



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Fizyki
Instytut Fizyki Doświadczalnej
Zakład Fizyki Jądrowej

Rozprawa doktorska

Straty energii cząstek α
o wysokim współczynniku LET i ich wpływ
na rozkład dawki oraz odpowiedź biologiczną
w komórkach glejaka linii M059J i M059K

Martyna Araszkiewicz

Promotor: dr hab. Agnieszka Korgul, prof. UW
Uniwersytet Warszawski, Wydział Fizyki

Promotor pomocniczy: dr Katarzyna Tymińska
Narodowe Centrum Badań Jądrowych

Dyscyplina: Nauki fizyczne

listopad 2025

Streszczenie

Promieniowanie α stanowią ciężkie, dodatnio naładowane cząstki o wysokim liniowym przekazie energii (LET). Ich oddziaływanie powoduje gęstą jonizację ośrodka w niewielkim zasięgu, co prowadzi do powstawania złożonych uszkodzeń DNA, często przekraczających możliwości naprawcze komórki i skutkujących jej śmiercią.

Ze względu na te właściwości, cząstki α znajdują zastosowanie w terapiach nowotworowych, takich jak celowana terapia α , wykorzystująca izotopy emitujące promieniowanie α , oraz terapia borowo-neutronowa, w której reakcja stabilnego jądra ^{10}B z neutronami termicznymi prowadzi do emisji cząstek α oraz jonów ^7Li . Obie metody stosowane są w leczeniu trudno dostępnych i nawracających nowotworów, takich jak glejak wielopostaciowy, przy czym kluczowym wyzwaniem pozostaje precyzyjne określenie zasięgu i dawki promieniowania w tkance docelowej.

W niniejszej pracy badano własności cząstek α emitowanych z powierzchniowego źródła ^{241}Am stanowiącego element układu do napromieniania próbek biologicznych. Za pomocą modelowania Monte Carlo określono rozkład energii, LET oraz dawkę deponowaną w próbce, a wyniki zweryfikowano eksperymentalnie.

Układ pomiarowy wykorzystano do napromieniania dwóch linii komórkowych glejaka – M059J oraz M059K – różniących się ekspresją genu *PRKDC* kodującego białko DNA-PKcs, kluczowe dla naprawy dwuniciowych pęknięć DNA. Oceniono frakcję przeżywającą komórek, cytotoksyczność cząstek α , liczbę ognisk γH2AX metodą immunofluorescencyjną oraz ekspresję 30 genów związanych z naprawą DNA metodą RT-PCR.

Wyniki wskazują, że większość cząstek α docierających do monowarstwy komórek charakteryzują się LET w zakresie $60\text{--}260\text{ keV}/\mu\text{m}$, co potwierdza ich wysoką skuteczność biologiczną w indukowaniu złożonych uszkodzeń DNA. Obie linie komórkowe wykazują zależny od dawki spadek przeżywalności, a napromienienie cząstkami o wysokim LET prowadzi do zbliżonego poziomu przeżycia. Liczba ognisk naprawczych rośnie wraz z dawką, przy czym linia M059J charakteryzuje się bardziej dynamicznym wzrostem ich liczby i bardziej złożoną strukturą.

Napromienienie cząstkami α indukuje silniejszą odpowiedź transkrypcyjną w komórkach M059J niż w M059K, co odzwierciedla kompensacyjną adaptację do braku białka DNA - PKcs. Profilowanie ekspresji genów naprawy DNA oraz ocena statusu DNA - PKcs mogą stanowić podstawę do klasyfikacji pacjentów z glejakiem wielopostaciowym w celu opracowania spersonalizowanej radioterapii i terapii ukierunkowanych na naprawę DNA

Słowa kluczowe

promieniowanie jonizujące, cząstki α , liniowy przekaz energii (LET), MCNP (Monte Carlo N-Particle code), dozymetria, dawka, M059J, M059K, glejak, uszkodzenia DNA, ekspresja genów

Abstract

Alpha radiation consists of heavy, positively charged particles with a high linear energy transfer (LET). Their interactions cause dense ionization within a short range, leading to complex DNA damage that often exceeds the capacity of cellular mechanisms responsible for repairing double-strand breaks, ultimately resulting in cell death.

Due to these properties, alpha particles are used in cancer treatments such as targeted alpha therapy, which employs isotopes emitting alpha radiation, and boron neutron capture therapy, in which the reaction of the stable nucleus ^{10}B with thermal neutrons produces alpha particles and ^7Li ions. Both methods are used to treat, hard to reach, and recurrent tumors, such as glioblastoma multiforme, although a major challenge remains the precise determination of the radiation field and dose within the target tissue.

In this study, alpha particles emitted from a ^{241}Am surface source, an element of a system designed for irradiating biological samples, were characterized. Using Monte Carlo modeling, the energy distribution, LET, and absorbed dose in the sample were determined, and the results were verified experimentally.

The system was used to irradiate two glioblastoma cell lines, M059J and M059K, that differ in *PRKDC* expression, which encodes the DNA-PKcs protein, an essential factor in double-strand break repair. The surviving fraction of cells, alpha particle cytotoxicity, the number of γH2AX foci using immunofluorescence staining, and the expression of 30 DNA repair-related genes using RT-PCR were assessed.

The results indicate that most of the particles α reaching the cell monolayer are characterized by a LET in the range 60–260 $\text{keV}/\mu\text{m}$, confirming their high biological effectiveness in inducing complex DNA damage. Both cell lines show a dose-dependent decrease in survival, and irradiation with high-LET particles leads to similar survival levels. The number of repair foci increases with dose, with M059J cells displaying more dynamic increase and more complex foci structures.

Irradiation with alpha particles induces a stronger transcriptional response in M059J cells than in M059K cells, reflecting a compensatory adaptation to the absence of DNA-PKcs. DNA repair gene expression profiling and assessment of DNA-PKcs status may serve as a basis for stratifying glioblastoma multiforme patients toward personalized radiotherapy and DNA repair-targeted therapies.

Keywords

ionizing radiation, α particles, linear energy transfer (LET), MCNP (Monte Carlo N-Particle code), dosimetry, dose, M059J, M059K, glioblastoma, DNA damage, gene expression.

Podziękowania

Najwyższe wyrazy podziękowania składam moim promotorkom.

***Agnieszce Korgul** za nieustającą pomoc w trakcie przygotowywania rozprawy doktorskiej oraz nieograniczone wsparcie, nie tylko merytoryczne.*

***Katarzynie Tymińskiej**, mentorce w obliczeniach Monte Carlo, za każdą wskazówkę, dobrą radę oraz ciepłe podejście, w każdej sytuacji.*

*Chciałabym wyrazić również ogromną wdzięczność **Urszuli Kaźmierczak** za wprowadzenie w świat hodowli komórkowej i każdą godzinę spędzoną wspólnie w laboratorium, a także **Kamili Maliszewskiej-Olejniczak** za merytoryczne rady, poświęcony czas oraz ogromną pomoc w wykonaniu eksperymentów ekspresji genów.*

*Składam podziękowania Pani **Beacie Wielgus-Kutrowskiej**, **Renacie Grzeli** oraz **Annie Stankiewicz-Drogoń** za otwartość na współpracę oraz dzielenie się wiedzą i doświadczeniem.*

*Pragnę podziękować **Marcie Maleszewskiej-Bobińskiej** oraz **Bohdanowi Paterczykowi** za ciepłe przyjęcie na Wydziale Biologii oraz wsparcie przy obrazowaniu komórek.*

*Słowa podziękowania kieruję również w stronę Pani **Anety Malinowskiej** oraz Pana **Rocha Kwiatkowskiego** za owocną współpracę przy pomiarach z detektorami śladowymi.*

*Pragnę podziękować również **Patrycji Chuchale** i **Patrycji Kamińskiej**, za to, że mogłam na Was liczyć przy pracy laboratoryjnej.*

*Dziękuję mojej siostrze **Zuzannie** oraz **Sewerynowi Słodownikowi** za pomocną dłoń w tworzeniu i edycji rysunków do niniejszej pracy.*

*Dziękuję również moim **Bliskim** i **Przyjaciółom** za motywację do codziennego działania. Bez Was ta praca by nie powstała.*

Spis treści

Spis rysunków	xii
Spis tabel	xiii
Wykaz skrótów	xv
Motywacja	xvii
Cel pracy	xix
1 Wstęp	1
1.1 Promieniowanie jonizujące	1
1.2 Izotop ^{241}Am	1
1.3 Oddziaływanie promieniowania γ z materią	2
1.4 Oddziaływanie ciężkich cząstek naładowanych z materią	5
1.5 Linear Energy Transfer	7
1.6 Dawki promieniowania jonizującego	8
1.7 Budowa i organizacja DNA	9
1.8 Ekspresja genów	10
1.9 Cykl komórkowy i punkty kontrolne	11
1.10 Oddziaływanie promieniowania jonizującego na poziomie komórkowym	13
1.11 Uszkodzenia i naprawa DNA	14
1.12 Śmierć komórkowa	16
1.13 Naprawa dwuniciowych pęknięć DNA	17
1.14 Białko DNA-PKcs	19
2 Układ eksperymentalny	21
2.1 Geometria układu eksperymentalnego	21
2.1.1 Mikroskopia konfokalna	22
2.1.2 Pomiary próbki biologicznej	23
2.2 Obliczenia Monte Carlo	30
2.2.1 Program MCNP	30
2.2.1.1 Input do programu MCNP	31
2.2.1.2 Modele transportu ciężkich jonów w programie MCNP	33
2.2.2 Model układu eksperymentalnego	34
2.2.3 Obliczenia wykonane za pomocą programu MCNP	36

2.3	Weryfikacja obliczeń Monte Carlo	39
2.3.1	Pomiary za pomocą detektora krzemowego	39
2.3.2	Pomiary za pomocą detektora śladowego	42
2.4	Dozymetria układu eksperymentalnego	47
2.4.1	Wyznaczenie dawki	47
2.4.2	Rozkład energii cząstek α	49
2.4.3	LET cząstek α	53
3	Badania na liniach komórkowych	55
3.1	Linie komórkowe M059J i M059K	55
3.2	Test przeżywalności	57
3.2.1	Procedura testu przeżywalności	59
3.2.2	Analiza wyników testu przeżywalności	60
3.3	Test cytotoksyczności (MTT)	63
3.3.1	Procedura testu MTT	64
3.3.2	Analiza wyników testu MTT	65
3.4	Test γ H2AX	66
3.4.1	Procedura testu γ H2AX	66
3.4.2	Analiza wyników testu γ H2AX	68
3.5	Badanie ekspresji genów	70
3.5.1	Procedura testu RT-qPCR	72
3.5.2	Detekcja mykoplazmy	75
3.5.3	Analiza ekspresji genów	76
3.6	Analiza statystyczna	78
4	Wyniki	79
4.1	Dozymetria układu do napromieniania	79
4.2	Test przeżywalności	81
4.3	Test cytotoksyczności	82
4.4	Badanie ognisk naprawczych γ H2AX	83
4.5	Badanie ekspresji genów	85
4.5.1	Badanie obecności mykoplazmy w hodowli komórkowej	86
4.5.2	Relatywna ekspresja genów M059K 0 Gy w stosunku do M059J 0 Gy	87
4.5.3	Relatywna ekspresja genów M059J 2 Gy w stosunku do M059J 0 Gy	91
4.5.4	Relatywna ekspresja genów M059K 2 Gy w stosunku do M059K 0 Gy	94
4.5.5	Relatywna ekspresja genów M059K 2 Gy w stosunku do M059J 2 Gy	97
5	Podsumowanie	103
	Referencje	109
	Dodatek	121

Spis rysunków

1.1	Schemat rozpadu ^{241}Am	2
1.2	Efekt fotoelektryczny	3
1.3	Efekt Comptona	4
1.4	Kreacja par	4
1.5	Przekrój czynny na efekt fotoelektryczny, efekt Comptona oraz kreację par	5
1.6	Krzywa Bragga cząstek α o energii 5,49 MeV w powietrzu	6
1.7	Rozrzut energii oraz zasięgu cząstek α	7
1.8	Organizacja DNA w chromosomie	10
1.9	Cykl komórkowy i punkty kontrolne	12
1.10	Skutki oddziaływania promieniowania jonizującego na komórkę	13
1.11	Rodzaje uszkodzeń i naprawy DNA	15
1.12	Rola białka p53 oraz rodzaje śmierci komórkowej	17
1.13	Ścieżki naprawy dwuniciowych pęknięć DNA	18
2.1	Schemat układu do napromieniania ze źródłem powierzchniowym ^{241}Am	22
2.2	Obrazy 3D próbki biologicznej z mikroskopu konfokalnego	25
2.3	Rozkład wysokości komórek linii M059J oraz M059K	27
2.4	Rozkład wysokości medium hodowlanego w próbce biologicznej	28
2.5	Wymiary komórek linii M059J i M059K	29
2.6	Wymiary jąder komórkowych linii M059J i M059K	29
2.7	Geometria komórek na szkiełku podstawowym	36
2.8	Energia cząstek α zmierzona detektorem krzemowych i obliczona metodą Monte Carlo	41
2.9	Ślady cząstek α na detektorze śladowym CR-39	43
2.10	Parametry GEB dla detektora śladowego	44
2.11	Rozkład energii cząstek α na powierzchni próbki biologicznej - MCNP i detektor CR-39	45
2.12	Liczba cząstek deponowana w medium hodowlanym	46
2.13	Zależność dawki od wysokości medium hodowlanego	48
2.14	Intensywność depozycji energii cząstek α w komórkach	49
2.15	Rozkład energii cząstek α w komórkach	50
2.16	Tory cząstek α ze źródła ^{241}Am przez elementy układu do napromieniania	51
2.17	Rozkład LET cząstek α w komórkach	53
3.1	Linie komórkowe M059J i M059K	56

3.2	Zależność wpływu liczby kolonii od liczby wysianych komórek	58
3.3	Schemat procedury testu przeżywalności	59
3.4	Szalki z koloniami linii M059J i M059K	61
3.5	Kolonie zliczone za pomocą modelu YOLOv5	62
3.6	Zasada działania testu MTT	64
3.7	Schemat procedury testu MTT	65
3.8	Schemat procedury badania ognisk naprawczych γ H2AX	67
3.9	Jądra linii M059K z foci γ H2AX po napromienieniu dawką 2 Gy pochodzącą od cząstek α	69
3.10	Zasada działania reakcji RT-qPCR	71
3.11	Schemat procedury badania ekspresji genów	73
3.12	Projekt płytki ze specyficznymi primerami	76
4.1	Krzywa przeżywalności komórek linii M059J i M059K	81
4.2	Żywotność komórek M059J oraz M059K	82
4.3	Obrazy 3D jąder komórek M059J oraz M059K z wybarwionymi foci γ H2AX	84
4.4	Zależności liczby foci γ H2AX od dawki promieniowania α	85
4.5	Wyniku testu detekcji mykoplazmy w komórkach M059J oraz M059K .	86
4.6	Relatywna ekspresja poszczególnych genów w komórkach M059K 0 Gy względem M059J 0 Gy	88
4.7	Średnia relatywna ekspresja badanych genów w komórkach M059K 0 Gy względem M059J 0 Gy	89
4.8	Mapa poziomu ekspresji genów w komórkach linii M059K (0 Gy) i M059J (0 Gy)	90
4.9	Relatywna ekspresja poszczególnych genów w komórkach M059J 2 Gy względem M059J 0 Gy	91
4.10	Średnia relatywna ekspresja badanych genów w komórkach M059J 2 Gy względem M059J 0 Gy	92
4.11	Mapa poziomu ekspresji genów w komórkach linii M059J (2 Gy) i M059J (0 Gy)	93
4.12	Relatywna ekspresja poszczególnych genów w komórkach M059K 2 Gy względem M059K 0 Gy	94
4.13	Średnia relatywna ekspresja badanych genów w komórkach M059K 2 Gy względem M059K 0 Gy	95
4.14	Mapa poziomu ekspresji genów w komórkach linii M059K (2 Gy) i M059K (0 Gy)	96
4.15	Relatywna ekspresja poszczególnych genów w komórkach M059K 2 Gy względem M059J 2 Gy	97
4.16	Średnia relatywna ekspresja badanych genów w komórkach M059K 2 Gy względem M059J 2 Gy	98
4.17	Mapa poziomu ekspresji genów w komórkach linii M059K (2 Gy) i M059J (2 Gy)	99

Spis tabel

1.1	Wartości LET w wodzie, dla różnego rodzaju promieniowania	8
1.2	Wartości współczynnika wagowego promieniowania w_R	9
2.1	<i>Tally</i> użyte w MCNP: definicje, jednostki i przeznaczenie	32
2.2	Struktura pliku wejściowego do MCNP	33
2.3	Szczegóły definicji układu ze źródłem ^{241}Am w MCNP	35
2.4	Zestawienie obliczeń wykonanych za pomocą kodu MCNP	38
3.1	Kluczowe wartości parametrów klonowania komórek glejaka	63
3.2	Parametry zliczania foci w programie <i>FociCounter</i>	69
3.3	Skład mieszaniny reakcyjnej odwrotnej transkrypcji (RT)	74
3.4	Skład mieszaniny reakcyjnej qPCR	74
3.5	Geny wybrane do badania ekspresji	77
4.1	Geny o najwyższej relatywnej ekspresji	100

Wykaz skrótów

BER	Base Excision Repair, naprawa przez wycinanie zasady
BNCT	Boron Neutron Capture Therapy, terapia borowo-neutronowa
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscopy, konfokalna, laserowa mikroskopia skaningowa
CSDA	Continuous Slowing Down Approximation, przybliżenie ciągłego spowalniania
DDR	DNA Damage Response, odpowiedź na uszkodzenia DNA
DNA	Deoxyribonucleic Acid, kwas deoksyrybonukleinowy
DSBs	Double-Strand Breaks, dwuniciowe pęknięcia DNA
DSBR	Double-Strand Break Repair, naprawa dwuniciowych pęknięć DNA
ENDF	Evaluated Nuclear Data File, eksperymentalne dane jądrowe zweryfikowane przez ewaluatora (baza ENDF)
FWHM	Full Width at Half Maximum, szerokość piksu odpowiadająca połowie maksimum
GBM	Glioblastoma multiforme, glejak wielopostaciowy
GEB	Gaussian Energy Broadening, gaussowskie poszerzenie energii
HR	Homologous Recombination, homologiczna rekombinacja
ICRP	International Commission on Radiological Protection, Międzynarodowa Komisja Ochrony Radiologicznej
LET	Linear Energy Transfer, liniowy przekaz energii
MC	Monte Carlo, metoda Monte Carlo
MCNP	Monte Carlo N-Particle, program Monte Carlo N-cząstek
MMR	Mismatch Repair, naprawa niedopasowanych zasad
NER	Nucleotide Excision Repair, naprawa przez wycinanie nukleotydów

NHEJ	Non-Homologous End Joining, niehomologiczne łączenie końców
PCR	Polymerase Chain Reaction, reakcja łańcuchowa polimerazy
PE	Plating Efficiency, wydajność klonowania
RT	Reverse Transcription, odwrotna transkrypcja
qPCR	Quantitative Real-Time PCR, ilościowa reakcja PCR w czasie rzeczywistym
RT-qPCR	Reverse Transcription Quantitative Real-Time PCR, ilościowa PCR z odwrotną transkrypcją w czasie rzeczywistym
SF	Surviving Fraction, frakcja przeżywająca
SSBs	Single-Strand Breaks, jednoniciowe pęknięcia DNA
SSBR	Single-Strand Break Repair, naprawa jednoniciowych pęknięć DNA
SSNTD	Solid-State Nuclear Track Detector, detektor śladowy
ŚLCJ UW	Środowiskowe Laboratorium Ciężkich Jonów Uniwersytetu Warszawskiego
TAT	Targeted α Therapy, celowana terapia alfa

Motywacja

W leczeniu zmian onkologicznych, radioterapia coraz bardziej ewoluuje w kierunku strategii umożliwiających precyzyjne wprowadzanie energii do tkanki nowotworowej, przy jednoczesnym maksymalnym oszczędzaniu otaczających ją zdrowych struktur. Konwencjonalne techniki oparte na fotonach i elektronach charakteryzują się niskim Linowym Przekazem Energii, ang. *Linear Energy Transfer (LET)*, w zakresie $0,2\text{--}3\text{ keV}/\mu\text{m}$. Niska gęstość jonizacji wzdłuż toru cząstek powoduje głównie jednoniciowe pęknięcia DNA, ang. *Single-Strand Breaks (SSBs)*, które komórki nowotworowe, wyposażone w wydajne mechanizmy, mogą skutecznie naprawić [1, 2].

W ostatnich latach szeroko rozwinęła się terapia protonowa, która dzięki zjawisku piku Bragga umożliwia koncentrację dawki w określonym obszarze guza, a tym samym lepszą ochronę zdrowych tkanek. Jednak typowe wartości LET dla protonów, mieszczące się w zakresie $5\text{--}30\text{ keV}/\mu\text{m}$, pozostają stosunkowo niskie. W konsekwencji, chociaż protony mogą indukować bardziej złożone uszkodzenia DNA niż fotony, ich względna skuteczność biologiczna jest nadal ograniczona w porównaniu z cięższymi cząstkami naładowanymi [3].

Radionuklidy takie jak ^{177}Lu lub ^{161}Tb emitujące promieniowanie β znalazły szerokie zastosowanie w celowanej terapii radioizotopowej, ang. *Targeted α Therapy (TAT)*. Ich działanie terapeutyczne opiera się głównie na efekcie "ostrzału krzyżowego", ang. *crossfire effect*, który polega na penetracji przez cząstki β tkanki na głębokość setek mikrometrów [4]. Powoduje to uszkodzenie wielu komórek, jednak z jednoczesnym narażeniem zdrowych tkanek. Symulacje Monte Carlo (MC) wskazują, że promieniowanie β indukuje głównie uszkodzenia SSBs, podczas, gdy dwuniciowe pęknięcia, ang. *Double-Strand Breaks (DSBs)*, kluczowe pod względem śmiertelności komórek, występują stosunkowo rzadko.

W związku z powyższym cząstki α nabierają szczególnego znaczenia. Ich unikalne właściwości radiobiologiczne wynikają z niezwykle krótkiego zasięgu w tkance (poniżej $100\text{ }\mu\text{m}$) i wyjątkowo wysokiego LET, zazwyczaj w zakresie $80\text{--}300\text{ keV}/\mu\text{m}$ [5, 6]. Na tak krótkich torach energia jest deponowana bardzo gęsto, co skutkuje licznymi, złożonymi i skupionymi uszkodzeniami DNA, w tym DSBs. Takie uszkodzenia są w dużej mierze nieodwracalne przez szlaki naprawy komórkowej, co wyjaśnia wysoką cytotoksyczność cząstek α w porównaniu z fotonami, elektronami lub protonami [1].

Radionuklidy emitujące cząstki α zostały wprowadzone do leczenia glejaka wielopostaciowego, ang. *Glioblastoma multiforme (GBM)*, jednego z najbardziej agresywnych nowotworów mózgu według Światowej Organizacji Zdrowia, ang. *World Health Organization (WHO)* [7]. GBM cechuje się znaczną heterogennością kliniczną, patologiczną

i molekularną, co w istotny sposób przyczynia się do jego niekorzystnego rokowania [8, 9]. Kluczowe znaczenie ma eliminacja migrujących komórek nowotworowych infiltrujących otaczającą zdrową tkankę mózgową, które często pozostają poza zasięgiem resekcji chirurgicznej. Nawrót guza po zabiegu chirurgicznym zazwyczaj wynika z niecałkowitego usunięcia lub zniszczenia komórek nowotworowych znajdujących się poza bezpośrednim obszarem oddziaływania zastosowanej terapii.

Celowana terapia α , TAT, bazująca na takich izotopach jak ^{225}Ac , ^{211}At , lub ^{212}Bi , umożliwia koniugację izotopów z ligandami lub przeciwciałami, które selektywnie docierają do komórek nowotworowych [10, 11]. Dzięki temu emisję α można skierować w stronę pozostałości guza lub jamy pooperacyjnej, minimalizując ryzyko uszkodzenia zdrowej tkanki.

Innym obiecującym podejściem jest terapia borowo-neutronowa, ang. *Boron Neutron Capture Therapy (BNCT)*, która wykazała stosunkowo wysoką skuteczność w leczeniu GBM. Terapia ta obejmuje dwa zasadnicze etapy: w pierwszym pacjentowi podawane są związki zawierające stabilny izotop ^{10}B , który selektywnie akumuluje się w komórkach nowotworowych; w drugim etapie przeprowadza się napromienianie wiązką neutronów termicznych. Wychwyt neutronów przez jądra ^{10}B prowadzi do reakcji jądrowej, w wyniku której powstają cząstki α oraz jony ^7Li o bardzo wysokim LET i krótkim zasięgu (około 5 - 10 μm). Dzięki temu możliwe jest skuteczne niszczenie komórek nowotworowych przy jednoczesnym oszczędzeniu zdrowej tkanki otaczającej [12, 13].

Zarówno TAT, jak i BNCT dowodzą, że cząstki α są wyjątkowo skuteczne w precyzyjnej eliminacji komórek nowotworowych, co podkreśla fundamentalne znaczenie dokładnego scharakteryzowania ich interakcji. Maksymalny przekaz energii następuje pod koniec toru cząstki, tuż przed jej zatrzymaniem. W tych warunkach, przy LET rzędu 100 - 200 $\text{keV}/\mu\text{m}$, powstają złożone uszkodzenia DNA, których naprawa jest szczególnie trudna dla komórki. Omawiany zakres LET odpowiada zatem obszarowi najwyższej skuteczności biologicznej.

Należy jednak zauważyć, iż osiągnięcie gwałtownego spadku energii cząstek α w docelowej głębokości penetracji stanowi poważne wyzwanie kliniczne. Nieprecyzyjnie zdeponowana dawka może skutkować niepełnym zniszczeniem komórek nowotworowych lub niepożądanym uszkodzeniem zdrowej tkanki, zwłaszcza w obrębie narządów krytycznych, takich jak mózg. Dlatego dokładne określenie dawki i jej dystrybucji w tkankach jest kluczowe.

W odpowiedzi na tę potrzebę opracowano system napromieniania wykorzystujący powierzchniowe źródło promieniowania α z izotopem ^{241}Am . Jego kompaktowa konstrukcja pozwala na umieszczenie go w standardowej szalce Petriego, zapewniając niezawodne i długotrwałe narzędzie do badania wpływu promieniowania α na linie komórkowe, w tym tworzenia DSBs i mechanizmów naprawy. Kluczową zaletą tego układu jest możliwość utrzymania sterylności i optymalnych warunków hodowli komórkowej podczas napromieniania. W części eksperymentalnej wykorzystano dwie linie komórkowe glejaka wielopostaciowego, M059K (CRL-2365) i M059J (CRL-2366), pochodzące z banku komórek American Type Culture Collection (ATCC).

Cel pracy

Celem pracy była ocena strat energii cząstek α emitowanych z powierzchniowego źródła ^{241}Am w poszczególnych elementach układu do napromieniania próbek biologicznych oraz scharakteryzowanie właściwości cząstek trafiających bezpośrednio do monowarstwy komórek stanowiącej część próbki. Dodatkowo zbadano wpływ promieniowania α na odpowiedź biologiczną dwóch linii komórkowych glejaka – M059J oraz M059K.

Realizację założonego celu rozpoczęto od wyznaczenia geometrii układu do napromieniania ze źródłem powierzchniowym oraz określenia wymiarów komórek metodą mikroskopii konfokalnej. Na tej podstawie przygotowano szczegółowy model układu w formie pliku wejściowego do programu Monte Carlo N-Particle (MCNP), służącego do obliczeń metodą MC. Wyniki symulacji zostały następnie zweryfikowane eksperymentalnie.

Obliczenia umożliwiły wyznaczenie rozkładu energii, wartości liniowego przekazu energii (LET) oraz dawki deponowanej przez cząstki α w monowarstwie komórek. Określono również średnią liczbę cząstek trafiających w pojedyncze jądro komórkowe.

Na podstawie poznanych właściwości cząstek α przeprowadzono badania dwóch linii komórkowych – M059J oraz M059K. Oceniono poziom przeżywalności komórek oraz cytotoksyczność cząstek α w zależności od deponowanej dawki. Dokonano także ilościowej i jakościowej oceny ognisk naprawczych γH2AX powstających w odpowiedzi na dwuniciowe pęknięcia DNA. Ponadto przeprowadzono analizę porównawczą poziomu ekspresji genów w odpowiedzi na działanie promieniowania α o wysokim współczynniku LET dla obu linii komórkowych.

Rozdział 1

Wstęp

1.1 Promieniowanie jonizujące

Podstawowym źródłem promieniowania jonizującego jest rozpad jądra atomowego, którego następstwem, w zależności od rodzaju przemiany, jest emisja cząstek takich jak elektrony, protony, neutrony, cząstki α , którym najczęściej towarzyszy emisja kwantów γ lub X . Każdy z wymienionych rodzajów promieniowania nazywamy jonizującym z uwagi na to, iż posiada energię wystarczającą do zjonizowania materii, na którą oddziałuje. Jonizacja polegająca na oderwaniu elektronów z atomów co prowadzi do powstania jonów.

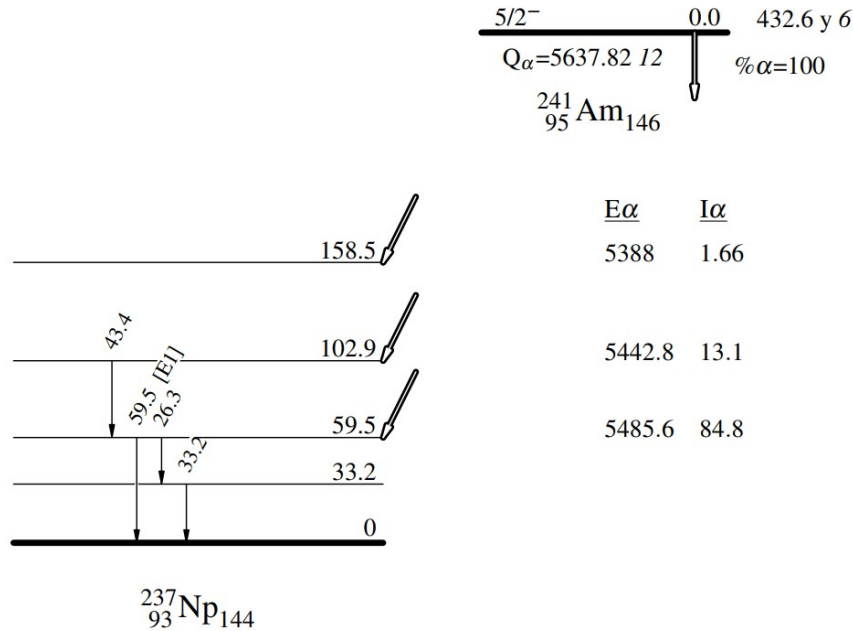
Ze względu na sposób oddziaływania promieniowania z materią wyróżnia się promieniowanie jonizujące bezpośrednio np. α , β , protony, które jonizują materię poprzez oddziaływania kulombowskie, oraz promieniowanie pośrednio jonizujące, do którego należą fotony promieniowania γ , X oraz neutrony. Nie posiadają one ładunku elektrycznego i prowadzą do jonizacji pośrednio, poprzez wywoływanie emisji wtórnych cząstek naładowanych w procesach takich jak efekt fotoelektryczny, rozproszenie Comptona czy reakcje jądrowe [14, 15].

Właściwości jonizujące danego rodzaju promieniowania mają szczególne znaczenie pod kątem sposobu jego detekcji, dozymetrii, a także zastosowań, między innymi w fizyce jądrowej, ochronie radiologicznej, energetyce jądrowej czy medycynie nuklearnej [16].

1.2 Izotop ^{241}Am

Izotop ^{241}Am ulega rozpadowi α do jądra ^{237}Np . Czas połowicznego zaniku ^{241}Am wynosi 432,6(6) lat, a spin i parzystość stanu podstawowego to $5/2^-$. Rozpad tego izotopu zachodzi w 100% przez emisję cząstki α . Całkowita energia Q_α wyemitowana w rozpadzie wynosi 5637,82(12) keV i dzielona jest między energię kinetyczną cząstki α oraz energię wzbudzenia jądra potomnego. Przemiana z emisją cząstek α o energiach: 5388; 5442,80(13); 5485,56(12) keV zachodzi z różną procentową intensywnością (I_α), odpowiednio: 1,66(2); 13,1(3); 84,8(5)% do stanów wzbudzonych o wymienionych energiach: 158,497(11); 102,959(3); 59,54092(10) keV [17]. Strzałki między poziomami oznaczają deekscytację stanów wzbudzonych równoważną emisji kwantów γ o ener-

giach opisanych nad strzałkami. Natomiast w nawiasie kwadratowym oznaczony jest rodzaj przejścia elektromagnetycznego między poziomami energetycznymi jądra ^{237}Np . Rysunek 1.1 przedstawia uproszczony schemat rozpadu ^{241}Am [18].



Rysunek 1.1: Schemat rozpadu α ^{241}Am do ^{237}Np . Czas połowicznego zaniku ^{241}Am wynosi 432,6(6) lat, spin i parzystość stanu podstawowego to $5/2^-$. Rozpad zachodzi w 100% przez emisję cząstki α . Q_α to całkowita energia emitowana w rozpadzie. Przemiana z emisją cząstek α o energiach: 5388; 5442,80(13); 5485,56(12) keV zachodzi z różną procentową intensywnością (I_α), odpowiednio: 1,66(2); 13,1(3); 84,8(5)% do stanów wzbudzonych o wymienionych energiach: 158,497(11); 102,959(3); 59,54092(10) keV [17]. Poziomy wzbudzone jądra ^{237}Np deekscytują z emisją kwantów γ . Nad strzałkami podana jest energia oraz rodzaj przejścia elektromagnetycznego [18].

Do badań nad komórkami linii M059J oraz M059K wykorzystano powierzchniowe źródło ^{241}Am , emitujące cząstki α oraz fotony γ , których najintensywniejsze przejścia zaznaczono na schemacie (rysunek 1.1). Energie te zaimplementowano w definicji źródła, w programie do obliczeń MC.

1.3 Oddziaływanie promieniowania γ z materią

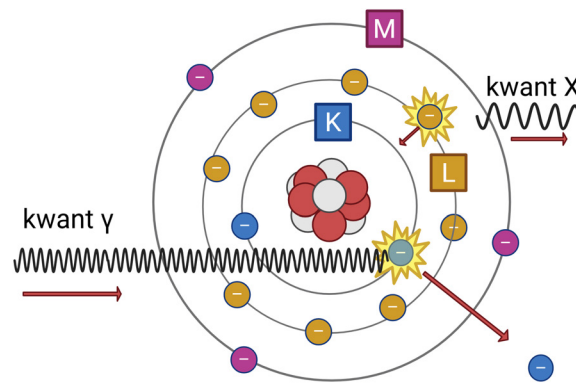
Promieniowanie elektromagnetyczne oddziałuje pośrednio poprzez całkowite lub częściowe przekazanie energii elektronom atomów materii, przez którą przechodzi. Taki sposób oddziaływania prowadzi do nagłej zmiany energii fotonu, ponieważ ulega on całkowitemu pochłonięciu lub rozproszeniu. Wyróżnia się trzy główne sposoby oddziaływania kwantów γ z materią: efekt fotoelektryczny, rozpraszanie Comptona i kreacja par.

W procesie fotoelektrycznym kwant γ przekazuje całą swoją energię elektronowi silnie związanemu na powłokach najbliższych jądra atomowemu, w konsekwencji zostaje

całkowicie pochłonięty, a elektron wybity z powłoki elektronowej z energią kinetyczną E_k zgodnie ze wzorem 1.1:

$$E_k = E_\gamma - \phi, \quad (1.1)$$

gdzie E_γ jest energią padającego fotonu, a ϕ jest energią wiązania elektronów w danej powłoce elektronowej. Powstały fotoelektron, może również oddziaływać z atomami ośrodka i przyczyniać się do jego dalszej jonizacji. W następstwie efektu fotoelektrycznego pozostaje luka na powłoce elektronowej, która może być szybko zapełniona w wyniku przemieszczenia elektronów z dalszych powłok z emisją charakterystycznego promieniowania X [14, 15]. Rysunek 1.2 przedstawia schemat efektu fotoelektrycznego.

