoshi et al. 2019] ARIYOSHI, Kentaro; MIURA, Tomisato; KASAI, Kosuke; FUJISHIMA, Yohei; NAKATA, Akifumi; YOSHIDA, Mitsuaki: Radiation-Induced Bystander Effect is Mediated by Mitochondrial DNA in Exosome-Like Vesicles. *Scientific Reports* 9(1), 2019, str. 9103. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45669-z>
- [Arscott et al. 2013] ARSCOTT, W. T.; TANDLE, Anita T.; ZHAO, Shuping; SHABASON, Jacob E.; GORDON, Ira K. et al.: Ionizing Radiation and Glioblastoma Exosomes: Implications in Tumor Biology and Cell Migration. *Translational Oncology* 6(6), 2013, str. 638–IN6. <https://doi.org/https://doi.org/10.1593/tlo.13640>
- [Assunção et al. 2025] ASSUNÇÃO, Raphaela Rebeca S.; SANTOS, Nathalia L.; SOUSA ANDRADE, Luciana N.: Extracellular vesicles as cancer biomarkers and drug delivery strategies in clinical settings: Advances, perspectives, and challenges. *Clinics* 80, 2025, str. 100635. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.clinsp.2025.100635>

- [Azzam et al. 1998] AZZAM, Edouard I.; DE TOLEDO, Sonia M.; GOODING, Tamara; LITTLE, John B.: Intercellular communication is involved in the bystander regulation of gene expression in human cells exposed to very low fluences of alpha particles. *Radiation research* 150(5), 1998, str. 497–504. <https://doi.org/10.2307/3579865>
- [Baatout 2023] BAATOUT, Sarah: *Radiobiology textbook*. Springer, 2023
- [Bachurski et al. 2019] BACHURSKI, Daniel; SCHULDNER, Maximiliane; NGUYEN, Phuong-Hien; MALZ, Alexandra; REINERS, Katrin et al.: Extracellular vesicle measurements with nanoparticle tracking analysis - An accuracy and repeatability comparison between NanoSight NS300 and ZetaView. *Journal of Extracellular Vesicles* 8, 2019. <https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1596016>
- [Bagheri et al. 2018] BAGHERI, Hesam S.; MOUSAVI, Monireh; REZABAKHSH, Aysa; REZAIE, Jafar; RASTA, Seyed H. et al.: Low-level laser irradiation at a high power intensity increased human endothelial cell exosome secretion via Wnt signaling. *Lasers in Medical Science* 33, 2018, str. 1131–1145
- [Ballarini et al. 2002] BALLARINI, Francesca; BIAGGI, Marco; OTTOLENGHI, Andrea; SAPORA, Orazio: Cellular communication and bystander effects: a critical review for modelling low-dose radiation action. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 501(1-2), 2002, str. 1–12. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(02\)00010-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0027-5107(02)00010-6)
- [Bancer et al. 2020] BANCER, Aleksandr; PIETRZAK, Marcin; MIETELSKA, Monika: Particle track structure measurements from 0.5 to 18 nm in nitrogen using the Jet Counter nanodosimeter. *Radiation Physics and Chemistry* 172, 2020, str. 108805. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2020.108805>
- [Barbieri et al. 2018] BARBIERI, Sofia; BAIOTTO, Giorgio; BABINI, Gabriele; MORINI, Jacopo; FRIEDLAND, Werner et al.: Modelling γ H2AX foci induction to minim limitations in the scoring technique. *Radiation Protection Dosimetry* 183(1-2), 2018, str. 121–125. <https://doi.org/10.1093/rpd/ncy217>
- [Barendsen 1968] BARENDSEN, G W.: Responses of cultured cells, tumours, and normal tissues to radiations of different linear energy transfer. pp 293-356 of *Current Topics in Radiation Research. Vol. IV. Ebert, Michael Howard, Alma (eds.). New York, John Wiley and Sons, Inc., 1968.*, 1968. <https://www.osti.gov/biblio/4500126>
- [Baró et al. 1995] BARÓ, J.; SempaU, J.; FERNÁNDEZ-VAREA, J.M.; SALVAT, F.: PENELOPE: An algorithm for Monte Carlo simulation of the penetration and energy loss of electrons and positrons in matter. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 100(1), 1995, str. 31–46. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0168-583X\(95\)00349-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0168-583X(95)00349-5)
- [Becquerel 1896] BECQUEREL, Henri: Sur les radiations émises par phosphorescence. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 122, 1896, str. 501–503
- [Belyaev 2010] BELYAEV, I.Y.: Radiation-induced DNA repair foci: Spatio-temporal aspects of formation, application for assessment of radiosensitivity and biological dosimetry. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 704(1), 2010, str. 132–141. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2010.01.011>

- [Bendall et al. 2012] BENDALL, Sean C.; NOLAN, Garry P.; ROEDERER, Mario; CHATTOPADHYAY, Pratip K.: A deep profiler's guide to cytometry. *Trends in Immunology* 33(7), 2012, str. 323–332. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.02.010>
- [Bertolet et al. 2020] BERTOLET, Alejandro; CORTÉS-GIRALDO, Miguel A.; CARABE-FERNANDEZ, Alejandro: On the concepts of dose-mean lineal energy, unrestricted and restricted dose-averaged LET in proton therapy. *Physics in Medicine & Biology* 65(7), 2020, str. 075011. <https://doi.org/10.1088/1361-6560/ab730a>
- [Bethe 1930] BETHE, H.: Zur Theorie des Durchgangs schneller Korpuskularstrahlen durch Materie. *Annalen der Physik* 397(3), 1930, str. 325–400. <https://doi.org/10.1002/andp.19303970303>
- [Bhattacharjee 2016] BHATTACHARJEE, Sourav: DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release* 235, 2016, str. 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
- [Bhavani et al. 2014] BHAVANI, M; SELVAN, G T.; KAUR, Harpreet; ADHIKARI, JS; VIJAYALAKSHMI, J et al.: Dicentric chromosome aberration analysis using giemsa and centromere specific fluorescence in-situ hybridization for biological dosimetry: an inter-and intra-laboratory comparison in Indian laboratories. *Applied Radiation and Isotopes* 92, 2014, str. 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2014.06.004>
- [Biancone et al. 2012] BIANCONE, Luigi; BRUNO, Stefania; DEREGIBUS, Maria C.; TETTA, Ciro; CAMUSSI, Giovanni: Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived microvesicles. *Nephrology Dialysis Transplantation* 27(8), 2012, str. 3037–3042. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfs168>
- [Biernacka et al. 2018] BIERNACKA, Anna; ZHU, Yingjie; SKRZYPCZAK, Magdalena; FOREY, Romain; PARDO, Benjamin et al.: i-BLESS is an ultra-sensitive method for detection of DNA double-strand breaks. *Communications Biology* 1(1), 2018, str. 181. <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0165-9>
- [Billen 1990] BILLEN, Daniel: Spontaneous DNA Damage and Its Significance for the "Negligible Dose" Controversy in Radiation Protection. *Radiation Research* 124(2), 1990, str. 242–245. <http://www.jstor.org/stable/3577872>
- [Bio-Rad Laboratories 2020] BIO-RAD LABORATORIES: *Image Lab Software User Guide, Version 6.1*, 2020. <https://www.bio-rad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lsr/literature/110000076953.pdf>
- [Black 2019] BLACK, Aine: An analytical solution of photon beam attenuation and energy downshift via Compton Scattering. , 2019
- [Blyth i Sykes 2011] BLYTH, Benjamin J.; SYKES, Pamela J.: Radiation-Induced Bystander Effects: What Are They, and How Relevant Are They to Human Radiation Exposures? *Radiation Research* 176(2), 2011, str. 139–157. <https://doi.org/10.1667/RR2548.1>
- [Boag 1975] BOAG, JW: The time scale in radiobiology. 12th Failla memorial lecture. W: *Proceedings of the 5th International Congress of Radiation Research* Bd. 1, 1975, str. 9–29

- [Boelens et al. 2014] BOELENS, Mirjam C.; WU, Tony J.; NABET, Barzin Y.; XU, Bihui; QIU, Yu et al.: Exosome Transfer from Stromal to Breast Cancer Cells Regulates Therapy Resistance Pathways. *Cell* 159(3), 2014, str. 499–513. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.051>
- [Borzdziłowska i Bednarek 2021] BORZDZIŁOWSKA, Paulina; BEDNAREK, Ilona: Biogeneza i znaczenie egzosomów w komunikacji międzykomórkowej, w wybranych procesach fizjologicznych, i w nowotworzeniu. *Postępy Biologii Komórki*, 2021, str. 345–364
- [Bradford 1976] BRADFORD, Marion M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72(1-2), 1976, str. 248–254
- [Bragg i Kleeman 1905] BRAGG, W. H.; KLEEMAN, R.: On the α particles of radium, and their loss of range in passing through various atoms and molecules. *The London Edinburgh and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* 10(57), 1905, str. 318–340. <https://doi.org/10.1080/14786440509463378>
- [Briesmeister et al. 2000] BRIESMEISTER, Judith F. et al.: MCNP-TM-A general Monte Carlo N-particle transport code. *Version 4C, LA-13709-M, Los Alamos National Laboratory* 2, 2000
- [Brzozowska et al. 2016] BRZOZOWSKA, B.; FRIEDLAND, W.; CHENG, L.; LUNDHOLM, L.; SOLLAZZO, A.; WOJCIK, A.: *Monte Carlo simulations of DNA damage and repair after exposure of cells to ionizing radiation of different qualities*. 2016. – Poster session
- [Brzozowska et al. 2019] BRZOZOWSKA, Beata; GALECKI, Maciej; TARTAS, Adrianna; GINTER, Józef; KAŻMIERCZAK, Urszula; LUNDHOLM, Lovisa: Freeware tool for analysing numbers and sizes of cell colonies. *Radiation and Environmental Biophysics* 58, 2019, str. 1–9. <https://doi.org/10.1007/s00411-018-00772-z>
- [Brzozowska et al. 2020] BRZOZOWSKA, Beata; TARTAS, Adrianna; WOJCIK, Andrzej: Monte Carlo modeling of DNA lesions and chromosomal aberrations induced by mixed beams of alpha particles and X-rays. *Frontiers in Physics* 8, 2020, str. 567864. <https://doi.org/10.3389/fphy.2020.567864>
- [Bushberg et al. 2002] BUSHBERG, Jerrold T.; SEIBERT, J. A.; LEIDHOLDT, Edwin M.; BOONE, John M.: *The Essential Physics of Medical Imaging*. Second edition. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 2002. – ISBN 9780683301182
- [Carter et al. 2019] CARTER, Rachel J.; NICKSON, Catherine M.; THOMPSON, James M.; KACPEREK, Andrzej; HILL, Mark A.; PARSONS, Jason L.: Characterisation of Deubiquitylating Enzymes in the Cellular Response to High-LET Ionizing Radiation and Complex DNA Damage. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 104(3), 2019, str. 656–665. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2019.02.053>
- [Cavallari et al. 2020] CAVALLARI, Eleonora; CARRERA, Carla; DI MATTEO, Ginevra; BONDAR, Oksana; AIME, Silvio; REINERI, Francesca: In-vitro NMR Studies of Prostate Tumor Cell Metabolism by Means of Hyperpolarized [1-13C]Pyruvate Obtained Using the PHIP-SAH Method. *Frontiers in Oncology* Volume 10 - 2020, 2020. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00497>

- [Chan et al. 2025] CHAN, Hei; WANG, Qi; HOWIE, Andrew; BUCCI, Joseph; GRAHAM, Peter; LI, Yong: Extracellular vesicle biomarkers redefine prostate cancer radiotherapy. *Cancer Letters* 616, 2025, str. 217568. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2025.217568>
- [Chaudhary et al. 2014] CHAUDHARY, Pankaj; MARSHALL, Thomas I.; PEROZZIELLO, Francesca M.; MANTI, Lorenzo; CURRELL, Frederick J. et al.: Relative Biological Effectiveness Variation Along Monoenergetic and Modulated Bragg Peaks of a 62-MeV Therapeutic Proton Beam: A Preclinical Assessment. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 90(1), 2014, str. 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2014.05.010>
- [Chavaudra et al. 2004] CHAUDAUDRA, Nicole; BOURHIS, Jean; FORAY, Nicolas: Quantified relationship between cellular radiosensitivity, DNA repair defects and chromatin relaxation: a study of 19 human tumour cell lines from different origin. *Radiotherapy and Oncology* 73(3), 2004, str. 373–382. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.radonc.2004.07.016>
- [Cheng 2019] CHENG, Lei: *Factors modifying cellular response to ionizing radiation*, Department of Molecular Bioscience, The Winner-Gren Institute, Stockholm University, Rozprawa doktorska, 2019
- [Cheng et al. 2018] CHENG, Lei; BRZOWSKA, Beata; SOLLAZZO, Alice; LUNDHOLM, Lovisa; LISOWSKA, Halina et al.: Simultaneous induction of dispersed and clustered DNA lesions compromises DNA damage response in human peripheral blood lymphocytes. *PLOS ONE* 13(10), 2018, str. 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204068>
- [Chetty et al. 2007] CHETTY, Indrin J.; CURRAN, Bruce; CYGLER, Joanna E.; DEMARCO, John J.; EZZELL, Gary et al.: Report of the AAPM Task Group No. 105: Issues associated with clinical implementation of Monte Carlo-based photon and electron external beam treatment planning. *Medical Physics* 34(12), 2007, str. 4818–4853. <https://doi.org/https://doi.org/10.1118/1.2795842>
- [Chiruvella et al. 2013] CHIRUVELLA, Kishore K.; LIANG, Zhuobin; WILSON, Thomas E.: Repair of double-strand breaks by end joining. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5(5), 2013, str. a012757. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012757>
- [Clements i Bazalova-Carter 2024] CLEMENTS, Nathan; BAZALOVA-CARTER, Magdalena: Monte Carlo calculated absorbed-dose energy dependence of EBT3 and EBT4 films for 5–200 MeV electrons and 100 keV–15 MeV photons. *Journal of Applied Clinical Medical Physics* 25(12), 2024, str. e14529. <https://doi.org/10.1002/acm2.14529>
- [Comfort et al. 2021] COMFORT, Nicole; CAI, Kunheng; BLOOMQUIST, Tessa; STRAIT, Madeleine; JR, Anthony; BACCARELLI, Andrea: Nanoparticle Tracking Analysis for the Quantification and Size Determination of Extracellular Vesicles. *Journal of Visualized Experiments* , 2021. <https://doi.org/10.3791/62447-v>
- [Conte et al. 2012] CONTE, V; COLAUTTI, P; GROSSWENDT, B; MORO, D; DE NARDO, L: Track structure of light ions: experiments and simulations. *New Journal of Physics* 14(9), 2012, str. 093010. <https://doi.org/10.1088/1367-2630/14/9/093010>
- [Cornford et al. 2024] CORNFORD, Philip; VAN DEN BERGH, Roderick C.; BRIERS, Erik; VAN DEN BROECK, Thomas; BRUNCKHORST, Oliver et al.: EAU-EANM-ESTRO-ESUR-ISUP-SIOG Guidelines on Prostate Cancer—2024 Update. Part I: Screening, Diagnosis, and Local

- Treatment with Curative Intent. *European Urology* 86(2), 2024, str. 148–163. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.eururo.2024.03.027>
- [Cossarizza et al. 2019] COSSARIZZA, Andrea; CHANG, Hyun-Dong; RADBRUCH, Andreas; ACS, Andreas; ADAM, Dieter et al.: Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). *European Journal of Immunology* 49(10), 2019, str. 1457–1973. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/eji.201970107>
- [Czub et al. 2020] CZUB, Joanna; BRAZIEWICZ, Janusz; WASILEWSKI, Adam; WYSOCKA-RABIN, Anna; WOŁOWIEC, Paweł; AND, Andrzej W.: Monte Carlo dosimetry using Fluka code and experimental dosimetry with Gafchromic EBT2 and XR-RV3 of self-built experimental setup for radiobiological studies with low-energy X-rays. *International Journal of Radiation Biology* 96(6), 2020, str. 718–733. <https://doi.org/10.1080/09553002.2020.1721606>
- [Daley i and 2005] DALEY, James M.; AND, Thomas E. W.: Rejoining of DNA Double-Strand Breaks as a Function of Overhang Length. *Molecular and Cellular Biology* 25(3), 2005, str. 896–906. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.3.896-906.2005>
- [De Amicis et al. 2014] DE AMICIS, Andrea; DE SANCTIS, Stefania; DI CRISTOFARO, Sara; FRANCHINI, Valeria; REGALBUTO, Elisa et al.: Dose estimation using dicentric chromosome assay and cytokinesis block micronucleus assay: comparison between manual and automated scoring in triage mode. *Health physics* 106(6), 2014, str. 787–797. https://journals.lww.com/health-physics/fulltext/2014/06000/dose_estimation_using_dicentric_chromosome_assay.22.aspx
- [Diacclone SAS 2020] DIACLONE SAS: *Human IL-6 ELISA Kit Product Manual*, 2020. <https://www.diacclone.com/product/950.030.048-human-il-6-elisa-kit/759>
- [Durante et al. 2013] DURANTE, M; BEDFORD, JS; CHEN, DJ; CONRAD, S; CORNFORTH, MN et al.: From DNA damage to chromosome aberrations: joining the break. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 756(1-2), 2013, str. 5–13. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.05.014>
- [Durante i Paganetti 2016] DURANTE, Marco; PAGANETTI, Harald: Nuclear physics in particle therapy: A review. *Reports on Progress in Physics* 79, 2016, str. 096702. <https://doi.org/10.1088/0034-4885/79/9/096702>
- [E. Feinendegen 2003] E. FEINENDEGEN, L: Relative implications of protective responses versus damage induction at low dose and low-dose-rate exposures, using the microdose approach. *Radiation protection dosimetry* 104(4), 2003, str. 337–346. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.rpd.a006197>
- [Easton 2009] EASTON, Suzanne: *Radiografia. Podręcznik dla techników elektroradiologii*. Edra Urban & Partner, 2009
- [Einstein 1905] EINSTEIN, A.: Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. *Annalen der Physik* 322(8), 1905, str. 549–560. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/andp.19053220806>

- [Elbakrawy et al. 2021] ELBAKRAWY, Eman M.; MAYAH, Ammar; HILL, Mark A.; KADHIM, Munira: Induction of Genomic Instability in a Primary Human Fibroblast Cell Line Following Low-Dose Alpha-Particle Exposure and the Potential Role of Exosomes. *Biology* 10(1), 2021. <https://doi.org/10.3390/biology10010011>
- [Elgqvist et al. 2016] ELGQVIST, Jörgen; TIMMERMAND, Oskar V.; LARSSON, Erik; STRAND, Sven-Erik: Radiosensitivity of prostate cancer cell lines for irradiation from beta particle-emitting radionuclide ^{177}Lu compared to alpha particles and gamma rays. *Anticancer research* 36(1), 2016, str. 103–109
- [Ensminger i Löbrich 2020] ENSMINGER, Michael; LÖBRICH, Markus: One end to rule them all: Non-homologous end-joining and homologous recombination at DNA double-strand breaks. *British Journal of Radiology* 93(1115), 2020, str. 20191054. <https://doi.org/10.1259/bjr.20191054>
- [Fabbri et al. 2024] FABBRI, Maria R.; NICKSON, Catherine M.; HUGHES, Jonathan R.; ROBINSON, Emily A.; VAIDYA, Karthik et al.: Targeting OGG1 and PARG radiosensitises head and neck cancer cells to high-LET protons through complex DNA damage persistence. *Cell Death & Disease* 15(2), 2024, str. 150. <https://doi.org/10.1038/s41419-024-06541-9>
- [Faddegon et al. 2023] FADDEGON, Bruce; BLAKELY, Eleanor A.; BURIGO, Lucas; CENSOR, Yair; DOKIC, Ivana et al.: Ionization detail parameters and cluster dose: a mathematical model for selection of nanodosimetric quantities for use in treatment planning in charged particle radiotherapy. *Physics in Medicine and Biology* 68(17), 2023. <https://doi.org/10.1088/1361-6560/acea16>
- [Falcone et al. 2015] FALCONE, Germana; FELSANI, Armando; D'AGNANO, Igea: Signaling by exosomal microRNAs in cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 34(1), 2015, str. 32. <https://doi.org/10.1186/s13046-015-0148-3>
- [Ferranti et al. 2020] FERRANTI, Charles; CHENG, Jin; THOMPSON, Chris; ZHANG, Jianjun; ROTOLO, Jimmy et al.: Fusion of lysosomes to plasma membrane initiates radiation-induced apoptosis. *The Journal of cell biology* 219, 2020. <https://doi.org/10.1083/jcb.201903176>
- [Ferrari et al. 2005] FERRARI, Alfredo; SALA, Paola; FASSO, Alberto; RANFT, J.: *FLUKA: a multi-particle transport code*. Bd. 2005-10. 2005. <https://doi.org/10.2172/877507>
- [Filipek et al. 2024] FILIPEK, Mateusz; PSZCZÓŁKOWSKA-KĘPA, Beata; KOCIŃSKI, Bartłomiej; SENKOWSKA, Marta; SZEFLIŃSKI, Zygmunt; BRZOSOWSKA, Beata: From radiobiology to radiotherapy: dose homogeneity in cells after alpha irradiation in measurements and Monte Carlo simulations. *Polish Journal of Medical Physics and Engineering* 30(2), 2024, str. 79–89. <https://doi.org/doi:10.2478/pjmpe-2024-0009>
- [Forkasiewicz et al. 2020] FORKASIEWICZ, Agata; DOROCIAK, Maja; STACH, Kamilla; SZELACHOWSKI, Piotr; TABOLA, Renata; AUGOFF, Katarzyna: The usefulness of lactate dehydrogenase measurements in current oncological practice. *Cellular & Molecular Biology Letters* 25(1), 2020, str. 35. <https://doi.org/10.1186/s11658-020-00228-7>
- [Francis et al. 2011] FRANCIS, Ziad; VILLAGRASA, Carmen; CLAIRAND, Isabelle: Simulation of DNA damage clustering after proton irradiation using an adapted DBSCAN algorithm. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 101(3), 2011, str. 265–270. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2010.12.012>