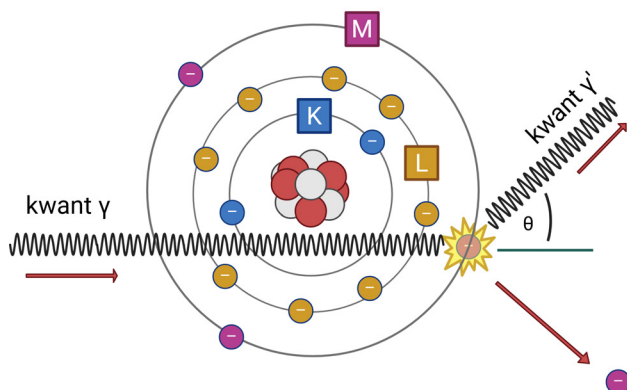


Rysunek 1.2: Schemat efektu fotoelektrycznego. Kwant γ oddziałuje z elektronem związanym na powłoce K. Z atomu wybijany jest fotoelektron o energii równej różnicy energii kwantu gamma i energii wiązania elektronu. Powstała luka na powłoce K zostaje zapełniona przez elektron z powłoki L, z emisją promieniowania X [19]. Utworzono w BioRender.com.

Kolejnym możliwym sposobem oddziaływania kwantów γ z materią jest efekt Comptona, w którym foton rozprasza się na elektronie słabo związanym w atomie, tracąc przy tym tylko część początkowej energii, a energia fotonu rozproszonego pod kątem θ opisana jest wzorem 1.2. Elektron natomiast zostaje wybity z powłoki, co zostało zobrazowane na rysunku 1.3 [14, 15].

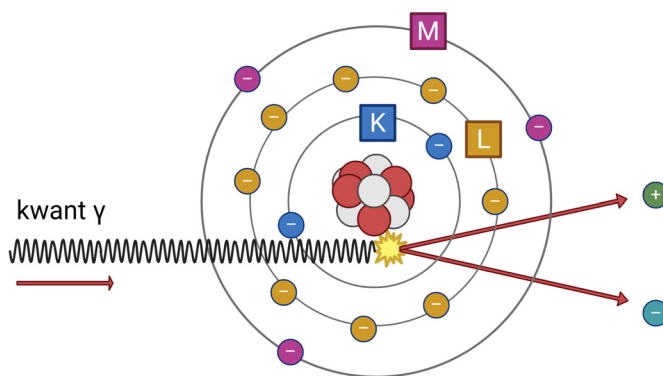
$$E' = \frac{E}{1 + \left(\frac{E}{m_0 c^2}\right) (1 - \cos \theta)} \quad (1.2)$$

gdzie: E - energia początkowa fotonu, E' - energia fotonu po rozproszeniu, m_0 - masa spoczynkowa elektronu, c - prędkość światła, a θ - kąt rozproszenia fotonu.



Rysunek 1.3: Schemat efektu Comptona. Kwant γ oddziałuje z elektronem związanym na powłoce M i zostaje rozproszony pod kątem θ . Elektron również zostaje wyrzucony z orbitalu elektronowego, a jego energia jest równa energii przekazanej przez foton i pomniejszonej o energię wiązania elektronu na powłoce M. Utworzono w BioRender.com.

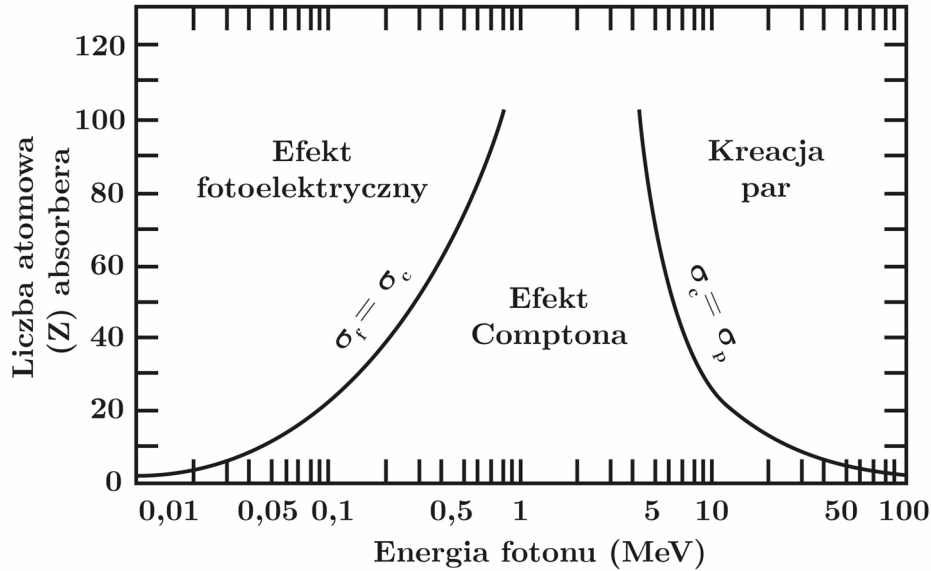
W przypadku, gdy energia fotonu przekracza dwukrotność energii spoczynkowej elektronu ($1,02 \text{ MeV}$) możliwym sposobem oddziaływania promieniowania γ jest kreacja par. Schemat procesu znajduje się na rysunku 1.4. Proces ten zachodzi w polu kulombowskim jądra atomowego, gdzie foton zostaje całkowicie pochłonięty i zastąpiony przez parę elektron-pozyton, których sumaryczna energia kinetyczna jest równa energii przenoszonej przez foton, pomniejszonej o wymaganych $1,02 \text{ MeV}$.



Rysunek 1.4: Schemat kreacji par. Kwant γ o energii przewyższającej $1,02 \text{ MeV}$ ulega konwersji w polu kulombowskim jądra atomowego, co skutkuje emisją pary elektron-pozyton. Utworzono w BioRender.com.

To, który sposób oddziaływania promieniowania gamma dominuje zależy od energii kwantu γ oraz liczby atomowej (Z) absorbera. Zależność przekroju czynnego (σ - prawdopodobieństwa zajścia danego oddziaływania) na jeden z trzech procesów od energii i liczby Z przedstawia rysunek 1.5. Krzywa po lewej stronie przedstawia energię oraz

liczbę Z , przy których zajście procesu fotoelektrycznego oraz efektu Comptona są tak samo prawdopodobne ($\sigma_f = \sigma_c$), Krzywa po prawej natomiast dotyczy tego samego jednak dla efektu Comptona oraz procesu kreacji par ($\sigma_c = \sigma_p$).



Rysunek 1.5: Przekrój czynny na efekt fotoelektryczny, efekt Comptona oraz kreację par w zależności od energii fotonu oraz liczby masowej absorbera. Krzywa po lewej stronie przedstawia energię oraz liczbę Z , przy których przekrój czynny na efekt fotoelektryczny oraz efekt Comptona są równe ($\sigma_f = \sigma_c$). Krzywa po prawej oznacza $\sigma_c = \sigma_p$ dla efektu Comptona i kreacji par. Rysunek na podstawie [14].

1.4 Oddziaływanie ciężkich cząstek naładowanych z materią

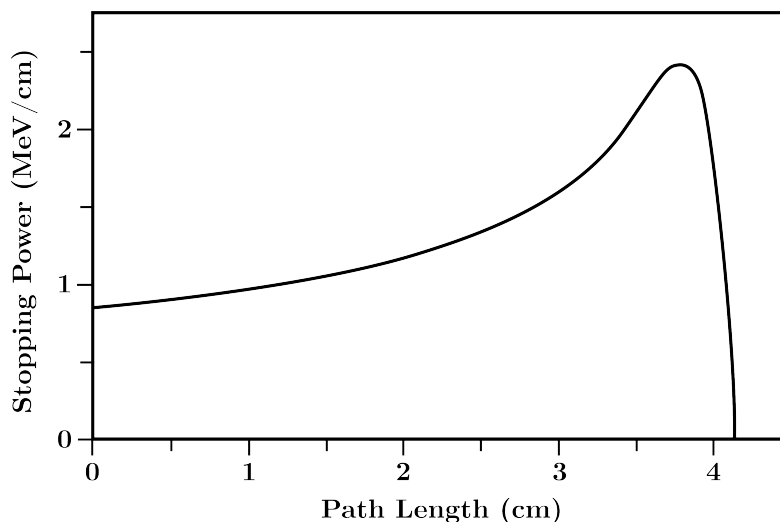
Ciężkie cząstki naładowane, takie jak dodatnio naładowane cząstki α , mogą oddziaływać z materią poprzez jonizację, podczas której dochodzi do oderwania z powłoki elektronowej ujemnie naładowanego elektronu, w wyniku czego powstaje para jonowa. Kolejnym procesem jest wzbudzenie elektronu, co oznacza jego przejście na wyższy poziom energetyczny. Wyróżnia się również rozpraszanie kątowe, kiedy to cząstka α oddziałuje z jądrem atomu i zostaje rozproszona zmieniając jednocześnie kierunek ruchu [14]. Straty energii (ang. *stopping power*) cząstek na jednostkę pokonywanej drogi opisywane są równaniem Bethego-Blocha 1.3.

$$\frac{dE}{dx} = \frac{4\pi z^2 e^4 n (3 \times 10^9)^4}{m v^2 (1,6 \times 10^{-6})} \left[\ln \left(\frac{2mv^2}{I} \right) - \ln \left(1 - \frac{v^2}{c^2} \right) - \frac{v^2}{c^2} \right] \text{ MeV cm}^{-1}, \quad (1.3)$$

gdzie: z - liczba atomowa cząstki jonizującej, e - ładunek elementarny ($1,6 \times 10^{-19}$ C), n - liczba elektronów na jednostkę objętości absorbentu, m - masa elektronu, v - prędkość

cząstki, c - prędkość światła, oraz I - efektywny potencjał jonizacji atomów absorbentu ($1,38 \times 10^{-10}$ erg dla powietrza).

Wraz z obniżeniem prędkości cząstki wartość $\frac{dE}{dx}$ gwałtownie wzrasta, co oznacza, że intensywność oddziaływań jest znacznie wyższa w końcowej fazie toru cząstki naładowanej. W efekcie jej *stopping power* rośnie, osiągając maksimum tuż przed całkowitym zatrzymaniem [15], co odzwierciedla krzywa Bragga przedstawiona na rysunku 1.6.

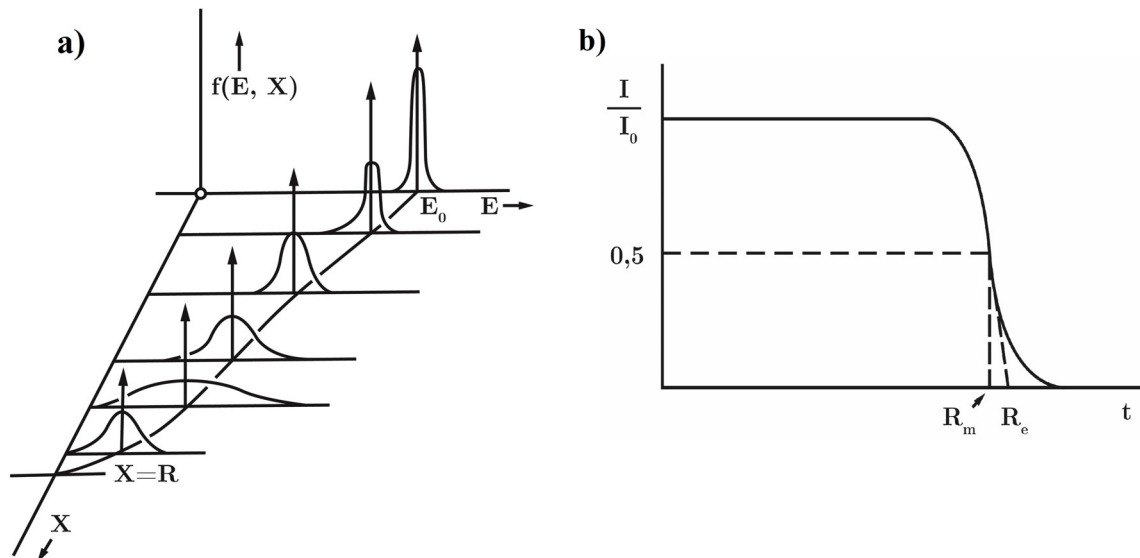


Rysunek 1.6: Krzywa Bragga przedstawia zależność strat energii cząstek α o początkowej energii 5,49 MeV w powietrzu od długości przebytej drogi. W końcowym odcinku toru widoczny jest charakterystyczny pik Bragga, wynikający z gwałtownego wzrostu gęstości oddziaływań cząstki naładowanej z materią [20].

Cząstki α mogą tworzyć od 40 do 80 tysięcy par jonowych na centymetr, biorąc pod uwagę, że energia potrzebna do utworzenia jednej pary jonowej w powietrzu lub tkance wynosi około 34 eV. W praktyce oznacza to, że cząstka α o energii zakresu od 4 do 8 MeV zatrzyma się po kilku centymetrach w powietrzu, natomiast w tkance o dużo większej gęstości elektronów, po kilku mikrometrach [14].

Średni zasięg cząstek α w danym materiale definiuje się jako grubość absorbera, przy której liczba zliczeń rejestrowanych cząstek α (I) maleje do połowy wartości początkowej (I_0). Zasięg ekstrapolowany odpowiada natomiast grubości, dla której ekstrapolacja końcowego fragmentu krzywej transmisji (I/I_0) prowadzi do zaniku sygnału. Ze względu na statystyczny charakter utraty energii, cząstki o tej samej energii początkowej nie zatrzymują się dokładnie w tym samym punkcie. Zjawisko to nazywa się rozrzutem zasięgu (patrz rysunek 1.7b). Podobnie jak zasięg, energia cząstek α również podlega rozrzutowi, ze względu na losowy charakter oddziaływania. W rezultacie, po przejściu wiązki monoenergetycznych cząstek naładowanych przez określoną grubość materiału absorbującego, zawsze pojawia się rozrzut energii cząstek. Na początku toru rozkład energii staje się szerszy i bardziej asymetryczny wraz ze wzrostem głębokości

penetracji. Na koniec rozkład ponownie się zwęża wraz z malejącą średnią energią cząstek. Charakter rozrzutu cząstek α w zależności od drogi ich przebiegu w ośrodku przedstawiono na rysunku 1.7a [14].



Rysunek 1.7: Rozrzut (a) energii oraz (b) zasięgu monoenergetycznych cząstek α w zależności od odcinka drogi pokonanej w absorbencie. Od początku, wzdłuż niemal całego toru, rozkład energii staje się szerszy i bardziej asymetryczny, natomiast pod koniec ponownie się zwęża wraz ze spadkiem średniej energii cząstek. Średni zasięg cząstek α definiuje się jako grubość absorbera, przy której intensywność sygnału spada do połowy wartości początkowej, natomiast zasięg ekstrapolowany wyznacza się poprzez przedłużenie końcowego odcinka krzywej transmisji do punktu zaniku sygnału [14].

1.5 Linear Energy Transfer

Ważną wielością określającą jakość promieniowania jest LET definiowany jako iloraz średniej energii przekazywanej lokalnie ośrodkowi dE_L przez cząstkę naładowaną podczas przebywania odcinka drogi dl [21], zgodnie ze wzorem 1.4:

$$LET = \frac{dE_L}{dl}. \quad (1.4)$$

W odróżnieniu od *stopping power*, LET określa jak gęsto energia niesiona przez promieniowanie jonizuje ośrodek. Wartość LET wyrażana jest w kiloelektronowoltach na mikrometr ($keV/\mu m$) i zależy od wielu czynników, takich jak energia, prędkość i ładunek oddziałującej cząstki, a także rodzaj i gęstość ośrodka.

Promieniowanie o niskim LET, takie jak fotony i elektrony ($< 1keV/\mu m$), powoduje w materiałach biologicznych uszkodzenia rozproszone, które są zazwyczaj łatwe do naprawy. Protony należą do promieniowania o średnim LET (kilka-kilkanaście $keV/\mu m$),

natomiast cząstki α i ciężkie jony, charakteryzujące się wysokim LET (dziesiątki-setki $keV/\mu m$), tworzą skupione obszary intensywnej jonizacji, prowadzące do złożonych i trudnych do naprawy uszkodzeń molekularnych. Tabela 1.1 przedstawia wartości LET w wodzie, dla różnego rodzaju promieniowania i energii.

Tabela 1.1: Wartości LET w wodzie, dla różnych rodzajów promieniowania jonizującego o odmiennych energiach [22].

Rodzaj promieniowania	LET ($keV/\mu m$)
X 250 kVp	2,0
γ Co-60	0,3
X 3 MeV	0,3
Elektron 1 MeV	0,25
Neutron 14 MeV	12,0
Elektron 1 keV	12,3
Elektron 10 keV	2,3
Ciężkie cząstki naładowane (np. α , C, Fe)	100-200

1.6 Dawki promieniowania jonizującego

Zgodnie z Prawem Atomowym dawka pochłonięta promieniowania jonizującego D określa energię, jaką traci promieniowanie dE , a pochłania ośrodek, na jednostkę masy tego ośrodka dm , zgodnie ze wzorem 1.5. Jednostką dawki pochłoniętej jest Grej $Gy = J/kg$ [23],

$$D = dE/dm. \quad (1.5)$$

Wielkością ściśle związaną z dawką pochłoniętą jest kerma K , kinetyczna energia uwolniona w materii, ang. *kinetic energy released in matter*. Określana jest wzorem 1.6

$$K = \frac{dE_{Tr}}{dm}, \quad (1.6)$$

gdzie dE_{Tr} w odróżnieniu od dawki pochłoniętej, jest sumą początkowych energii kinetycznych wszystkich cząstek naładowanych uwolnionych przez promieniowanie jonizujące pośrednio w materiale o masie dm [15].

Dawka równoważna (H_T) zgodnie ze wzorem 1.7, to dawka pochłonięta w tkance lub narządzie T , ważona przez współczynnik dla rodzaju i energii promieniowania R .

$$H_T = w_R D_{T,R}, \quad (1.7)$$

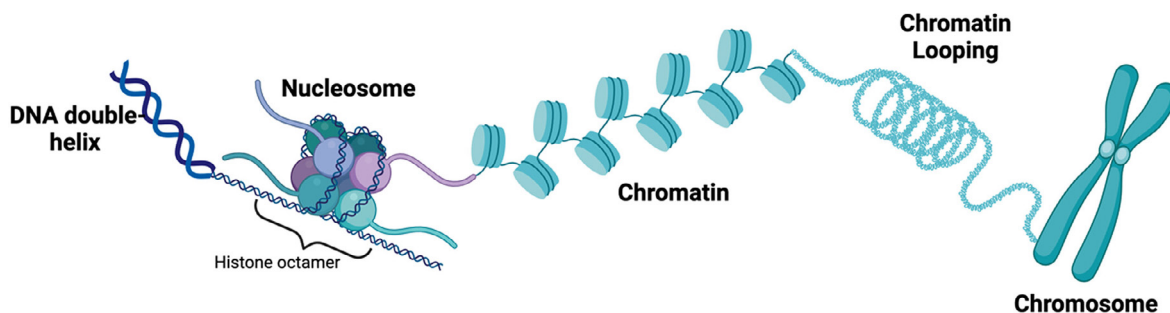
gdzie: $D_{T,R}$ to dawka pochłonięta uśredniona w tkance lub narządzie T od promieniowania R , w_R - czynnik wagowy promieniowania [23]. Tabela 1.2 przedstawia stosowane wartości współczynnika wagowego promieniowania jonizującego (w_R). Jednostką dawki równoważnej jest Sivert $Sv = J/kg$.

Tabela 1.2: Wartości współczynnika wagowego promieniowania w_R [23].

Rodzaj promieniowania i zakres energii, R	Czynnik wagowy promieniowania, w_R
Fotony, wszystkie energie	1
Elektrony i miony, wszystkie energie	1
Neutrony, energie < 10 keV	5
10 keV do 100 keV	10
> 100 keV do 2 MeV	20
> 2 MeV do 20 MeV	10
> 20 MeV	5
Protony energia > 2 MeV	5
Cząstki alfa, fragmenty rozszczepienia, ciężkie jądra	20

1.7 Budowa i organizacja DNA

Kwas deoksyrybonukleinowy ang. *Deoxyribonucleic Acid (DNA)* to polimer nukleotydów, w skład którego wchodzi pięciowęglowy cukier - deoksyryboza, grupa fosforanowa oraz zasada azotowa. Zasady azotowe to dwupierścieniowe puryny: adenina (A) i guanina (G) oraz pirymidyny: cytozyna (C) i tymina (T). Cząsteczki DNA zbudowane są z liniowo ułożonych nukleotydów połączonych wiązaniami fosfodiesterowymi. Reszty fosforanowe łączą się wiązaniami kowalencyjnymi z resztami cukrów sąsiednich nukleotydów. DNA składa się z dwóch nici polinukleotydowych połączonych wiązaniami wodorowymi. Łańcuchy skręcają się wokół własnej osi tworząc podwójną helisę [24].



Rysunek 1.8: Schemat organizacji DNA w chromosomie (ang. *chromosome*): 147 par zasad helisy DNA (ang. *DNA double helix*) owiniętych wokół ośmiu histonów (ang. *histone octamer*) składa się na nukleosom (ang. *nucleosome*). Nukleosomy są powtarzalnymi strukturami, które ulegają upakowaniu w chromatynę (ang. *chromatin*). Coraz silniej skondensowana chromatyna organizuje się w chromosomy [25].

DNA z powodu obecności grup fosforanowych ma ładunek ujemny, dzięki temu łatwo wiąże się z histonami, białkami posiadającymi ładunek dodatni dzięki obecności dużej liczby aminokwasów, w struktury zwane nukleosomami. Każdy z nukleosomów składa się z odcinka DNA zawierającego 147 par zasad owiniętego okół ośmiu histonów: H2A, H2B, H3 i H4. Histony H3 i H4 tworzą centralny tetramer $(H3-H4)_2$, który jest otoczony dimerami H2A-H2B [25]. Rolą histonów jest ochrona nici DNA przed splątaniem. Nukleosomy są częścią chromatyny, która następnie ulega skręceniu i kondensacji tworząc chromosom. Chromosom jest najwyższym poziomem organizacji materiału genetycznego, w którym ściśle upakowane włókna chromatyny umożliwiają precyzyjne rozmieszczenie i segregację DNA podczas podziału komórki. Rysunek 1.8 przedstawia sposób upakowania DNA w skondensowanym chromosomie.

1.8 Ekspresja genów

Ekspresja genów to proces, w którym informacja genetyczna zawarta w sekwencji zasad DNA przekłada się na syntezę białek w komórce. Wyróżnia się dwa kluczowe etapy ekspresji. Pierwszym z nich jest transkrypcja, będąca syntezą cząstki RNA komplementarnej do sekwencji DNA. Drugi kluczowy etap to translacja, polegający na syntezie białek na podstawie RNA [26]. RNA podobnie jak DNA jest polimerem nukleotydów, jednak w odróżnieniu od DNA składa się z cukru rybozy, a tyminę (T) zastępuję uracyl (U).

Synteza RNA zachodzi w jądrze komórkowym i rozpoczyna się etapem inicjacji, w którym enzym polimeraza RNA rozpoznaje sekwencję DNA nazywaną promotorem, rozplata podwójną helisę i inicjuje proces. Kolejny etap to elongacja, w którym kolejne nukleotydy przyłączane są do powstającej nici RNA. Polimeraza RNA działa do momentu, póki nie rozpozna sygnału terminacji transkrypcji, który stanowi specyficzna sekwencja zasad w przepisywanym DNA. Po zakończeniu etapu terminacji dochodzi do obróbki potranskrypcyjnej, procesu, w którym RNA jest oczyszczany i modyfikowany, aby mógł zostać wykorzystany do syntezy białka [24].

W wyniku transkrypcji powstają trzy główne rodzaje RNA: informacyjny (mRNA) pojedynczy łańcuch, który niesie informację genetyczną na temat białek; transportujący (tRNA) pojedynczy łańcuch o specyficznym kształcie, który łączy się z konkretnym aminokwasem przenosząc go do rybosomu; rybosomalny (rRNA) który jest składnikiem budowy rybosomu. Rybosom to niewielkie organellum komórkowe zbudowane z RNA i białek, które uczestniczy w syntezie białek, odczytując informacje genetyczne zawarte w mRNA.

Drugim etapem ekspresji genów, podczas którego informacja genetyczna zawarta w mRNA służy do wyznaczenia kolejności aminokwasów w syntezy białkach, jest translacja. Proces ten zachodzi w cytoplazmie, poza jądrem komórkowym. Sekwencja trzech kolejnych zasad RNA nazywana jest kodonem, który określa jeden aminokwas. Kluczową rolę w translacji pełni tRNA wyposażony w antykodon, który na podstawie komplementarności łączy się z kodonem mRNA i przyłącza odpowiadający mu aminokwas. tRNA transportuje aminokwasy do rybosomu, gdzie są one łączone w łańcuch polipeptydowy. Translacja rozpoczyna się od kodonu start, a kończy na kodonie stop, sygnalizującym zakończenie syntezy białka. W efekcie powstaje nowo zsyntetyzowane białko [24].

Działanie promieniowania jonizującego prowadzi do zmian w poziomie ekspresji genów kodujących białka biorące udział w odpowiedzi na uszkodzenie DNA oraz w jego naprawie.

1.9 Cykl komórkowy i punkty kontrolne

Na cykl komórkowy składają się wszystkie etapy, przez które przechodzi komórka od momentu swojego powstania do kolejnego podziału. Obejmuje on cztery główne fazy: M, G1, S oraz G2.

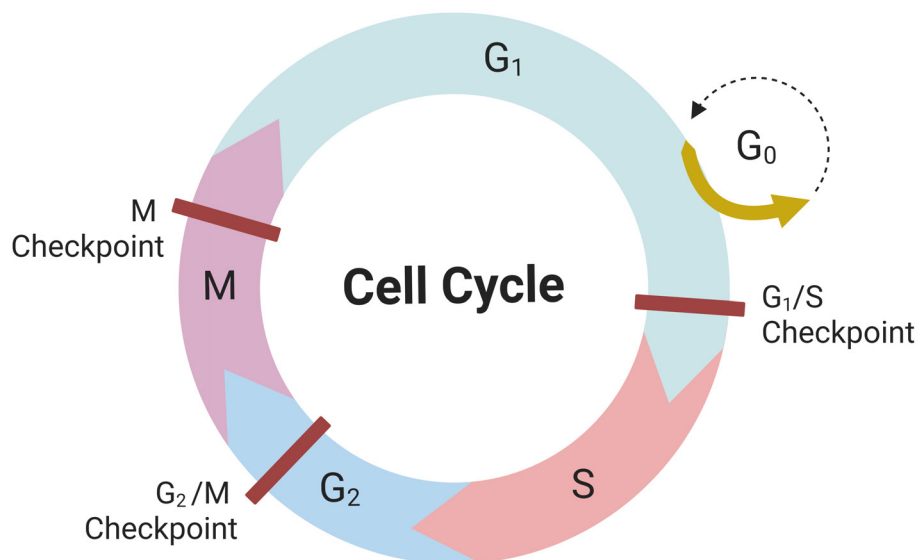
Faza M obejmuje dwa zasadnicze procesy – mitozę i cytokinezę. Mitoza polega na podziale jądra komórkowego, natomiast cytokineza jest procesem podziału cytoplazmy, w wyniku którego powstają dwie komórki potomne.

Faza G1 (ang. *gap*, przerwa) to stadium intensywnego wzrostu i aktywności metabolicznej komórki. Pod koniec tej fazy zwiększa się synteza białek, enzymów oraz organelli, co przygotowuje komórkę do replikacji DNA. W niektórych przypadkach komórki po zakończeniu fazy G1 nie wchodzi w kolejną fazę cyklu (S), lecz przechodzą w stan spoczynku określany jako faza G0. W fazie G0 komórki zaprzestają podziałów, lecz mogą nadal pełnić swoje funkcje metaboliczne. Niektóre komórki, takie jak neurony czy erytrocyty, pozostają w G0 trwale, podczas gdy inne mogą powrócić do cyklu i ponownie wejść w fazę G1.

Podczas fazy S (ang. *synthesis*, synteza) zachodzi replikacja DNA i synteza histonów, w wyniku czego powstaje kopia całego materiału genetycznego komórki. Po zakończeniu tej fazy komórka wchodzi w fazę G2, charakteryzującą się wzmożoną syntezą białek niezbędnych do przeprowadzenia podziału komórkowego [24].

Punkty kontrolne cyklu komórkowego (ang. *checkpoints*) stanowią wewnętrzne mechanizmy nadzorujące prawidłowość procesów zachodzących w poszczególnych fazach

cyklu oraz zapewniające integralność genomu. Za regulację cyklu odpowiadają kinazy białkowe zależne od cyklin (CDK) – enzymy, które aktywują lub inaktywują inne białka poprzez fosforylację. Ich aktywność jest możliwa dzięki połączeniu z białkami regulatorowymi zwanymi cyklinami.



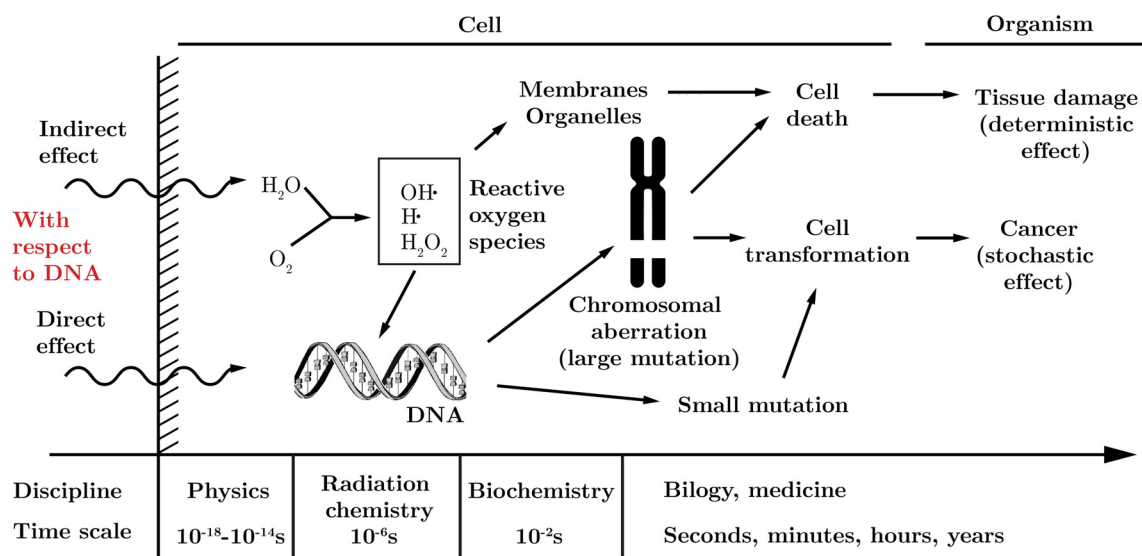
Rysunek 1.9: Schemat cyklu komórkowego, na który składają się cztery główne fazy M, G1, S oraz G2. G0 jest fazą spoczynkową, w której pozostają komórki nieulegające podziałom. W trakcie cyklu komórkowego działają trzy punkty kontrolne (ang. *Checkpoint*) M, G1/S oraz G2/M odpowiedzialne za kontrolę poprawnego przebiegu jego poszczególnych faz [27]. Utworzono w BioRender.com.

W cyklu komórkowym wyróżnia się trzy główne punkty kontrolne: G1/S, G2/M oraz M. Odpowiadają one za weryfikację, czy komórka spełnia warunki niezbędne do przejścia do kolejnej fazy cyklu. W przypadku wykrycia nieprawidłowości cykl zostaje zatrzymany, co umożliwia naprawę błędów. Punkt kontrolny G1/S (pod koniec fazy G1) sprawdza, czy komórka posiada odpowiednie zasoby metaboliczne i czy DNA nie jest uszkodzone [28]. Punkt G2/M kontroluje, czy replikacja DNA została zakończona prawidłowo, natomiast w fazie M oceniane jest, czy chromosomy są rozmieszczone i przygotowane do równomiernego rozdzielenia między komórki potomne.

W przypadku wystąpienia uszkodzeń DNA aktywowane są tzw. punkty kontrolne uszkodzeń DNA (*DNA damage checkpoints*), będące wyspecjalizowaną formą tych mechanizmów. Ich celem jest zatrzymanie cyklu komórkowego oraz umożliwienie naprawy genomu, co zapobiega przekazywaniu mutacji do komórek potomnych. Szczególnie istotny jest punkt kontrolny G2/M, który blokuje przejście komórki do mitozy (tzw. *G2 arrest*) w odpowiedzi na uszkodzenia DNA. Zatrzymanie cyklu ma charakter przejściowy i utrzymuje się do momentu pełnej naprawy DNA. Jednak w sytuacji, gdy naprawa nie powiedzie się, możliwe jest wystąpienie zjawiska, w którym komórka mimo obecnych uszkodzeń DNA przechodzi do mitozy, co zwiększa ryzyko niestabilności genomu i śmierci komórki [29].

1.10 Oddziaływanie promieniowania jonizującego na poziomie komórkowym

Promieniowanie jonizujące jest jednym z czynników, które powodują uszkodzenia materiału genetycznego. Mechanizm oddziaływania promieniowania na komórki można podzielić na trzy główne etapy: fizyczny, chemiczny oraz biologiczny, w zależności od procesów w nich zachodzących. Schemat wymienionych etapów oraz następstw oddziaływania promieniowania na komórkę przedstawia rysunek 1.10.



Rysunek 1.10: Łańcuch zdarzeń zachodzących w komórce po ekspozycji na promieniowanie jonizujące, z podziałem na etap fizyczny, chemiczny oraz biologiczny, w odpowiadającej im skali czasowej. Efekty oddziaływania promieniowania jonizującego podzielone na bezpośrednie (przekazanie energii bezpośrednio w DNA) i pośrednie (jonizacja wody i tworzenie wolnych rodników). Uszkodzenia błon i organelli skutkują śmiercią komórki, co na poziomie tkanek prowadzi do efektów deterministycznych. Z kolei aberracje chromosomowe i drobne mutacje DNA mogą powodować transformację nowotworową komórek, stanowiąc efekty stochastyczne, np. rozwój nowotworów [30]. Opisy z rysunku zostały wyjaśnione w tekście.

W fazie fizycznej dochodzi do bezpośredniego przekazania energii atomom wchodzącym w skład materii biologicznej poprzez jonizację i wzbudzenie elektronów. Jest ona bardzo szybka i trwa w przedziale od 10^{-18} do 10^{-14} sekundy. W przypadku, gdy jonizacja ma miejsce bezpośrednio na cząsteczce DNA, proces nazywany jest działaniem bezpośrednim (ang. *direct action*), który dominuje w przypadku działania cząstek o wysokim LET, takich jak α i ciężkie jony. Z uwagi na gęstszą jonizację wzdłuż toru dochodzi do bardziej złożonych uszkodzeń DNA. Działanie pośrednie natomiast (ang. *indirect action*) [19] polega na oddziaływaniu promieniowania z cząsteczkami wody.

W etapie chemicznym, trwającym w przedziale od 10^{-14} do 10^{-6} sekundy dochodzi

do radiolizy wody i powstawania reaktywnych form tlenu ang. *Reactive Oxygen Species (ROS)* takie jak: rodnik hydroksylowy ($\text{OH}\cdot$), anionorodnik ponadtlenkowy ($\text{O}_2\cdot^-$) czy nadtlenek wodoru (H_2O_2), które bezpośrednio lub pośrednio reagują z cząsteczkami DNA, powodując dalsze uszkodzenia [31, 30].

Faza biologiczna to proces od uszkodzenia DNA po ekspresję efektów biologicznych, który może trwać od pojedynczych sekund do godzin, a nawet dni po napromienianiu [19]. Na tym etapie uruchamiane są mechanizmy naprawy uszkodzeń DNA ang. *DNA Damage Response (DDR)* takie jak wykrywanie uszkodzeń przez kompleksy białkowe, zahamowanie cyklu komórkowego, naprawa DNA lub aktywacja śmierci komórki, jeśli uszkodzenia ze względu na swoją złożoność, nie są możliwe do naprawy.