- [Franken et al. 2006] FRANKEN, Nicolaas; RODERMOND, Hans; STAP, Jan; HAVEMAN, J.; BREE, Chris: Clonogenic assay of cells. *Nature protocols* 1, 2006, str. 2315–9. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>
- [Franklin et al. 2010] FRANKLIN, Kirsten; MUIR, Paul; SCOTT, Terry; WILCOCKS, Lara; YATES, Paul: *Introduction to biological physics for the health and life sciences*. John Wiley & Sons, 2010
- [Friedland et al. 2017] FRIEDLAND, W.; SCHMITT, E.; KUNDRÁT, P.; DINGFELDER, M.; BAIOTTO, G. et al.: Comprehensive track-structure based evaluation of DNA damage by light ions from radiotherapy-relevant energies down to stopping. *Scientific Reports* 7(1), 2017, str. 45161. <https://doi.org/10.1038/srep45161>
- [Friedland et al. 2011] FRIEDLAND, Werner; DINGFELDER, Michael; KUNDRÁT, Pavel; JACOB, Peter: Track structures, DNA targets and radiation effects in the biophysical Monte Carlo simulation code PARTRAC. *Mutation research* 711, 2011, str. 28–40. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.01.003>
- [Friesen et al. 2013] FRIESEN, Claudia; ROSCHER, Mareike; HORMANN, Inis; LEIB, Oliver; MARX, Sebastian et al.: Anti-CD33-antibodies labelled with the alpha-emitter Bismuth-213 kill CD33-positive acute myeloid leukaemia cells specifically by activation of caspases and break radio- and chemoresistance by inhibition of the anti-apoptotic proteins X-linked inhibitor of apoptosis protein and B-cell lymphoma-extra large. *European Journal of Cancer* 49(11), 2013, str. 2542–2554. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejca.2013.04.008>
- [Furlong et al. 2013] FURLONG, Hayley; MOTHERSILL, Carmel; LYG, Fiona M.; HOWE, Orla: Apoptosis is signalled early by low doses of ionising radiation in a radiation-induced bystander effect. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 741–742, 2013, str. 35–43. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2013.02.001>
- [Gardiner et al. 2013] GARDINER, Chris; FERREIRA, Yannick J.; DRAGOVIC, Rebecca A.; REDMAN, Christopher W.; SARGENT, Ian L.: Extracellular vesicle sizing and enumeration by nanoparticle tracking analysis. *Journal of extracellular vesicles* 2(1), 2013, str. 19671
- [Gasińska 2006] GASIŃSKA, A: Leksykon pojęć i definicji–radiobiologia kliniczna–cz. I. *NOWOTWORY Journal of Oncology* 56, 2006, str. 595–604
- [Galecki et al. 2019] GALECKI, Maciej; TARTAS, Adrianna; SZYMANEK, Agata; SIMS, Emma; LUNDHOLM, Lovisa et al.: Precision of scoring radiation-induced chromosomal aberrations and micronuclei by unexperienced scorers. *International Journal of Radiation Biology* 95(9), 2019, str. 1251–1258. <https://doi.org/10.1080/09553002.2019.1625462>
- [Geard et al. 2002] GEARD, Charles R.; JENKINS-BAKER, Gloria; MARINO, Stephen A.; PONGNAIYA, B: Novel approaches with track segment alpha particles and cell co-cultures in studies of bystander effects. *Radiation protection dosimetry* 99(1), 2002, str. 233–236. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.rpd.a006771>
- [Goodhead 1994] GOODHEAD, Dudley T.: Initial Events in the Cellular Effects of Ionizing Radiations: Clustered Damage in DNA. *International Journal of Radiation Biology* 65(1), 1994, str. 7–17. <https://doi.org/10.1080/09553009414550021>

- [Gow et al. 2010] GOW, MD; SEYMOUR, CB; RYAN, LA; MOTHERSILL, CE: Induction of bystander response in human glioma cells using high-energy electrons: a role for TGF- β 1. *Radiation research* 173(6), 2010, str. 769–778. <https://doi.org/10.1667/RR1895.1>
- [Grassberger i Paganetti 2011] GRASSBERGER, Clemens; PAGANETTI, Harald: Elevated LET components in clinical proton beams. *Physics in Medicine & Biology* 56(20), 2011, str. 6677. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/56/20/011>
- [Grilj i Brenner 2018] GRILJ, Veljko; BRENNER, D: LET dependent response of GafChromic films investigated with MeV ion beams. *Physics in Medicine and Biology* 63, 2018. <https://doi.org/10.1088/1361-6560/aaf34a>
- [Grzybowska et al. 2019] GRZYSKOWSKA, Aleksandra; LORENC, Tomasz; OLEJARZ, Wioletta; NOWICKA, Grażyna: EXOSOMES AS CARRIERS OF INFORMATION BETWEEN TUMOR CELLS. *Prospects in Pharmaceutical Sciences* 17(2), 2019, str. 6–13. <https://doi.org/10.56782/pps.32>
- [Guan et al. 2018] GUAN, Fada; GENG, Changran; MA, Duo; BRONK, Lawrence; KERR, Matthew et al.: RBE Model-Based Biological Dose Optimization for Proton Radiobiology Studies. *International Journal of Particle Therapy* 5(1), 2018, str. 160–171. <https://doi.org/https://doi.org/10.14338/IJPT-18-00007.1>
- [Gutiérrez-Fernández et al. 2021] GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ, María; CUESTA, Fernando de l.; TALLÓN, Antonio; PUERTAS, Inmaculada; FERNÁNDEZ-FOURNIER, Mireya et al.: Potential Roles of Extracellular Vesicles as Biomarkers and a Novel Treatment Approach in Multiple Sclerosis. *International Journal of Molecular Sciences* 22(16), 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22169011>
- [Hall i Giaccia 2018] HALL, Eric J.; GIACCIA, Amato J.: *Radiobiology for the Radiologist*. 8th. Wolters Kluwer Health, 2018. – ISBN 9781975114152
- [Hamada 2014] HAMADA, Nobuyuki: What are the intracellular targets and intratissue target cells for radiation effects? *Radiation Research* 181(1), 2014, str. 9–20. <https://doi.org/10.1667/RR13505.1>
- [Hamada et al. 2007] HAMADA, Nobuyuki; MATSUMOTO, Hideki; HARA, Takamitsu; KOBAYASHI, Yasuhiko: Intercellular and intracellular signaling pathways mediating ionizing radiation-induced bystander effects. *Journal of radiation research* 48(2), 2007, str. 87–95. <https://doi.org/10.1269/jrr.06084>
- [Harding et al. 1983] HARDING, C; HEUSER, J; STAHL, P: Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *Journal of Cell Biology* 97(2), 1983, str. 329–339. <https://doi.org/10.1083/jcb.97.2.329>
- [Hei et al. 2008] HEI, Tom; ZHOU, Hongning; IVANOV, Vladimir; HONG, Mei; LIEBERMAN, Howard et al.: Mechanism of radiation-induced bystander effects: A unifying model. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 60, 2008, str. 943–50. <https://doi.org/10.1211/jpp.60.8.0001>
- [Hickman et al. 1994] HICKMAN, Albert W.; JARAMILLO, Richard J.; LECHNER, John F.; JOHNSON, Neil F.: α -Particle-induced p53 protein expression in a rat lung epithelial cell strain. *Cancer research* 54(22), 1994, str. 5797–5800

- [Hori et al. 1968] HORI, Yasuharu; TAKAMORI, Yasuhiko; NISHIO, Kazuo: The Effect of X-Irradiation on the Lactate Dehydrogenase Level in Plasma and in Various Organs of Mice. *Radiation Research* 34(2), 1968, str. 411–420. <http://www.jstor.org/stable/3572566>
- [Hryniewicz 2001] HRYNKIEWICZ, Andrzej: *Człowiek i promieniowanie jonizujące: praca zbiorowa*. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2001
- [Huebner et al. 2015] HUEBNER, Alyssa R.; SOMPARN, Poorichaya; BENJACHAT, Thitima; LEELAHAVANICHKUL, Asada; AVIHINGSANON, Yingyos et al.: Exosomes in urine biomarker discovery. *Urine proteomics in kidney disease biomarker discovery*, 2015, str. 43–58. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9523-4_5
- [Huo et al. 2001] HUO, Lihong; NAGASAWA, Hatsumi; LITTLE, John B.: HPRT mutants induced in bystander cells by very low fluences of alpha particles result primarily from point mutations. *Radiation research* 156(5), 2001, str. 521–525. [https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2001\)156\[0521:HMIIBC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2001)156[0521:HMIIBC]2.0.CO;2)
- [ICRU 2011] ICRU: Report 85. Fundamental quantities and units for ionizing radiation. *Journal of the International Commission on Radiation Units and Measurements* 11(1), 2011. https://doi.org/10.1093/jicru_ndr011
- [ICRU 2023] ICRU: Report 98, Stochastic Nature of Radiation Interactions: Microdosimetry. *Journal of the ICRU* 23, 2023, str. 1–168. <https://doi.org/10.1177/14736691231211380>
- [Incerti et al. 2006] INCERTI, S; NATHALIE, Gault; MICHELET, Claire; LEFAIX, J; MORETTO, Ph et al.: A comparison of cellular irradiation techniques with alpha particles using the GEANT4 Monte Carlo simulation toolkit. *Radiation protection dosimetry* 122, 2006, str. 327–9. <https://doi.org/10.1093/rpd/nc1422>
- [Incerti et al. 2010] INCERTI, Sébastien; BALDACCHINO, Gérard; BERNAL, M; CAPRA, Riccardo; CHAMPION, Christophe et al.: The geant4-dna project. *International Journal of Modeling, Simulation, and Scientific Computing* 1(02), 2010, str. 157–178
- [Jakob i Durante 2012] JAKOB, B.; DURANTE, M.: Radiation Dose Detection by Imaging Response in Biological Targets. *Radiation Research* 177(4), 2012, str. 524 – 532. <https://doi.org/10.1667/RR2452.1>
- [Janiak i Wójcik 2005] JANIAK, Marek K.; WÓJCIK, Andrzej: *Medycyna zagrożeń i urazów radiacyjnych*. Wydaw. Lekarskie PZWL, 2005
- [Jaracz 2001] JARACZ, Piotr: *Promieniowanie jonizujące w środowisku człowieka: fizyka, skutki radiologiczne, społeczeństwo*. Wydawnictwa Uniwersytetu Warszawskiego, 2001
- [Jayakumar et al. 2014] JAYAKUMAR, Sundarraj; KUNWAR, Amit; SANDUR, Santosh K.; PANDEY, Badri N.; CHAUBEY, Ramesh C.: Differential response of DU145 and PC3 prostate cancer cells to ionizing radiation: Role of reactive oxygen species, GSH and Nrf2 in radiosensitivity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1840(1), 2014, str. 485–494. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.10.006>
- [Jella et al. 2014] JELLA, Kishore K.; RANI, Sweta; DRISCOLL, Lorraine; MCCLEAN, Brendan; BYRNE, Hugh; LYG, Fiona: Exosomes Are Involved in Mediating Radiation Induced Bystander Signaling in Human Keratinocyte Cells. *Radiation research* 181, 2014. <https://doi.org/10.1667/RR13337.1>