Uszkodzenie błon i organelli (ang. *membranes, organelles*) prowadzi do śmierci komórki (ang. *cell death*), co na poziomie tkanek objawia się efektami deterministycznymi (ang. *deterministic effect*) zależnymi od dawki, np. martwicą lub utratą funkcji narządu. Natomiast błędnie naprawione lub utrwalone uszkodzenia DNA mogą prowadzić do losowych, niezależnych od dawki progowej, efektów stochastycznych (ang. *stochastic effect*), takich jak rozwój nowotworów (ang. *cancer*).

1.11 Uszkodzenia i naprawa DNA

Dwa główne rodzaje uszkodzeń DNA będące wynikiem oddziaływania promieniowania jonizującego na komórki, to jednoniciowe pęknięcia podwójnej helisy DNA (SSBs) lub dwuniciowe (DSBs). Pierwsze z nich definiowane jest jako zerwanie wiązania fosfodiesterowego łączącego nukleotydy. Nie stanowią dużego zagrożenia dla komórki, ponieważ są one wydajnie wykrywane i naprawiane. Głównie dlatego, iż druga nić pozostaje nienaruszona i jest używana jako matryca do naprawy [32]. Jest głównym uszkodzeniem indukowanym przez promieniowanie o niskim LET. Po napromienieniu dawką 1 Gy powstaje w komórce około 1000 SSBs.

Dwuniciowe pęknięcia nici DNA polega na przerwaniu wiązań fosfodiesterowych w obu niciach helisy zlokalizowanych w odległości rzędu kilku par zasad. Jest to najbardziej złożone i cytotoksyczne uszkodzenie, ponieważ zgodnie z rysunkiem 1.11 przerywa ciągłość genomu. Wywoływane jest głównie poprzez oddziaływanie promieniowania o wysokim LET. Dla porównania depozycja dawki 1 Gy promieniowania X powoduje powstanie jedynie około 40 DSBs na komórkę. Nieprawidłowa naprawa DSBs może powodować aberracje chromosomowe, zatrzymanie replikacji i śmierć komórki.

Wśród rodzajów uszkodzeń DNA wyróżnia się także addukty DNA powstające na skutek kowalencyjnego przyłączenia cząstek chemicznych do zasad azotowych. Kolejnym rodzajem uszkodzenia DNA są crosslinki DNA zwane inaczej, wiązaniami poprzecznymi w DNA. Polegają na tworzeniu się kowalencyjnych wiązań poprzecznych wewnątrz nici DNA, pomiędzy nimi lub między białkami znajdującymi się w komórce [32]. Prowadzą do zaburzeń procesów translacji i transkrypcji. Uszkodzenia oksydacyjne zasad powstają w wyniku oddziaływania reaktywnych form tlenu na zasady azotowe. Przykładem jest 8-oksoguanina (8-oxoG), która błędnie paruje z adeniną zamiast z cytozyną, prowadząc do mutacji. Wyróżnia się także błędy parowania zasad azotowych,

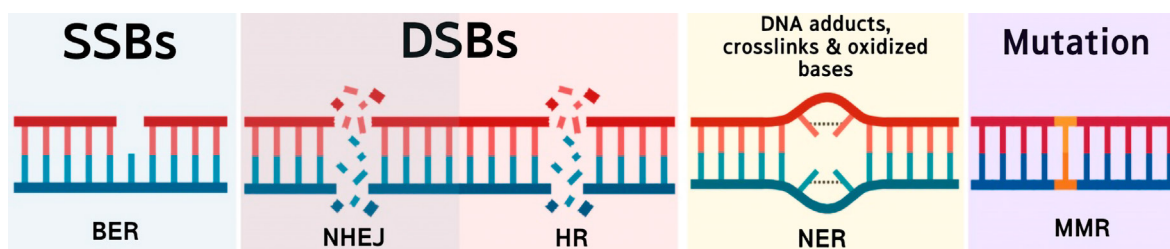
które mogą wystąpić podczas replikacji DNA [33]. Polimeraza DNA może wstawić niewłaściwą zasadę (ang. *mismatch*) lub pominąć nukleotyd. Jeśli taki błąd nie zostanie naprawiony, może prowadzić do mutacji powielanych w kolejnych podziałach DNA. Schematyczną wizualizację rodzajów uszkodzeń DNA oraz sposobów ich naprawy przedstawia rysunek 1.11.

Jednoniciowe pęknięcia DNA podlegają naprawie zwanej ang. *Single-Strand Break Repair (SSBR)*, stanowiącej wariant mechanizmu, ang. *Base Excision Repair (BER)* [34, 35]. Przerwa w nici DNA rozpoznawana jest przez białko *PARP*, które wiąże się do końców DNA i rekrutuje pozostałe czynniki naprawcze, które następnie wypełniają lukę wstawiając brakujący nukleotyd. Natomiast Ligaza (*LIG3*) stanowiąca kompleks wraz z białkiem *XRCC1* łączy końce DNA.

Za naprawę DSBs w komórkach eukariotycznych odpowiadają dwa procesy: homologiczna rekombinacja ang. *Homologous Recombination (HR)* oraz niehomologiczne łączenie końców ang. *Non-Homologous End Joining (NHEJ)*. Główną różnicą między obiema ścieżkami naprawy jest fakt, że HR wymaga nieuszkodzonej nici DNA, natomiast NHEJ naprawia uszkodzenie poprzez działanie mechanizmów łączących obie nici DNA [19].

Uszkodzenia takie jak addukty DNA, oksydacyjne uszkodzenia zasad czy wiązania krzyżowe (crosslinki) usuwane są poprzez wycinanie nukleotydu ang. *Nucleotide Excision Repair (NER)*. Proces ten polega na rozpoznaniu uszkodzenia oraz wycięciu fragmentu DNA o długości od 24 do 32 nukleotydów zawierającego błąd, poprzez wykonanie dwóch nacięć w nici. Za jedno z nich odpowiedzialny jest kompleks białek *ERCC1* oraz *XPF*. Następnie brakujący fragment jest uzupełniany przez nowo zsyntetyzowany fragment DNA. Proces kończy się ligacją czyli zespoleniem nici.

Błędnie sparowane zasady naprawiane są przez ang. *Mismatch Repair (MMR)*. System ten rozpoczyna się od rozpoznania takiego uszkodzenia przez kompleksy złożone między innymi z białek *MSH2* i *MSH3*, następnie błędny fragment zostaje usunięty i zastąpiony właściwym [36].



Rysunek 1.11: Rodzaje uszkodzeń DNA (od lewej): jedoniciowe pęknięcie DNA (SSBs), dwuniciowe pęknięcie DNA (DSBs), addukty DNA, wiązania krzyżowe DNA (crosslinki), oksydacyjne uszkodzenia zasad oraz błędy parowania zasad. Poniżej nici DNA z wizualizacją poszczególnych uszkodzeń przedstawiono nazwy odpowiadających im mechanizmów naprawy: naprawa przez wycinanie zasady (BER), niehomologiczne łączenie końców (NHEJ), rekombinacja homologiczna (HR), naprawa przez wycinanie nukleotydu (NER), oraz naprawa błędnie sparowanych nukleotydów (MMR) [33].

1.12 Śmierć komórkowa

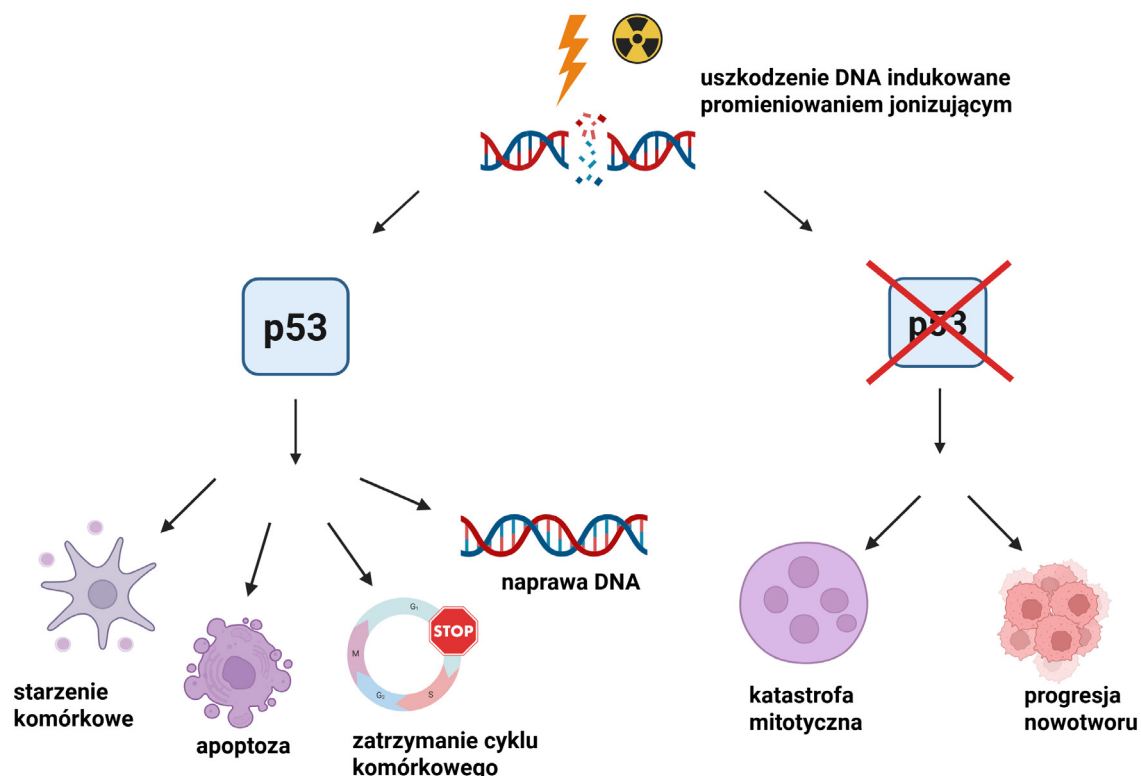
W wyniku oddziaływania promieniowania jonizującego na komórki dochodzi do uszkodzeń DNA. Kluczową rolę w odpowiedzi komórkowej pełni białko p53, nazywane *strażnikiem genomu*, którego zadaniem jest monitorowanie integralności materiału genetycznego i decydowanie o dalszych losach komórki. Proces ten schematycznie przedstawia rysunek 1.12. Po ekspozycji na promieniowanie poziom białka p53 wzrasta, a ono samo inicjuje transkrypcję genów regulujących naprawę DNA, zatrzymanie cyklu komórkowego oraz śmierć komórki.

W przypadku niewielkich uszkodzeń p53 tymczasowo zatrzymuje cykl komórkowy, aby umożliwić naprawę DNA. Jeśli proces naprawy przebiega pomyślnie, komórka może powrócić do regularnych podziałów. Senescencja, czyli starzenie komórki, to trwałe zatrzymanie cyklu komórkowego, podczas którego komórka pozostaje metabolicznie aktywna, lecz nie ulega dalszym podziałom. Takie komórki mogą jednak wydzielać czynniki wzrostu i cytokiny, które w niektórych przypadkach sprzyjają wzrostowi komórek nowotworowych.

Gdy uszkodzenia DNA są znaczne i nieodwracalne, p53 aktywuje geny proapoptyczne, inicjując programowaną śmierć komórki – apoptozę. Proces ten zachodzi szybko, zwykle w ciągu kilku godzin po napromienianiu. Charakteryzuje się kurczeniem komórki, kondensacją i fragmentacją jądra, pocięciem DNA na krótkie odcinki, rozpadem cytoszkieletu oraz powstawaniem pęcherzyków apoptotycznych. Cały proces przebiega bez wywołania stanu zapalnego [37].

W komórkach, które utraciły aktywność białka p53, zachodzi inny typ śmierci komórkowej – katastrofa mitotyczna. Występuje ona wtedy, gdy komórka z uszkodzonym DNA wchodzi w podział mitotyczny mimo braku naprawy materiału genetycznego. W efekcie powstają aberracje chromosomowe, błędny rozdział chromosomów oraz komórki wielojądrzaste. Takie komórki zwykle nie dzielą się dalej i giną w wyniku późnej apoptozy lub przechodzą w stan senescencji.

W niektórych przypadkach mogą jednak przetrwać z nieprawidłową liczbą chromosomów, co sprzyja niestabilności genetycznej i progresji nowotworu [38].



Rysunek 1.12: Rola białka p53 w odpowiedzi na uszkodzenia DNA wywołane promieniowaniem jonizującym oraz rodzaje śmierci komórkowej. W przypadku, gdy białko p53 jest aktywne w komórkach może prowadzić do zatrzymania cyklu komórkowego, naprawy DNA, apoptozy czy starzenia komórkowego. W przypadku braku aktywności p53 komórka jest uśmiercana na drodze katastrofy mitotycznej, może też dochodzić do progresji nowotworów [38]. Utworzono w BioRender.com.

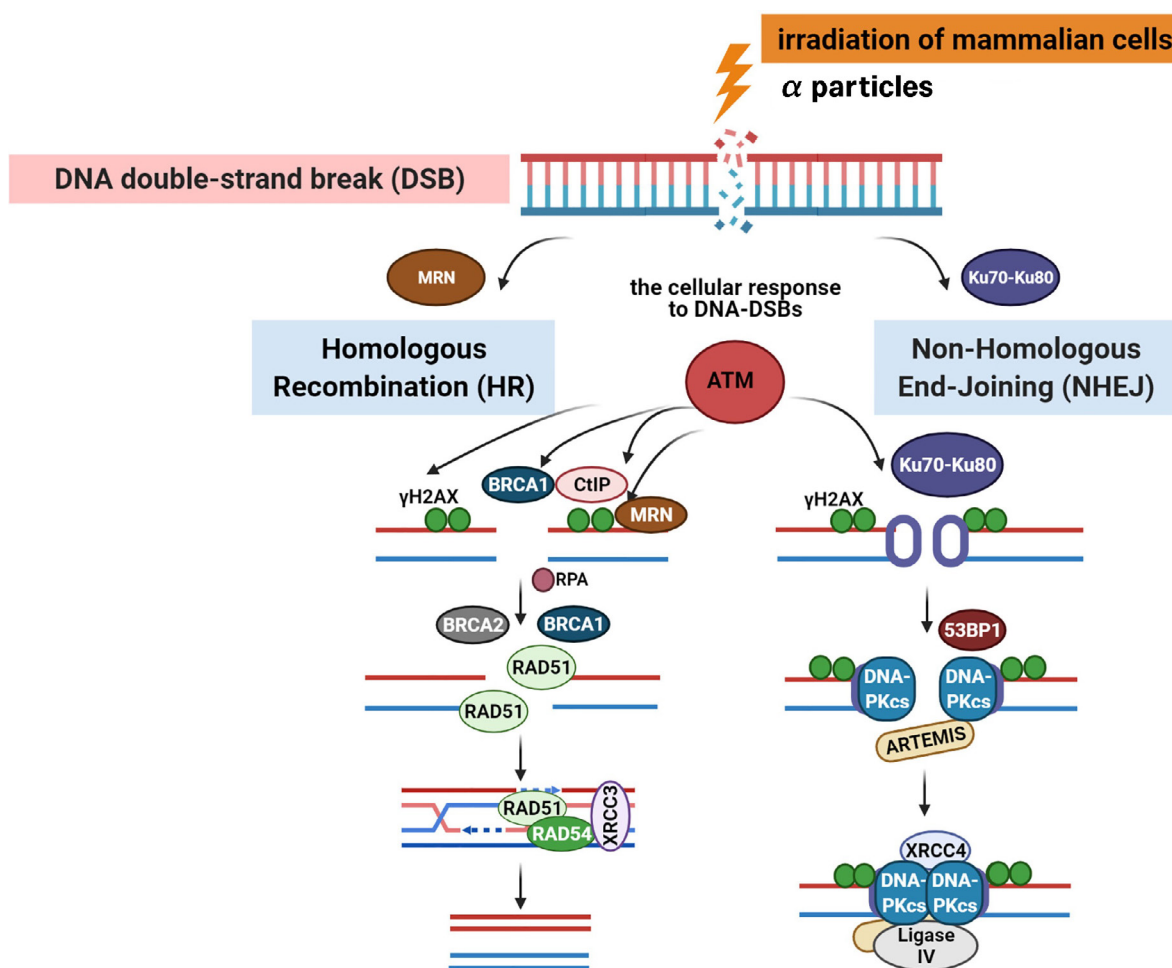
1.13 Naprawa dwuniciowych pęknięć DNA

Do naprawy dwuniciowych pęknięć DNA (DSBs) angażowana jest jedna z dwóch głównych ścieżek naprawy: rekombinacja homologiczna (HR) lub niehomologiczne łączenie końców (NHEJ). Różnią się one przede wszystkim wymaganiami dotyczącymi matrycy DNA, szybkością działania oraz dokładnością naprawy. Ścieżka HR wymaga obecności nieuszkodzonej nici DNA jako wzoru do odtworzenia sekwencji w miejscu pęknięcia, dzięki czemu przebiega z dużą dokładnością [39]. Dla porównania, NHEJ nie korzysta z matrycy DNA, co czyni ją procesem szybszym, ale bardziej podatnym na błędy – polega ona na bezpośrednim połączeniu końców uszkodzonej helisy DNA. Rysunek 1.13 przedstawia przebieg obu ścieżek naprawy DSBs.

Kinaza ATM (ang. *Ataxia Telangiectasia Mutated*) pełni kluczową rolę w odpowiedzi komórkowej na uszkodzenia DNA. Jej głównym zadaniem jest fosforylacja, czyli aktywacja białek zaangażowanych w odpowiedź na uszkodzenia DNA (DDR). ATM działa jako nadrzędny regulator odpowiedzialny za wykrywanie uszkodzeń DNA oraz podejmowanie decyzji o naprawie lub eliminacji komórki. Jednym z pierwszych biał-

łęk aktywowanych przez ATM jest histon H2AX, który po fosforylacji w pozycji seryny 139 tworzy γ H2AX – wskaźnik miejsca uszkodzenia DNA. ATM fosforyluje również kinazę CHK2, aktywującą punkty kontrolne cyklu komórkowego i powodującą jego zatrzymanie w fazie G1/S lub G2/M, co umożliwia przeprowadzenie naprawy uszkodzonego DNA. Kolejnym istotnym substratem ATM jest białko p53, które po fosforylacji indukuje ekspresję genów odpowiedzialnych za zatrzymanie cyklu komórkowego lub, w przypadku nieodwracalnych uszkodzeń, aktywuje ścieżki apoptozy [40].

To, która ścieżka naprawy zostanie wykorzystana, zależy od rodzaju komórki oraz fazy cyklu komórkowego. HR dominuje w fazie S/G2, natomiast NHEJ jest charakterystyczna dla fazy przedreplicacyjnej G1 oraz wczesnej fazy S. Uszkodzenia powstałe w późnej fazie S oraz G2 mogą być naprawiane przez obie ścieżki [41].



Rysunek 1.13: Ścieżki naprawy dwuniciowych pęknięć DNA (DSBs) komórek ssaczych, wywołanych promieniowaniem jonizującym o wysokim LET. Kinaza ATM rozpoznaje uszkodzenie i prowadzi do fosforylacji histonu γ H2AX. Naprawa może mieć miejsce na drodze jednej ze ścieżek. Homologicznej rekombinacji (HR) lub niehomologicznego łączenia końców (NHEJ). W szlaku HR uczestniczą białka naprawcze takie jak: kompleks MRN, CtIP, BRCA1, BRCA2, RPA, RAD51, RAD54 i XRCC3. W przypadku ścieżki NHEJ angażowane są: Ku70 i Ku80, DNA-PKcs, XRCC4 i ligaza 4 (LIG4). Rysunek pochodzi z [41].

W przypadku HR, DSBs są początkowo wykrywane przez kompleks MRN, złożony z białek MRE11-RAD50-NBS1, który następnie aktywuje ATM. ATM fosforyluje białka γ H2AX oraz CtIP. CtIP wraz z kompleksem MRN przycina końce DNA w miejscu uszkodzenia, tak aby powstały jednoniciowe fragmenty. Zostają one natychmiast pokryte przez białko RPA, które chroni je przed degradacją [42]. Następnie, przy udziale białek BRCA1 i BRCA2, RPA zostaje zastąpione przez RAD51. Zadaniem RAD51 jest odnalezienie homologicznej sekwencji na matrycy DNA, natomiast RAD54 i XRCC3 aktywują oraz stabilizują kompleks RAD51-DNA, regulując dalsze etapy rekombinacji [41].

Ścieżka NHEJ angażuje heterodimer białek Ku70 i Ku80, które wiążą się z końcami uszkodzonego DNA. Prowadzi to do rekrutacji enzymu DNA-PKcs (ang. *DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*), w wyniku czego tworzony jest kompleks DNA-PK, inicjujący dalsze etapy naprawy. W kolejnym etapie rekrutowane jest białko 53BP1, które dodatkowo chroni końce DNA. Nukleaza ARTEMIS przycina końce DNA tak, aby mogły zostać prawidłowo połączone. Ostatecznie ligaza IV wraz z białkiem XRCC4 są odpowiedzialne za ligację, czyli „sklejenie” pękniętych nici DNA.

1.14 Białko DNA-PKcs

DNA-PKcs (ang. *DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*) jest białkiem należącym do rodziny kinaz, które regulują aktywność enzymów poprzez fosforylację. Białko to odgrywa kluczową rolę w mechanizmie naprawy dwuniciowych pęknięć nici DNA poprzez szlak NHEJ. DNA-PKcs stanowi katalityczną podjednostkę enzymu DNA-PK, ang. *DNA-dependent protein kinase*, który tworzy aktywny kompleks z białkami Ku70 i Ku80 [43]. Szlak NHEJ inicjuje się poprzez związanie heterodimeru Ku70/Ku80 z końcami uszkodzonego DNA, co prowadzi do rekrutacji DNA-PKcs i utworzenia aktywnego kompleksu DNA-PK. Następnie dochodzi do autofosforylacji DNA-PKcs oraz fosforylacji innych białek naprawczych, takich jak ARTEMIS czy XRCC4, co umożliwia przygotowanie końców DNA do ligacji przez Ligazę IV [44]. Białko DNA-PKcs kodowane jest przez gen PRKDC (ang. *Protein Kinase, DNA-Activated, Catalytic Subunit*), a zaburzenia w jego ekspresji prowadzą do poważnych konsekwencji biologicznych, takich jak niestabilność genomowa czy radiowrażliwość komórek.

Rozdział 2

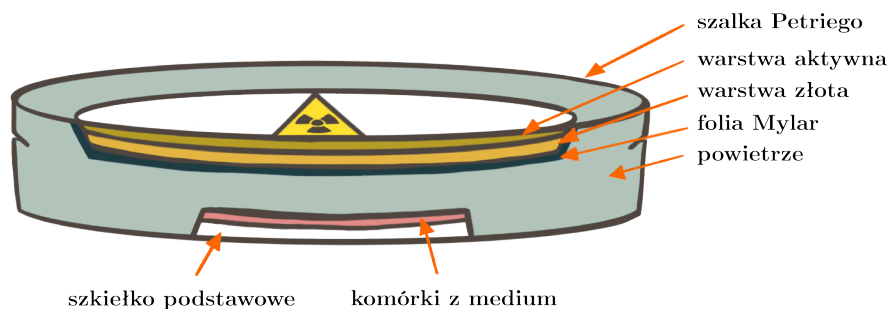
Układ eksperymentalny

2.1 Geometria układu eksperymentalnego

Układ do napromieniania próbek biologicznych cząstkami α składa się z powierzchniowego źródła ^{241}Am , które dostępne jest komercyjnie i zostało zakupione z firmy Eckert & Ziegler. Zgodnie z informacją od producenta średnica źródła wynosi 54 mm natomiast wysokość $5,2\text{ mm}$. Składa się ono z części aktywnej będącej mieszaniną złota i dwutlenku ameryku (AmO_2) w stosunku 1:0,0425 oraz warstwy ochronnej wykonanej ze złota. Certyfikat źródła [45] wskazuje, iż wymiary poszczególnych komponentów wynoszą 50 mm średnicy i, odpowiednio $0,2\text{ mm}$ wysokości dla części aktywnej oraz $1\text{ }\mu\text{m}$ dla złota, jednak do obliczeń wykonanych w pracy przyjęto inne wymiary, co zostało omówione w szerzej w rozdziale 2.3.

Nominalna aktywność źródła powierzchniowego wynosi $1,96\text{ MBq}$. Jądra ^{241}Am ulegają rozpadowi do jądra córki ^{237}Np z czasem połowicznego zaniku równym $432,6(6)$ lat. Rozpadowi towarzyszy emisja cząstek α o dyskretnych energiach, których wartość wraz z intensywnościami na jeden rozpad, określonymi w procentach, to odpowiednio: 5388 keV (1,7%), $5442,80(13)\text{ keV}$ (13,1%), $5485,56(12)\text{ keV}$ (84,8%) i $5544,5(16)\text{ keV}$ (0,4%). Rozpadowi towarzyszy również emisja kwantów γ oraz promieniowania X [17]. Energie cząstek α oraz fotonów o najwyższych intensywnościach uwzględniono w symulacjach MC.

Geometria układu została zaprojektowana w Środowiskowym Laboratorium Ciężkich Jonów Uniwersytetu Warszawskiego ŚLCJ UW, co zostało opisane pierwotnie w pracy Szepliński et al. [46]. Ogranicza się ona do pojedynczej szalki Petriego o średnicy 9 cm i wysokości $1,4\text{ cm}$. Jest to ogromną zaletą, ponieważ napromienianie może odbywać się bezpośrednio w laboratorium radiobiologicznym pod komorą laminarną, z zachowaniem sterylności. W układzie źródło powierzchniowe przymocowane jest za pomocą folii Mylar o grubości $6\text{ }\mu\text{m}$ do wewnętrznej części pokrywy szalki Petriego. Dzięki takiej konfiguracji źródło zawieszone jest bezpośrednio nad napromienianą próbką, ułożoną koncentrycznie na dolnej części szalki, co obrazuje rysunek 2.1.



Rysunek 2.1: Schemat układu do napromieniania próbek biologicznych cząstkami α . W górnej części układu znajdują się kolejno: warstwa aktywna powierzchniowego źródła ^{241}Am , ochronna warstwa złota oraz folia Mylar. Obszar powietrza oddziela źródło od próbki biologicznej. Dolną część układu stanowi próbka biologiczna (medium hodowlane i komórki) oraz szkiełko podstawowe, na które wysiewane były komórki. Całość zamknięta w plastikowej szalce Petriego o średnicy 9 cm i wysokości $1,4\text{ cm}$. Układ przedstawiony w formie zamkniętej, jak podczas eksperymentu napromieniania. Rysunek ma charakter schematyczny, skala nie została zachowana.

Odpowiednio przed eksperymentem komórki będące targetem dla cząstek α wysiewane były na sterylne szkiełko podstawowe o średnicy 30 mm , tworząc monowarstwę. Tak przygotowana biologiczna próbka, na chwilę przed napromienianiem przenoszona była na spód szalki Petriego. Następnie bezpośrednio na komórki наносzono $4\text{ }\mu\text{l}$ medium hodowlanego, aby zapobiec wysychaniu komórek w trakcie napromieniania. Na potrzeby napromieniania komórek cząstkami α szalkę zamykano.

Uwzględniając wymiary źródła oraz grubość plastikowych ścianek szalki, a także grubość szkiełka podstawowego obliczono wymiar przestrzeni między źródłem a próbką biologiczną, która wynosiła $6,8(1)\text{ mm}$. W warunkach eksperymentalnych przestrzeń ta wypełniona była powietrzem. Sposób wyznaczenia monowarstwy komórek oraz warstwy medium hodowlanego przedstawione zostały w podrozdziale 2.1.1.

2.1.1 Mikroskopia konfokalna

W celu wyznaczenia precyzyjnych rozmiarów próbki biologicznej wykorzystano skaningowy laserowy mikroskop konfokalny, ang. *Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)*. Sposób pozyskiwania obrazu w mikroskopie konfokalnym zasadniczo różni się od metody stosowanej w klasycznym, szerokopółowym mikroskopie, w którym cały preparat oświetlany jest światłem z lampy, a obraz można obserwować bezpośrednio. W mikroskopii konfokalnej próbka skanowana jest punktowo poprzez ogniskowane wiązki światła pochodzące z lasera [47]. Wiązka jest kierowana przez układ kolimujący, złożony z lusterek, do obiektywu, który skupia światło w jednym, ściśle określonym punkcie próbki. Zmiana nachylenia lusterek, a co za tym idzie kąta odbicia wiązki, umożliwia skanowanie próbki w osiach X i Y . Światło emitowane z próbki wraca przez

ten sam obiektyw, następnie przechodzi przez otwór konfokalny do fotopowielacza, gdzie przekształcane jest w sygnał elektryczny i dalej w sygnał cyfrowy. Szczególną rolę odgrywa otwór konfokalny, przez który do detektora dociera światło emitowane wyłącznie z obrazowanej płaszczyzny próbki [48]. Od tej właściwości pochodzi termin *confocal* (łac. *con* - razem, *focus* - ognisko), który odnosi się do tego, że otwór konfokalny i płaszczyzna obrazowania są ze sobą sprzężone, co pozwala na odcięcie światła spoza płaszczyzny ostrości i uzyskanie obrazu o wysokiej rozdzielczości.

W obrazowaniu CLSM wykorzystuje się fluorofory, inaczej zwane barwnikami fluorescencyjnymi, zdolne do pochłaniania światła o określonej długości fali i emisji promieniowania o większej długości fali. Mikroskopia konfokalna pozwala na nieinwazyjne skanowanie próbki przy jednoczesnym pozyskiwaniu obrazów 3D o wysokiej rozdzielczości, dlatego wykorzystywana jest między innymi do obrazowania komórek, struktur wewnątrzkomórkowych, organelli oraz procesów zachodzących w żywych komórkach [49].

Do analizy oraz mikrofotografii cząstek fluorescencyjnych wykorzystano CLSM Nikon A1R MP (Nikon Corporation, Tokio, Japonia) z serii Nikon Ti-Eclipse, wyposażony w obiektyw Plan Apo VC 60 $\times$ /1.4 z imersją olejową. Obrazy rejestrowano w rozdzielczości 2048 $\times$ 2048 pikseli, z krokiem w osi *Z* równym 1,0 μm , kalibracją *XY* wynoszącą 0,11 $\mu\text{m}/\text{px}$ oraz głębią bitową 12 bitów. Niebieski sygnał fluorescencji zbierano przy użyciu fioletowego lasera o długości fali 404 nm oraz odpowiedniego filtra pasmowego 425-475 nm. Zieloną fluorescencję rejestrowano przy długości fali wzbudzenia 488 nm i zakresie emisji 500-550 nm. W tym przypadku część obrazów wykonano za pomocą obiektywu 40 $\times$ S Plan Fluor ELWD. Czerwony sygnał rejestrowano przy wzbudzeniu 561 nm oraz filtrze pasmowym obejmującym zakres emisji 570-620 nm. Obrazy przetwarzano i analizowano z użyciem oprogramowania *NIS-Elements AR v. 4.10*.

2.1.2 Pomiary próbki biologicznej

Komórki wraz z medium hodowlanym stanowią próbkę napromienianą w układzie. Dokładne określenie depozycji energii w komórkach wymaga precyzyjnego wyznaczenia jej wymiarów, co pozwoli na obliczenie strat energii cząstek α zanim dotrą do targetu, jakim jest monowarstwa komórek. Próbki linii komórkowych M059J i M059K zostały przygotowane w analogiczny sposób jak przed eksperymentem napromieniania. Procedura ta jest dokładniej opisana w podrozdziale 3.2.1. Na 48 godzin przed pomiarami wysiano komórki na 30 mm szkiełko nakrywkowe umieszczone w szalce 6 - cio dołkowej, w liczbie 5 $\times$ 10⁴ komórek na dołek. Próbki przechowywano w inkubatorze, w 5% CO₂ w atmosferze i 37°C.

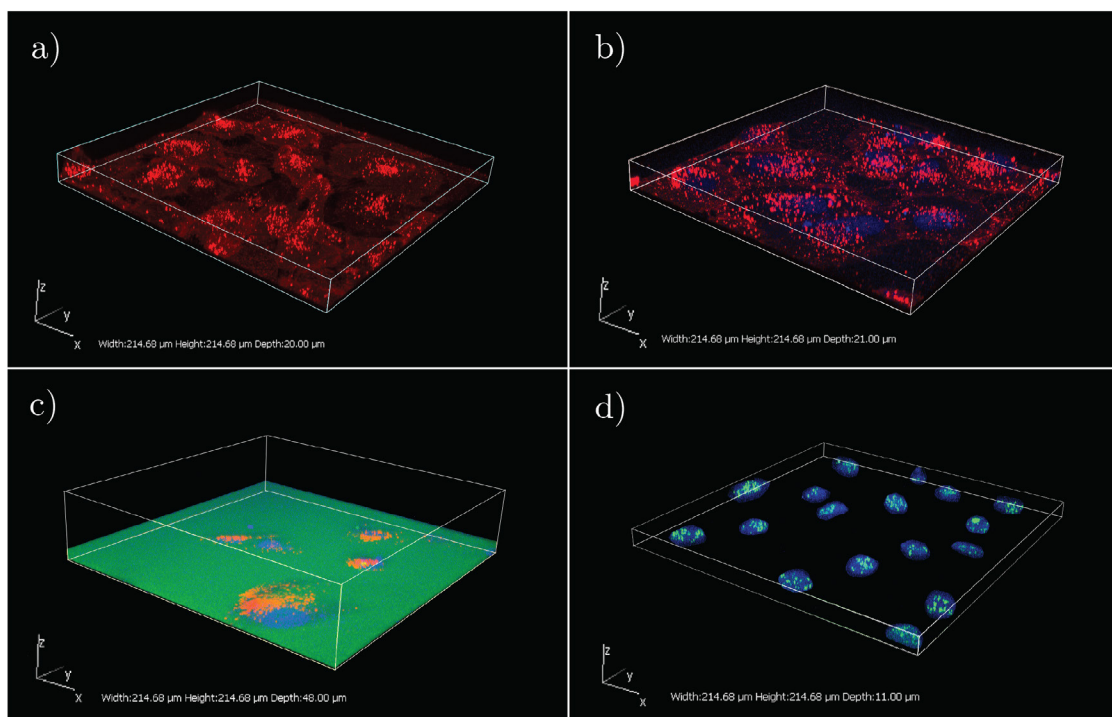
W następnym kroku jądra komórkowe, błony komórkowe oraz medium zostały wybarwione fluorescencyjnymi znacznikami. Do wybarwienia jąder komórkowych posłużyło DAPI (4',6-diamidyno-2-fenylindol, Thermo Fisher Scientific), niebieski barwnik, który ma zdolność do specyficznego wiązania się z DNA. Barwnik VybrantTM Dil (1,1'-Diocetadecyl-3,3',3'-tetrametylindokarbocyanina, sól nadchloranowa) ze względu na swoją liofilowość wnika w dwuwarstwę lipidową barwiąc całą powierzchnię błony komórkowej na czerwono. Komórki inkubowane były przez 30 minut w kompletnym me-

dium zawierającym DAPI oraz Dil o stężeniach odpowiednio $10 \mu\text{g/ml}$ oraz $5 \mu\text{g/ml}$. Następnie zostały trzykrotnie przepłukane medium (2 ml na dołek ze szkiełkiem podstawowym, na każde płukanie) zawierającym $1 \mu\text{M}$ barwnika DCF ($2',7'$ -dichlorofluoresceina, Sigma-Aldrich). Po zakończonym barwieniu szkiełka przenoszono kolejno na szalki Petriego o średnicy 9 cm i wysokości $1,4 \text{ cm}$, następnie dodawano po $4 \mu\text{l}$ medium z barwnikiem DCF, aby zapobiec wysuszeniu komórek.

Tak przygotowane próbki trafiały od razu na mikroskop konfokalny w celu analizy wysokości komórek oraz znajdującego się na nich medium. Każdy pomiar trwał od 15 do 20 minut, co odpowiadało czasowi napromieniania komórek. Został on dobrany tak, aby ograniczyć wpływ przebywania komórek poza kontrolowanym środowiskiem inkubatora (temperatura, stężenie CO_2 w atmosferze, wilgotność) na ich stan fizjologiczny, w tym pH medium i aktywność metaboliczną. To oznacza, że zarejestrowane wartości uwzględniają zarówno zmiany morfologiczne komórek, jak i parowanie medium hodowlanego w warunkach eksperymentalnych, co odzwierciedla realny stan próbki pod koniec procesu napromieniania.