- [Johnstone et al. 1987] JOHNSTONE, R. M.; ADAM, M.; HAMMOND, J. R.; ORR, L.; TURBIDE, C.: Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *Journal of Biological Chemistry* 262(19), 1987, str. 9412–9420. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)48095-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)48095-7)
- [Joiner i Kogel 2009] JOINER, M.; KOGEL, A.: *Basic Clinical Radiobiology*. Fourth edition. Hodder Arnold, 2009
- [Kadhim et al. 2013] KADHIM, Munira; SALOMAA, Sisko; WRIGHT, Eric; HILDEBRANDT, Guido; BELYAKOV, Oleg V. et al.: Non-targeted effects of ionising radiation—Implications for low dose risk. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 752(2), 2013, str. 84–98. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2012.12.001>
- [Kaighn et al. 1979] KAIGHN, ME; NARAYAN, KS; OHNUKI, Y; LECHNER, JF; JONES, LW: Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Investigative urology* 17(1), 1979, str. 16–23. <http://europepmc.org/abstract/MED/447482>
- [Kalholm et al. 2021] KALHOLM, Fredrik; GRZANKA, Leszek; TRANEUS, E.; BASSLER, Niels: A Systematic Review on the Usage of Averaged LET in Radiation Biology for Particle Therapy. *Radiotherapy and Oncology* 161, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2021.04.007>
- [Kalluri i LeBleu 2020] KALLURI, Raghu; LEBLEU, Valerie S.: The biology and biomedical applications of exosomes. *Science* 367(6478), 2020, str. eaau6977. <https://doi.org/10.1126/science.aau6977>
- [Kanda 2000] KANDA, Reiko: Improvement of accuracy of chromosome aberration analysis for biological radiation dosimetry. *Journal of radiation research* 41(1), 2000, str. 1–8. <https://doi.org/10.1269/jrr.41.1>
- [Karthik et al. 2019] KARTHIK, K.; RAJAN, Vasumathy; PANDEY, Badri N.; SIVASUBRAMANIAN, K.; PAUL, Solomon F.; AND, P. V.: Direct and bystander effects in human blood lymphocytes exposed to 241Am alpha particles and the relative biological effectiveness using chromosomal aberration and micronucleus assay. *International Journal of Radiation Biology* 95(6), 2019, str. 725–736. <https://doi.org/10.1080/09553002.2019.1589018>
- [Kassis 2008] KASSIS, Amin: Therapeutic Radionuclides: Biophysical and Radiobiologic Principles. *Seminars in nuclear medicine* 38, 2008, str. 358–66. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2008.05.002>
- [Katz i Cucinotta 1999] KATZ, R.; CUCINOTTA, F.A.: Tracks to therapy. *Radiation Measurements* 31(1), 1999, str. 379–388. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1350-4487\(99\)00098-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1350-4487(99)00098-0)
- [Kirolkar et al. 2018] KIROLIKAR, Saurabh; PRASANNAN, Preeti; RAGHURAM, Gorantla V.; PANCHOLI, Namrata; SAHA, Tannishtha et al.: Prevention of radiation-induced bystander effects by agents that inactivate cell-free chromatin released from irradiated dying cells. *Cell Death & Disease* 9(12), 2018, str. 1142. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1181-x>
- [Koniusz et al. 2016] KONIUSZ, Sylwia; ANDRZEJEWSKA, Anna; MURACA, Maurizio; SRIVASTAVA, Amit K.; JANOWSKI, Mirosław; LUKOMSKA, Barbara: Extracellular Vesicles in Physiology, Pathology, and Therapy of the Immune and Central Nervous System, with Focus on Extracellular Vesicles Derived from Mesenchymal Stem Cells as Therapeutic Tools. *Frontiers in Cellular Neuroscience* Volume 10 - 2016, 2016. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00109>

- [Kowkabany i Bao 2024] KOWKABANY, Gabrielle; BAO, Yuping: Nanoparticle Tracking Analysis: An Effective Tool to Characterize Extracellular Vesicles. *Molecules* 29(19), 2024. <https://doi.org/10.3390/molecules29194672>
- [Krajewski 2009] KRAJEWSKI, Paweł: *Biologiczne skutki promieniowania jonizującego*. 2009
- [Krings Rocha et al. 2011] KRINGS ROCHA, Cristiano; PRAULICH, Inka; GEHRKE, Iris; HALLEK, Michael; KREUZER, Karl-Anton: A rare case of t(11;22) in a mantle cell lymphoma like B-cell neoplasia resulting in a fusion of IGL and CCND1: Case report. *Molecular cytogenetics* 4, 2011, str. 8. <https://doi.org/10.1186/1755-8166-4-8>
- [Kyriakou et al. 2022] KYRIAKOU, Ioanna; SAKATA, Dousatsu; TRAN, Hoang N.; PERROT, Yann; SHIN, Wook-Geun et al.: Review of the Geant4-DNA Simulation Toolkit for Radiobiological Applications at the Cellular and DNA Level. *Cancers* 14(1), 2022. <https://doi.org/10.3390/cancers14010035>
- [Lea 1955] LEA, Douglas E.: *Actions of radiations on living cells*. Cambridge University Press Archive, 1955
- [Lee et al. 2012] LEE, Yi; EL ANDALOUSSI, Samir; WOOD, Matthew J.: Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. *Human Molecular Genetics* 21(R1), 2012, str. R125–R134. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds317>
- [Lieber 2010] LIEBER, Michael R.: The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway. *Annual Review of Biochemistry* 79(Volume 79, 2010), 2010, str. 181–211. <https://doi.org/https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.052308.093131>
- [Linz 2011] LINZ, Ute: *Ion beam therapy: fundamentals, technology, clinical applications*. Springer Science & Business Media, 2011
- [Lisowska et al. 2018] LISOWSKA, Halina; CHENG, Lei; SOLLAZZO, Alice; LUNDHOLM, Lovisa; WĘGIEREK-CIUK, Aneta et al.: Hypothermia modulates the DNA damage response to ionising radiation in human peripheral blood lymphocytes. *International journal of radiation biology* 94, 2018, str. 1–23. <https://doi.org/10.1080/09553002.2018.1466206>
- [Little 2006] LITTLE, John B.: Cellular radiation effects and the bystander response. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 597(1-2), 2006, str. 113–118. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.12.001>
- [Liu et al. 1999] LIU, James C.; BONG, P; GRAY, B; MAO, XS; NELSON, G et al.: Radiation safety system of the B-Factor at the Stanford Linear Accelerator Center. *Health physics* 77(5), 1999, str. 588–594. https://journals.lww.com/health-physics/fulltext/1999/11000/radiation_safety_system_of_the_b_factory_at_the.14.aspx
- [Liu et al. 2021] LIU, Kevin X.; EVERDELL, Emily; PAL, Sharmistha; HAAS-KOGAN, Daphne A.; MILLIGAN, Michael G.: Harnessing Lactate Metabolism for Radiosensitization. *Frontiers in Oncology* Volume 11 - 2021, 2021. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.672339>
- [Łobodziec 1995] ŁOBODZIEC, Włodzimierz: *Dozymetria promieniowania jonizującego w radioterapii*. Uniwersytet Śląski, 1995