Na rysunku 2.2 przedstawione zostały obrazy 3D żywych komórek zarejestrowane z wykorzystaniem CLSM Nikon A1R MP. Są to wszystkie warianty pomiarów, które zostały wykonane na potrzeby niniejszej pracy. W panelu (a) widoczny jest sygnał czerwony pochodzący od błon komórkowych, w części (b) przedstawiono wizualizację dwóch sygnałów: czerwonego oraz niebieskiego, pochodzącego z jąder komórkowych. Dodatkowo część (c) zawiera również sygnał zielony odpowiadający medium hodowlanemu, natomiast (d) to obrazy złożone z sygnału niebieskiego (jądra komórkowe) oraz zielonego, pochodzącego od wybarwionych fluorescencyjnie ognisk naprawczych po uszkodzeniu DNA cząstkami α , co zostało opisane szczegółowo w rozdziale 3.4.

Obrazy otrzymane z mikroskopu konfokalnego były złożeniem obrazów w osi Z , dlatego wyznaczenie wysokości komórek oraz medium hodowlanego wymagało analizy trójwymiarowych skanów. Mikroskop uzyskiwał obraz w osi XY dla płaszczyzny o danej współrzędnej Z , z krokiem co $1 \mu\text{m}$. Otrzymane obrazy poddano analizie przy użyciu makra opracowanego w programie *Fiji/ImageJ* [50, 51]. Jego działanie polegało na wykorzystaniu wtyczki *Bio-Formats*, która pozwalała na importowanie i konwersję obrazów mikroskopowych w formacie *.nd2* do tzw. *hyperstack* zawierającego informacje o wymiarach w osiach X , Y , Z oraz kanałach fluorescencji. Następnie obrazy były dzielone na kanały odpowiadające poszczególnym zarejestrowanym kolorom. Każdy obraz wzdłuż osi Z został poddany binaryzacji względem płaszczyzny XY przy użyciu stałego progu intensywności. Piksele, których jasność przekraczała 20% maksymalnej wartości, oznaczano jako sygnał, natomiast piksele o niższej intensywności klasyfikowano jako tło. Liczba zliczonych pikseli odnosi się zatem do liczby pikseli, w których intensywność sygnału przekraczała poziom tła w trójwymiarowym stosie obrazów (osie X , Y i Z). Wartość ta odzwierciedla całkowitą objętość obszarów zawierających sygnał fluorescencyjny. Uzyskane wartości przeliczano następnie na wysokość sygnału w μm .



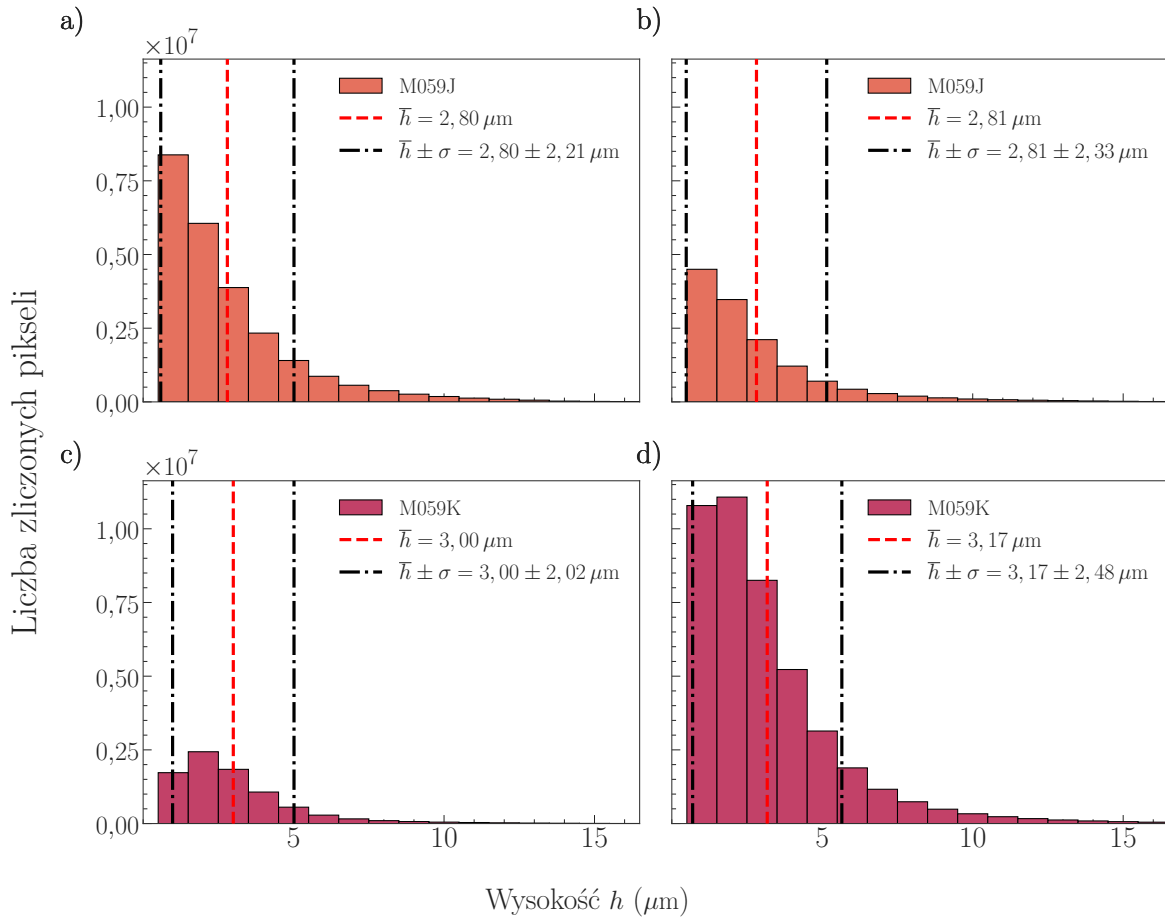
Rysunek 2.2: Obrazy 3D próbki biologicznej uzyskane za pomocą mikroskopu konfokalnego. Przedstawiają cztery warianty pomiarów wykonanych za pomocą mikroskopii konfokalnej. a) Błony komórkowe wybarwione barwnikiem fluorescencyjnym Dil w kolorze czerwonym. b) Błony komórkowe wybarwione barwnikiem Dil (kolor czerwony) oraz jądra komórkowe wybarwione barwnikiem DAPI (kolor niebieski). c) Błony komórkowe i jądra komórkowe wybarwione odpowiednio Dil i DAPI oraz medium hodowlane wybarwione barwnikiem DCF, w kolorze zielonym. d) Jądra komórkowe wybarwione DAPI wraz z ogniskami naprawczymi γ H2AX powstałymi po dwuniciowych pęknięciach DNA spowodowanych przez cząstki α .

Pomiary wysokości komórek wykonano mikroskopem konfokalnym w kilku niezależnych wariantach dla obu linii komórkowych: z wybarwionych wyłącznie błon komórkowych na kolor czerwony; wybarwionych błon komórkowych wraz z jądrami komórkowymi w kolorach odpowiednio czerwonym i niebieskim; z trzecim kanałem odpowiadającym zielonemu medium hodowlanemu. Zmierzono również próbki o wyższej początkowej liczbie wysianych komórek wynoszącej $7,5 \times 10^4$, co umożliwiło weryfikację czy ma ona wpływ na wysokość monowarstwy. Wyniki analizy obrazów 3D pozwoliły na wykreślenie histogramów liczby zliczonych pikseli w płaszczyznach XYZ w zależności od wysokości komórek, co zostało przedstawione na rysunku 2.3. Każdy z histogramów przedstawia dane dla różnych wariantów pomiaru. Część 2.3a to histogram liczby pikseli w płaszczyźnie XYZ dla linii M059J w konfluencji 5×10^4 , średnia wysokość w tym przypadku wyniosła $2,80 \pm 2,43 \mu\text{m}$. Wypadkowa niepewność uwzględnia nie tylko składową wynikającą ze średniej lecz również z niepewności urządzenia, które dokonywało pomiaru z krokiem $1 \mu\text{m}$ wzdłuż osi Z . Histogram 2.3b przedstawia wyniki dla linii komórkowej M059J i początkowej konfluencji $7,5 \times 10^4$, z których wyliczona

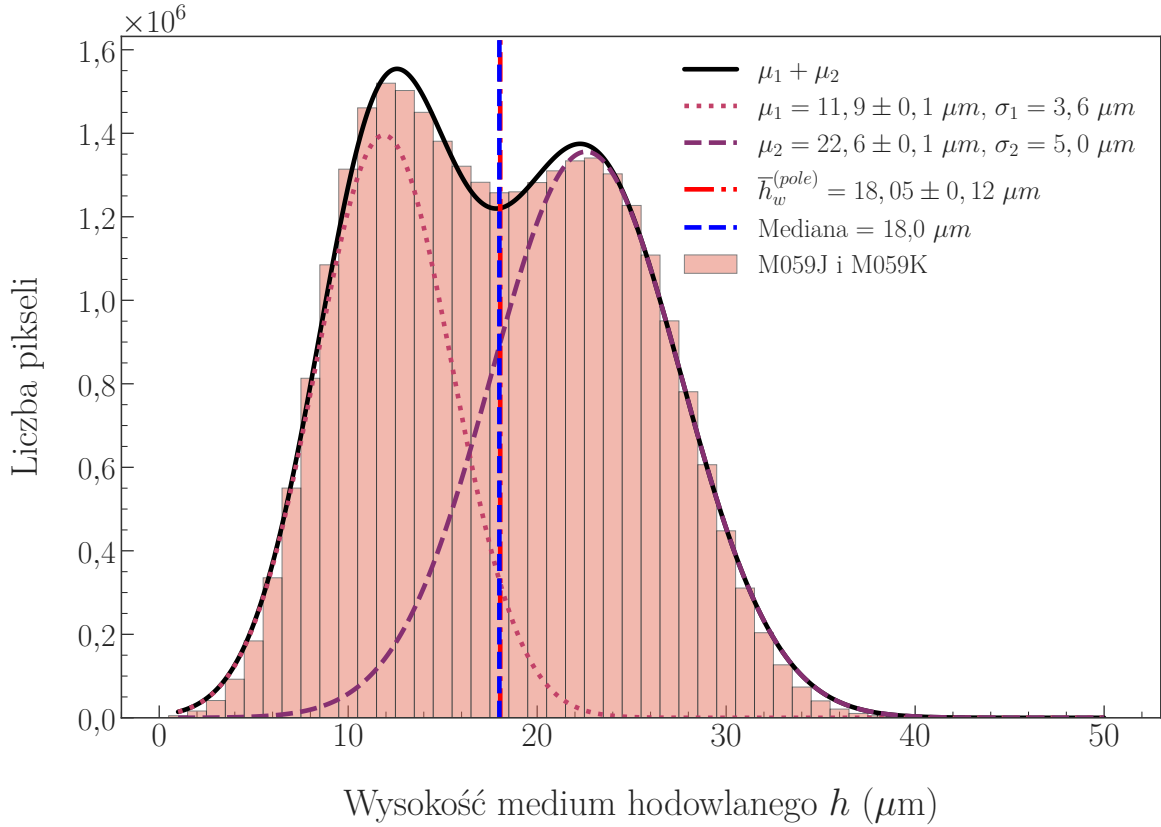
średnia wyniosła $2,81 \pm 2,54 \mu m$.

Histogramy a i b powstały z analizy ośmiu obrazów w przypadku docelowej liczby wysianych komórek (5×10^4 komórek na dołek) oraz czterech obrazów dla $7,5 \times 10^4$. Każdy z obrazów przedstawiał minimum 10 pełnych komórek po wybarwieniu wyłącznie barwnikiem Dil (tylko kanał czerwony). Z pomiarów wynika, iż zmiana liczby wysianych komórek nie zmienia znacząco wysokości monowarstwy. Na rysunku 2.3c zaprezentowany został histogram dla linii M059K powstały z analizy dwóch obrazów z kompletem kanałów, czerwonym, niebieskim oraz zielonym odpowiadającym medium hodowlanemu. W tym przypadku średnia wysokość komórek wyniosła $3,00 \pm 2,25 \mu m$, co świadczy o tym, że pomiar wielokanałowy nie ma wpływu na pogorszenie jakości obrazu. Ostatni rysunek 2.3d jest sumą z dziesięciu skanów z wykorzystaniem wyłącznie czerwonego barwnika. Średnia wysokość komórek dla tego zbioru danych wyniosła $3,17 \pm 2,67 \mu m$.

Średnia ważona wysokość dla czterech wartości przedstawionych na rysunku 2.3 wyniosła odpowiednio $2,94 \pm 1,23 \mu m$. Do symulacji MC przyjęto wysokość komórek równą $3,00 \mu m$.



Rysunek 2.3: Histogramy liczby zliczonych pikseli w funkcji wysokości komórek, uzyskane z analizy trójwymiarowych stosów obrazów (osie X , Y i Z). a) Linia M059J po wybarwieniu barwnikiem Dil, dla początkowej liczby wysianych komórek 5×10^4 . b) Linia M059J po wybarwieniu barwnikiem Dil dla początkowej liczby wysianych komórek $7,5 \times 10^4$. c) Linia M059K po pomiarach w trzech kanałach wraz z medium hodowlanym (czerwonym, niebieskim oraz zielonym). d) Linia M059K, suma danych dla dwóch początkowych liczb wysianych komórek z pomiarów, z wykorzystaniem wyłącznie kanału czerwonego. Przy każdym z wariantów znajduje się średnia wysokość komórek wraz z niepewnością uwzględniającą niepewność mikroskopu. Czerwone przerywane linie odpowiadają średniej wysokości komórek $\bar{h}$, natomiast czarne linie kreskowo-kropkowe średnim wysokościami $\pm \sigma$.

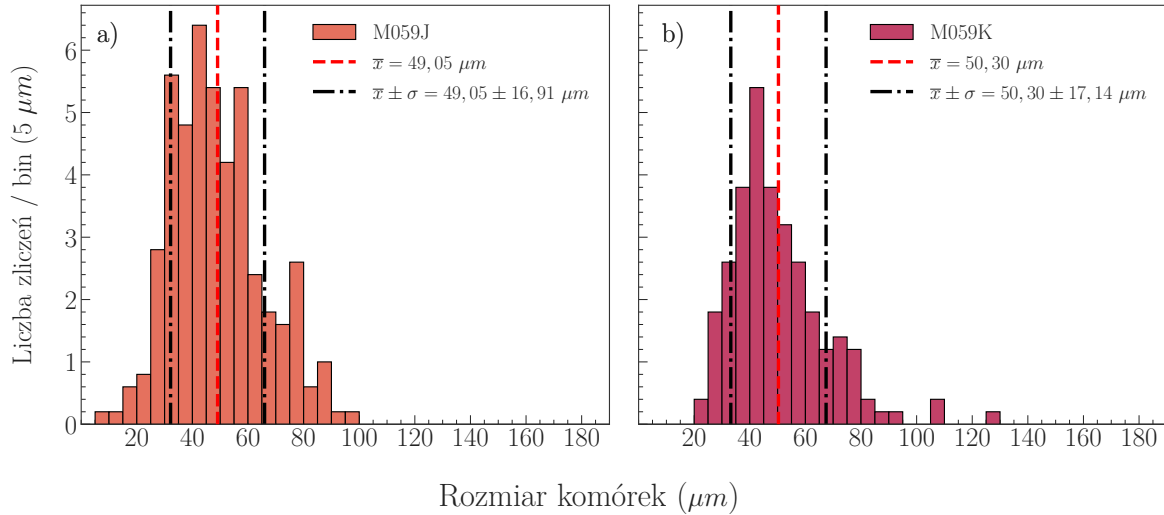


Rysunek 2.4: Histogram liczby zliczonych pikseli w zależności od wysokości medium hodowlanego otrzymany z pomiarów za pomocą mikroskopu konfokalnego, dla linii M059J oraz linii M059K. Czarna linia ciągła przedstawia sumę dwóch rozkładów Gaussa dopasowanych do danych eksperymentalnych. Różowa linia kropkowana ogranicza funkcję Gaussa dopasowaną dla jednego z dwóch maksimów o wartości średniej $\mu_1 = 11,9 \pm 0,1 \mu\text{m}$. Fioletowa linia przerywana to funkcja Gaussa dopasowana do drugiego maksimum o wartości średniej $\mu_2 = 22,6 \pm 0,1 \mu\text{m}$. Czerwona linia kropkowo-kreskowa oznacza średnia ważoną wysokość medium hodowlanego $\bar{h}_w^{(pole)}$. Niebieska przerywana linia oznacza medianę.

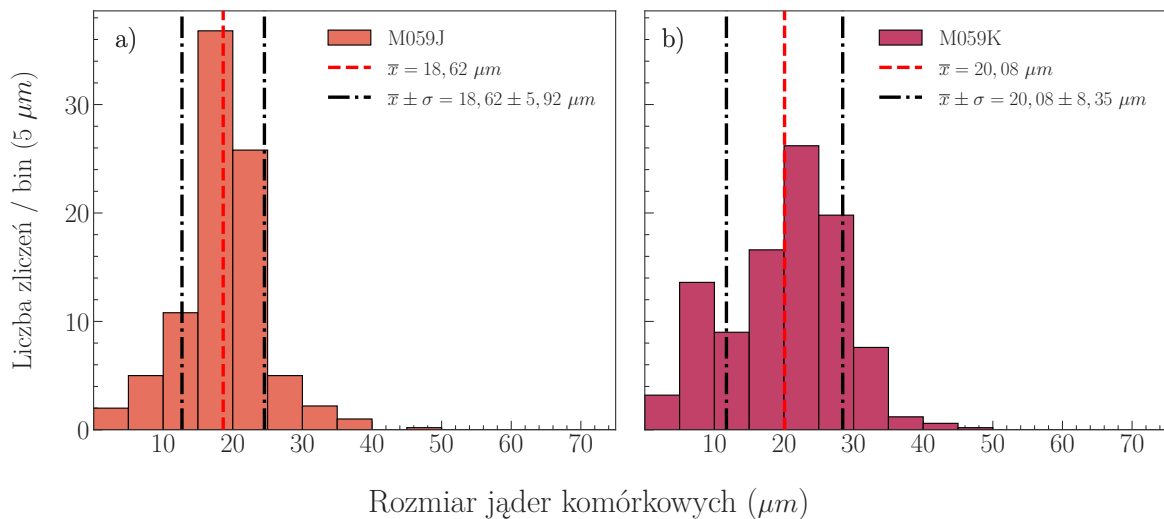
Otrzymany histogram liczby zliczonych pikseli w stosunku do wysokości medium hodowlanego przedstawia rysunek 2.4. Otrzymano dwa wyraźne maksima, do których dopasowano funkcję Gaussa ze średnimi wynoszącymi $\mu_1 = 11,9 \pm 0,1 \mu\text{m}$ oraz $\mu_2 = 22,6 \pm 0,1 \mu\text{m}$. Średnia wysokość $\bar{h}_w^{(pole)}$ policzona jako średnia ważona względem pola pod danym rozkładem to $18,05 \pm 0,12 \mu\text{m}$. Uwzględniając niepewność urządzenia to dokładnie $18,05 \pm 1,01 \mu\text{m}$. Sprawdzone również medianę dla wszystkich binów w histogramie, która wyniosła $18,00 \mu\text{m}$.

Wykonano również pomiary błon oraz jąder komórkowych wybarwionych odpowiednio Dil (kolor czerwony) oraz DAPI (kolor niebieski) jak przedstawiono na rysunku 2.2a oraz 2.2b. Zmierzono ponad 50 pełnych komórek i jąder komórkowych za pomocą programu *Fiji/ImageJ* [50, 51]. Histogramy liczby zliczeń w zależności od rozmiaru komórki dla linii M059J i M059K przedstawia rysunek 2.5. Wyniosły one odpowiednio $49,05 \pm 16,91 \mu\text{m}$ dla M059J i $50,30 \pm 17,14 \mu\text{m}$ w przypadku M059K. Na rysunku 2.6 znajdują się analogiczne histogramy dla rozmiaru jąder komórkowych. W przy-

padku linii M059J ich rozmiary wyniosły $18,62 \pm 5,92 \mu m$, natomiast dla linii M059K $20,08 \pm 8,35 \mu m$. Otrzymane rozmiary komórek zaokrąglono do $50,0 \mu m$ natomiast jąder komórkowych do $20,0 \mu m$ oraz zaimplementowano w modelu próbki biologicznej w programie do obliczeń MC.



Rysunek 2.5: Histogram liczby zliczeń pomiarów komórek na bin o szerokości $5 \mu m$ w zależności od rozmiaru mierzonego w μm a) dla linii M059J oraz b) dla linii M059K. Czerwone przerywane linie odpowiadają średniemu rozmiarowi komórek $\bar{x}$, natomiast czarne linie kreskowo-kropkowe średnim rozmiarom $\pm \sigma$.



Rysunek 2.6: Histogram liczby zliczeń pomiarów jąder komórkowych na bin o szerokości $5 \mu m$ w zależności od rozmiaru mierzonego w μm a) dla linii M059J oraz b) dla linii M059K. Czerwone przerywane linie odpowiadają średniemu rozmiarowi jąder komórkowych $\bar{x}$, natomiast czarne linie kreskowo-kropkowe średnim rozmiarom $\pm \sigma$.

2.2 Obliczenia Monte Carlo

Podstawowym celem zastosowania układu do napromieniania próbek biologicznych z wykorzystaniem źródła ^{241}Am jest prowadzenie badań radiobiologicznych na liniach komórkowych. Aby wyniki takich eksperymentów były wiarygodne oraz umożliwiały porównanie z danymi dostępnymi w literaturze, konieczne jest ich przedstawienie w funkcji zdeponowanej dawki. Ze względu na specyfikę oddziaływania cząstek α z materią oraz charakter badanego układu, bezpośrednie wyznaczenie dawki metodami pomiarowymi było niemożliwe. Ograniczenie to stało się podstawą do zastosowania metod MC, pozwalających na szczegółowe modelowanie transportu cząstek w zadanej geometrii. Wykorzystując precyzyjną wiedzę na temat geometrii źródła oraz badanego układu biologicznego, a także mając na uwadze, że bezpośredni pomiar energii zdeponowanej w monowarstwie komórek nie był możliwy, do obliczeń użyto programu MCNP w wersji 6.2 [52].

2.2.1 Program MCNP

Program MCNP jest uniwersalnym, ciągleenergetycznym, zależnym od czasu kodem do modelowania transportu promieniowania w uogólnionej geometrii. Został opracowany w Los Alamos National Laboratory i jest wykorzystywany do obliczeń transportu neutronów, kwantów γ , protonów, elektronów, cząstek α , czy innych cząstek naładowanych [52, 53]. Wykonuje on obliczenia MC w oparciu o ciągły w funkcji energii opis przekrojów czynnych, dla każdej możliwej energii rozpatrywanej cząstki. Dzięki temu otrzymuje się dokładne odwzorowanie fizyki oddziaływania cząstek i reakcji jądrowych. MCNP korzysta z obszernych baz danych jądrowych, ang. *Evaluated Nuclear Data File (ENDF)*, które następnie przetwarzane są narzędziem *NJOY* do plików formatu *ACE* (A Compact ENDF)[54] odczytywanego bezpośrednio przez MCNP6 [53]. Kod pozwala na zbudowanie dowolnej geometrii w trzech wymiarach, od prostych brył po bardzo złożone układy.

Obliczenia można przeprowadzać zarówno w trybie statycznym, który zakłada stałą w czasie emisję cząstek ze źródła, jak również w trybie zależnym od czasu, w którym oprócz przestrzennego i energetycznego rozkładu cząstek uwzględniany jest także ich rozkład czasowy. MCNP znajduje swoje zastosowanie w wielu dziedzinach, co potwierdza jego uniwersalność, między innymi: diagnostyka eksperymentalna, detekcja i pomiary promieniowania, bezpieczeństwo krytyczności w fizyce reaktorów jądrowych, redukcja zagrożeń jądrowych, ochrona radiologiczna i modelowanie osłon przed promieniowaniem jonizującym, czy analizę kryminalistyczną materiałów jądrowych [55]. Wiele prac naukowych potwierdziło, że MCNP jest również efektywnym narzędziem w dozymetrii na poziomie komórkowym[56, 57, 58]. Obliczenia rozkładu energii promieniowania jonizującego w mikroskali mają kluczowe znaczenie w eksperymentach radiobiologicznych i badaniach nad radioterapią.

2.2.1.1 Input do programu MCNP

Plik wejściowy do programu MCNP jest plikiem tekstowym, który składa się z trzech głównych sekcji: definicji komórek (ang. *Cell cards*), definicji powierzchni (ang. *Surface cards*) oraz karty danych (ang. *Data cards*).

Pierwsza służy do definicji obszarów geometrycznych, tzw. komórek (*cell*), będących składowymi tworzącymi geometrię rozpatrywanego przypadku. W celu jednoznacznego rozróżnienia komórek biologicznych i komórek w MCNP, w dalszej części pracy przy tych drugich wprowadzono zapis komórka (*cell*). Przypisuje się im w kolejnych kolumnach kodu numer porządkowy, numer materiału zdefiniowanego w karcie danych, gęstość materiału, wzajemne położenie względem siebie powierzchni budujących daną komórkę (*cell*) oraz parametry transportowe na przykład cenność. Wartość ujemna w kolumnie gęstości oznacza gęstość masową wyrażoną w g/cm^3 , natomiast wartość dodatnia odpowiada gęstości atomowej podanej w atomach na $barn \times cm$.

Po zdefiniowaniu gęstości materiału następuje pełna specyfikacja geometrii komórki (*cell*). Obejmuje ona listę ponumerowanych powierzchni ograniczających daną komórkę (*cell*). Znak przypisany do numeru powierzchni określa orientację powierzchni względem komórki (*cell*), gdzie znak ujemny oznacza obszar znajdujący się wewnątrz lub poniżej powierzchni, natomiast dodatni na zewnątrz lub powyżej. Cenność (ang. *importance*, tekst *IMP*) w MCNP jest parametrem przypisywanym komórkom geometrii, który określa, czy cząstki będą w nich śledzone. Wartość równa 0 oznacza brak śledzenia (cząstki są usuwane), natomiast wartości dodatnie definiują względne znaczenie cząstek i służą do kontroli transportu oraz optymalizacji czasu obliczeń metodą redukcji wariancji.

W sekcji drugiej, *Surface cards*, definiuje się granice geometryczne, czyli powierzchnie ograniczające poszczególne komórki (*cell*). Parametry te określają przede wszystkim ich kształt i położenie w przestrzeni. Definicji dokonuje się dając numer porządkowy, symbol określający kształt oraz współrzędne lub wymiary.

W sekcji danych definiuje się przede wszystkim materiały, które przypisane są poszczególnym komórkom (*cell*). Nadaje się im numer porządkowy, komponenty materiałów podając je w formacie *ZZZAAA*, gdzie *ZZZ* oznacza liczbę atomową, natomiast *AAA* liczbę masową (początkowe zera *ZZZ* mogą zostać pominięte). W następnej kolejności podaje się frakcje danego izotopu. Liczba dodatnia reprezentuje stosunek atomowy, a liczba ujemna stosunek masowy. Poza materiałem definiuje się również źródło, podając jego geometrię, lokalizację, rodzaj i kierunek emitowanego promieniowania wraz z energią, która może być reprezentowana jako liczba, rozkład ciągły lub dyskretny, a także jako kombinacja tych sposobów.

W trzeciej sekcji określa się również jaki typ cząstek ma być śledzony oraz definiowane są funkcje wynikowe tzw. *tallies*, które odpowiadają za to jakie wielkości fizyczne mają być wynikiem symulacji. Pozwalają wyznaczyć między innymi, strumień cząstek, dawkę czy całkowitą liczbę cząstek w elementach geometrii, do których są przypisane. Tabela 2.1 przedstawia niektóre z *tallies*, które są dostępne w kodzie MCNP i zostały wykorzystane na potrzeby niniejszej pracy.

Na końcu karty danych określa się warunek zakończenia symulacji, który może być reprezentowany przez liczbę przeanalizowanych cząstek lub czas obliczeń. Szczegółowe informacje na temat charakterystyki pliku wejściowego znajdują się w instrukcji do programu MCNP [59].

Tabela 2.1: *Tally* wykorzystane w obliczeniach za pomocą MCNP wraz z definicją, jednostkami oraz przeznaczeniem obliczeń.

Nr <i>tally</i>	Opis <i>tally</i>	Jednostka
F1	całkowita liczba cząstek przechodzących przez powierzchnię	<i>liczba cząstek</i>
F2	strumień cząstek uśredniony po powierzchni	<i>liczba cząstek/cm²</i>
F4	strumień cząstek uśredniony po objętości	<i>liczba cząstek/cm²</i>
F4 LET	liczba cząstek w funkcji mocy hamowania	<i>liczba cząstek/cm²</i>
F6	zdeponowana energia dzielona przez masę	<i>MeV/g</i>

W tabeli 2.2 wypisane zostały trzy główne sekcje pliku wsadowego do MCNP oraz elementy, które są w nich definiowane. Dla zilustrowania podany został prosty przykład kodu umożliwiający obliczenia przypadku ze źródłem cząstek α . Pełny kod modelu układu doświadczalnego opisanego w niniejszej pracy został opisany w rozdziale 2.2.2 i znajduje się w dodatku. Zamieszczony w tabeli prosty przykład zawiera geometrię prostopadłościanu, zdefiniowanego za pomocą *macrobodyes*. *Macrobodyes* w MCNP to złożone powierzchnie geometryczne, reprezentujące gotowe kształty (np. walce, stożki, prostopadłościany), które upraszczają definicję geometrii bez potrzeby łączenia wielu prostych powierzchni. Jeden z wierzchołków prostopadłościanu znajduje się na początku układu współrzędnych, bryła wypełniona jest wodą, a długości jego boków wynoszą odpowiednio: $x = 3 \text{ cm}$, $y = 4 \text{ cm}$, $z = 5 \text{ cm}$. Punktowe źródło zostało zdefiniowane w samym początku układu współrzędnych i emituje cząstki α o energii 5 MeV . Kod liczy strumień cząstek α uśredniony w objętości prostopadłościanu. Warunkiem zakończenia symulacji, jest rozpatrzenie historii 1×10^{10} cząstek.

Tabela 2.2: Struktura pliku wejściowego programu MCNP przedstawiona w trzech kolumnach: sekcje główne, definiowane w nich elementy kodu oraz przykładowy kod.

Sekcja	Elementy kodu	Przykładowy kod
definicja komórek (<i>cell</i>)	nr komórki (1) nr materiału (1) gęstość materiału w g/cm^3 (-1.0) wewnątrz powierzchni 1 (-1) tryb transportu (<i>imp</i>)	1 1 -1.0 -1 <i>imp:a=1</i>
definicja powierzchni	nr powierzchni (1) prostopadłościan (<i>RPP</i>) wymiały ($3 \times 4 \times 5$ cm)	1 <i>RPP</i> 0 3 0 4 0 5
karta danych	woda źródło monoenergetyczne (5 <i>MeV</i>) w punkcie (0,0,0) alfa średni strumień cząstek w objętości prostopadłościanu warunki zakończenia	M1 1001 2 8016 1 SDEF pos=0 0 0 par=a erg=5 MODE a F4:a 1 nps 1e+10

2.2.1.2 Modele transportu ciężkich jonów w programie MCNP

Transport ciężkich cząstek naładowanych opisywany jest w MCNP za pomocą trzech kolejnych procesów fizycznych. Dla cząstek o energii poniżej 1 *MeV* stosowane są tzw. dane tablicowe (*tabular regime*), oparte na bazach danych zawierających wyniki eksperymentalne.

W przypadku cząstek o wyższych energiach, w zakresie od 1 *MeV* do 1 *GeV*, wykorzystywane są różne modele teoretyczne. Pierwszym procesem fizycznym jest ciągła utrata energii, w której analizowana jest średnia wartość strat energii cząstek na podstawie przybliżenia ciągłego spowalniania, ang. *Continuous Slowing Down Approximation (CSDA)*. W zakresie niskich energii, poniżej 1,31 *MeV*, MCNP stosuje teorię Lindharda, która traktuje ośrodek jako gaz elektronowy, a cząstkę jako punktowy ładunek doświadczający oporu kulombowskiego. Dla energii powyżej 5,24 *MeV* używana jest teoria Bethego, w której dominującym mechanizmem hamowania są nieelastyczne zderzenia z elektronami związanymi w atomach. Teoria ta obejmuje dwie poprawki: efekt gęstości, uwzględniający ekranowanie pola cząstki przez elektrony w gęstym ośrodku i ograniczający wzrost strat energii przy bardzo wysokich energiach, oraz poprawkę powłokową, związaną z zależnością strat energii od struktury powłok elektronowych. W zakresie energii 1,31-5,24 *MeV* stosowana jest interpolacja między

modelami Lindharda i Bethego.

Drugim procesem jest rozpraszanie energii (*straggling*). O ile model CSDA opisuje średnią wartość utraty energii, w rzeczywistości cząstki o tej samej energii początkowej nie tracą jej w sposób identyczny, lecz doświadczają fluktuacji. Wynikają one z różnej liczby i charakteru zderzeń z elektronami na danym odcinku drogi, a MCNP modeluje je probabilistycznie, co pozwala realistycznie odwzorować rozrzut energii resztkowej cząstek.

Trzecim procesem jest rozpraszanie kątowe, wynikające z wielokrotnych oddziaływań kulombowskich pomiędzy cząstką a jądrami atomów w materiale. W MCNP stosowana jest teoria FNAL (Fermi National Lab models), która dzieli oddziaływania na *soft* - liczne, małe kąty, traktowane statystycznie jako rozkład Gaussa, oraz *hard* - rzadkie, duże kąty, modelowane indywidualnie. Proces ten determinuje geometrię torów cząstek i prowadzi do ich przestrzennego rozproszenia w materiale. Po każdym z trzech etapów MCNP sprawdza, czy cząstka spełnia warunki zakończenia jej transportu, takie jak osiągnięcie energii poniżej progu czy opuszczenie obszaru istotnego statystycznie [60].

2.2.2 Model układu eksperymentalnego

Bazując na zasadach pliku wejściowego do programu MCNP opisanych w podrozdziale 2.2.1.1 przygotowano dokładny model opisujący układ do napromieniania próbek biologicznych ze źródłem powierzchniowym ^{241}Am . W pierwszej części inputu (*Cell cards*) poszczególnym komponentom geometrii przypisano materiały, gęstości oraz cenności. W sekcji *Surface cards* uwzględniono szczegółową geometrię poprzez zdefiniowanie powierzchni ograniczających poszczególne części układu. Listę elementów układu, przypisanych im numerów komórek (*cell*), materiałów, gęstości oraz rozmiarów zawiera tabela 2.3.

Model układu składa się z walców o różnych średnicach ograniczonych powierzchniami o odpowiedniej współrzędnej w osi Z . Elementy geometrii modelu zostały przedstawione w odwrotnej kolejności w stosunku do rysunku 2.1, jednak w programie MCNP nie jest uwzględniany wpływ grawitacji, dlatego orientacja modelu nie ma znaczenia dla wyników obliczeń. W kierunku od dołu znajdują się kolejno część aktywna źródła (2) ochronna warstwa złota (3), folia Mylar (4) oraz powietrze między źródłem a próbką biologiczną (5). Komponenty od 1 do 5 zostały zdefiniowane ze średnicą równą 5 cm, odpowiadającą realnym rozmiarom źródła. Średnica medium hodowlanego (6) oraz monowarstwy komórek (7) wynosiła 3 cm. Przestrzeń pod źródłem (1) oraz nad komórkami (8) była nieograniczoną przestrzenią poza układem, nieistotną z punktu widzenia symulacji.

Dokładne wymiary oraz współrzędne położenia brył geometrycznych pochodziły odpowiednio z certyfikatu źródła wydanego przez producenta, pomiarów szalki Petriego, czy w przypadku próbki biologicznej, wyników otrzymanych na podstawie mikroskopii konfokalnej opisanej w podrozdziale 2.1.1. Przekrój poprzeczny przez geometrię układu eksperymentalnego przedstawia rysunek 2.16, natomiast interpretacja znajdujących się na nim torów cząstek α opisana została w podrozdziale 2.4.1.