- [Löbrich i Jeggo 2017] LÖBRICH, Markus; JEGGO, Penny: A Process of Resection-Dependent Nonhomologous End Joining Involving the Goddess Artemis. *Trends in Biochemical Sciences* 42(9), 2017, str. 690–701. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.06.011>
- [Lorimore et al. 1998] LORIMORE, SA; KADHIM, MA; POCOCK, DA; PAPWORTH, D; STEVENS, DL et al.: Chromosomal instability in the descendants of unirradiated surviving cells after α -particle irradiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(10), 1998, str. 5730–5733. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.10.5730>
- [Lorimore i Wright 2003] LORIMORE, SA; WRIGHT, EG: Radiation-induced genomic instability and bystander effects: related inflammatory-type responses to radiation-induced stress and injury? A review. *International journal of radiation biology* 79(1), 2003, str. 15–25. <https://doi.org/10.1080/0955300021000045664>
- [Lucas et al. 1993] LUCAS, J. N.; POGGENSEE, M.; STRAUME, T.: Translocations between two specific human chromosomes detected by three-color "chromosome painting". *Cytogenetics and Cell Genetics* 62(1), 1993, str. 11–12. <https://doi.org/10.1159/000133434>
- [Ludwig et al. 2019] LUDWIG, Nils; HONG, Chang-Sook; LUDWIG, Sonja; AZAMBUJA, Juliana; SHARMA, Priyanka et al.: Isolation and Analysis of Tumor-Derived Exosomes. *Current Protocols in Immunology* 127, 2019. <https://doi.org/10.1002/cpim.91>
- [Lyu et al. 2021] LYU, Tae S.; AHN, Yoojin; IM, Young-Jun; KIM, Seong-Soo; LEE, Ki-Heon et al.: The characterization of exosomes from fibrosarcoma cell and the useful usage of Dynamic Light Scattering (DLS) for their evaluation. *PLOS ONE* 16(1), 2021, str. 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231994>
- [M. Prise et al. 2003] M. PRISE, K; FOLKARD, M; D. MICHAEL, B: A review of the bystander effect and its implications for low-dose exposure. *Radiation protection dosimetry* 104(4), 2003, str. 347–355. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.rpd.a006198>
- [Malicki i Ślosarek 2016] MALICKI, Julian; ŚŁOSAREK, Krzysztof: *Planowanie leczenia i dozymetria w radioterapii Tom I*. Bd. 1. VM Media Sp. z oo VM Group Sp. k., Grupa Via Medica, 2016
- [Mathivanan et al. 2010] MATHIVANAN, Suresh; JI, Hong; SIMPSON, Richard J.: Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of Proteomics* 73(10), 2010, str. 1907–1920. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.06.006>
- [Matsuoka et al. 2016] MATSUOKA, Yuichiro; NAKAYAMA, Hideki; YOSHIDA, Ryoji; HIROSUE, Akiyuki; NAGATA, Masashi et al.: IL-6 controls resistance to radiation by suppressing oxidative stress via the Nrf2-antioxidant pathway in oral squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer* 115, 2016. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.327>
- [McMahon 2018] MCMAHON, Stephen: The linear quadratic model: usage, interpretation and challenges. *Physics in Medicine and Biology* 64, 2018. <https://doi.org/10.1088/1361-6560/aaf26a>
- [Mellman i Emr 2013] MELLMAN, Ira; EMR, Scott D.: A Nobel Prize for membrane traffic: vesicles find their journey's end. *The Journal of cell biology* 203(4), 2013, str. 559. <https://doi.org/10.1083/jcb.201310134>

- [Moquet et al. 2017] MOQUET, Jayne; BARNARD, Stephen; STAYNOVA, Albena; LINDHOLM, Carita; GIL, Octávia M. et al.: The second gamma-H2AX assay inter-comparison exercise carried out in the framework of the European biodosimetry network (RENEB). *International Journal of Radiation Biology* 93(1), 2017, str. 58–64. <https://doi.org/10.1080/09553002.2016.1207822>
- [Morgan 2003] MORGAN, William F.: Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: I. Radiation-induced genomic instability and bystander effects in vitro. *Radiation research* 159(5), 2003, str. 567–580. [https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2003\)159\[0567:NADEOE\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2003)159[0567:NADEOE]2.0.CO;2)
- [Mothersill et al. 2019] MOTHERSILL, Carmel; RUSIN, Andrej; SEYMOUR, Colin: Relevance of Non-Targeted Effects for Radiotherapy and Diagnostic Radiology; A Historical and Conceptual Analysis of Key Players. *Cancers* 11(9), 2019. <https://doi.org/10.3390/cancers11091236>
- [Mrowczynski et al. 2018] MROWCZYNSKI, Oliver; MADHANKUMAR, Achuthamangalam; SUNDBSTROM, Jeffrey; ZHAO, Yuanjun; IMAMURA, Yuka et al.: Exosomes impact survival to radiation exposure in cell line models of nervous system cancer. *Oncotarget* 9, 2018. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26300>
- [Mulcahy et al. 2014] MULCAHY, Laura A.; PINK, Ryan C.; AND, David Raul Francisco C.: Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *Journal of Extracellular Vesicles* 3(1), 2014, str. 24641. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.24641>
- [Munich et al. 2012] MUNICH, Stephan; SOBO-VUJANOVIC, Andrea; BUCHSER, William J.; BEER-STOLZ, Donna; AND, Nikola L. V.: Dendritic cell exosomes directly kill tumor cells and activate natural killer cells via TNF superfamily ligands. *OncoImmunology* 1(7), 2012, str. 1074–1083. <https://doi.org/10.4161/onci.20897>
- [Mutschelknaus et al. 2017] MUTSCHELKNAUS, Lisa; AZIMZADEH, Omid; HEIDER, Theresa; WINKLER, Klaudia; VETTER, Marcus et al.: Radiation alters the cargo of exosomes released from squamous head and neck cancer cells to promote migration of recipient cells. *Scientific Reports* 7(1), 2017, str. 12423. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12403-6>
- [Nasir i Mohd Siam 2019] NASIR, Hanis; MOHD SIAM, Fuaada: Simulation and Sensitivity Analysis on the Parameter of Non-Targeted Irradiation Effects Model. *Jurnal Teknologi* 81, 2019, str. 133–142. <https://doi.org/10.11113/jt.v81.12448>
- [Ni et al. 2019] NI, Jie; BUCCI, Joseph; MALOUF, David; KNOX, Matthew; GRAHAM, Peter; LI, Yong: Exosomes in Cancer Radioresistance. *Frontiers in Oncology* Volume 9 - 2019, 2019. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00869>
- [Nikjoo et al. 1999] NIKJOO, H.; O'NEILL, P.; TERRISSOL, M.; GOODHEAD, D. T.: Quantitative modelling of DNA damage using Monte Carlo track structure method. *Radiation and Environmental Biophysics* 38(1), 1999, str. 31–38. <https://doi.org/10.1007/s004110050135>
- [Nilsson et al. 2015] NILSSON, Jenny; BAUDEN, Monika P.; NILSSON, Jonas M.; STRAND, Sven-Erik; ELGQVIST, Jörgen: Cancer cell radiobiological studies using in-House-Developed α -particle irradiator. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* 30(9), 2015, str. 386–394. <https://doi.org/10.1089/cbr.2015.1895>

- [Nonaka i Wong 2017] NONAKA, Taichiro; WONG, David T.: Chapter Six - Saliva-Exosomics in Cancer: Molecular Characterization of Cancer-Derived Exosomes in Saliva. Wydanie: 2017. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.enz.2017.08.002>. W: HU, Tony Y. (Red.); TAMANOI, Fuyuhiko (Red.): *Peptidomics of Cancer-Derived Enzyme Products* Bd. 42. Academic Press, 2017. – ISSN 1874–6047, str. 125–151
- [Ohuchi 2007] OHUCHI, Hiroko: High sensitivity radiochromic film dosimetry using an optical common-mode rejection and a reflective-mode flatbed color scanner. *Medical Physics* 34(11), 2007, str. 4207–4212. <https://doi.org/10.1118/1.2795828>
- [Okada i Mak 2004] OKADA, Hitoshi; MAK, Tak W.: Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nature Reviews Cancer* 4(8), 2004, str. 592–603. <https://doi.org/10.1038/nrc1412>
- [Olko i Booz 1990] OLKO, P.; BOOZ, J.: Energy deposition by protons and alpha particles in spherical sites of nanometer to micrometer diameter. *Radiation and Environmental Biophysics* 29(1), 1990, str. 1–17. <https://doi.org/10.1007/BF01211231>
- [Oorschot et al. 2013] OORSCHOT, Bregje; HOVINGH, Suzanne; RODERMOND, Hans; GÜÇLÜ, Ahmet; LOSEKOOT, Nienke et al.: Decay of γ -H2AX foci correlates with potentially lethal damage repair in prostate cancer cells. *Oncology reports* 29, 2013. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2364>
- [Ostashevsky 1990] OSTASHEVSKY, JY: Prediction of cell survival curves from DNA double-strand break repair data for low-and high-LET radiation. *International journal of radiation biology* 57(3), 1990, str. 523–536. <https://doi.org/10.1080/09553009014552661>
- [Osterreicher et al. 2003] OSTERREICHER, Jan; PRISE, Kevin M.; MICHAEL, Barry D.; VOGT, Jürgen; BUTZ, Tilman; TANNER, Judith M.: Radiation-induced bystander effects. Mechanisms, biological implications, and current investigations at the Leipzig LIPSION facility. *Strahlentherapie und Onkologie: Organ der Deutschen Röntgengesellschaft...[et al]* 179(2), 2003, str. 69–77. <https://doi.org/10.1007/s00066-003-1000-9>
- [Pan et al. 1985a] PAN, B T.; TENG, K; WU, C; ADAM, M; JOHNSTONE, R M.: Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *Journal of Cell Biology* 101(3), 1985, str. 942–948. <https://doi.org/10.1083/jcb.101.3.942>
- [Pan et al. 1985b] PAN, B T.; TENG, K; WU, C; ADAM, M; JOHNSTONE, R M.: Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *Journal of Cell Biology* 101(3), 1985, str. 942–948. <https://doi.org/10.1083/jcb.101.3.942>
- [Pan et al. 2017] PAN, Jun; DING, Meng; XU, Kai; YANG, Chunhua; MAO, Li-Jun: Exosomes in diagnosis and therapy of prostate cancer. *Oncotarget* 8(57), 2017, str. 97693–97700. <https://doi.org/https://doi.org/10.18632/oncotarget.18532>
- [Park et al. 2014] PARK, Sunyoung; ANG, Richard R.; DUFFY, Simon P.; BAZOV, Jenny; CHI, Kim N. et al.: Morphological Differences between Circulating Tumor Cells from Prostate Cancer Patients and Cultured Prostate Cancer Cells. *PLOS ONE* 9(1), 2014, str. 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085264>

- [Parsons Jr et al. 1954] PARSONS JR, William B.; WATKINS, Charles H.; PEASE, Gertrude L.; CHILDS JR, Donald S.: Changes in sternal marrow following roentgen-ray therapy to the spleen in chronic granulocytic leukemia. *Cancer* 7(1), 1954, str. 179–189. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1097-0142\(195401\)7:1<179::AID-CNCR2820070120>3.0.CO;2-A](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1097-0142(195401)7:1<179::AID-CNCR2820070120>3.0.CO;2-A)
- [Philips Analytical B.V. 2001] PHILIPS ANALYTICAL B.V.: *PW3830 Generator 4kW, System User's Guide*. First Edition. Lelyweg 1, 7602 EA, Almelo, The Netherlands, 2001
- [Philips Analytical X-ray 1998] PHILIPS ANALYTICAL X-RAY: *Glass Diffraction X-Ray Tube Instruction Manual*. Netherlands, 1998. – Release 11.06.1998
- [PhysicsOpenLab 2016] PHYSICSOPENLAB: *Some Alpha and Beta Spectra*. <https://physicsopenlab.org/2016/11/05/some-alpha-spectra/>, 2016. – [Dostęp: 14.04.2025]
- [Pistrutto et al. 2016] PISTRITTO, Giuseppa; TRISCIUOGGIO, Daniela; CECI, Claudia; GARUFI, Alessia; D’ORAZI, Gabriella: Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (albany NY)* 8(4), 2016, str. 603–619. <https://doi.org/10.18632/aging.100934>
- [Pszczółkowska-Kępa et al. 2022] PSZCZÓŁKOWSKA-KĘPA, Beata; OLEJARZ, Wioletta; FILIPEK, Mateusz; TARTAS, Adrianna; KUBIAK-TOMASZEWSKA, Grażyna et al.: Exosome secretion and cellular response of DU145 and PC3 after exposure to alpha radiation. *Radiation and Environmental Biophysics* 61, 2022, str. 3. <https://doi.org/10.1007/s00411-022-00991-5>
- [Pucińska 2021] PUCIŃSKA, Julia: *Ocena skutków biologicznych ekspozycji komórek na promieniowanie lampy rentgenowskiej*, Wydział Fizyki, Uniwersytet Warszawski, Praca magisterska, 2021
- [Raposo i Stoorvogel 2013] RAPOSO, Graça; STOORVOGEL, Willem: Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology* 200(4), 2013, str. 373–383. <https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>
- [Ratajczak i Ratajczak 2020] RATAJCZAK, Mariusz Z.; RATAJCZAK, Janina: Extracellular microvesicles/exosomes: discovery, disbelief, acceptance, and the future? *Leukemia* 34(12), 2020, str. 3126–3135. <https://doi.org/10.1038/s41375-020-01041-z>
- [Reindl et al. 2017] REINDL, Judith; GIRST, Stefanie; WALSH, Dietrich W. M.; GREUBEL, Christoph; SCHWARZ, Benjamin et al.: Chromatin organization revealed by nanostructure of irradiation induced H2AX, 53BP1 and Rad51 foci. *Scientific Reports* 7(1), 2017, str. 40616. <https://doi.org/10.1038/srep40616>
- [Riballo et al. 2004] RIBALLO, Enriqueta; KÜHNE, Martin; RIEF, Nicole; DOHERTY, Aidan; SMITH, Graeme C. M. et al.: A Pathway of Double-Strand Break Rejoining Dependent upon ATM, Artemis, and Proteins Locating to γ-H2AX Foci. *Molecular Cell* 16(5), 2004, str. 715–724. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.10.029>
- [Roos i Kaina 2013] ROOS, Wynand P.; KAINA, Bernd: DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer letters* 332(2), 2013, str. 237–248. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.01.007>
- [Rucinski et al. 2021] RUCINSKI, Antoni; BIERNACKA, Anna; SCHULTE, Reinhard: Applications of nanodosimetry in particle therapy planning and beyond. *Physics in Medicine & Biology* 66(24), 2021, str. 24TR01. <https://doi.org/10.1088/1361-6560/ac35f1>

- [Röntgen 1895] RÖNTGEN, Wilhelm C.: Ueber eine neue Art von Strahlen. *Sitzungsberichte der Würzburger Physikalisch-Medizinischen Gesellschaft* 9, 1895, str. 132–141
- [Saga et al. 2019] SAGA, Ryo; MATSUYA, Yusuke; TAKAHASHI, Rei; HASEGAWA, Kazuki; DATE, Hiroyuki; HOSOKAWA, Yoichiro: Analysis of the high-dose-range radioresistance of prostate cancer cells, including cancer stem cells, based on a stochastic model. *Journal of radiation research* 60(3), 2019, str. 298–307. <https://doi.org/10.1093/jrr/rrz011>
- [Sakata et al. 2020] SAKATA, Dousatsu; BELOV, Oleg; BORDAGE, Marie-Claude; EMFIETZOGLU, Dimitris; GUATELLI, Susanna et al.: Fully integrated Monte Carlo simulation for evaluating radiation induced DNA damage and subsequent repair using Geant4-DNA. *Scientific Reports* 10(1), 2020, str. 20788. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75982-x>
- [Santivasi i Xia 2014] SANTIVASI, Wil L.; XIA, Fen: Ionizing radiation-induced DNA damage, response, and repair. *Antioxidants & redox signaling* 21(2), 2014, str. 251–259. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5668>
- [Scholz 2003] SCHOLZ, Michael: Effects of ion radiation on cells and tissues. *Radiation effects on polymers for biological use*, 2003, str. 95–155
- [Seymour i Mothersill 1997a] SEYMOUR, C.; MOTHERSILL, C.: Medium from irradiated human epithelial cells but not human fibroblasts reduces the clonogenic survival of unirradiated cells. *International Journal of Radiation Biology* 71(4), 1997, str. 421–427. <https://doi.org/10.1080/095530097144030>
- [Seymour i Mothersill 1997b] SEYMOUR, CB; MOTHERSILL, C: Delayed expression of lethal mutations and genomic instability in the progeny of human epithelial cells that survived in a bystander-killing environment. *Radiation Oncology Investigations: Clinical and Basic Research* 5(3), 1997, str. 106–110. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6823\(1997\)5:3<106::AID-ROI4>3.0.CO;2-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6823(1997)5:3<106::AID-ROI4>3.0.CO;2-1)
- [Seymour i Mothersill 2004] SEYMOUR, Colin B.; MOTHERSILL, Carmel: Radiation-induced bystander effects—implications for cancer. *Nature Reviews Cancer* 4(2), 2004, str. 158–164. <https://doi.org/10.1038/nrc1277>
- [Shahi et al. 2024] SHAHI, Sanjay; KANG, Taeyoung; FONSEKA, Pamali: Extracellular Vesicles in Pathophysiology: A Prudent Target That Requires Careful Consideration. *Cells* 13(9), 2024. <https://doi.org/10.3390/cells13090754>
- [Sherin et al. 2013] SHERIN, Danielle; ANDRAIS, B; MIRZAYANS, Razmik; SIEGBAHN, Albert; FALLONE, Biagio; WARKENTIN, Brad: Comparison of two methods for measuring H2AX nuclear fluorescence as a marker of DNA damage in cultured human cells: Applications for microbeam radiation therapy. *Journal of Instrumentation* 8, 2013, str. C06008. <https://doi.org/10.1088/1748-0221/8/06/C06008>
- [Shibata et al. 2011] SHIBATA, Atsushi; CONRAD, Sandro; BIRRAUX, Julie; GEUTING, Verena; BARTON, Olivia et al.: Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase. *The EMBO Journal* 30(6), 2011, str. 1079–1092. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/emboj.2011.27>
- [Skrzypczak i Szepliński 2012] SKRZYPCZAK, E.; SZEPLIŃSKI, Z.: *Wstęp do fizyki jądra atomowego i cząstek elementarnych*. Wydanie II. Uniwersytet Warszawski. Wydział Fizyki, 2012

- [Smolarz et al. 2022] SMOLARZ, Mateusz; SKOCZYŁAS, Łukasz; GAWIN, Marta; KRZYŻOWSKA, Monika; PIETROWSKA, Monika; WIDŁAK, Piotr: Radiation-Induced Bystander Effect Mediated by Exosomes Involves the Replication Stress in Recipient Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 23(8), 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms23084169>
- [Sobel i Sadar 2005] SOBEL, R.E.; SADAR, M.D.: Cell Lines Used in Prostate Cancer Research: A Compendium of Old and New Lines-Part 1. *The Journal of Urology* 173(2), 2005, str. 342–359. <https://doi.org/https://doi.org/10.1097/01.ju.0000141580.30910.57>
- [Sofińska et al. 2022] SOFIŃSKA, Kamila; CIEŚLA, Michał; BARBASZ, Jakub; WILKOSZ, Natalia; LIPIEC, Ewelina et al.: Double-strand breaks quantification by statistical length analysis of DNA fragments imaged with AFM. *Measurement* 198, 2022, str. 111362. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.measurement.2022.111362>
- [Srivastava i Khanna 2009] SRIVASTAVA, Rajat; KHANNA, K.: Stokes–Einstein Relation in Two- and Three-Dimensional Fluids†. *Journal of Chemical and Engineering Data - J CHEM ENG DATA* 54, 2009. <https://doi.org/10.1021/je800698t>
- [Stevens et al. 1996] STEVENS, MA; TURNER, J; HUGTENBURG, Richard; BUTLER, Philip: High-resolution dosimetry using radiochromic film and a document scanner. *Physics in medicine and biology* 41, 1996, str. 2357–65. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/41/11/008>
- [Stone et al. 1978] STONE, Kenneth R.; MICKEY, Don D.; WUNDERLI, Heidi; MICKEY, George H.; PAULSON, David F.: Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *International Journal of Cancer* 21(3), 1978, str. 274–281. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ijc.2910210305>
- [Strzałkowski 1979] STRZĄLKOWSKI, Adam: *Wstęp do fizyki jądra atomowego*. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, 1979
- [Subra et al. 2007] SUBRA, Caroline; LAULAGNIER, Karine; PERRET, Bertrand; RECORD, Michel: Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie* 89(2), 2007, str. 205–212. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.10.014>
- [Suetens et al. 2015] SUETENS, Annelies; MOREELS, Marjan; QUINTENS, Roel; SOORS, Els; BUSET, Jasmine et al.: Dose- and time-dependent gene expression alterations in prostate and colon cancer cells after in vitro exposure to carbon ion and X-irradiation. *Journal of radiation research* 56(1), 2015, str. 11–21. <https://doi.org/10.1093/jrr/rru070>
- [Sutherland et al. 2000] SUTHERLAND, Betsy M.; BENNETT, Paula V.; SIDORKINA, Olga; LAVAL, Jacques: Clustered DNA damages induced in isolated DNA and in human cells by low doses of ionizing radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(1), 2000, str. 103–108. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.1.103>
- [Szumiel 2008] SZUMIEL, I.: Intrinsic Radiation Sensitivity: Cellular Signaling is the Key. *Radiation Research* 169(3), 2008, str. 249 – 258. <https://doi.org/10.1667/RR1239.1>
- [TaKaRa Bio Inc. 2020] TAKARA BIO INC.: *LDH Cytotoxicity Detection Kit Product Manual*, 2020. https://www.takarabio.com/documents/User%20Manual/MK401_e.v2009.pdf. – For Research Use Only. Cat. #MK401