Stworzono również zaawansowaną geometrię próbki biologicznej definiując w niej

Tabela 2.3: Parametry komórek (*cell*) zdefiniowanych w modelu układu do napromieniania próbek biologicznych ze źródłem ^{241}Am . Do każdej komórki (*cell*) został przypisany element układu, materiał, gęstość oraz wysokość.

Komórka (<i>cell</i>)	Element układu	Materiał	Gęstość (g/cm ³)	Wysokość (cm)
1	przestrzeń pod źródłem	powietrze	0,001205	∞^a
2	warstwa aktywna źródła	AmO ₂ i Au	19,32	0,00004
3	warstwa ochronna	Au	19,32	0,00008
4	folia Mylar	PET ^b	1,38	0,0006
5	wnętrze szalki Patriego	powietrze	0,001205	0,68
6	medium hodowlane	woda ^c	1,0	0,001805
7	monowarstwa komórek	brain ^d	1,03	0,0003
8	przestrzeń nad komórkami	powietrze	0,001205	∞^a

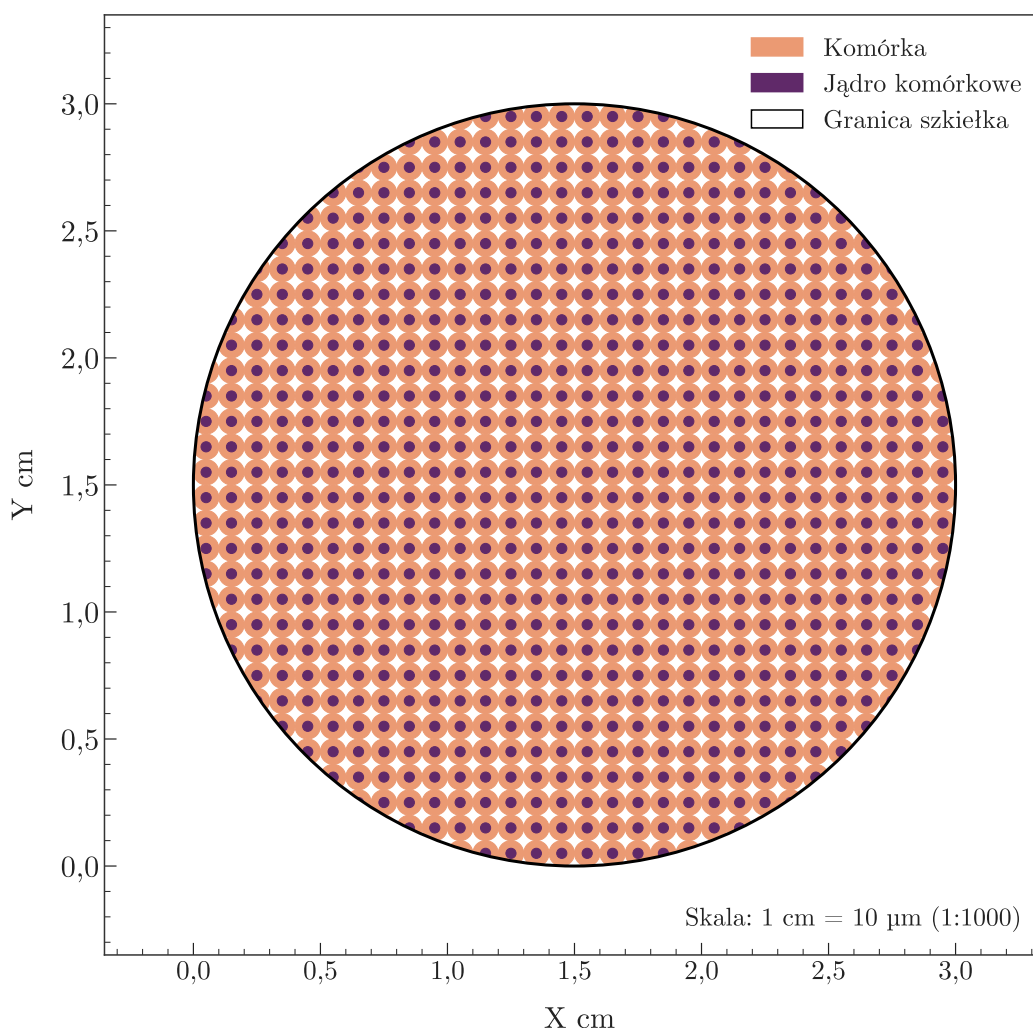
^a Nieskończona przestrzeń poza geometrią modelu.

^b Politereftalan etylenu.

^c Medium hodowlane zostało uproszczone w modelu jako woda.

^d Tkanka mózgowa według danych Międzynarodowej Komisji Ochrony Radiologicznej ang. *International Commission on Radiological Protection (ICRP)* [61].

siatkę o rozmiarze oczek $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$, w których koncentrycznie zdefiniowano komórki o średnicy $50\ \mu\text{m}$ oraz wewnątrz nich jądra komórkowe o średnicy $20\ \mu\text{m}$, co odpowiada rozmiarom komórek, których wyznaczenie opisano w podrozdziale 2.1.2. Tak zbudowana siatka pokrywała powierzchnię walca o średnicy $3\ \text{cm}$ i wysokości $3\ \mu\text{m}$, odpowiadającej wymiarom szkiełka nakrywkowego oraz wysianym na nie komórkom. Rysunek 2.7 przedstawia wizualizację geometrii próbki komórkowej w zmienionej skali. Jeden centymetr siatki komórek na rysunku odpowiada $10\ \mu\text{m}$ rzeczywistej próbki.



Rysunek 2.7: Geometria komórek na szkiełku podstawowym zaimplementowana do programu MCNP. Okręgi koloru pomarańczowego odwzorowują komórki, kolorem fioletowym zaznaczone zostały jądra komórkowe, koncentryczne do komórek. Granica próbki biologicznej na szkiełku podstawowym o średnicy 3 cm została oznaczona czarną ciągłą linią. Elementy wewnątrz próbki zostały zobrazowane w skali, gdzie 1 cm na osi X odpowiada 10 μm w rzeczywistości.

2.2.3 Obliczenia wykonane za pomocą programu MCNP

Wykonanie oceny transportu cząstek wewnątrz układu, strat energii na przestrzeni poszczególnych komponentów oraz wyznaczenie dawki deponowanej w komórkach wymagało wykonania odpowiednich obliczeń za pomocą kodu MCNP. W tym celu skorzystano z funkcji wynikowych (*tallies*) opisanych w tabeli 2.1.

Aktywność źródła podana przez producenta wynosiła 1,96 MBq i jest interpretowana jako liczba cząstek emitowanych po przejściu przez część aktywną oraz ochronną warstwę złota w kąt bryłowy 2π (wyłącznie przez rzeczywistą powierzchnię źródła w górę). Symulacje MC wykonane w pracy zakładają, że część aktywna źródła ^{241}Am to źródło objętościowe z emisją cząstek we wszystkich kierunkach, tj. 4π , w związku z powyższym aktywność początkowa w obliczeniach została odpowiednio znormali-

zowana, aby zrekompensować straty liczby cząstek na elementach źródła. Czynniki normalizacyjny N został wyliczony z wykorzystaniem *tally F1*, którego wynikiem jest całkowita liczba cząstek przechodzących przez zadaną powierzchnię. Czynniki N został zdefiniowany jako odwrotność stosunku liczby cząstek przechodzących przez rzeczywistą powierzchnię źródła do liczby cząstek emitowanych przez wszystkie powierzchnie ograniczające łącznie część aktywną i warstwę złota. Wyznaczoną całkowitą emisję będącą iloczynem aktywności podanej przez producenta i czynnika N zaimplementowano do kolejnych symulacji.

Cząstki α po opuszczeniu elementów źródła, (zanim dotarły do próbki biologicznej) traciły energię w kolejnym ośrodku, którym było powietrze. Sprawdzenie rozkładu cząstek wchodzących do próbki na powierzchni medium hodowanego umożliwiły obliczenia, z wykorzystaniem *tally F2*, strumienia cząstek uśrednianego przez powierzchnię, wyrażonego jako liczba cząstek na cm^2 . Z kolei strumień cząstek α uśredniony przez objętość monowarstwy komórek został policzony na podstawie *tally F4*, definiowanego jako suma długości torów cząstek w komórce (*cell*) dzielona przez jej objętość. Strumień cząstek w zależności od energii w tym przypadku również został wyrażony w liczbie cząstek na cm^2 . Do *tally F4* dodano parametr LET, który umożliwia przeliczenie uzyskanych wyników z całkowitego strumienia cząstek na strumień w zależności od LET, wyrażonego w MeV/cm . Parametr ten pozwala na uwzględnienie sposobu, w jaki cząstki oddają energię ośrodkowi wzdłuż swojego toru. W praktyce zastosowanie opcji LET w karcie danych powoduje, że MCNP dokonuje sortowania i sumowania wkładów do strumienia cząstek według ich wartości LET, umożliwiając uzyskanie rozkładu strumienia w funkcji przekazu energii.

Obliczenie dawki deponowanej w monowarstwie komórek zarówno przez cząstki α jak i fotony możliwe było za pomocą *tally F6*, którego wynikiem jest dawka pochłonięta, czyli energia zdeponowana w odpowiedniej komórce (*cell*) dzielona przez jej masę. Otrzymano wyniki w jednostkach MeV/g w funkcji aktywności źródła (w Bq), co odpowiada $MeV/g/s$. Następnie przeliczono je na $J/kg/s$, co odpowiada jednostce mocy dawki pochłoniętej (Gy/s). Na tej podstawie ustalono czas napromieniania niezbędny do zdeponowania 1 Gy w komórkach.

Obliczenia depozycji cząstek α wykorzystano również do zweryfikowania jednorodności napromieniania próbek biologicznych. W tym celu target, w geometrii modelu MCNP układu, podzielono na koncentryczne okręgi w odstępach co 1 mm . Na potrzeby tych obliczeń zwiększono również jego średnicę do 5 cm . To umożliwiło weryfikację wartości zdeponowanej energii cząstek w zależności od położenia względem odległości od środka źródła powierzchniowego. Dodatkowo geometria próbki przedstawiona na rysunku 2.7 umożliwiła obliczenie liczby cząstek w funkcji energii, trafiających bezpośrednio w pojedynczą błonę komórkową, jądro komórkowe, a także oszacować jaka część z nich trafia w przestrzeń między komórkami.

Zestawienie wszystkich obliczeń wykonanych za pomocą MCNP, wykorzystanych w nich *tally*, a także numer kodu, z dodatku do pracy, w którym znajduje się odpowiadający plik wejściowy do programu MCNP przedstawiono w tabeli 2.4.

Tabela 2.4: Zestawienie obliczeń wykonanych za pomocą kodu MCNP, użyte w nich funkcje wynikowe (*tallies*) oraz numer kodu wykorzystanego do przeprowadzenia symulacji, załączonego w dodatku do pracy

Lp.	Opis wykonanego obliczenia	<i>tally</i>	fragment kodu
1	Aktywność początkowa powierzchniowego źródła ^{241}Am	<i>tally</i> F1	6.1
2	Rozkład energii cząstek α wchodzących do próbki biologicznej	<i>tally</i> F2	6.1
3	Rozkład energii cząstek α w monowarstwie komórek	<i>tally</i> F2	6.1
4	LET cząstek α w monowarstwie komórek	<i>tally</i> F4 LET	6.1
5	Dawka promieniowania α oraz γ w monowarstwie komórek	<i>tally</i> F4	6.1
6	Zależność deponowanej dawki promieniowania α w monowarstwie komórek od grubości warstwy medium hodowlanego	<i>tally</i> F6	6.1
7	Weryfikacja jednorodności depozycji energii cząstek α w monowarstwie komórek, w obszarze źródła powierzchniowego	<i>tally</i> F6	6.2
8	Liczba cząstek α padających na pojedyncze jądro komórkowe	<i>tally</i> F4	6.1
9	Uśredniony strumień cząstek α w objętości detektora krzemowego (opisane w podrozdziale 2.3.1)	<i>tally</i> F4	6.3
10	Rozkład energii oraz liczba cząstek α deponowanych w detektorze śladowym (opisane w podrozdziale 2.3.2)	<i>tally</i> F2 <i>tally</i> F4	6.1

2.3 Weryfikacja obliczeń Monte Carlo

Opisana geometria układu do napromieniania została wiernie odwzorowana w kodzie MCNP, w celu obliczenia depozycji energii cząstek α w materiale biologicznym. Zanim jednak cząstki dotarły do obszaru docelowego, przechodziły przez materiały o zróżnicowanym składzie izotopowym i gęstości. Precyzję symulacji zweryfikowano poprzez pomiary rozkładu energii cząstek α w warunkach umożliwiających bezpośrednią detekcję. W tym celu zastosowano dwie komplementarne metody: detektor krzemowy w próżni, który pozwolił na bezpośrednią weryfikację kodu MC oraz określenie grubości części aktywnej źródła, oraz detektory śladowe, które umożliwiły sprawdzenie poprawności obliczeń strat energii cząstek α w geometrii układu, przed dotarciem do próbki biologicznej. Zestawienie wyników eksperymentalnych i symulacyjnych w warunkach, gdzie możliwe były bezpośrednie pomiary, potwierdziło wiarygodność modelu numerycznego i pozwoliło na ekstrapolację obliczeń do skali komórkowej, w której bezpośrednia rejestracja nie była możliwa.

2.3.1 Pomiary za pomocą detektora krzemowego

Obliczenie aktywności początkowej warstwy aktywnej, opisane w podrozdziale 2.2.3, wymagało szczegółowych informacji o budowie źródła, w tym wysokości warstwy aktywnej i grubości warstwy ochronnej. Producent w certyfikacie źródła [45] podaje te wartości jedynie jako górne limity. Dlatego konieczne było wykonanie dodatkowych pomiarów, które pozwoliły na dokładne określenie obu parametrów. Umożliwiło to precyzyjne obliczenie strat energii cząstek α w poszczególnych elementach źródła oraz weryfikację wyników symulacji MC.

W celu wyznaczenia wysokości warstwy mieszaniny AmO_2 i złota oraz ochronnej warstwy złota wykonano pomiary energii cząstek α z wykorzystaniem monolitycznego, barierowego detektora krzemowego (ORTEC, USA) o średnicy warstwy aktywnej wynoszącej 21 mm. Następnie wyniki porównano z obliczeniami MC. W pierwszej kolejności wykonano pomiary kalibracyjne w próżni (1×10^{-3} mbar) z wykorzystaniem pulsera oraz spektroskopowego źródła ^{241}Am o aktywności 9 kBq. Na podstawie trzech energii cząstek α 5388 keV, 5442,80(13) keV oraz 5485,56(12) keV oszacowano gaussowskie poszerzenie energii, ang. *Gaussian Energy Broadening (GEB)*, parametr detektora związany z jego zdolnością rozdzielczą. Znając również szerokości w połowie wysokości maksimów, ang. *Full Width at Half Maximum (FWHM)* obliczono parametry a , b oraz c , zgodnie z równaniem 2.1

$$FWHM = a + b\sqrt{E + cE^2}, \quad (2.1)$$

gdzie E jest energią cząstek wyrażoną w MeV [59].

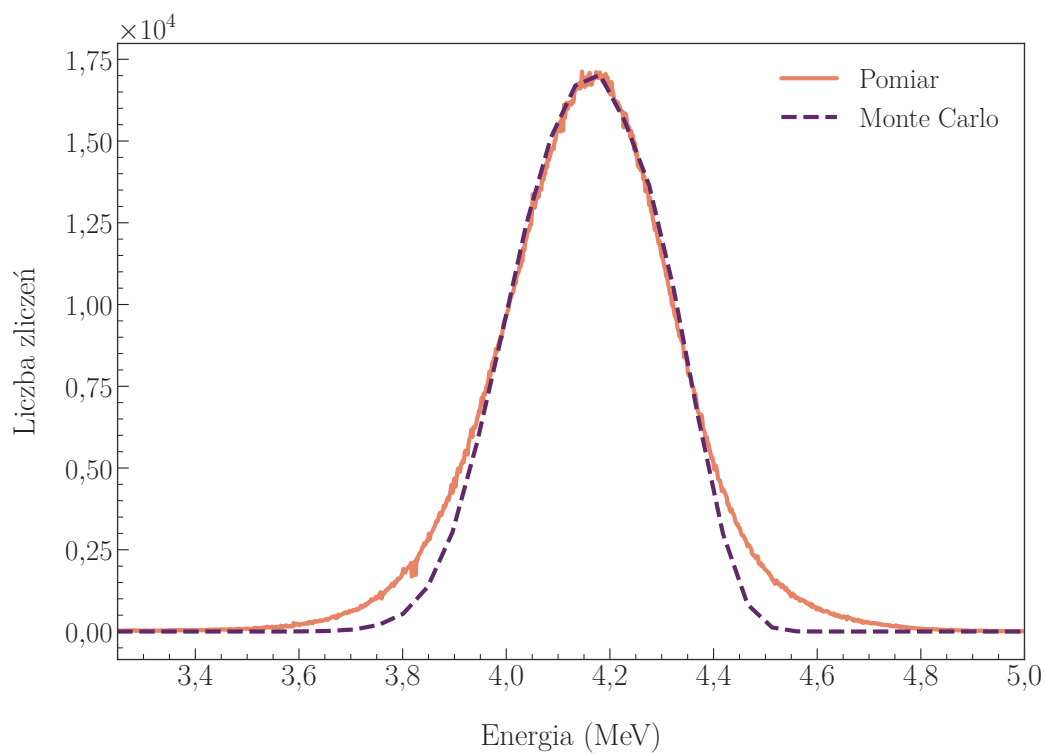
Wyniosły one odpowiednio: $a = 0,657(419)$, $b = -0,272(180)$ oraz $c = 0$ [62] i zostały wykorzystane w obliczeniach MC, aby uwzględnić GEB detektora krzemowego.

Następnie przeprowadzono właściwe pomiary ze źródłem powierzchniowym. Źródło znajdowało się na ramieniu zamontowanym bezpośrednio nad częścią aktywną detektora

krzemowego, na którym koncentrycznie względem detektora ułożony został aluminiowy kolimator o średnicy 50 mm z otworem o średnicy 20 mm . Dzięki temu pokrywał on pozostałą powierzchnię źródła cząstek α . Bezpośrednio na kolimatorze położono O - ring, na którym ułożone zostało źródło pokryte folią Mylar o grubości $6\text{ }\mu\text{m}$. Jego celem była ochrona powierzchni źródła przed uszkodzeniami mechanicznymi. W przyjętej geometrii pomiaru, z uwzględnieniem grubości poszczególnych elementów znajdujących się pomiędzy aktywną częścią detektora krzemowego a źródłem, odległość między nimi wynosiła $4,12\text{ cm}$. Pomiary prowadzono w warunkach próżni.

Opisane parametry eksperymentu zostały szczegółowo odtworzone w MCNP, z dokładnością do wymiarów, gęstości oraz składu atomowego poszczególnych materiałów. Policzone zostało *tally F4*, tj. uśredniony strumień cząstek α w objętości detektora krzemowego wyrażony w liczbie cząstek na cm^2 w funkcji energii. Obliczenia uwzględniały wcześniej ustalone parametry GEB. Rozkład energii cząstek α w funkcji liczby zliczeń wyliczony poprzez *tally F4* porównano z wynikami pomiarów z wykorzystaniem detektora krzemowego i przedstawiono na rysunku 2.8.

Wykonano serię obliczeń dla różnych wariantów wysokości części aktywnej źródła (AmO_2 i Au) oraz warstwy ochronnej (Au), wybrano takie, przy których występowała największa zbieżność położenia centroidów oraz przykrycie powierzchni pod funkcją Gaussa. Wynosiły one odpowiednio $0,4\text{ }\mu\text{m}$ dla warstwy aktywnej oraz $0,8\text{ }\mu\text{m}$ dla ochronnej warstwy złota. Te wartości zostały zaimplementowane do symulacji MC związanych z dozymetrią układu, co zostało opisane w kolejnym rozdziale 2.4. Pomarańczowa linia ciągła odpowiada wynikom pomiarów z detektorem natomiast fioletowa linia przerywana danym z symulacji. Obliczono całki odpowiadające krzywym przedstawionym na rysunku 2.8 (tj. pola pod odpowiednimi pikami), a stwierdzona rozbieżność między ich wartościami wynosi 4%.



Rysunek 2.8: Rozkład energii cząstek α , emitowanych z powierzchniowego źródła ^{241}Am pokrytego folią Mylar. Pomarańczowa ciągła linia odpowiada energii zmierzonej za pomocą detektora krzemowego w próżni, natomiast fioletowa linia przerywana energii obliczonej za pomocą MCNP.

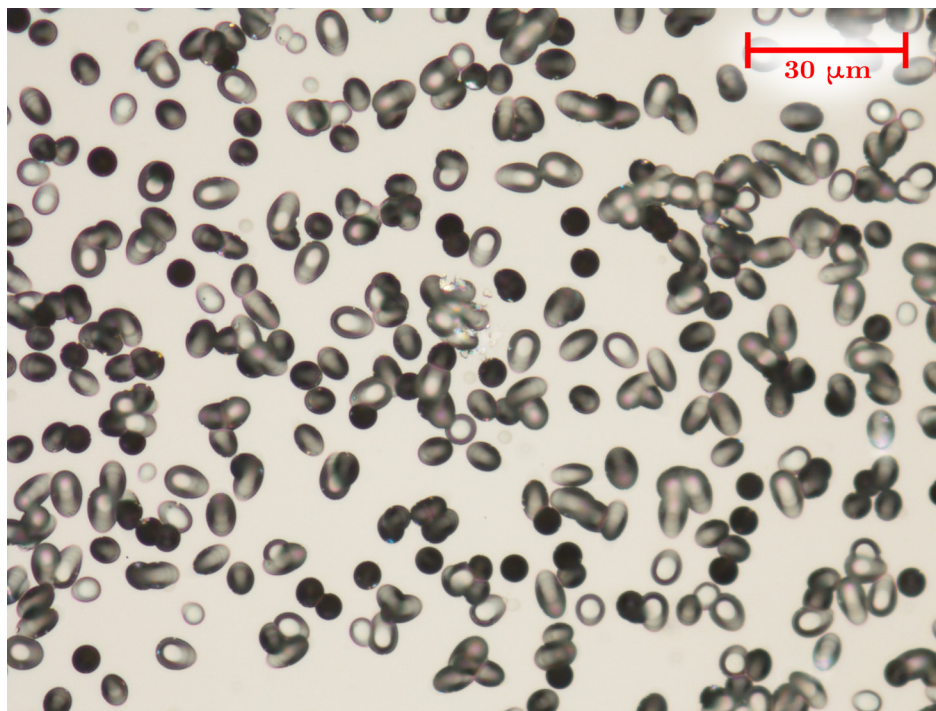
2.3.2 Pomiary za pomocą detektora śladowego

Polimer CR-39 (poli(allylo-diglikolowy węglan), PADC) oraz jego odmiany handlowe PM-355/PM-500/PM-600 stosowane są jako stałociałowe detektory śladowe ang. *Solid-State Nuclear Track Detector (SSNTD)*. Jest to polimer sieciowany z monomeru allyl-diglykolowego węglanu wprowadzony komercyjnie w latach 40-tych XX wieku jako materiał optyczny Columbia Resin 39, a w latach 70-tych znalazł zastosowanie jako detektor promieniowania jonizującego [63]. Detektory śladowe to przezroczyste tworzywa sztuczne charakteryzujące się wysoką czułością na ciężkie cząstki naładowane, przy jednoczesnej niskiej czułości na promieniowanie γ , X czy elektrony, co czyni je materiałem wysoce selektywnym i wykorzystywanym w warunkach promieniowania mieszanego [64].

Podstawą działania detektorów SSNTD jest powstawanie torów uszkodzeń w materiale detektora po przejściu przez niego ciężkiej cząstki naładowanej. Cząstki o wysokim LET oraz elektrony wtórne, powstałe w wyniku jonizacji powodują wzdłuż swojego toru rozerwanie długich łańcuchów polimerów, tworzenie wolnych rodników, a także niskocząsteczkowych produktów radiolizy, np. CO_2 , czy fragmentów monomerów. Wymienione zmiany w materiale detektora składają się na tor uszkodzeń, ang. *latent track*. Powstałe ślady nie są widoczne optycznie, dlatego stosuje się trawienie chemiczne w roztworach wodorotlenku sodu (NaOH). Polimer nieuszkodzony rozpuszcza się z prędkością V_B , ang. *bulk etch rate*, natomiast zdegradowana strefa wzdłuż toru cząstki – szybciej, z prędkością V_T , ang. *track etch rate*. Warunek $V_T > V_B$ sprawia, że w miejscu toru formuje się lej trawienny, ang. *pit*, którego rozmiary i kształt zależą od rodzaju i energii cząstki [65, 66]. Detektory śladowe charakteryzują się wysoką efektywnością detekcji między innymi cząstek α o energii z zakresu od 100 *keV* do kilku *MeV* z możliwością rejestracji do 10×10^6 *cząstek/cm²* bez efektu nakładania się torów [64, 67]. Zdolność rozdzielcza polimerów to 50 *keV* w przypadku cząstek α [67] i około 3% dla protonów i jonów węgla o energii rzędu kilku *MeV* [66].

Detektory SSNTD wykorzystywane są między innymi w detekcji radonu, eksperymentach fuzji jądrowej w diagnostyce wiązek ciężkich jonów [68, 67, 66]. W Literaturze znajdują się również wskazania o zastosowaniu detektorów w radiobiologii, gdzie mikrometrowe warstwy polimerów CR-39 posłużyły jako szalki do hodowli komórkowej, a następnie w badaniu charakterystyki promieniowania α na poziomie komórek [65].

Ze względu na sposób detekcji oraz selektywność względem promieniowania γ detektory SSNTD zostały wykorzystane do zbadania rozkładu energii cząstek α pochodzących z powierzchniowego źródła ^{241}Am na powierzchni próbki biologicznej, tj. wchodzących do medium hodowlanego w zaprezentowanym układzie. W tym celu umieszczono źródło na specjalnie zaprojektowanym oraz wydrukowanym w 3D statywie, który pozwalał na umiejscowienie powierzchni aktywnej źródła dokładnie 6,8 *mm* nad powierzchnią detektora śladowego. Ze względu na ograniczenie związane z liczbą cząstek rejestrowaną na *cm²* (bez efektu nakładania torów), napromienianie detektora przeprowadzono w czasie 69 s. Napromieniony detektor SSNTD przedstawia rysunek 2.9.

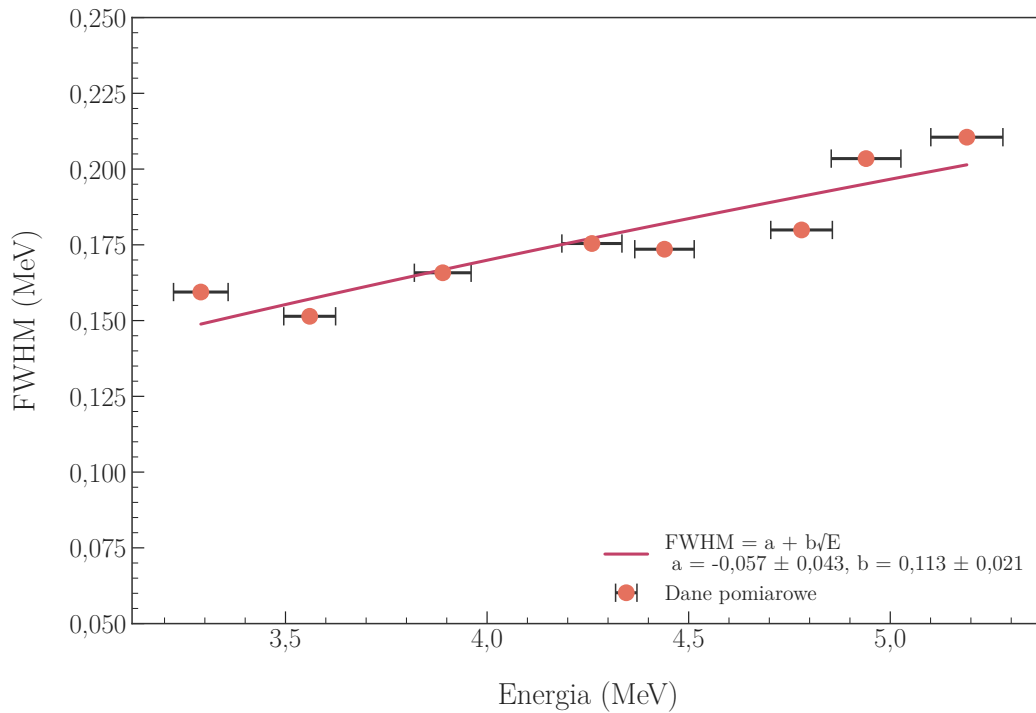


Rysunek 2.9: Detektor śladowy napromieniony dawką $0,17\text{ Gy}$. Widoczne ślady powstały w wyniku oddziaływania cząstek α na materiał detektora. Poziom szarości oraz powierzchnia śladów zależą od energii cząstek.

Odpowiednio wcześniej wykonano kalibrację energetyczną z wykorzystaniem spektroskopowego źródła ^{241}Am . Cząstki alfa o niższych energiach uzyskano poprzez zastosowanie cienkich, aluminiowych folii na powierzchni detektorów. Grubość warstw oraz starty energii cząstek zostały wyliczone z wykorzystaniem oprogramowania do obliczeń strat energii jonów *SRIM* [69].

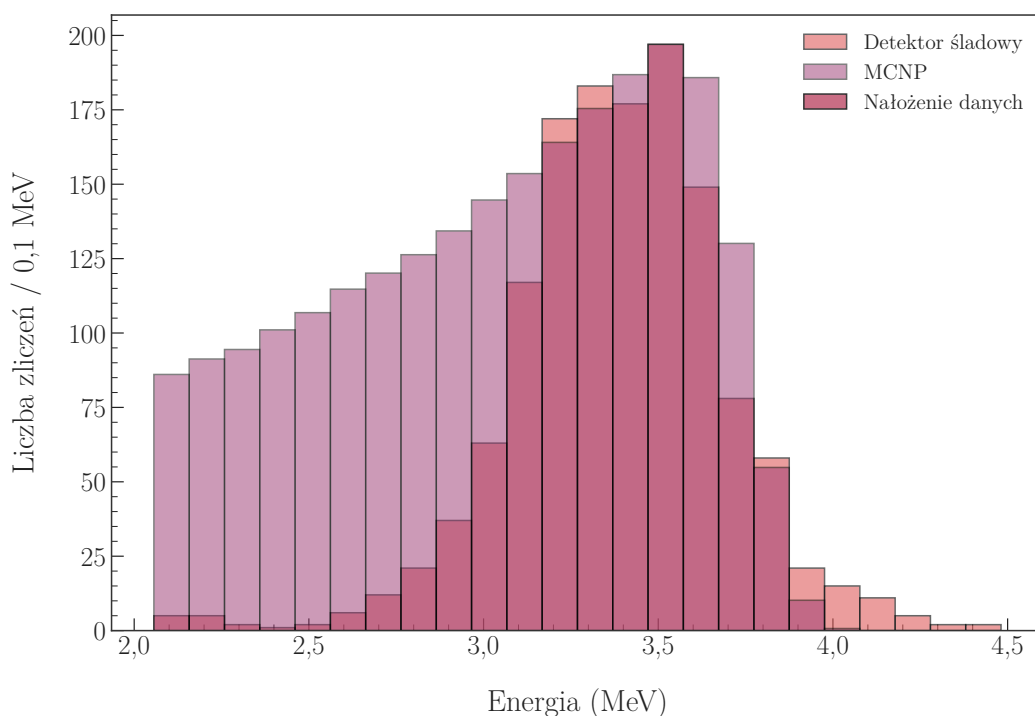
Napromienione detektory wytrawiano w roztworze $6,25\text{ N (mol/L)}$ NaOH w temperaturze 70°C przez trzy godziny, a następnie analizowano za pomocą półautomatycznego systemu składającego się z mikroskopu optycznego połączanego z komputerem wyposażonym w kamerę CCD (Nikon DS-Fi2, 5.24 Mpix) oraz oprogramowanie Nikon NIS-Elements BR 4.00.03 (64-bit).

Kalibracja pozwoliła na przypisanie danej średnicy kraterów w materiale detektora do energii cząstek α oraz czasu wytrawiania detektorów. Dodatkowo wyznaczano parametr określany jako średni poziom szarości śladu, który odzwierciedla ilość światła odbitego od powstałego w detektorze zagłębienia, rejestrowanego za pomocą mikroskopu optycznego. Połączenie obu parametrów – geometrycznych i optycznych – pozwalało na jednoznaczne określenie energii cząstki odpowiedzialnej za zarejestrowany ślad. Na podstawie punktów kalibracyjnych wykreślono zależność FWHM obliczonej energii w zależności od zarejestrowanej energii cząstek α przez detektor śladowy, co przedstawia rysunek 2.10. Zgodnie z równaniem 2.1, dla $c = 0$ wyznaczono parametry poszerzenia gaussowskiego (GEB) detektora polimerowego, które następnie zaimplementowano w obliczeniach MC.



Rysunek 2.10: Zależność FWHM od energii cząstek α otrzymana z pomiarów kalibracyjnych. Różowa prosta została dopasowana do danych pomiarowych, w celu wyznaczenia parametrów GEB według podanego równania: $FWHM = a + b\sqrt{E}$.

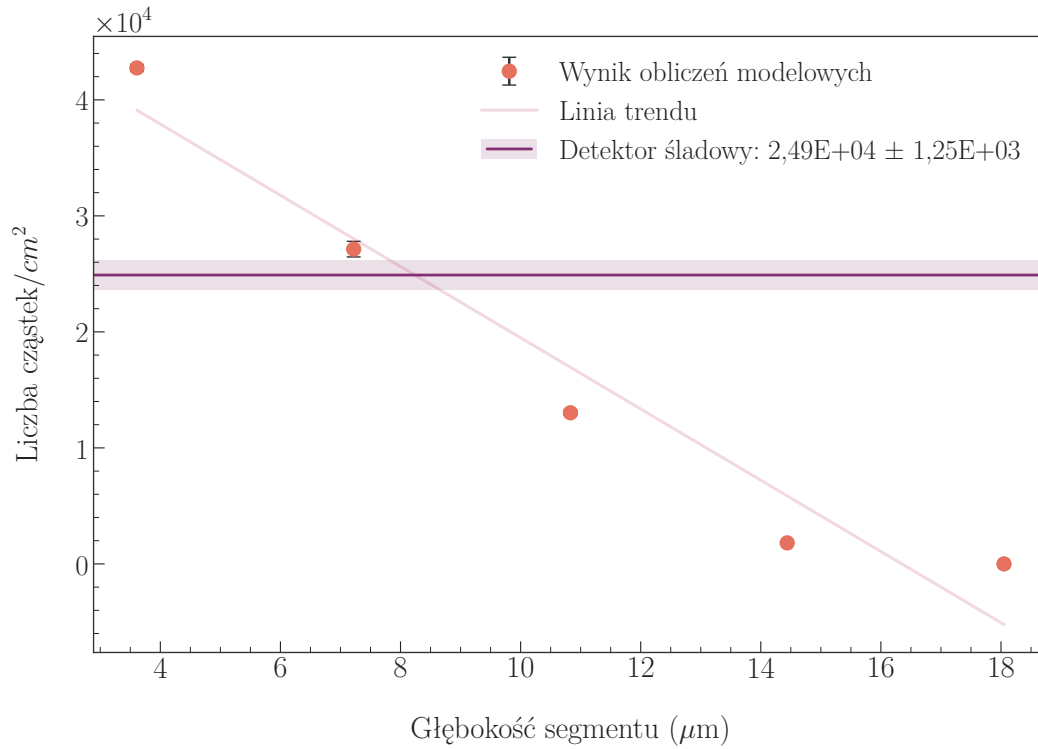
Na rysunku 2.11 przedstawiono wyniki rozkładu energii cząstek α otrzymanego z pomiarów źródła powierzchniowego, zarejestrowanego przy użyciu detektora śladowego (kolor pomarańczowy), oraz odpowiadające im wyniki symulacji MC dla *tally* F2, opisującego strumień cząstek uśredniony po powierzchni medium hodowlanego (kolor fioletowy). Słupki w kolorze różowym wskazują na obszary, w których dane eksperymentalne i symulacyjne się pokrywają. Brak takich słupków w zakresie niskich energii wynika z faktu, że mimo rejestracji cząstek α przez detektor, nie przeprowadzono kalibracji w tym przedziale energetycznym, co uniemożliwiło ich wykorzystanie w analizie porównawczej. Symulacje MC nie podlegały tym ograniczeniom – cząstki α śledzono aż do całkowitej utraty energii w rozpatrywanym ośrodku.