- [Théry et al. 2018] THÉRY, Clotilde; WITWER, Kenneth W.; AIKAWA, Elena; ALCARAZ, Maria J.; ANDERSON, Johnathon D. et al.: Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles* 7(1), 2018, str. 1535750. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>
- [Tian et al. 2013] TIAN, Tian; ZHU, Yan-Liang; HU, Fei-Hu; WANG, Yuan-Yuan; HUANG, Ning-Ping; XIAO, Zhong-Dang: Dynamics of exosome internalization and trafficking. *Journal of Cellular Physiology* 228(7), 2013, str. 1487–1495. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jcp.24304>
- [Trzos et al. 2020] TRZOS, Arkadiusz; KUDŁA, Wiktoria; ŁYZIŃSKI, Karol; KORMAN, Michał: Health effects of exposure to Ionising radiation. *Safety & Fire Technology* 55(1), 2020, str. 32–47. <https://doi.org/10.12845/sft.55.1.2020.3>
- [Urabe et al. 2020] URABE, Fumihiko; KOSAKA, Nobuyoshi; ITO, Kagenori; KIMURA, Takahiro; EGAWA, Shin; OCHIYA, Takahiro: Extracellular vesicles as biomarkers and therapeutic targets for cancer. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 318(1), 2020, str. C29–C39. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00280.2019>
- [Van et al. 2023] VAN, Benjamin; DEWARAJA, Yuni K.; NIEDEBALA, Jeremy T.; ROSEBUSH, Gerid; KAZMIERSKI, Matthew et al.: Experimental validation of Monte Carlo dosimetry for therapeutic beta emitters with radiochromic film in a 3D-printed phantom. *Medical physics* 50(1), 2023, str. 540–556. <https://doi.org/10.1002/mp.15926>
- [Verkhovtsev et al. 2019] VERKHOVTSEV, Alexey; SURDUTOVICH, Eugene; SOLOV'YOV, Andrey V.: Phenomenon-based evaluation of relative biological effectiveness of ion beams by means of the multiscale approach. *Cancer Nanotechnology* 10(1), 2019, str. 4. <https://doi.org/10.1186/s12645-019-0049-9>
- [Vucic et al. 2006] VUCIC, Vesna; ISENOVIC, Esma; ADZIC, Miroslav; RUZDIJIC, Sabera; RADOJCIC, Marija: Effects of gamma-radiation on cell growth, cycle arrest, death, and superoxide dismutase expression by DU 145 human prostate cancer cells. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]* 39, 2006, str. 227–36. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2006000200009>
- [Watson i Crick 1953] WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C.: Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 171(4356), 1953, str. 737–738. <https://doi.org/10.1038/171737a0>
- [Webber et al. 1997] WEBBER, Mukta M.; BELLO, Diana; QUADER, Salmaan: Immortalized and tumorigenic adult human prostatic epithelial cell lines: Characteristics and applications part 2. Tumorigenic cell lines. *The Prostate* 30(1), 1997, str. 58–64. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0045\(19970101\)30:1<58::AID-PROS9>3.0.CO;2-H](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0045(19970101)30:1<58::AID-PROS9>3.0.CO;2-H)
- [Weinfeld et al. 2011] WEINFELD, Michael; MANI, Rajam S.; ABDOLU, Ismail; ACEYTUNO, R. D.; GLOVER, J. N. M.: Tidying up loose ends: the role of polynucleotide kinase/phosphatase in DNA strand break repair. *Trends in Biochemical Sciences* 36(5), 2011, str. 262–271. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.01.006>

- [Wesołowska i Piwocka 2017] WESOŁOWSKA, Agnieszka; PIWOCKA, Katarzyna: Egzosomalne mikroRNA jako element komunikacji międzykomórkowej w nowotworach. *Postępy Biochemii* 63(2), 2017, str. 110–118
- [Wikibooks contributors] WIKIBOOKS CONTRIBUTORS: *Strona internetowa*. https://pl.wikibooks.org/wiki/Plik:Chromosom_pl.svg, . – [Dostęp: 30.04.2025]
- [Winch et al. 2017] WINCH, Nicola; WATSON, Scott; HUNTER, James: Modeling blur in various detector geometries for MeV radiography, 2017, str. 101323U
- [Wojcik et al. 2017] WOJCIK, Andrzej; OESTREICHER, Ursula; BARRIOS, Lleonard; VRAL, Anne; TERZOUDI, Georgia et al.: The RENEb operational basis: complement of established biodosimetric assays. *International journal of radiation biology* 93(1), 2017, str. 15–19. <https://doi.org/10.1080/09553002.2016.1235296>
- [Wojcik et al. 2024] WOJCIK, Andrzej; THIERRY-CHEF, Isabelle; FRIEDL, Anna A.; RÜHM, Werner: Minimum reporting standards about dosimetry of radiation sources used in radiation research studies. *Radiation and Environmental Biophysics* 63(2), 2024, str. 181–183. <https://doi.org/10.1007/s00411-024-01063-6>
- [Wolf 1967] WOLF, Peter: The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma. *British Journal of Haematology* 13(3), 1967, str. 269–288. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x>
- [Wu et al. 2013] WU, Chun-Te; CHEN, Miao-Fen; CHEN, Wen-Cheng; HSIEH, Ching-Chuan: The role of IL-6 in the radiation response of prostate cancer. *Radiation oncology* 8, 2013, str. 1–11. <https://doi.org/10.1186/1748-717X-8-159>
- [Wójtowicz et al. 2014] WÓJTOWICZ, Aneta; BAJ-KRZYWORZEKA, Monika; BARAN, Jarek: Characterization and biological role of extracellular vesicles. *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej (Online)* 68, 2014, str. 1421–32. <https://doi.org/10.5604/17322693.1130655>
- [Yang et al. 2007] YANG, Hongying; ANZENBERG, Vered; HELD, Kathryn D.: The time dependence of bystander responses induced by iron-ion radiation in normal human skin fibroblasts. *Radiation research* 168(3), 2007, str. 292–298. <https://doi.org/10.1667/RR0864.1>
- [Yang et al. 2005] YANG, Hongying; ASAAD, Nesrin; HELD, Kathryn D.: Medium-mediated intercellular communication is involved in bystander responses of X-ray-irradiated normal human fibroblasts. *Oncogene* 24(12), 2005, str. 2096–2103. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208439>
- [Yap et al. 2025] YAP, Jacinta; BAL, Navrit; BROOKE, Mark; OANCEA, Cristina; GRANJA, Carlos et al.: *LET measurements and simulation modelling of the charged particle field for the Clatterbridge ocular proton therapy beamline*
- [Yu et al. 2006] YU, Xin; HARRIS, Sandra L.; LEVINE, Arnold J.: The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein. *Cancer research* 66(9), 2006, str. 4795–4801. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4579>
- [Zaichick i Zaichick 2016] ZAICHICK, Vladimir; ZAICHICK, Sofia: Distinguishing malignant from benign prostate using content of 17 chemical elements in prostatic tissue. *Integrative Cancer Science and Therapeutics* 3, 2016. <https://doi.org/10.15761/ICST.1000208>

- [Zhang et al. 2015] ZHANG, Jian; LI, Sha; LI, Lu; LI, Meng; GUO, Chongye et al.: Exosome and Exosomal MicroRNA: Trafficking, Sorting, and Function. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 13(1), 2015, str. 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.02.001>
- [Zhang et al. 2019] ZHANG, Yuan; LIU, Yunfeng; LIU, Haiying; TANG, Wai H.: Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell & Bioscience* 9(1), 2019, str. 19. <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0282-2>
- [Zhao et al. 2019] ZHAO, Hong; ZHUANG, Yafei; LI, Ruibin; LIU, Yinyin; MEI, Zijie et al.: Effects of different doses of X-ray irradiation on cell apoptosis, cell cycle, DNA damage repair and glycolysis in HeLa cells. *Oncol Lett* 17(1), 2019, str. 42–54. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9566>
- [Zhou et al. 2000] ZHOU, Hongning; RANDERS-PEHRSON, Gerhard; WALDREN, Charles A.; VANNAIS, Diane; HALL, Eric J.; HEI, Tom K.: Induction of a bystander mutagenic effect of alpha particles in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(5), 2000, str. 2099–2104. <https://doi.org/10.1073/pnas.030420797>
- [Zhou et al. 2002] ZHOU, Hongning; SUZUKI, Masao; GEARD, Charles R.; HEI, Tom K.: Effects of irradiated medium with or without cells on bystander cell responses. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 499(2), 2002, str. 135–141. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(01\)00285-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0027-5107(01)00285-8)
- [Ziegler et al. 2010] ZIEGLER, James F.; ZIEGLER, M.D.; BIRSACK, J.P.: SRIM – The stopping and range of ions in matter (2010). *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 268(11), 2010, str. 1818–1823. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nimb.2010.02.091>

Dodatek A

Protokół laboratoryjny hodowli komórek PC3 i DU145

Przygotowanie pożywki do hodowli

Pożywka stosowana do hodowli komórkowej stanowi podstawowe środowisko wzrostowe hodowanych komórek, zastępując ich naturalne środowisko życia i wzrostu. Pożywka powinna być bogata w składniki odżywcze, takie jak cukry, aminokwasy, witaminy i minerały. Ważne jest, aby skład pożywki zapewniał odpowiednie pH oraz osmolalność. Dla każdej linii komórkowej dobiera się specyficzną pożywkę hodowlaną, która najlepiej wspiera rozwój komórek.

W przypadku komórek nowotworowych gruczołu krokowego, PC3 i DU145, pożywkę komórkową stanowi roztwór zmodyfikowanej pożywki DMEM-F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium, VWR, nr kat. 392-0411) suplementowany 10% płodową surowicą bydlęcą (FBS, z ang. *Fetal Bovine Serum*, Biowest, nr kat. S1810) zapewniającą odpowiedni wzrost komórek oraz 2% antybiotykiem (roztwór penicyliny streptomycyny, Gibco, nr kat. 15140122) warunkującym silniejszą ochronę komórek przed kontaminacją grzybową lub bakteryjną.

Pasażowanie komórek

Komórki PC3 i DU145 były hodowane w butelce T-75 (powierzchnia wzrostu 75 cm²). Czynności związane z pasażowaniem komórek były wykonywane trzy razy w tygodniu. Poszczególne kroki wykonywania pasażu komórek zostały przedstawione poniżej. Wszystkie procedury związane z komórkami zostały wykonane przy użyciu komory laminarnej (z wyjątkiem obserwowania komórek pod mikroskopem).

1. Pierwszym krokiem jest usunięcie z butelki starej pożywki wzrostowej, a następnie przepłukanie dna butelki 10 ml soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS, z ang. *Phosphate Buffered Saline*).
2. Po przepłukaniu należy wylać płyn z butelki i dodać 2 ml trypsyny (Gibco, nr kat. 25200072), która jest enzymem trawiennym umożliwiającym komórkom odklejenie się od dna butelki. Należy delikatnie poruszyć butelką, aby trypsyna pokryła całe dno i umieścić w inkubatorze na 2 min inkubacji w temperaturze 37°C.
3. Po upływie 2 minut, należy obejrzeć komórki pod mikroskopem, aby mieć pewność, że czas trypsynizacji oraz ilość trypsyny były odpowiednie. Po odklejeniu komórek od dna naczynia hodowlanego należy dodać do butelki 8 ml pożywki, w celu zawieszenia komórek w pożywce hodowlanej.
4. Przy użyciu automatycznego licznika komórkowego należy policzyć komórki, które znajdują się w butelce. W tym celu należy pobrać próbkę zawieszonych komórek (0,5-1 ml) do probówki Eppendorfa. Z probówki Eppendorfa z komórkami należy pobrać 20 μ m i przelać do drugiej probówki Eppendorfa. Następnie należy pobrać taką samą objętość roztworu błękitu trypanu (z ang. *Trypan Blue*), jak zawiesiny komórkowej i umieścić ją w tej samej probówce Eppendorf. Po dokładnym wymieszaniu, należy pobrać 10 μ m roztworu i przelać na płytkę do zliczania komórek, którą następnie należy umieścić w liczniku.
5. Po wykonaniu pomiarów, pozostałe 9-9,5 ml zawiesiny komórkowej należy podzielić do nowych butelek według odpowiednich proporcji. Zalecany stosunek subkultywacji wynosi od 1:3 do 1:6. Jeśli dzielimy komórki w proporcji 1:5 (używanej w tej pracy), to w oryginalnej butelce hodowlanej należy zostawić 2 ml komórek i dodać do nich 8 ml pożywki, aby uzyskać całkowitą objętość 10 ml.

Dodatek B

Protokół laboratoryjny izolacji egzosomów

Wstępne oczyszczanie supernatantu komórkowego

Na potrzeby niniejszej pracy egzosomy zostały wyizolowane z linii komórkowej gruczołu krokowego: komórek PC3 oraz DU145.

1. Pierwszym krokiem jest zebranie supernatantu komórkowego do falkonu.
2. Następnie należy umieścić falkon z supernatantem w wirówce (2000 *g* przez 10 minut).
3. W kolejnym kroku należy przenieść supernatant do probówek Eppendorfa i umieścić w wirówce (10000 *g* przez 30 minut w temperaturze 4°C).
4. Na koniec należy przefiltrować supernatant przez filtr strzykawkowy 0,22 µm do kolejnego falkona.

Przygotowanie kolumny Econo-Pac® Chromatography Columns

1. Pierwszym krokiem jest odłamanie z dolnej części kolumny jej końcówki oraz zaznaczenie wartości 10 ml na skali kolumny przy pomocy markera.
2. Następnie należy umieścić kolumnę w statywie (w pozycji pionowej) nad zlewką, która zostanie wykorzystana jako pojemnik na zlewki.
3. Sefarozę należy nanosić do kolumny jednostajnym powolnym ruchem, nalewając ją po ścianie tak, by końcowa objętość zawiesiny w kolumnie osiągnęła

objętość 10 ml.

Ważne:

- *Sefaroza powinna mieć temperaturę zbliżoną do pokojowej.*
- *Sefaroza powinna być bardzo dokładnie wymieszana (należy mieszczać delikatnie, aby uniknąć powstania pęcherzyków powietrza oraz piany).*
- *Nie należy odciągać nadmiaru sefarozy z kolumny.*
- *Powolne, ale jednostajne wypełnianie kolumny oraz brak pęcherzyków powietrza są kluczowe do zapewnienia równomiernej porowatości podłoża.*

4. Jeżeli zawiesina z kolumny przestanie kapać (oznacza to zakończenie procesu sieciowania sefarozy) to należy zamknąć (ostrożnie) kolumnę korkiem oraz zainstalować złoże krzemionkowe na powierzchni sefarozy.

Ważne:

- *Kolumna cały czas powinna znajdować się dokładnie w pozycji pionowej.*
- *Złoże krzemionkowe powinno być umieszczone równolegle do podłoża i powinno ściśle do niego przylegać.*
- *Do umieszczenia filtra krzemionkowego w kolumnie nie należy używać przedmiotów o ostrym zakończeniu, które mogą zniszczyć jego strukturę lub uniemożliwić wprowadzenie filtra w pozycji równoległej do powierzchni sefarozy.*

5. Upakowaną i pozbawioną pęcherzyków powietrza kolumnę należy przepłukać 10 ml PBS.

Od tej chwili należy z dużą ostrożnością używać kolumny. Musi ona być zabezpieczona przed wyschnięciem, które dyskwalifikuje ją do dalszego użytkowania. Po przemyciu PBS kolumna jest gotowa do procesu izolacji.

Zatężenie supernatantu komórkowego w Vivaspin®20

1. Pierwszym krokiem jest wymieszanie zawartości falkonu, w którym znajduje się przefiltrowany supernatant komórkowy.

2. Następnie należy nanieść 20 ml supernatantu do górnej części koncentratora i umieścić go w wirówce (2000 *g* przez 10 minut).

Ważne: Jeżeli objętość supernatantu jest większa niż 20 ml to należy pozostawić nadmiar do kolejnego procesu koncentrowania.

3. Po 10 minutach wirowania należy sprawdzić poziom pożywki w koncentratorze. Czas wirowania należy dopasować do szybkości przefiltrowywania się roztworu. Supernatant komórkowy należy wirować tak długo, aż zostanie nieco mniej niż 1 ml.

Ważne: Należy zwrócić uwagę, żeby zakrętki koncentratora posiadały otwór, co zapobiega wytworzeniu podciśnienia. Należy również pamiętać o usuwaniu przefiltrowanej pożywki z dolnej części koncentratora.

4. Po zakończonym procesie wirowania należy zebrać supernatant z rynienki znajdującej się w górnej części koncentratora do probówki Eppendorfa i dokładnie określić jego objętość. Objętość medium powinna wynosić 1 ml. Jeśli wynosi mniej, należy uzupełnić PBS.

Izolacja egzosomów na kolumnie Econo-Pac® Chromatography Columns

1. Pierwszym krokiem po przepłukaniu kolumny 10 ml PBS (co jest elementem procesu przygotowania kolumny) jest naniesienie 1 ml uprzednio zatężonego supernatantu i oczekiwanie aż przestanie kapać (frakcja #0).

Ważne: Przed naniesieniem supernatantu na membranę krzemionkową należy go dokładnie wymieszać.

2. Następnie należy dodać 1 ml PBS do kolumny w celu wypłukania #1. Kiedy przestanie kapać, należy dodać kolejną porcję objętości 1 ml PBS, aby wypłukać frakcję #2. Czynność należy powtórzyć ponownie w celu elucji frakcji #3.
3. Na koniec należy dodać 1 ml PBS i zebrać tę frakcję (#4) do probówki Eppendorfa. Frakcja ta jest najbardziej bogata w egzosomy.

Dodatek C

Materiały uzupełniające

Wyznaczenie wartości dawki na podstawie zaczerwnienia filmów radiochromowych polegało na odczytaniu wartości średniej oraz odchylenia standardowego intensywności piksela dla kanału czerwonego. Na ich podstawie oraz dostępnej krzywej kalibracyjnej została obliczona wartość dawki (wzór 3.2) wraz z jej niepewnością (wzór 3.3).

Tabela C.1. Średnie wartości intensywności piksela i dawki promieniowania dla różnych czasów napromieniania.

Czas [s]	Średnia intensywność piksela	Dawka [Gy]	$\overline{D}$ [Gy]
Kontrola	46000 $\pm$ 630	0,000 $\pm$ 0,041	0,001 $\pm$ 0,024
	46000 $\pm$ 570	0,004 $\pm$ 0,041	
	46000 $\pm$ 590	-0,001 $\pm$ 0,041	
5	37000 $\pm$ 850	0,323 $\pm$ 0,059	0,331 $\pm$ 0,029
	37000 $\pm$ 870	0,318 $\pm$ 0,060	
	37000 $\pm$ 950	0,332 $\pm$ 0,063	
	36000 $\pm$ 1200	0,340 $\pm$ 0,073	
	36000 $\pm$ 1100	0,351 $\pm$ 0,069	
10	33000 $\pm$ 1100	0,500 $\pm$ 0,078	0,535 $\pm$ 0,038
	33000 $\pm$ 1200	0,544 $\pm$ 0,091	
	33000 $\pm$ 1100	0,544 $\pm$ 0,084	
	32000 $\pm$ 1300	0,568 $\pm$ 0,094	
	33000 $\pm$ 1100	0,531 $\pm$ 0,081	
15	30000 $\pm$ 1500	0,70 $\pm$ 0,12	0,696 $\pm$ 0,051
	30000 $\pm$ 1300	0,71 $\pm$ 0,11	
	30000 $\pm$ 1300	0,69 $\pm$ 0,11	
	31000 $\pm$ 1500	0,68 $\pm$ 0,12	

dalsza część na kolejnej stronie

Tabela C.1 – Kontynuacja

Czas [s]	Średnia intensywność piksela	Dawka [Gy]	$\bar{D}$ [Gy]
	30000 ± 1400	$0,70 \pm 0,11$	
20	27000 ± 1600	$1,00 \pm 0,17$	$1,008 \pm 0,075$
	26000 ± 1800	$1,04 \pm 0,20$	
	27000 ± 1600	$0,98 \pm 0,16$	
	26000 ± 1500	$1,01 \pm 0,16$	
	26000 ± 1500	$1,02 \pm 0,16$	
30	21000 ± 2200	$1,68 \pm 0,38$	$1,68 \pm 0,15$
	21000 ± 1900	$1,66 \pm 0,32$	
	22000 ± 1900	$1,59 \pm 0,31$	
	21000 ± 2000	$1,79 \pm 0,37$	
	22000 ± 1800	$1,55 \pm 0,28$	
45	18000 ± 2400	$2,43 \pm 0,65$	$2,43 \pm 0,26$
	18000 ± 2100	$2,37 \pm 0,56$	
	18000 ± 1800	$2,45 \pm 0,51$	
	18000 ± 2100	$2,48 \pm 0,58$	
	18000 ± 2500	$2,42 \pm 0,69$	
60	13000 ± 3100	$4,1 \pm 1,8$	$4,18 \pm 0,61$
	13000 ± 2900	$4,2 \pm 1,8$	
	13000 ± 2000	$4,1 \pm 1,2$	
	13000 ± 1800	$4,2 \pm 1,1$	
	13000 ± 2200	$4,3 \pm 1,4$	