Rysunek 2.11: Histogramy liczby cząstek α na bin o szerokości $0,1 \text{ MeV}$ w funkcji energii zmierzonej detektorem śladowym CR-39 (kolor pomarańczowy) oraz policzony za pomocą MCNP (kolor fioletowy). Kolorem różowym zaznaczone zostały nakładające się wartości.

Pomiary z wykorzystaniem detektora CR-39 posłużyły również do wyznaczenia liczby cząstek o energii powyżej 2 MeV padających na jego powierzchnię. Wyniki wskazywały, iż na jedną sekundę napromieniania zdeponowanych zostało $2,49 \times 10^4 \pm 1,25 \times 10^3$ cząstek na cm^2 . Mając na uwadze, że na skutek oddziaływania z materiałem próbki strumień cząstek ulega osłabieniu wraz z głębokością, w celu porównania otrzymanej liczby cząstek z obliczeniami MCNP podzielono na 5 warstw (segmentów) o jednakowej wysokości komórkę (*cell*) odpowiadającą warstwie medium hodowlanego i za pomocą *tally* F4 obliczono uśredniony strumień cząstek α w objętości każdego z pięciu segmentów. Rysunek 2.12 przedstawia zależność średniej liczby zdeponowanych cząstek na cm^2 dla różnych głębokości rozpatrywanego segmentu. Przedstawione na wykresie liczby dotyczą cząstek α o energii powyżej 2 MeV , co umożliwiło uwzględnienie progu detekcji detektora śladowego. Fioletowa linia wraz z tłem niepewności odwzorowują liczbę cząstek zmierzoną przez detektor.

Z rysunku 2.12 wynika, iż liczba cząstek mierzona przez detektor zdeponowana jest na głębokości ponad $8 \mu\text{m}$ w warstwie medium hodowlanego, co wynika z punktu przecięcia linii trendu dopasowanej do wyliczonych liczb cząstek α na cm^2 i prostej odpowiadającej wynikom pomiarów otrzymanych za pomocą detektora śladowego.



Rysunek 2.12: Zależność średniej liczby deponowanych cząstek o energii powyżej 2 MeV na cm^2 od głębokości segmentu, na które podzielona została komórka (*cell*) odpowiadająca warstwie medium hodowlanego. Do wyników obliczeń modelowych dopasowana została różowa linia trendu. Fioletowa prosta odpowiada liczbie cząstek zmierzonej przez detektor śladowy wraz z niepewnościami. Z uwagi na niskie wartości niepewności pomiarowych wysymulowanych liczb cząstek α , nie są one widoczne przy każdym z punktów pomiarowych.

2.4 Dozymetria układu eksperymentalnego

W analizowanym układzie istotne znaczenie ma zarówno precyzyjne wyznaczenie dawki pochłoniętej w próbce, jak i szczegółowa charakterystyka cząstek α docierających do komórek. We wcześniejszych etapach pracy przedstawiono odwzorowanie geometrii układu oraz jej implementację w kodzie MCNP, a następnie zweryfikowano poprawność symulacji poprzez porównanie wyników obliczeń z wynikami pomiarów w konfiguracjach, w których możliwa była bezpośrednia detekcja. Na tej podstawie wykonano obliczenia obejmujące rzeczywiste warunki napromieniania próbki biologicznej, uwzględniając parametry źródła powierzchniowego ^{241}Am , geometrię układu oraz wysokość warstwy medium hodowlanego i monowarstwy komórek. Uzyskane wyniki umożliwiły określenie rozkładu energii i liniowego przekazu energii (LET) cząstek α oraz ocenę jednorodności napromieniania w objętości próbki, co stanowi podstawę do dalszej interpretacji efektów biologicznych.

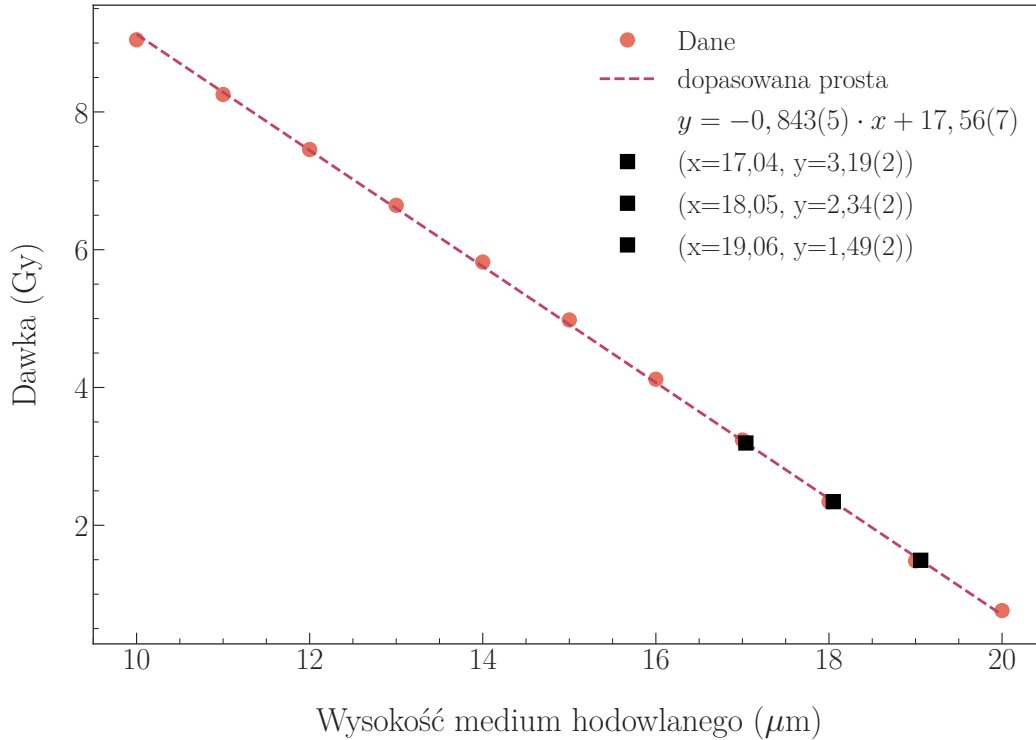
2.4.1 Wyznaczenie dawki

Dawkę promieniowania jonizującego deponowaną w monowarstwie komórek o wysokości $3\text{ }\mu\text{m}$ obliczono za pomocą *tally* F6, tak jak zostało to opisane w podrozdziale 2.2.3. Otrzymana moc dawki cząstek α oraz promieniowania γ wynosiły odpowiednio $1,73 \times 10^7 \pm 3,28 \times 10^4\text{ MeV/g/s}$ oraz $1,26 \times 10^3 \pm 1,26 \times 10^{-1}\text{ MeV/g/s}$, co pokazuje, że wkład do dawki od promieniowania γ jest o cztery rzędy wielkości niższy w stosunku do promieniowania α . Wyniki depozycji przeliczono następnie przez stałe ($1\text{ MeV} = 1,60217662 \times 10^{-13}\text{ J}$, $g = 1,00 \times 10^{-3}\text{ kg}$), aby otrzymać wartości mocy dawki w jednostce Gy/s . Dzięki temu wyznaczono czas niezbędny do zdeponowania dawki 1 Gy w objętości próbki komórkowej, który wynosił 413 sekund. Pozostałe dawki na potrzeby eksperymentów biologicznych policzono proporcjonalnie do czasu napromieniania.

Pomiary wysokości medium hodowlanego opisane w podrozdziale 2.1.2 pozwoliły wyznaczyć wartość średnią wysokości $\bar{h}_w^{(\text{pole})} = 18,05\text{ }\mu\text{m}$, która została zaimplementowana w modelu układu i wykorzystana do obliczeń charakterystyki cząstek α w monowarstwie komórek. Mając na uwadze niepewność statystyczną oraz niepewność odczytu mikroskopu konfokalnego jaką obarczona była $\bar{h}_w^{(\text{pole})}$ ($1,01\text{ }\mu\text{m}$) wyliczono depozycje dla różnych wartości wysokości medium hodowlanego z większości zakresu między maksimumi zaprezentowanymi na rysunku 2.4. Wyniki obliczeń przedstawiono na rysunku 2.13 za pomocą zależności zdeponowanej dawki w Gy od wysokości medium hodowlanego.

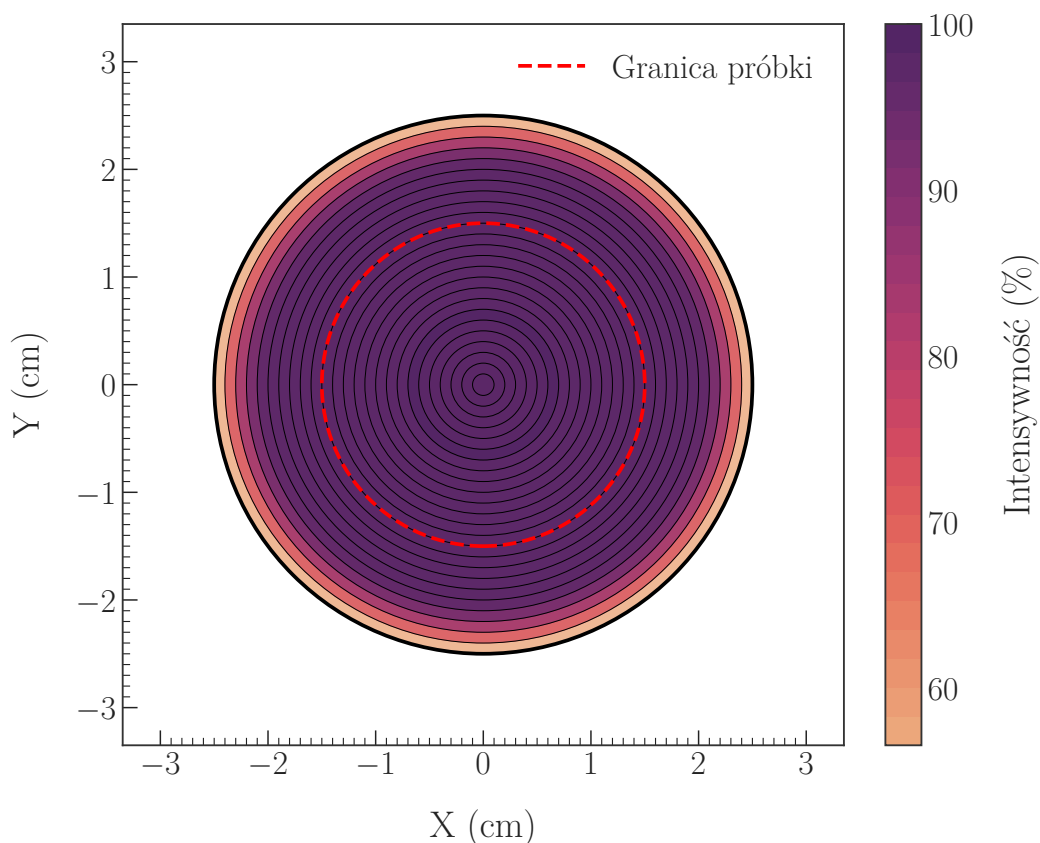
Do danych dopasowano zależność opisaną równaniem $\text{Dawka (Gy)} = -0,843(5) \times \text{wysokość} + 17,56(7)$. Czarne kwadraty odpowiadają dawkom dopasowanym do wysokości medium hodowlanego równej $\bar{h}_w^{(\text{pole})} \pm \sigma$, które wyniosły odpowiednio $3,19(2)\text{ Gy}$ oraz $1,49(2)\text{ Gy}$ dla $17,04\text{ }\mu\text{m}$ i $19,06\text{ }\mu\text{m}$. Takie podejście umożliwiło sprawdzenie jak zmienna jest dawka deponowana w objętości monowarstwy komórek w zależności od wysokości medium hodowlanego znajdującego się nad nią w trakcie eksperymentu napromieniania. Biorąc pod uwagę fluktuację wysokości spowodowaną parowaniem medium hodowlanego w trakcie eksperymentu oraz kwestię odtwarzalności nakładania

medium na komórki przyjęto, że dawka 2 Gy deponowana w czasie odpowiadającym długości trwania pomiaru jednej próbki na mikroskopie konfokalnym, równym 13 minut i 43 sekundy jest obarczona 50% niepewnością i wynosi 2 ± 1 Gy, co również wynika z rysunku 2.13.



Rysunek 2.13: Zależność dawki deponowanej przez cząstki α w monowarstwie komórek, policzonej za pomocą MCNP, w zależności od wysokości medium hodowlanego pokrywającego komórki. Do wysymulowanych danych dopasowano prostą oznaczoną różową przerywaną linią. Z uwagi na niskie wartości niepewności obliczonych dawek nie zostały one przedstawione na rysunku. Czarne kwadraty oznaczają wartości dawek dla wysokości medium hodowlanego zmierzonej za pomocą mikroskopu konfokalnego $\bar{h}_w^{(pole)} \pm \sigma$.

Sprawdzono również poziom intensywności depozycji cząstek α na przestrzeni próbki biologicznej, zgodnie z opisem w podrozdziale 2.2.3. Otrzymane wyniki, zgodnie z zasadą działania *tally F6* były znormalizowane przez masę danego ringu, który stanowił rozpatrywaną komórkę (*cell*) w części *Cell cards* pliku wejściowego. W kolejnym kroku wyniki dla 25 pierścieni znormalizowano względem całkowitej depozycji w próbce, a następnie odniesiono do wartości o najwyższym udziale procentowym. Rozkład intensywności depozycji promieniowania α na przestrzeni próbki przedstawia rysunek 2.14. Czerwona przerywana linia wyznacza granice rzeczywistej próbki biologicznej. Zmiany intensywności w pierścieniach, w jej obrębie nie przekraczają 1%, co świadczy o jednorodnej depozycji dawki na całej przestrzeni monowarstwy komórek.



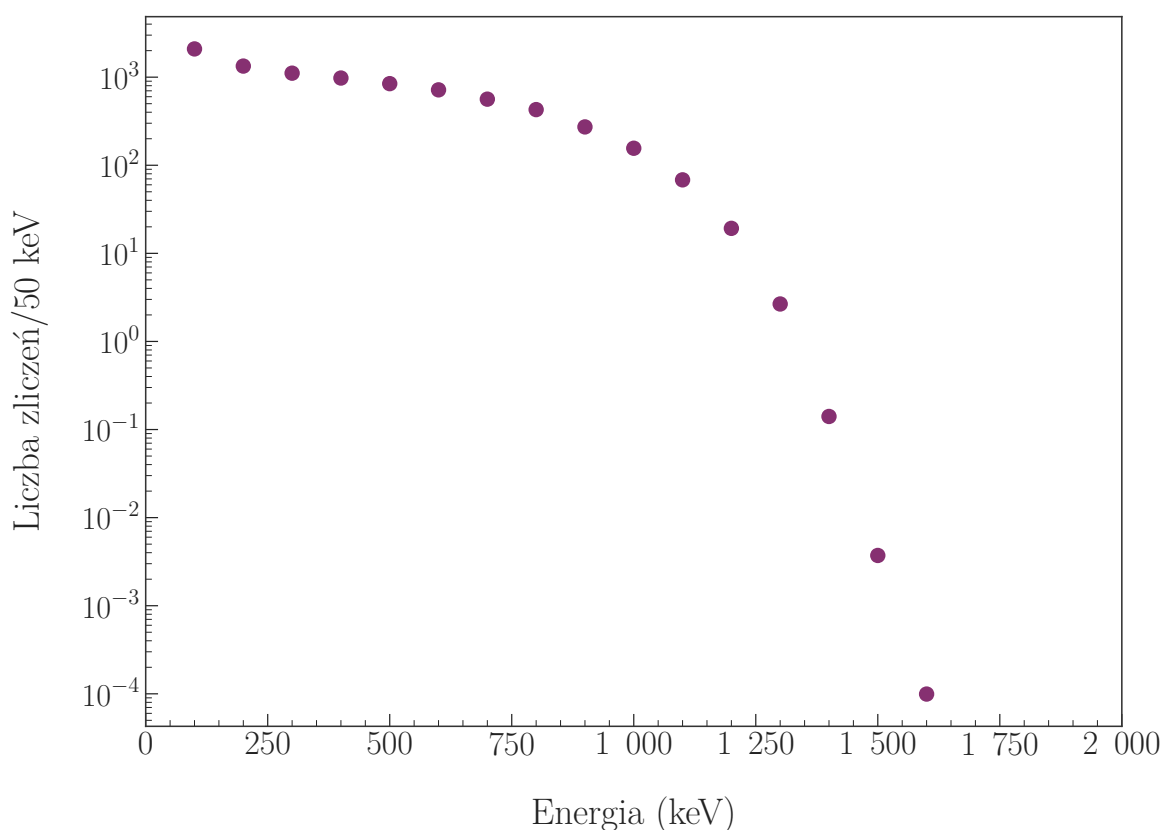
Rysunek 2.14: Intensywność depozycji energii cząstek α w $3\ \mu\text{m}$ warstwie komórek, w próbce o średnicy $5\ \text{cm}$, obliczona w MCNP. Depozycja energii, znormalizowana względem masy, została obliczona dla próbki podzielonej na koncentryczne pierścienie o średnicach zwiększanych co $1\ \text{mm}$. Intensywność w % znormalizowana została do ringu o najwyższej wartości depozycji. Okrąg zaznaczony czerwoną przerywaną krzywą odpowiada granicy rzeczywistej próbki o średnicy $3\ \text{cm}$.

2.4.2 Rozkład energii cząstek α

Energia cząstek docierających do monowarstwy komórek została policzona za pomocą *tally* F4, które pozwala na uzyskanie uśrednionego strumienia cząstek przez zdefiniowaną komórkę (*cell*). Widmo energetyczne cząstek α zostało przedstawione na rysunku 2.15. Oś pozioma pokazuje energię wyrażoną w keV , w zakresie od 0 do $2000\ \text{keV}$, natomiast oś pionowa przedstawia liczbę zliczeń na bin energetyczny, zapisaną w skali logarytmicznej. Szerokość binu wynosi $50\ \text{keV}$ a zaprezentowane punkty to dane z jego górnej granicy. W przedziale od 0 do $1000\ \text{keV}$ liczba zliczeń jest zbliżona i maleje stopniowo od 1100 do 100 zliczeń na bin. Powyżej $1000\ \text{keV}$ obserwowany jest znaczny spadek liczby cząstek α docierających do komórek, a ich maksymalna energia w próbce wynosi $1600\ \text{keV}$. Oznacza to, że znaczna większość cząstek docierających i oddziałujących bezpośrednio na komórki charakteryzuje się energią równą lub niższą niż $1\ \text{MeV}$.

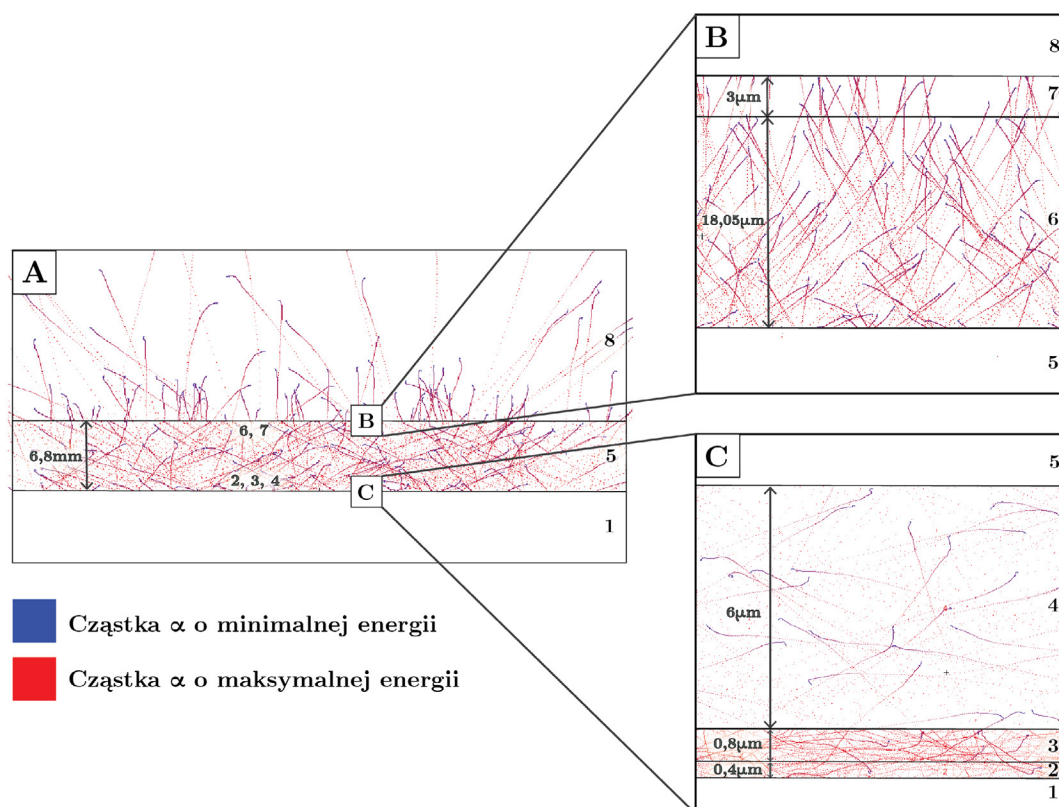
Niedyskretny charakter energetycznego rozkładu cząstek α wynika z faktu, iż są one emitowane z części aktywnej, mającej charakter źródła objętościowego, pod różnymi kątami. To właśnie głębokość położenia punktu, a także kąt emisji cząstki ze źródła

ma wpływ na długość toru jaki cząstka pokona w danym materiale. Wraz ze wzrostem drogi cząstki zwiększają się również jej straty energii w danym ośrodku. Oznacza to, że dla cząstek emitowanych pod kątem prostym względem powierzchni źródła straty energii w jego materiale będą znacznie mniejsze niż w przypadku cząstek emitowanych pod mniejszym kątem. Zjawisko to powtarza się w kolejnych warstwach układu, w których cząstki również wytracają energię w różnym stopniu - zależnym od ich energii początkowej przy wejściu do materiału oraz od długości przebytej w nim drogi. W efekcie następuje poszerzenie rozkładu energii cząstek przy przejściu przez kolejne materiały układu. Stąd właśnie szeroki zakres energetyczny cząstek zaprezentowany na rysunku 2.15.



Rysunek 2.15: Rozkład energii cząstek α obliczony za pomocą MCNP przedstawiony jako zależność liczby zliczeń na bin o szerokości 50 keV w zależności od energii. Przedstawiony rozkład został obliczony na podstawie *tally F4* jako strumień cząstek α uśredniony na objętość komórek o wysokości $3\text{ }\mu\text{m}$. Punkty reprezentują dane z górnej granicy binu. Niepewności obliczonego strumienia cząstek z uwagi na ich niewielkie wartości, nie zostały przedstawione na rysunku.

Wizualizacja torów cząstek α przez wszystkie elementy geometrii układu została wykonana za pomocą programu *MCNP Visual Editor (VisEd)*, który jest graficznym środowiskiem wspierającym kod MCNP. Pozwala on na tworzenie i modyfikację plików wejściowych, wizualizację geometrii w przestrzeniach 2D oraz 3D, a także śledzenie emisji cząstek ze źródła i ich torów w rozpatrywanej geometrii [70].



Rysunek 2.16: Tory cząstek α emitowanych z powierzchniowego źródła ^{241}Am poprzez kolejne elementy układu do napromieniania wygenerowane za pomocą programu VisualEditor do wizualizacji geometrii MCNP. Niebieskie tory odpowiadają cząstkom α o najniższej energii, natomiast kolorem czerwonym wyrysowane zostały cząstki o najwyższej energii. Rysunek przedstawia przekrój poprzeczny przez układ do napromieniania. Numery 1 - 8 odpowiadają kolejnym elementom geometrii układu: 1 – powietrze pod źródłem ^{241}Am , 2 – warstwa aktywna ^{241}Am , 3 – ochronna warstwa złota, 4 – folia Mylar, 5 – warstwa powietrza pomiędzy źródłem a próbką biologiczną, 6 – medium hodowlane, 7 – monowarstwa komórek, 8 – powietrze.

Rysunek 2.16 przedstawia przekrój poprzeczny przez geometrię układu do napromieniania zwizualizowaną w programie MCNP Visual Editor. Panel 2.16A to rzut na cały układ włącznie z przestrzeniami pod źródłem oraz nad próbką biologiczną. Numery od 1 do 8 odpowiadają kolejnym komórkom (*cell*) zdefiniowanym w pliku wejściowym do programu MCNP i przypisane są odpowiednio: 1 – powietrze pod źródłem ^{241}Am , 2 – warstwa aktywna ^{241}Am , 3 – ochronna warstwa złota, 4 – folia Mylar, 5 – warstwa powietrza pomiędzy źródłem a próbką biologiczną, 6 – medium hodowlane, 7 – monowarstwa komórek, 8 – powietrze nad komórkami. Panel 2.16B to zbliżenie na próbkę biologiczną, gdzie cząstki α przechodzą najpierw przez warstwę medium hodowlanego (6), następnie przez monowarstwę komórek (7). Część 2.16C, to przekrój przez elementy źródła, a kolejne numery odpowiadają: 2 – warstwie aktywnej źródła ^{241}Am , 3 – ochronnej warstwie złota, 4 – folii Mylar, 5 – warstwie powietrza pomiędzy źródłem a próbką biologiczną.

Geometria na rysunku 2.16 została przedstawiona w odwróconej orientacji pionowej względem rzeczywistego układu eksperymentalnego. W wizualizacji komórki znajdują się nad źródłem promieniowania, podczas gdy w rzeczywistości spoczywają na dnie szalki Petriego. Zabieg ten zastosowano celowo, aby lepiej zobrazować, że cząstki α swobodnie docierają do monowarstwy komórek, a nawet dysponują energią wystarczającą, by opuścić target. W rzeczywistych warunkach ich tor kończy się jednak w szkiełku nakrywkowym, którego grubość i gęstość są wystarczające, by skutecznie zatrzymać cząstki α wychodzące z targetu. Tory koloru czerwonego reprezentują cząstki α o maksymalnej energii, można jednak łatwo zaobserwować, iż zmieniają one kolor na niebieski odpowiadający minimalnej energii cząstek α , następnie tor zanika, a cząstka przestaje być śledzona.

Dzieje się tak, ponieważ w miejscu gdzie obserwujemy zmiany koloru, cząstki wytracają maksymalną energię, znajdując się w zakresie piku Bragga, a zaraz po tym ich energia maleje do zera, co jest warunkiem do zakończenia przez MCNP śledzenia toru cząstki. Opisane zjawisko przyczynia się do maksymalnej depozycji energii przez daną cząstkę w rozpatrywanym materiale. Na panelu C, można zaobserwować, że niektóre cząstki, wyemitowane pod kątem zbliżonym do zera względem płaszczyzny źródła nie opuszczają nawet części aktywnej, tracąc całą energię w tym obszarze. Takie zjawisko było podstawą do wykonania obliczeń początkowej emisji cząstek α , z wykorzystaniem *tally* F1, które zostały opisane w podrozdziale 2.2.3.

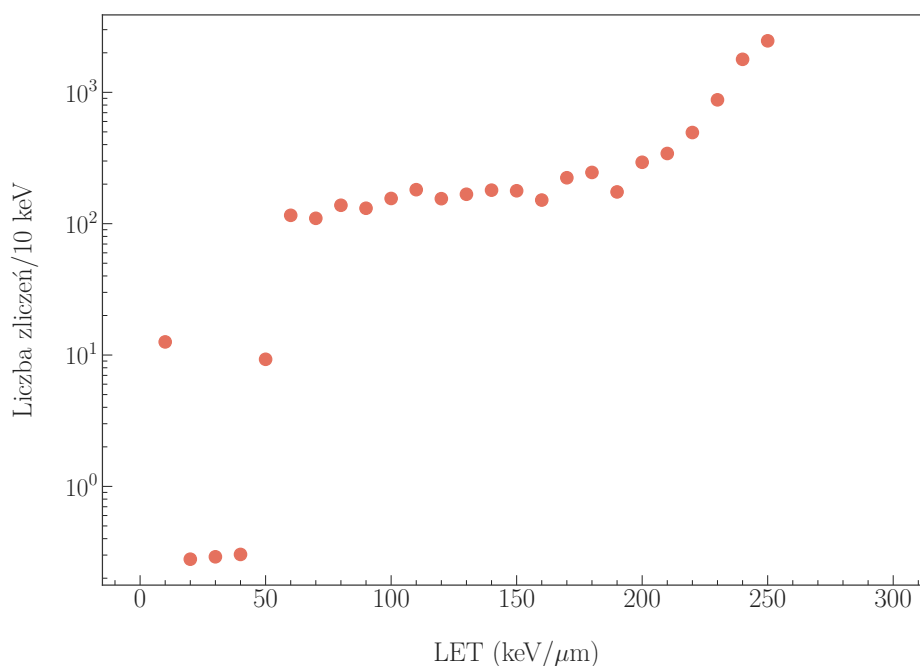
Na panelu B można również zaobserwować, że pewna część cząstek kończy swój tor na poziomie medium hodowlanego, znajdującego się przed warstwą komórek. Postanowiono zatem sprawdzić dokładną liczbę cząstek, która trafia w miejsce docelowe i jest w stanie bezpośrednio oddziaływać na komórki.

W modelu MCNP próbkę komórkową podzielono definiując siatkę komórek opisaną szczegółowo w podrozdziale 2.2.2, co zostało schematycznie zwizualizowane na rysunku 2.7. Takie podejście pozwoliło policzyć liczbę cząstek α deponowanych w pojedynczym jądrze komórkowym, na sekundę napromieniania. Otrzymana liczba cząstek po przeliczeniu przez czas napromieniania odpowiadający depozycji dawki 2 Gy w całej próbce komórkowej, oraz przez powierzchnię pojedynczego jądra komórkowego pozwoliły na oszacowanie, że w pojedyncze jądro komórkowe trafiają średnio 33 cząstki α .

Dodatkowo program MCNP znając objętości poszczególnych elementów składających się na geometrię siatki wyznaczył liczby cząstek trafiających w pojedyncze jądro, błonę komórkową i przestrzeń międzykomórkową. Ich stosunek wynosił odpowiednio 12%, 64% oraz 23% wszystkich cząstek trafiających na jedno oczko siatki. Takie przybliżenie rozkładu komórek w próbce biologicznej pozwoliło ocenić, iż blisko jedna czwarta ze wszystkich cząstek docierających do próbki nie trafiła w komórkę, a w przestrzeń między nimi. Fakt ten nie ma jednak wpływu na wyliczoną dawkę deponowaną w monowarstwie komórek, ponieważ MCNP normalizuje wynik *tally* F6 na masę rozważanego elementu geometrii. Pozwala on jedynie oszacować liczbę trafień jonów α na poszczególne elementy komórki.

2.4.3 LET cząstek α

Podobnie jak rozkład energii policzono również LET cząstek α uśredniony przez objętość monowarstwy komórek. W części *Data cards* pliku wejściowego do *tally F4* dodano parametr LET, którego działanie polegało na przeliczeniu strumienia cząstek α w funkcji energii na strumień cząstek w funkcji mocy hamowania w MeV/cm . Tak jak to zostało opisane w podrozdziale 2.2.3. Wyniki zostały przedstawione na rysunku 2.17 w postaci zależności liczby zliczeń cząstek α od parametru LET wyrażonego w $keV/\mu m$. Punkty odpowiadają liczbom w górnej granicy binu o szerokości $10 keV$. W przedziale od 0 do $10 keV/\mu m$ liczba zliczeń cząstek wynosi nieco ponad 10, a kolejne trzy biny do $40 keV/\mu m$ odpowiadają średniej liczbie zliczeń poniżej 1. Co oznacza, że nieznaczna część z rozpatrywanych jonów α zdeponowała energię poniżej $40 keV$ na mikrometr drogi w materiale komórek. Zakres ten dotyczy cząstek, które w przestrzeni numer 7 na rysunku 2.16B oznaczone były kolorem czerwonym, a ich tor był prostopadły do płaszczyzny ograniczającej monowarstwę komórek i zakończył się w przestrzeni 8 na panelu 2.16A. Znaczący wzrost LET rozpoczyna się od $50 keV/\mu m$, który następnie osiąga plateau w zakresie od 60 do $200 keV$ na poziomie 100-110 zliczeń/bin. Powyżej $200 keV/\mu m$ liczba zliczeń wzrasta i osiąga zwoje maksimum (1100 zliczeń/bin) przy wartości LET równej $260 keV/\mu m$. Cząstki o LET z przedziału od 60 do $260 keV/\mu m$ zdeponowały najwyższą wartość energii w monowarstwie komórek, mając jednocześnie najwyższy wkład do całkowitej deponowanej dawki.



Rysunek 2.17: Rozkład LET cząstek α obliczony za pomocą MCNP przedstawiony jako zależność liczby zliczeń na bin o szerokości $10 keV$. Przedstawiony rozkład został obliczony na podstawie *tally F4* LET jako energia hamowania cząstek α uśredniona na objętość komórek o wysokości $3 \mu m$. Punkty reprezentują dane z górnej granicy binu. Niepewności obliczonego LET cząstek z uwagi na ich niewielkie wartości, nie zostały przedstawione na rysunku.

Rozdział 3

Badania na liniach komórkowych

3.1 Linie komórkowe M059J i M059K

Do badań z wykorzystaniem układu do napromieniania z powierzchniowym źródłem ^{241}Am wybrano dwie linie komórkowe M059J (CRL-2366) oraz M059K (CRL-2365), zakupione z banku komórek ATCC (ang. *American Type Culture Collection*). Rysunek 3.1 przedstawia zdjęcia linii M059J oraz M059K wykonane w trakcie prowadzenia hodowli. Zgodnie z informacją podaną przez producenta, obie linie komórkowe zostały wyizolowane z mózgu 33 - letniego pacjenta ze złośliwym glejakiem wielopostaciowym [71, 72]. Linia M059J charakteryzuje się całkowitym brakiem katalitycznej podjednostki kinazy białkowej DNA-PKcs, podczas, gdy M059K zachowuje normalną aktywność białka DNA-PK. Wskazana różnica czyni obie linie wartościowym modelem do badań roli kinazy w odpowiedzi komórkowej na uszkodzenia DNA, w szczególności ich rozpoznawaniu i naprawie [73, 74].

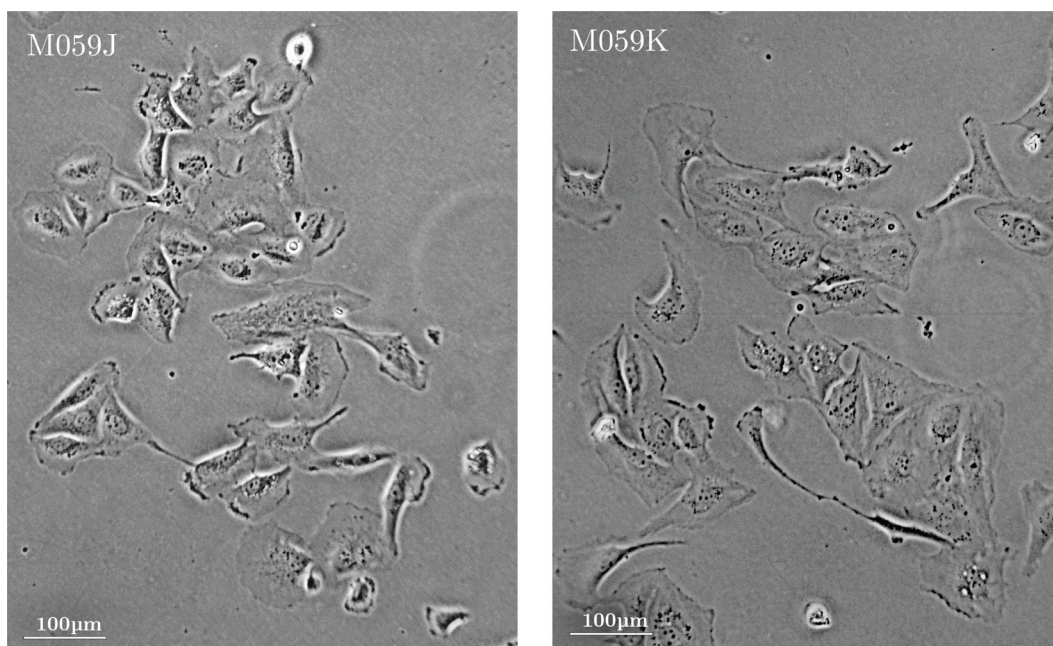
Badania porównawcze tych dwóch linii komórkowych wskazały, że komórki M059J są znacznie bardziej radiowrażliwe niż M059K, co w dużej mierze wynika z braku kinazy DNA-PKcs, odgrywającej ważną rolę w ścieżce NHEJ odpowiedzialnej za naprawę DSBs [75, 76].

Z dostępnej literatury wynika również, że punkty kontrolne cyklu komórkowego znacznie różnią się pomiędzy badanymi liniami, co przekłada się na ich zróżnicowaną odpowiedź na promieniowanie. Linia M059J utrzymuje sprawny punkt kontrolny G2/M, jednak zaburzenia w regulacji przejścia G1/S powodują zwiększoną podatność tych komórek na uszkodzenia indukowane promieniowaniem [77].

Utrzymywanie się komórek linii M059J w fazie G2 po napromienieniu może wskazywać na aktywację mechanizmów odpowiedzi na uszkodzenia DNA, które jednak są mniej skuteczne ze względu na brak kinazy DNA-PKcs. Dysfunkcja ta prowadzi do zwiększonej podatności na apoptozę, zwłaszcza po ekspozycji na promieniowanie o niskim LET. Natomiast po działaniu promieniowania o wysokim LET obie linie wykazują zbliżony poziom przeżywalności, co wynika z większej złożoności i trudności naprawy uszkodzeń, niezależnie od aktywności DNA-PKcs [78, 79].

W przypadku promieniowania o wysokim LET dominują złożone, skupione uszkodzenia DNA, ang. *clustered DNA damage*, które generują liczne, przestrzennie bliskie uszkodzenia helisy DNA. Takie uszkodzenia są trudne do naprawy zarówno przez

klasyczny szlak NHEJ zależny od DNA-PKcs, jak i przez alternatywne mechanizmy rekombinacji homologicznej, co skutkuje podobnym poziomem przeżywalności w obu liniach komórkowych.



Rysunek 3.1: Zdjęcia komórek linii komórkowych M059J (po lewej) oraz M059K (po prawej) hodowanych w pracowni radiobiologicznej Środowiskowe Laboratorium Ciężkich Jonów Uniwersytetu Warszawskiego (ŚLCJ UW). Obrazy zostały uzyskane za pomocą mikroskopu odwróconego Delta Optical IB - 100 wyposażonego w obiektyw 10x oraz kamerę DLT Cam. z oprogramowaniem Delta Cam Viewer.

Komórki hodowano w laboratorium radiobiologicznym ŚLCJ UW zgodnie z protokołami zaleconymi przez producenta [71, 72]. Materiał biologiczny namnażano w butelkach hodowlanych o powierzchni 75 cm^2 , w medium hodowlanym DMEM F12 (Biowest, Francja) z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej (FBS, Capricorn Scientific, Niemcy), penicyliny oraz streptomycyny (Genos, Polska) o stężeniu 10 mg/ml . Hodowlę prowadzono w temperaturze 37°C , przy 5% zawartości CO_2 i wilgotności 95%. Medium hodowlane wymieniano zgodnie z zaleceniami, co 2 - 3 dni, a komórki pasażowano przy 70–80% konfluencji z użyciem 4 ml roztworu trypsyny-EDTA (Genos, Polska), w ciągu 6 minut. Do obserwacji komórek korzystano z mikroskopu odwróconego Delta Optical IB - 100 z oprogramowaniem Delta Optical DLT Cam Viewer.

3.2 Test przeżywalności

Test przeżywalności pozwala określić zdolność pojedynczej komórki do nieograniczonej proliferacji i tworzenia kolonii w warunkach *in vitro* [80, 81, 82]. Metoda ta po raz pierwszy została opisana w 1956 roku przez T. T. Pucka oraz P. I. Marcusa [83] i dotyczyła zdolności klonowania komórek HeLa w zależności od dawki promieniowania X . Przez kolejne dekady test ten stał się powszechnie uznawany za standardową i najbardziej wiarygodną metodę oceny przeżywalności komórek w biologii i medycynie. Początkowo przeprowadzany do określania zdolności proliferacji komórek po ekspozycji na promieniowanie jonizujące jednak obecnie stosowany jest również do opisu wpływu innych czynników uszkadzających takich jak leki cytotoksyczne czy inhibitory celowane [82]. Test znalazł swoje zastosowanie w analizie przeżywalności różnego rodzaju komórek ssaczych, między innymi ustalonych liniach nowotworowych i zdrowych oraz pobranych bezpośrednio z guzów pacjenta [84].

W teście przeżywalności komórki traktowane promieniowaniem wysiewane są do naczynia hodowlanego i inkubowane w odpowiednich warunkach, w celu utworzenia kolonii. W trakcie wykonywania testu ważne jest spełnienie dwóch podstawowych kryteriów, aby otrzymane wyniki były precyzyjne. Po pierwsze badane komórki w okresie inkubacji, trwającym zwykle od 1 do 3 tygodni muszą być zdolne do przejścia co najmniej sześciu podziałów tworząc kolonie o liczbie minimum 50 komórek. Drugim bardzo ważnym czynnikiem jest uzyskanie zawiesiny pojedynczych komórek przed wysianiem do szalek hodowlanych, pozwala to zagwarantować, iż każda powstała kolonia wywodzi się z pojedynczej komórki [84].

Następnie kolonie są utrwalane i zliczane, a wynikiem końcowym jest krzywa przeżywalności definiowana jako zależność dawki czynnika uszkadzającego na frakcję komórek, które utrzymały zdolność do proliferacji [80]. Frakcja komórek przeżywających, ang. *Surviving Fraction (SF)* odnosi się do próbek traktowanych czynnikiem uszkadzającym i definiowana jest zgodnie z równaniem 3.1 jako stosunek liczby powstałych kolonii do liczby wysianych komórek z uwzględnieniem wydajności klonowania, ang. *Plating Efficiency (PE)*

$$SF = \frac{\text{liczba kolonii}}{\text{liczba wysianych komórek} \times PE}. \quad (3.1)$$

Zanim jednak określony zostanie wpływ danego czynnika należy wyznaczyć wydajność klonowania PE, którą definiuje się jako odsetek komórek w warunkach kontrolnych, które utworzyły kolonie liczące powyżej 50 komórek. Wydajność klonowania definiuje się jako stosunek liczby zliczonych kolonii do liczby wysianych komórek zgodnie z równaniem 3.2

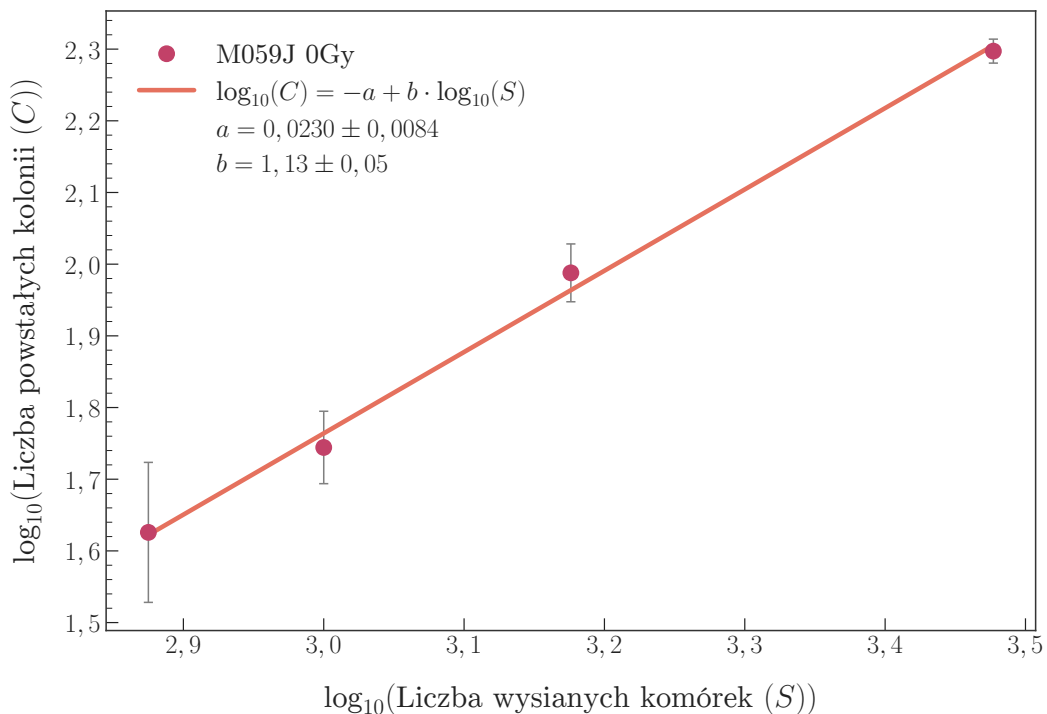
$$PE = \frac{\text{liczba kolonii}}{\text{liczba wysianych komórek}}. \quad (3.2)$$

PE określa potencjał proliferacji komórek nietraktowanych, który nie zawsze jest stały i może zależeć od rodzaju komórek, warunków hodowli czy liczby wysianych komórek [81]. W trzecim przypadku obserwuje się zjawisko określane jako współpraca komórkowa, ang. *cellular cooperation*, w którym komórki wzajemnie stymulują swój wzrost poprzez wymianę czynników metabolicznych. W takich sytuacjach zależność liczby powstałych kolonii C od wysianych komórek S może przyjmować charakter nieliniowy opisywany równaniem 3.3

$$C = a \times S^b, \quad (3.3)$$

gdzie a i b to parametry określające stopień współpracy komórek.

Szczególnie istotny jest tu parametr b , który w przedziale od 0,8 do 1,2 świadczy o tym, że zależność między C a S jest zbliżona do liniowej, a wpływ współpracy komórkowej w teście przeżywalności nie jest znaczący [84]. Biorąc pod uwagę konieczność dopasowania kryteriów takich jak długość inkubacji, czy rozmiary powstałych kolonii zaleca się przeprowadzenie wstępnego testu zdolności klonowania. Zgodnie z tą ideą sprawdzono zależność opisaną równaniem 3.3 na przykładzie komórek linii M059J a otrzymane wyniki przedstawiono na rysunku 3.2. Wartość parametru b wyniosła 1,13 co świadczy o braku wzajemnego wpływu komórek w warunkach eksperymentalnych.



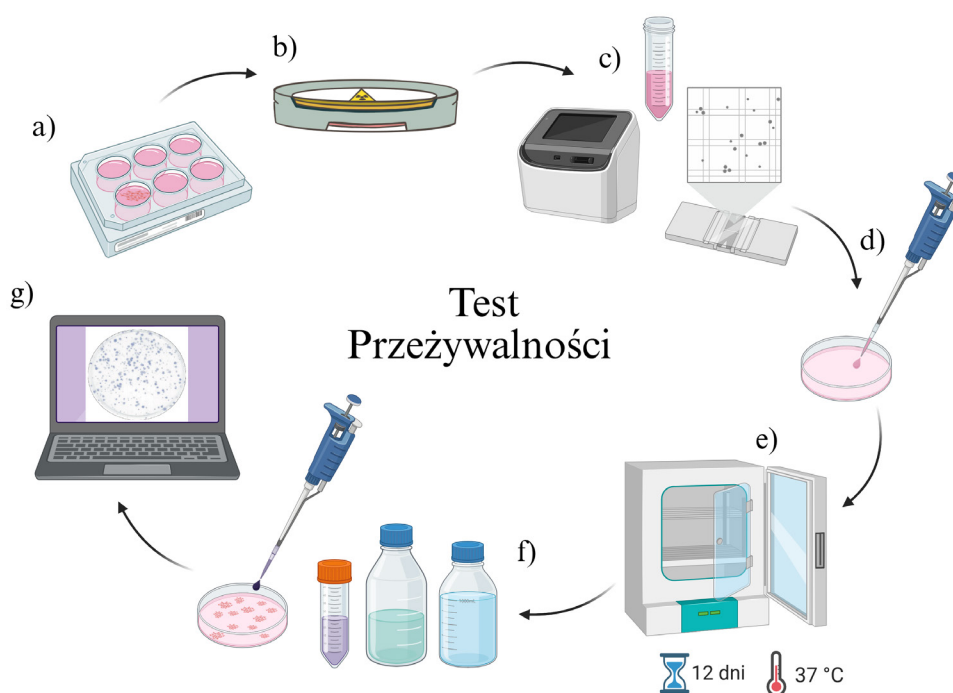
Rysunek 3.2: Zależność logarytmu liczby powstałych kolonii od logarytmu liczby wysianych komórek dla próbek nienapromienionych linii komórkowej M059J. Do danych pomiarowych została dopasowana prosta zgodna z przedstawionym równaniem. Wartość parametru b wynosi 1,13.

Po wypracowaniu optymalnych parametrów testu przeprowadzono właściwy eksperyment napromieniania linii komórkowych M059J oraz M059K powierzchniowym źródłem

^{241}Am w celu zbadania SF w zależności od promieniowania α . Wykonano trzy niezależne powtórzenia testu dla obu linii komórkowych, w każdym napromieniono od 4 do 5 próbek biologicznych na dawkę. Natomiast z pojedynczej próbki wysiano po 3 szalki Petriego z komórkami. Przy każdym powtórzeniu wysiewano również komórki kontrolne w celu wyznaczenia wartości PE.

3.2.1 Procedura testu przeżywalności

Procedura testu klonogenego po napromienianiu cząstkami α opierała się na standardowych protokołach postępowania z niewielkimi modyfikacjami [85, 81]. Schemat procedury testu przeżywalności został przedstawiony na rysunku 3.3.



Rysunek 3.3: Schemat procedury testu przeżywalności przedstawiający wszystkie jego etapy: a) inkubowanie komórek na szkiełkach nakrywkowych, b) napromienianie próbki powierzchniowym źródłem ^{241}Am , c) trypsynizacja i liczenie komórek, d) wysiewanie komórek, e) inkubacja komórek, f) utrwalanie i wybarwianie kolonii, g) zliczanie kolonii komórkowych. Utworzono w BioRender.com.

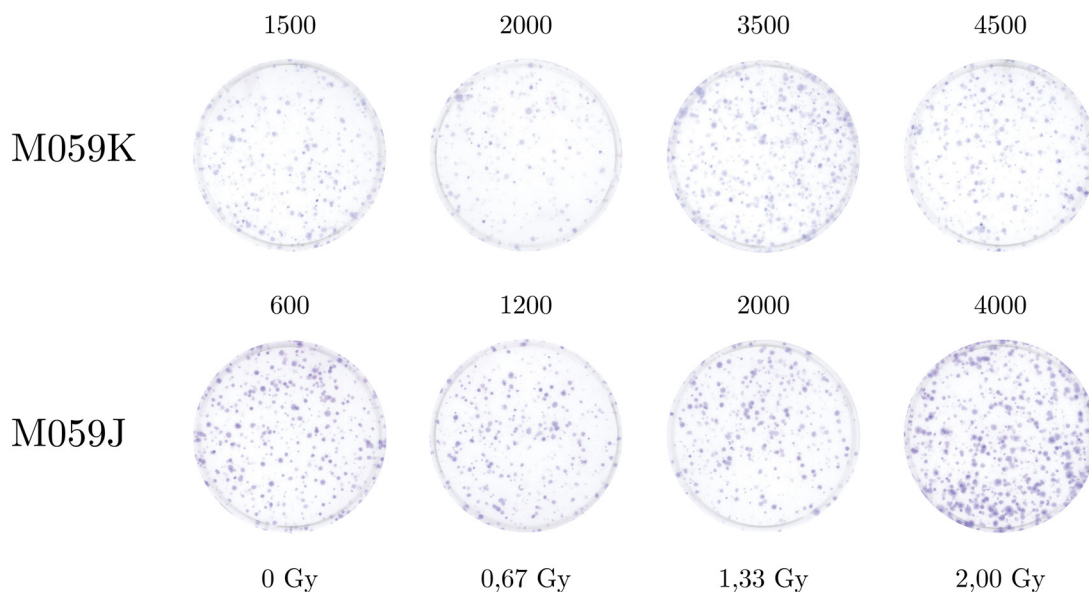
Eksperyment rozpoczynano od wysiania 5×10^4 komórek na szkiełko nakrywkowe o średnicy 3 cm ułożone na dnie szalki 6 - cio dołkowej. Każde szkiełko było uprzednio sterylizowane w etanolu. Komórki inkubowano 48 godzin przed eksperymentem w 4 ml pełnego medium hodowlanego. Na potrzeby napromieniania szkiełka z komórkami przenoszono do układu z powierzchniowym źródłem ^{241}Am i umieszczano na dnie szalki Petriego. Na komórki nakrapiano 4 μl medium hodowlanego, aby zapobiec ich wysychaniu. Czas napromieniania niezbędny do zdeponowania dawki 1 Gy wynosił 6 minut i 53 sekundy, i był proporcjonalny do dawki.

W kolejnym kroku komórki były odrywane ze szkiełka nakrywkowego za pomocą 1 *ml* trypsyny z czerwienią fenolową (Genos, Polska) w czasie 6 minut. Następnie trypsynizację zamykano dodając 2 *ml* medium hodowlanego na szkiełko i przenoszono zawiesinę do probówki stożkowej o objętości 15 *ml*. Komórki liczono automatycznie przy użyciu licznika komórek LUNA- II Automated Cell Counter (Logos Biosystems, Korea). Do zliczania komórki zawieszano w roztworze błękitu trypanu (Trypan Blue 0,4%, Sigma-Aldrich, USA) w stosunku 1 : 1 (v / v). Na podstawie barwienia określano całkowitą liczbę komórek oraz odsetek komórek żywych i martwych. Z uwagi na fakt, iż liczenie komórek jest punktem krytycznym testu przeprowadzano również liczenia porównawcze za pomocą hemacytometru. Taki zabieg pozwalał na porównanie zliczeń otrzymanych licznikiem automatycznym oraz weryfikację poziomu rozdzielenia komórek w zawiesinie.

Następnie komórki wysiewano do sterylnych szalek Petriego o średnicy 9 *cm* z 10 *ml* medium hodowlanego. Tak przygotowane próbki umieszczono w inkubatorze (37°C, 5% CO₂) na okres 12 dni. Po tym czasie wytworzone kolonie utrwalano i wybarwiano. Procedurę wybarwiania rozpoczynano od usunięcia medium hodowlanego z szalek Petriego z koloniami, a w celu ich utrwalenia dodawano 8 *ml* 10% roztworu formaldehydu i inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej, po czym roztwór usuwano. Następnie do każdej szalki wprowadzano 10 *ml* wody destylowanej i inkubowano przez 3 minuty. Kolonie komórkowe barwiono przez 10 minut w 15% roztworze barwnika Giemsy (Giemsa's azur eosin methylene blue solution, Sigma-Aldrich, Niemcy). Po zakończeniu barwienia roztwór usuwano, a szalki dwukrotnie płukano wodą destylowaną. Po wysuszeniu szalki skanowano w celu uzyskania elektronicznego obrazu. Kolonie zliczano za pomocą systemów elektronicznych lub z wykorzystaniem mikroskopu optycznego.

3.2.2 Analiza wyników testu przeżywalności

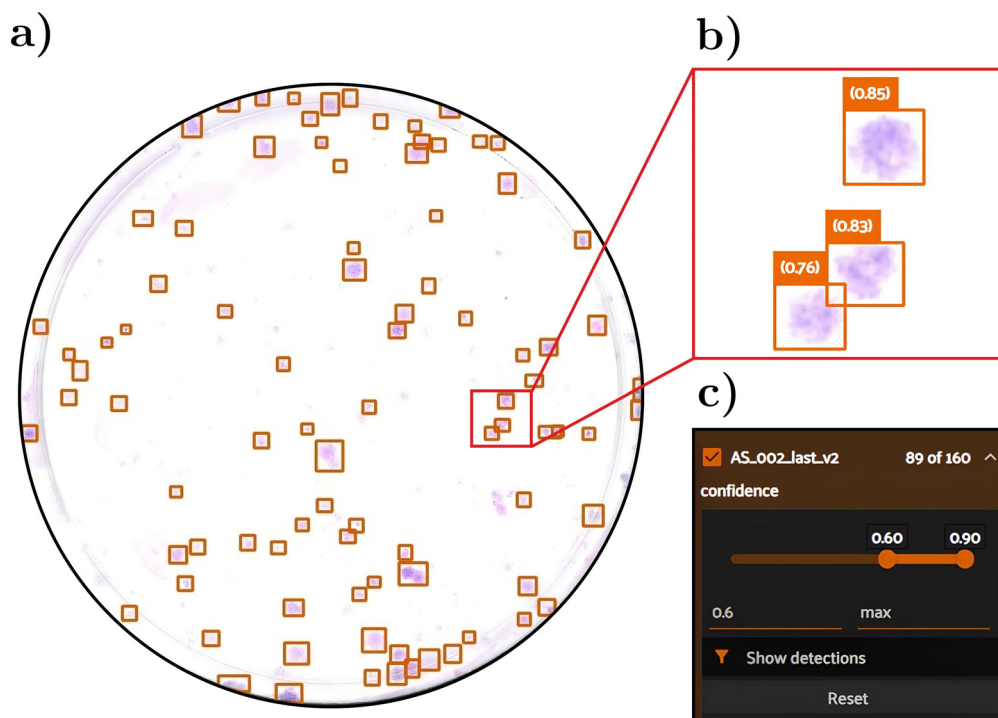
Analizę zeskanowanych obrazów szalek z wybarwionymi koloniami wykonano z wykorzystaniem narzędzi bazujących na głębokich sieciach neuronowych, które stanowią obecnie podstawowe narzędzie komputerowe do analizy obrazu. Przykładowe szalki z koloniami komórek M059J oraz M059K po napromienieniu różnymi dawkami promieniowania α zostały zobrazowane na rysunku 3.4. Liczby nad poszczególnymi skanami reprezentują liczbę wysianych na nie komórek.



Rysunek 3.4: Skany szalek z wybarwionymi koloniami linii komórkowej M059K (górny panel) oraz M059J (dolny panel). Kolonie komórkowe powstałe w teście przeżywalności po napromienieniu różnymi dawkami promieniowania α . Liczby nad szalkami reprezentują liczbę wysiewanych komórek.

Projekt obejmujący metodę detekcji wybarwionych kolonii komórkowych został zrealizowany w Centrum Uczenia Maszynowego Uniwersytetu Warszawskiego [86]. Głęboka sieć neuronowa to model uczenia maszynowego złożony z wielu warstw, z których każda przetwarza dane na coraz wyższym poziomie szczegółowości. Takie podejście pozwala sieci samodzielnie rozpoznawać cechy obrazów.

Do detekcji kolonii użyto modelu YOLOv5 (*You Only Look Once*, wersja 5) [87], który jednocześnie lokalizuje i klasyfikuje obiekty w obrazie [88]. Model ten został wytrenowany na podstawie skanów szalek z ręcznie oznaczonymi koloniami o liczbie komórek równej 50 i większej. Proces detekcji polegał na identyfikacji, wyznaczeniu położenia oraz zliczeniu wykrytych kolonii spełniających powyższe kryterium. Program automatycznie przypisywał kolonom parametry takie jak powierzchnia i intensywność, a na ich podstawie obliczał prawdopodobieństwo detekcji, umożliwiając regulację progu klasyfikacji, w zakresie od 0 do 1, w zależności od czułości analizy. Rysunek 3.5 przedstawia skan szalki ze zliczonymi przez program koloniami komórek (panel a). Na panelu b widać powiększenie na kilka zliczonych kolonii, którym zostało przypisane odpowiednie prawdopodobieństwo detekcji. Zgodnie z panelem b, w przypadku tej szalki zliczonych zostało w sumie 160 kolonii z czego 89 należało do rozpatrywanego progu detekcji od 0,6 do 0,9. Analizę przeprowadzano w środowisku Google Colab [89] z wykorzystaniem notatnika Jupyter [90], dzięki temu kod był uruchamiany w chmurze, co zapewniało łatwy dostęp i zapis wyników.



Rysunek 3.5: Wizualizacja działania programu bazującego na modelu YOLOv5 [87]. a) Skan szalki Petriego o średnicy 9 cm ze zliczonymi komórek glejaka. b) Zbliżenie na zliczone kolonie z przypisanym prawdopodobieństwo detekcji. c) Ustawienia detekcji kolonii z progiem w przedziale od 0,6 do 0,9. Zliczono 89 kolonii na 160 wykrytych.

Precyzja działania programu została zweryfikowana poprzez porównanie liczby kolonii rozpoznanych przez program, do liczby kolonii zliczonych ręcznie pod mikroskopem optycznym. W tym celu sprawdzono dane dla 35 szalek, a skuteczność identyfikacji kolonii powyżej 50 komórek, przez program na bazie modelu YOLOv5, dla progu detekcji od 0,6 w górę wynosiła 98%. Ręczną korektę oznaczeń kolonii, wykonywano za pomocą dostępnego online narzędzia CVAT (*Computer Vision Annotation Tool*) [91] służącego do oznaczania obiektów. Pozwalało ono na łatwe dodanie kolonii początkowo nieuwzględnionych przez program do automatycznego zliczania.

Otrzymane liczby zliczonych kolonii oraz znane liczby wysiewanych komórek posłużyły do obliczenia zdolności klonowania PE dla próbek kontrolnych oraz frakcji przeżywającej SF dla próbek napromienionych obu linii komórkowych. Tabela 3.1 przedstawia kluczowe parametry dla komórek linii M059J oraz M059K niezbędne do wyznaczenia przeżywalności otrzymane z jednego, z trzech powtórzeń eksperymentu. Na ich podstawie wyznaczono krzywą przeżywalności obu linii komórkowych w zależności od deponowanej w nich dawki promieniowania α .

Tabela 3.1: Wartości kluczowych parametrów dla eksperymentu zdolności klonowania obejmujących liczbę wysianych komórek, liczbę zliczonych kolonii, obliczoną zdolność klonowania oraz przeżywalność komórek. Dane uzyskane w jednym z trzech powtórzeń eksperymentu, nie uwzględniają niepewności pomiarowych opisanych w rozdziale 2.4.1 oraz 3.6.

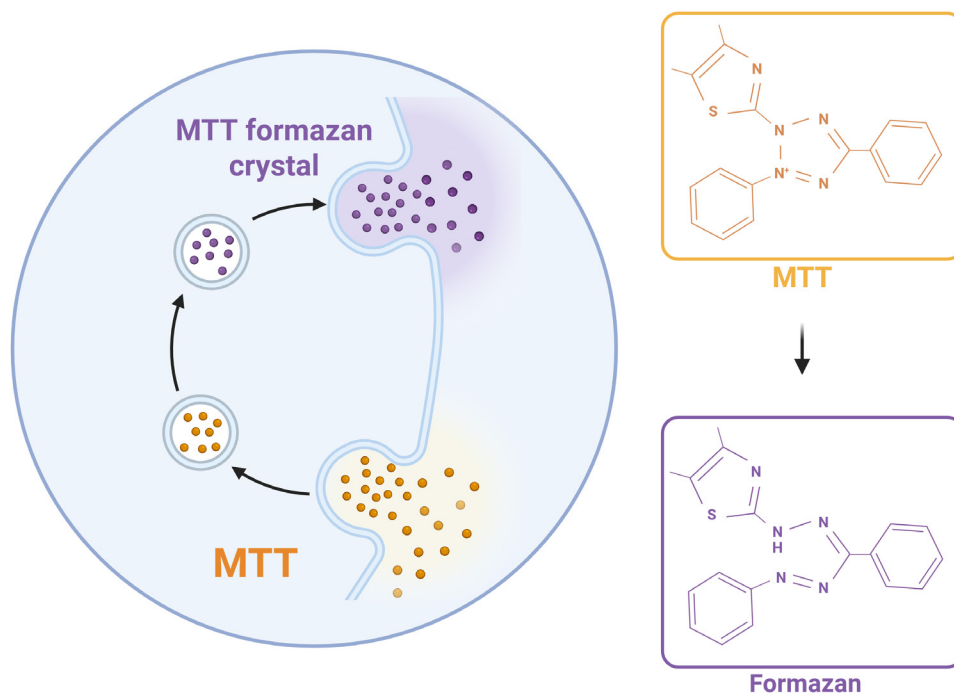
		Dawka (Gy)						
		0	0,33	0,67	1	1,33	1,67	2
L. komórek	M059J	600	900	1200	1700	2000	3000	4000
L. kolonii		137	198	213	279	253	387	458
PE		0,23						
SF		1	0,96	0,77	0,72	0,55	0,56	0,50
L. komórek	M059K	1500	-	2000	-	3500	4500	5500
L. kolonii		211	-	228	-	4	5	6
PE		0,14						
SF		1	-	0,81	-	0,61	0,49	0,45

3.3 Test cytotoksyczności (MTT)

Test MTT opiera się na reakcji rozpuszczalnej w wodzie soli tetrazoliowej – bromku 3-[4,5-dimetylotiazol-2-ylo]-2,5-difenylo-tetrazoliowego o żółtym kolorze. Związek ten składa się z dodatnio naładowanego pierścienia tetrazolowego, a jego redukcja w komórkach prowadzi do rozerwania centralnego pierścienia i powstania fioletowo-niebieskiej, nierozpuszczalnej w wodzie cząsteczki formazanu.

Odczynnik MTT może przenikać przez błonę komórkową, a także przez wewnętrzną błonę mitochondrialną komórek żywych dzięki swojemu dodatniemu ładunkowi oraz lipofilowej strukturze, i ulega redukcji do formazanu przez metabolicznie aktywne komórki [92].

Test MTT pozwala na określenie aktywności metabolicznej komórek (żywołności), a nie bezpośrednio ich zdolności do proliferacji. Spadek sygnału może wynikać zarówno ze śmierci komórki (cytotoksyczności), jak i z zahamowania metabolizmu lub zatrzymania cyklu komórkowego (efektu cytostatycznego) [93].



Rysunek 3.6: Zasada działania testu MTT. Żółta sól tetrazoliowa przyswajana jest przez komórki, gdzie ulega bio redukcji przez komórki metabolicznie aktywne do nierozpuszczalnych w wodzie kryształów o fioletowym kolorze. Redukcja MTT prowadzi do rozerwania centralnego pierścienia tetrazolowego i powstania cząsteczki formazanu. Utworzono w BioRender.com.

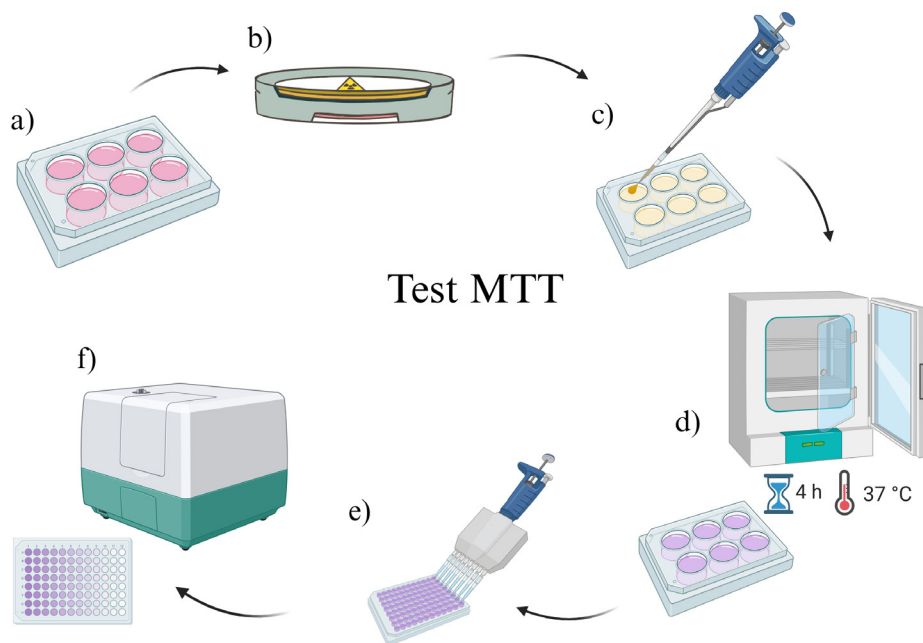
Ilość powstałego formazanu jest proporcjonalna do liczby żywych i metabolicznie aktywnych komórek, co można oszacować na podstawie pomiaru absorbancji jednorodnych roztworów rozpuszczonych kryształów formazanu. Pomiaru dokonuje się za pomocą czytnika mikropłytek dla próbek napromienianych, kontroli oraz tła. Żywność określa się jako stosunek absorbancji próbek napromienianych do nienapromienianych, po uprzednim odjęciu wartości tła.

Test ten stanowi wartościowe, komplementarne narzędzie w ocenie odpowiedzi komórek na działanie czynników cytotoksycznych lub promieniowania jonizującego [94]. Jego wynik odzwierciedla aktualny stan metaboliczny komórek, co pozwala na szybką ocenę wczesnych efektów biologicznych w krótkim czasie po ekspozycji. Metoda ta uzupełnia test przeżywalności, który ocenia długoterminową zdolność komórek do proliferacji.

3.3.1 Procedura testu MTT

Test MTT został przeprowadzony na dwóch liniach komórkowych M059J oraz M059K dla szerokiego zakresu dawek promieniowania α : 0,08 Gy, 0,17 Gy, 0,33 Gy, 0,5 Gy, 0,67 Gy, 1,33 Gy, 2 Gy, i 2,67 Gy, oraz dla próby kontrolnej. Eksperyment wykonano w trzech powtórzeniach biologicznych, każdy z nich obejmował osiem powtórzeń technicznych na daną dawkę. Analiza została wykonana w oparciu o opisane wcześniej protokoły z uwzględnieniem niewielkich zmian związanych z inkubacją komórek

z MTT na szalkach 6 - cio dołkowych [95]. Z uwagi na konieczność zachowania nieziennej geometrii napromieniania, komórki przed eksperymentem hodowane były dokładnie w takich samych warunkach jak opisano w pozostałych eksperymentach (podrozdział 3.2.1). Rysunek 3.7 przedstawia schemat protokołu testu MTT.



Rysunek 3.7: Schemat procedury testu MTT przedstawiający jego etapy: a) inkubacja komórek na szkiełkach nakrywkowych, b) napromienianie próbki powierzchniowym źródłem ^{241}Am , c) dodanie do komórek roztworu MTT, d) inkubacja komórek z roztworem MTT, e) rozpuszczenie kryształów formazanu i przeniesienie roztworu do szalki 96 - cio dołkowej, f) odczyt absorbancji za pomocą czytnika płytek Synergy H1MFDG Microplate Reader (BioTek). Utworzono w BioRender.com.

48 godzin po napromienianiu komórki inkubowano w roztworze MTT w świeżym medium hodowlanym o stężeniu $0,5\text{ mg/ml}$ (37°C , $5\%\text{ CO}_2$). Po czterech godzinach medium zostało usunięte, a kryształy formazanu przepłukane $100\text{ }\mu\text{l}$ buforu PBS. W celu rozpuszczenia kryształów do każdego dołka szalki 6 - cio dołkowych dodawano 1 ml izopropanolu i inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Następnie roztwór z rozpuszczonymi kryształami formazanu przenoszono na szalkę 96 - cio dołkową, gotową do odczytu w czytniku płytek.

3.3.2 Analiza wyników testu MTT

W celu wyznaczenia względnej żywotności komórek absorbancję mierzono przy długości fali 590 nm za pomocą czytnika mikropłytek Synergy H1MFDG (BioTek, USA) wyposażonego w oprogramowanie Gen5, które generowało pliki wynikowe w formacie `.csv`. Na podstawie otrzymanych danych obliczono żywotność komórek zgodnie ze wzorem 3.4.

$$\text{Żywotność (\%)} = \frac{A_{\text{próbkka}} - A_{\text{tło}}}{A_{\text{kontrola}} - A_{\text{tło}}} \times 100. \quad (3.4)$$

W równaniu 3.4 wykorzystano następujące oznaczenia:

$A_{\text{próbkka}}$ - wartość absorbancji próbki napromienionej,

A_{kontrola} - wartość absorbancji komórek nienapromienionych (kontrola),

$A_{\text{tło}}$ - wartość absorbancji pustych dołków (bez komórek).

Obliczone w ten sposób wartości przedstawiono w procentach względem kontroli, przyjmując 100% żywotności dla komórek nienapromienionych. Na podstawie wyników testu MTT sporządzono wykres zależności względnej żywotności komórek linii M059J oraz M059K od dawki promieniowania α zdeponowanej w próbce.

3.4 Test γ H2AX

Dwuniciowe pęknięcia DNA (DSBs) są następstwem oddziaływania promieniowania jonizującego na komórki, a jedną z pierwszych reakcji komórki na tego typu uszkodzenie jest fosforylacja histonu *H2AX* na serynie 139 (aminokwasie zlokalizowanym na pozycji 139 w łańcuchu aminokwasowym histonu). W następstwie tego procesu zaangażowane są kolejne białka szlaku naprawy DSBs. Ufosforylowany histon szybko rozprzestrzenia się na obszarze około 2 megapar zasad uszkodzonej chromatyny i staje się mikroskopowo wykrywalny w postaci wyraźnych ognisk jądrowych (ang. *foci*) w ciągu kilku minut po napromienieniu [96].

Uszkodzenia DNA mogą być skutecznie wykrywane metodą immunofluorescencyjnego znakowania γ H2AX. Sygnał rejestrowany przez mikroskop fluorescencyjny odpowiada jasnym punktom, zwanym foci. Każde ognisko naprawcze powstaje w odpowiedzi na pojedyncze DSBs w przypadku promieniowania o niskim LET, a średnia liczba powstających foci jest proporcjonalna do liczby uszkodzeń i rośnie wraz z dawką promieniowania.

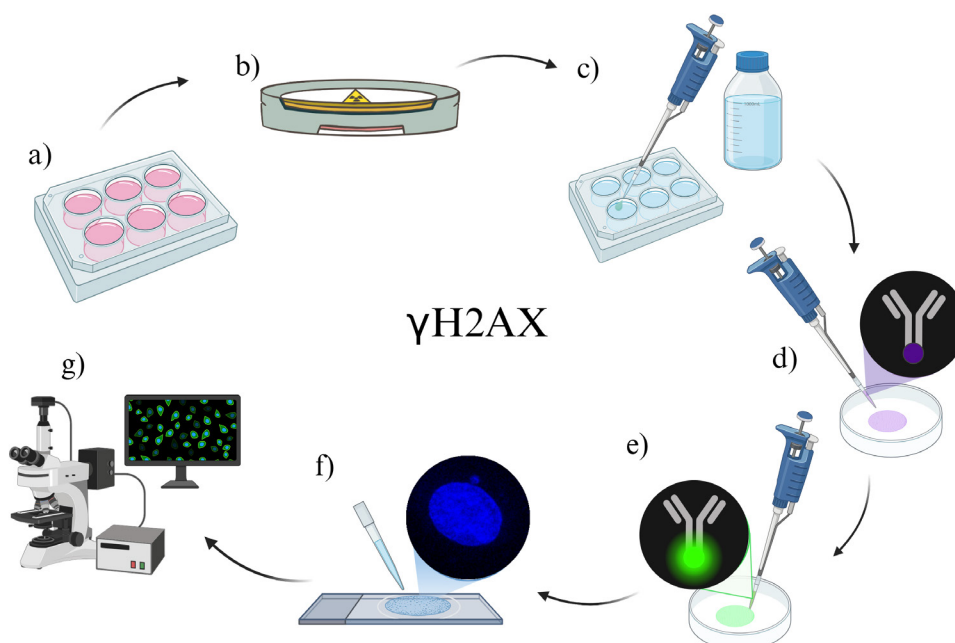
W przypadku promieniowania o wysokim LET jonizacja ośrodka, przez który przechodzi cząstka, jest znacznie gęstsza. Taki charakter cząstek α powoduje powstawanie foci zlokalizowanych bardzo blisko siebie w przestrzeni jądra komórkowego. Może również dochodzić do nakładania się ognisk. W konsekwencji promieniowanie o wysokim LET indukuje DSBs, które są bardziej rozległe, lecz mniej liczne.

Zmiana liczby ognisk w czasie odzwierciedla zdolność komórki do naprawy DNA. Cząstki α wywołują bardziej złożone i trudniejsze do naprawy DSBs, dlatego tempo redukcji liczby ognisk w czasie jest znacznie niższe w przypadku promieniowania o wysokim LET w porównaniu z promieniowaniem o niskim LET [97].

3.4.1 Procedura testu γ H2AX

W celu przeprowadzenia jakościowej i ilościowej analizy liczby foci wykonano analizę immunofluorescencyjną dwóch linii komórkowych: M059J oraz M059K, po podda-

niu ich działaniu promieniowania α o różnych dawkach. Procedurę testu przedstawiono schematycznie na rysunku 3.8. Szkiełka z komórkami przygotowano i napromieniono analogicznie jak opisano w przypadku testu przeżywalności (podrozdział 3.2.1). Dalsze etapy przeprowadzono zgodnie z wcześniej opublikowanymi protokołami, z uwzględnieniem niewielkich modyfikacji [98, 99].



Rysunek 3.8: Schemat procedury testu γ H2AX przedstawiający jego etapy: a) inkubacja komórek na szkiełkach nakrywkowych, b) napromienianie próbki powierzchniowym źródłem ^{241}Am , c) utrwalenie komórek zimnym metanolem, d) inkubacja z przeciwciałem pierwszorzędowym anty- γ H2AX, e) inkubacja z przeciwciałem drugorzędowym anty-mouse IgG sprzężonym z fluoroforem Alexa Fluor 488, f) osadzenie preparatów na szkiełkach podstawowych przy użyciu medium montującego VECTASHIELD[®] z barwnikiem DAPI, g) analiza próbek pod mikroskopem konfokalnym. Utworzono w BioRender.com.

Po 15 minutach od napromienienia każde szkiełko utrwalano przez 5 minut w zimnym metanolu w temperaturze -20°C . Następnie komórki rehydratowano poprzez trzykrotną, dziesięciominutową inkubację szkiełek w szalce 6-dołkowej, stosując 5 ml buforu PBS na dołek. W celu ograniczenia nieswoistego wiązania, tj. niepożądanego przyłączania przeciwciał do niewłaściwych struktur w komórce, szkiełka z komórkami inkubowano w buforze blokującym (2% BSA, 10% odtłuszczonego mleka w proszku, 0,1% Triton X-100) w roztworze KCM (20 mM KCl, 20 mM NaCl, 10 mM Tris $\cdot$ HCl, 0,5 mM EDTA, 0,1% Triton X-100, pH 8,0). Inkubację prowadzono w temperaturze 4°C przez noc.

Kolejnego dnia komórki inkubowano z przeciwciałem pierwszorzędowym anty- γ H2AX (Sigma-Aldrich, USA) w buforze blokującym (1:400). Na każde szkiełko наносzono 200 μl roztworu przeciwciała i inkubowano przez 2 godziny w temperaturze

pokojoyej. Po zakończeniu inkubacji szkiełka trzykrotnie płukano, po 15 minut każde, w zimnym buforze KCM.

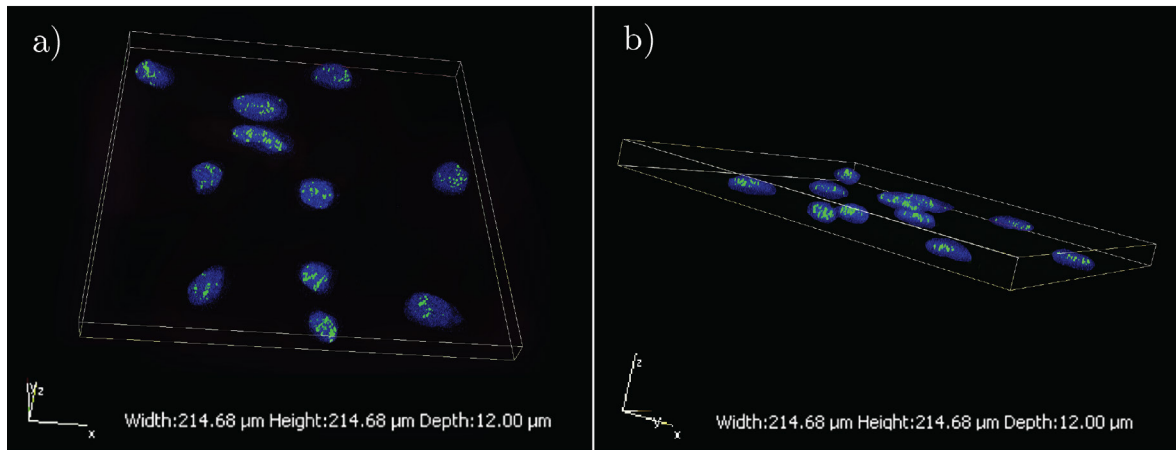
Następnie komórki inkubowano z przeciwciałem drugorzędowym anty - mouse IgG sprzężonym z fluoroforem Alexa Fluor 488 (1:400; Thermo Fisher Scientific, USA) przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Obie inkubacje prowadzono przy ograniczonym dostępie światła. Po zakończeniu drugiej inkubacji przeprowadzono trzy płukania w zimnym buforze KCM.

Na koniec komórki osadzano na szkiełkach podstawowych przy użyciu medium montującego VECTASHIELD® z barwnikiem DAPI (Vector Laboratories, USA) w celu wybarwienia jąder komórkowych. Tak przygotowane preparaty analizowano za pomocą mikroskopu konfokalnego. Eksperyment wykonano w trzech powtórzeniach biologicznych.

3.4.2 Analiza wyników testu γ H2AX

Przygotowane preparaty analizowano za pomocą mikroskopu konfokalnego Nikon A1R MP (Nikon Corporation, Tokio, Japonia) z serii Nikon Ti-Eclipse, wyposażonego w obiektyw Plan Apo VC 60 $\times$ /1.4 oraz olejek immersyjny. Niebieski sygnał fluorescencji, pochodzący od jąder komórkowych (DAPI) zbierano przy użyciu fioletowego lasera o długości fali 404 nm oraz odpowiedniego filtra pasmowego 425-475 nm. Zieloną fluorescencję (γ H2AX) rejestrowano przy długości fali wzbudzenia 488 nm i zakresie emisji 500-550 nm. Wyższą rozdzielczość obrazowania 3D uzyskano poprzez zmianę kroku w osi Z z 1 μ m na 0,105 μ m umożliwiło to otrzymanie wysokiej rozdzielczości obrazów 3D obrazujących uszkodzenia na przestrzeni całego jądra komórkowego.

Dla każdego wariantu linii komórkowej i dawki zebrano po 15 pól widzenia co łącznie dawało ponad 100 przeanalizowanych jąder komórkowych. Obrazy 3D w formacie .nd2 konwertowano za pomocą programu *Fiji/ImageJ* do obrazów 8 - bit wykorzystując projekcję sumującą (*Sum Slices*), która łączy wszystkie warstwy obrazu w osi Z w jeden obraz 2D, sumując intensywność sygnału dla każdego piksela. Rysunek 3.9 przedstawia dwie projekcje obrazów 3D jąder komórkowych (kolor niebieski) z ogniskami naprawczymi (kolor zielony) linii M059K napromienionej dawką 2 Gy.



Rysunek 3.9: Skany 3D jąder komórkowych (kolor niebieski) z wybarwionymi foci γ H2AX (kolor zielony) otrzymane za pomocą mikroskopu konfokalnego. Obrazy a i b przedstawiają ten sam skan linii komórkowej M059K po ekspozycji na cząstki α (2 Gy), w dwóch różnych projekcjach.

Obrazy 2D analizowane były pod kątem liczby foci γ H2AX za pomocą automatycznego programu *FociCounter* [100, 98]. Program może przetwarzać kilka obrazów jednocześnie po wcześniejszym zaznaczeniu na nich obszarów jąder komórkowych, z których foci mają być zliczane. Zliczenie opiera się na pięciu parametrach, które dostosowano przed wykonaniem ostatecznego zliczenia, a ich wartości zostały przedstawione w tabeli 3.2. Skany dla obu linii komórkowych niezależnie od dawki były zliczane z użyciem takich samych parametrów.

Tabela 3.2: Definicja parametrów zliczania foci γ H2AX w programie *FociCounter* oraz wartości zastosowane do analizy komórek M059J i M059K napromienionych cząstkami α [100, 98].

Nazwa	Opis parametru	Zastosowana wartość
MSS		
(median square side)	filtr medianowy do redukcji szumu	3
EP		
(enhancement parameter)	wzmocnienie kontrastu obrazu	1,05
CR		
(crown radius)	promień korony	2
RR		
(rim radius)	promień pierścienia	7
BD		
(brightness difference)	różnica jasności między tłem a ogniskami	20

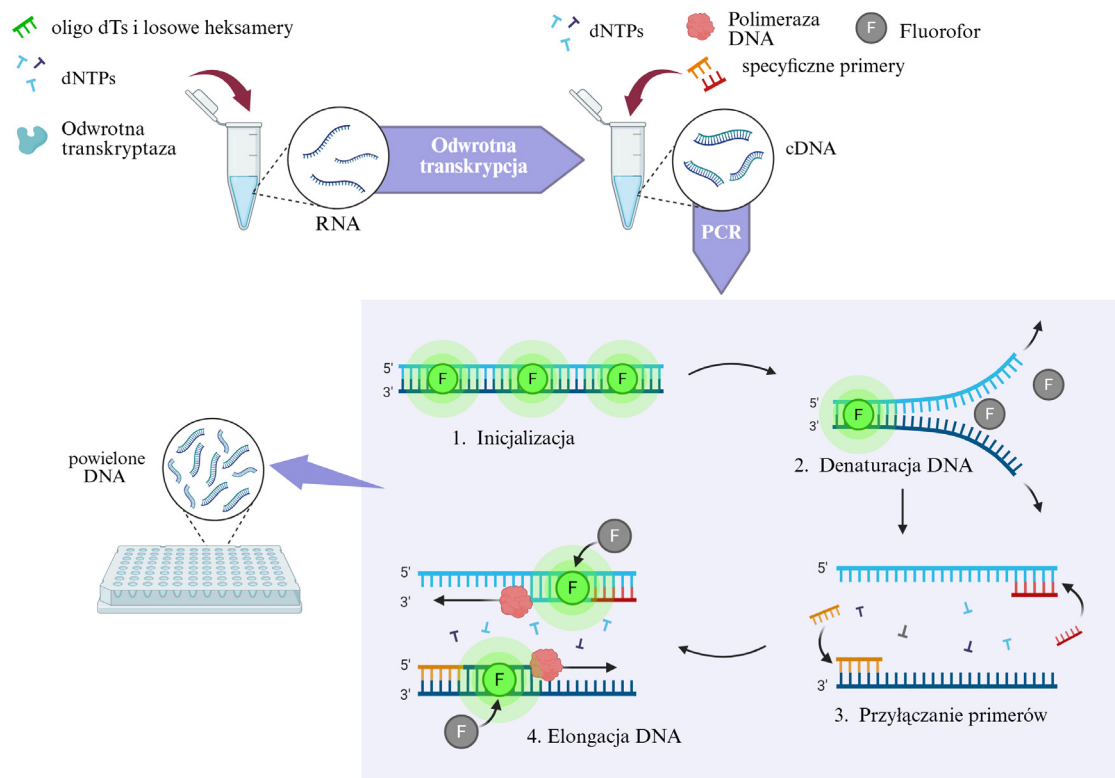
W pierwszym kroku program stosując filtr medianowy ang. *median square side (MSS)* redukuje szum, a w następnym etapie wzmacnia kontrast na podstawie przypisanego parametru ang. *enhancement parameter (EP)*. W celu identyfikacji ognisk program stosuje transformację, ang. *top - hat*, która pozwala wykrywać lokalne, okrągłe obszary o podwyższonej jasności względem tła. Analiza polega na porównaniu średniej jasności piksela w dwóch obszarach - wewnętrznym (promień korony, CR) i zewnętrznym (promień pierścienia, RR). Jeśli różnica jasności przekracza ustalony próg, ang. *brightness difference (BD)*, dany obszar jest klasyfikowany jako ognisko i oznaczany. *FociCounter* generuje wynikowy plik tekstowy oraz obrazy z oznaczonymi ogniskami naprawczymi. Dane otrzymane z przeprowadzonej analizy posłużyły do wykreślenia zależności średniej liczby foci $\gamma H2AX$ od dawki promieniowania α deponowanej w komórkach.

3.5 Badanie ekspresji genów

Komórka poddana działaniu promieniowania jonizującego spowalnia ogólną syntezę RNA i białek, a w odpowiedzi na uszkodzenia DNA aktywowane są głównie geny odpowiadające za jego naprawę [101]. Poziom ekspresji genów możliwy jest do weryfikowania za pomocą metody Reverse Transcription Quantitative Real-Time PCR (RT-qPCR). Bazuje ona na łańcuchowej reakcji polimerazy, ang. *Polymerase Chain Reaction (PCR)* polegającej na zwielokrotnianiu łańcuchów DNA, za odkrycie której w 1992 roku Kary Mullis otrzymał nagrodę Nobla [102].

Biorąc pod uwagę, że to RNA odzwierciedla, które geny zostały aktywowane, i to ono jest głównym regulatorem ekspresji [103] konieczne jest przepisanie RNA na DNA poprzez odwrotną transkrypcję, ang. *Reverse Transcription (RT)*. Rysunek 3.10 przedstawia najważniejsze etapy RT-qPCR. Pierwszym z nich jest właśnie RT, która zachodzi pod wpływem enzymu odwrotnej transkryptazy w obecności dNTP, Oligo(dT) i losowych heksamerów. dNTP to podstawowe substraty w reakcji syntezy DNA pełniące funkcję donorów nukleotydów. Oligo(dT) to krótkie (od 2 do 20 monomerów DNA), syntetyczne oligonukleotydy DNA składające się wyłącznie z tymidyn (T). Są komplementarne do ogona poli(A) mRNA, zakotwicząc starter tuż przy 3'-końcu transkryptu. Heksamery to natomiast mieszanina wszystkich możliwych sześciu-nukleotydowych starterów, które hybrydują w różnych miejscach cząsteczki RNA i inicjują syntezę cDNA. Odwrotna transkryptaza następnie wydłuża powstałą nici, syntetyzując komplementarne DNA (cDNA).

Kolejnym etapem jest reakcja PCR, w której do syntezowanego cDNA dostarcza się mieszaniny dNTP, enzymu polimerazy DNA, primerów specyficznych dla badanych genów, a także barwnika fluorescencyjnego wiążącego się specyficznym do dwuniciowego DNA. Pod wpływem ogrzania próbki dochodzi do denaturacji DNA, a następnie do syntezy komplementarnej nici z wykorzystaniem specyficznych primerów, a także pozostałych substratów.



Rysunek 3.10: Zasada działania reakcji RT-qPCR. Synteza cDNA poprzez odwrotną transkrypcję (RT) na wyizolowanym wcześniej RNA. Reakcja PCR, na którą składają się 4 etapy. Inicjalizacja (przyłączenie fluoroforu do podwójnej nici DNA), denaturacja DNA pod wpływem temperatury, przyłączanie specyficznych primerów do komplementarnych fragmentów nici DNA, elongacja DNA poprzez polimerazę DNA i dNTP. Utworzono w BioRender.com.

Q w skrócie RT-qPCR oznacza ilościowy (ang. *quantitative*) w czasie rzeczywistym (ang. *Real Time*) co świadczy o tym, że powielenie DNA może być mierzone ilościowo poprzez pomiar poziomu fluorescencji w czasie rzeczywistym. Pomiaru dokonuje się w wielu cyklach a jego rezultatem jest krzywa wzmocnienia fluorescencji w zależności od numeru cyklu. Wraz z rozpoczęciem reakcji poziom fluorescencji jest niski i uznawany jako tło. Powielenie DNA ma charakter eksponencjalny co odwzorowywane jest na krzywej. Punkt, w którym krzywa osiąga poziom progu, będący poziomem znacząco wyższym od tła, świadczy o tym, iż fluorescencja pochodzi od powielonego DNA, i oznaczany jest jako C_t (ang. *cycle threshold*). Oznacza to, iż im więcej było kopii genu w próbce na początku, tym szybciej (niższy C_t) zostanie osiągnięty próg.

Poziom ekspresji danego genu wyznacza się poprzez znormalizowanie wyników C_t badanego genu względem genu referencyjnego, który charakteryzuje się stałą ekspresją w trakcie całej reakcji, zgodnie z równaniem 3.5

$$\Delta C_t = C_{t,\text{gen badany}} - C_{t,\text{gen referencyjny}}, \quad (3.5)$$

Następnie wyniki próby badanej $\Delta C_{t,\text{próba badana}}$ porównuje z próbą kontrolną tak jak w równaniu 3.6

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t,\text{próba badana}} - \Delta C_{t,\text{próba kontrolna}}. \quad (3.6)$$

Zmianę krotności ekspresji (ang. *Fold Change*) względem kontroli oblicza się na podstawie równania 3.7

$$\text{Fold change} = 2^{-\Delta\Delta C_t} \quad [104]. \quad (3.7)$$

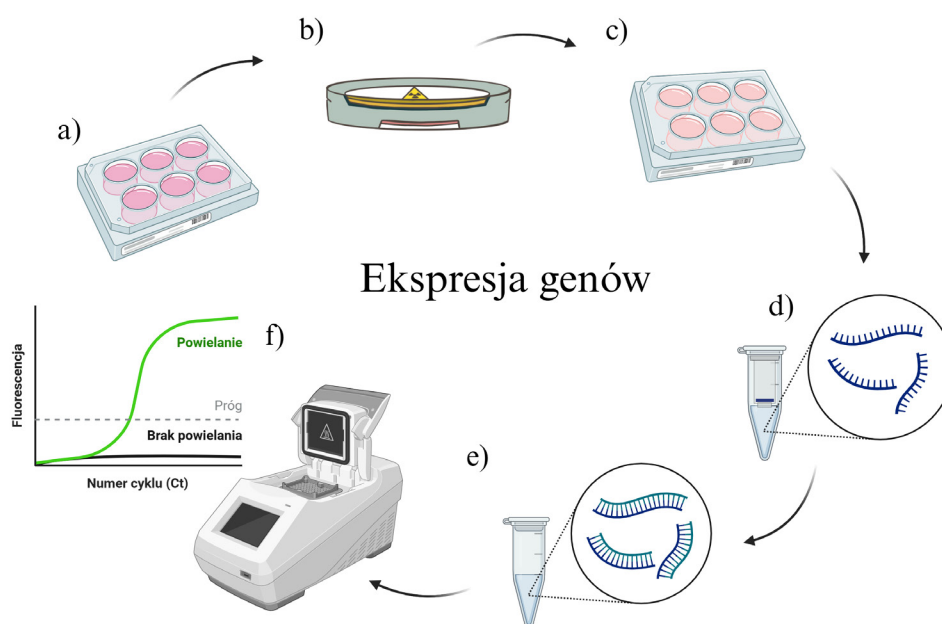
Metoda RT-qPCR jest obecnie szeroko stosowana w biologii i medycynie do ilościowej i jakościowej charakterystyki kwasów nukleinowych. Stosuje się ją do badania poziomu ekspresji genów, wrywaniu mutacji w genach nowotworowych, wykrywania organizmów modyfikowanych organicznie czy identyfikacji obecności bakterii i wirusów [105].

3.5.1 Procedura testu RT-qPCR

Procedurę analizy ekspresji genów w komórkach napromienionych cząstkami α rozpoczynano od wysiania 5×10^4 komórek na szkiełko nakrywkowe, następnie napromieniano komórki w układzie z powierzchniowym źródłem ^{241}Am tak jak to zostało opisane w podrozdziale 3.2.1. Schemat procedury eksperymentu przedstawia rysunek 3.11. Po zakończeniu napromieniania komórki przenoszono do nowej szalki 6 - cio dołkowej ze świeżym medium hodowlanym.

W kolejnym kroku przeprowadzono izolację RNA, które posłużyło za matrycę do reakcji RT i qPCR. W tym celu skorzystano z RNeasy Mini Kit (Qiagen, USA) bazującego na kolumnkowym oczyszczaniu RNA na złożu krzemionkowym. Procedurę przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta [106]. Na początku przepłukano komórki 2 ml PBS na dołek. Dodano 1 ml PBS na dołek, zeskrobano komórki ze szkiełek (łącznie 1×10^6) i całość zebrano do kolby stożkowej 50 ml. Dołki przepłukano dodatkowym 1 ml PBS i również przeniesiono do kolby. Całość odwirowano i zlano supernatant. Następnie dodano 350 μl buforu RLT, który odpowiadał za lizę (rozerwanie) komórek oraz inaktywację enzymów niszczących RNA. Dodano także 400 μl 70% etanolu, który powodował wiązanie RNA do membrany. Przeniesiono lizat na kolumnę i odwirowano.

Kolejno dodano 350 μl buforu RW1, aby wypłukać z lizatu pozostałości białek i enzymów. Następnie do kolumny dodano 80 μl mieszaniny DNazy I (10 μl) i buforu RDD (70 μl), które służą do trawienia DNA na membranie. Przeprowadzono kolejne płukanie z wykorzystaniem 350 μl buforu RW1 i dwukrotne buforem RPE (500 μl każde), w ramach ostatniego czyszczenia kolumny ze zbędnych białek czy soli, które mogłyby hamować dalsze reakcje.



Rysunek 3.11: Schemat procedury badania ekspresji genów przedstawiający wszystkie jego etapy: a) inkubowanie komórek na szkiełkach nakrywkowych, b) napromieniowanie próbek powierzchniowym źródłem ^{241}Am , c) transfer komórek do nowej szalki 6-cio-dółkowej, d) izolacja RNA, e) synteza cDNA, f) analiza qPCR. Utworzono w BioRender.com.

Po dodaniu każdego z buforów lizat odpowiednio wirowano. Kolumnę z membraną przeniesiono do nowej próbki odbiorczej i dokonano elucji RNA poprzez dodanie $30\ \mu\text{l}$ wody RNase - free i odwirowanie. Na koniec dokonano oceny jakości wyizolowanego RNA nakrapiając ($1,5\ \mu\text{l}$) na mikrokuwetę $\mu\text{Drop}^{\text{TM}}$ Duo Plate. Pomiaru dokonano za pomocą spektrofotometru Multiskan SkyHigh (Thermo Scientific, USA).

Drugim etapem przed reakcją Quantitative Real-Time PCR (qPCR) była synteza cDNA, której dokonano korzystając z iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, USA) na podstawie procedury załączonej przez producenta [107]. Rozpoczęto od przygotowania mieszaniny reakcyjnej zgodnie z proporcjami w niej zawartymi. Do próbki dodano $4\ \mu\text{l}$ $5\times$ iScript Reaction Mix, w którego skład wchodzi dNTP, jony magnezu Mg^{2+} , bufor, oraz mieszanka starterów: oligo(dT) i losowych heksamerów (primerów). Dodano również $1\ \mu\text{l}$ enzymu odwrotnej transkryptazy iScript. Znając stężenie wyizolowanego RNA obliczono objętość wody RNase - free niezbędną do przygotowania w sumie $20\ \mu\text{l}$ roztworu. Skład mieszaniny reakcyjnej RT dla próbek nienapromienionych dwóch linii komórkowych M059J oraz M059K przedstawia tabela 3.3. Gotową mieszaninę umieszczano w termocyklerze i inkubowano pierwsze pięć minut w 25°C , aby zainicjować przyłączanie się primerów. Kolejne 20 minut w temperaturze 46°C . Jest to optymalna temperatura aktywności odwrotnej transkryptazy. Ostatnia minuta w 95°C pozwalała na inaktywację enzymu i zakończenie reakcji.

Tabela 3.3: Skład mieszaniny reakcyjnej odwrotnej transkrypcji (RT) dla próbek nienapromienionych dwóch linii komórkowych M059J oraz M059K.

Składnik	Objętość na reakcję M059J 0 Gy (μ l)	Objętość na reakcję M059K 0 Gy (μ l)
5x iScript Reaction Mix	4	4
iScript Reverse Transcriptase	1	1
Woda wolna od nukleaz	13,86	13,89
Matryca RNA	1,14	1,11
Całkowita objętość reakcji	20	20

W celu przeprowadzenia właściwej reakcji qPCR wykorzystano zaprojektowane w tym celu płytki PrimePCR custom SYBR plate (Bio-Rad, USA) zawierające w dołkach liofilizowane primery odpowiednich genów. Przygotowano mieszaninę reakcyjną zgodnie z proporcją odpowiadającą na 1 dołek szalki 96 - dołkowej, adekwatnie do instrukcji producenta [108]. Wykorzystano 10 μ l iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, USA). Miks zawierał dNTP, jony magnezu Mg^{2+} , bufor, polimerazę DNA oraz barwnik fluorescencyjny SYBR Green. Dodano także 1 μ l wyizolowanego uprzednio cDNA, całość dopełniono 9 μ l wody Nuclease - free. Tak przygotowaną mieszaninę dodano do wszystkich dołków zawierających primery. Skład mieszaniny reakcyjnej qPCR dla obu linii komórkowych, na jeden dołek 96 - dołkowej płytki PrimePCR custom SYBR plate przedstawia tabela 3.4. Pomiar prowadzono na termocyklerze CFX Opus 96 Real-Time PCR system (Bio-Rad, USA). Pomiar obejmował 40 cykli składających się z dwóch etapów: 5 sekund w temperaturze $95^{\circ}C$ w celu denaturacji DNA i aktywacji polimerazy oraz 30 sekund w $60^{\circ}C$, w którym miało miejsce przyłączanie starterów, elongacja nici DNA oraz pomiar fluorescencji. Otrzymane dane ekspresji genów analizowano z wykorzystaniem oprogramowania CFX Maestro (Bio-Rad, USA).

Tabela 3.4: Skład mieszaniny reakcyjnej qPCR dla obu linii komórkowych, na jeden dołek 96 - dołkowej płytki PrimePCR custom SYBR plate, zawierającej primery analizowanych genów.

Składnik	Objętość na reakcję (μ l)
iTaq Universal SYBR [®] Green Supermix	10
Primery	liofilizowane na płytce SYBR plate
Matryca DNA	1
Woda wolna od nukleaz	9
Całkowita objętość reakcji	20

3.5.2 Detekcja mykoplazmy

Mykoplazmy są prostymi, samoreplikującymi bakteriami, pozbawionymi ściany komórkowej, całkowicie odpornymi na działanie antybiotyków stosowanych w mediach hodowlanych. Zanieczyszczenia hodowli *in vitro* mykoplazmą stanowią poważny problem z powodu niskiego współczynnika wykrywalności. Mają one również istotny wpływ na wzrost i funkcjonowanie komórek, syntezę i wydzielanie metabolitów, a także ekspresję genów [109, 110].

W celu wykluczenia ewentualnego wpływu tych mikroorganizmów na wyniki ekspresji genów w liniach komórkowych M059J oraz M059K przeprowadzono dodatkowy test na ich obecność, bazujący na metodzie PCR ukierunkowany na regiony w obrębie genu 16S rRNA, charakterystyczne dla różnych gatunków mykoplazm. Skorzystano z gotowego zestawu reagentów EZ-PCR Mycoplasma Detection Kit (Biological Industries, Izrael) przeprowadzając procedurę zgodnie z zaleceniami producenta [111].

W przypadku każdej próbki, 1 ml supernatantu przeniesiono do sterylnej probówki o pojemności 1,5 ml i wirowano z prędkością $250 \times g$ przez 1 minutę w celu usunięcia resztek komórek. Sklarowany supernatant przeniesiono następnie do nowej, sterylnej probówki i wirowano z prędkością $15\,000 \times g$ przez 10 minut. Uzyskany osad zawieszono ponownie w 50 μ l buforu i dokładnie pipetowano. Zawiesinę ogrzewano następnie do temperatury 95°C przez 3 minuty w celu lizy komórek i uwolnienia DNA. Reakcję PCR przeprowadzono w całkowitej objętości 50 μ l, używając składników dostarczonych w zestawie. Każda reakcja zawierała 10 μ l mieszaniny reakcyjnej, 5 μ l przygotowanej próbki testowej, 1 μ l matrycy DNA kontroli wewnętrznej, 5 μ l mieszanki starterów kontroli wewnętrznej oraz 29 μ l wody wolnej od nukleaz. W osobnej probówce znajdowała się kontrola pozytywna zawierająca 1 μ l DNA kontroli pozytywnej oraz kontrola negatywna przygotowana z użyciem sterylnej wody destylowanej. Reakcję PCR przeprowadzono w termocyklerze (T100, Bio-Rad).

Produkty PCR analizowano metodą elektroforezy w żelu agarozowym. Polega ona na rozdzielaniu fragmentów DNA według ich długości w porowatej matrycy agarozy pod wpływem pola elektrycznego. Mniejsze fragmenty migrują szybciej, a większe wolniej, co pozwala na ich wizualne rozróżnienie. Po zakończeniu rozdziału prążki DNA uwidacznia się dzięki zastosowaniu barwnika fluorescencyjnego.

Do analizy użyto 2% żelu agarozowego przygotowanego z użyciem Prona Standard Agarose (Bio-Standard, Polska) rozpuszczonej w buforze $0,5 \times$ TBE (Thermo Fisher Scientific, USA) i wybarwiono barwnikiem SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, USA). Elektroforezę prowadzono przy napięciu 100 V przez 40 minut. Przed nałożeniem na żel, 15 μ l każdego produktu PCR zmieszano z barwnikiem obciążającym $6 \times$ (Thermo Fisher Scientific, USA). Jako marker masy cząsteczkowej zastosowano gotowy do użycia test DNA o długości 1 kb (Thermo Fisher Scientific, USA). Prążki DNA uwidoczniono za pomocą systemu obrazowania iBright Imaging System (Thermo Fisher Scientific, USA).

3.5.3 Analiza ekspresji genów

Eksperyment ekspresji genów przeprowadzono na dwóch liniach komórkowych M059J i M059K, dla próbek kontrolnych (0 *Gy*) oraz napromienionych dawką 2 *Gy*. Do analizy wybrano 30 różnych genów spełniających istotną rolę w odpowiedzi na uszkodzenia DNA. Rysunek 3.12 przedstawia schemat 96 - dołkowej płytki PrimePCR custom SYBR plate (Bio-Rad, USA) zawierającej liofilizowane primery wybranych genów. Płytkę została zaprojektowana specjalnie do tego eksperymentu, w czterech jednakowych egzemplarzach. Dla linii M059J i M059K 0 *Gy* oraz M059J i M059K 2 *Gy*. Na każdej z płytek znajdował się również primer genu referencyjnego *ACTB* oraz primery reakcji kontrolnych DNA (genomowe), RT i PCR [112].

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	ATM	ATM	ATM	LIG1	LIG1	LIG1	PARP1	PARP1	PARP1	XRCC1	XRCC1	XRCC1	A
B	ATR	ATR	ATR	LIG3	LIG3	LIG3	PARP2	PARP2	PARP2	XRCC2	XRCC2	XRCC2	B
C	BRCA1	BRCA1	BRCA1	LIG4	LIG4	LIG4	PARP3	PARP3	PARP3	XRCC3	XRCC3	XRCC3	C
D	BRCA2	BRCA2	BRCA2	MRE11A	MRE11A	MRE11A	PRKDC	PRKDC	PRKDC	XRCC4	XRCC4	XRCC4	D
E	CHEK1	CHEK1	CHEK1	MSH2	MSH2	MSH2	RAD50	RAD50	RAD50	XRCC5	XRCC5	XRCC5	E
F	CHEK2	CHEK2	CHEK2	MSH3	MSH3	MSH3	RAD51	RAD51	RAD51	XRCC6	XRCC6	XRCC6	F
G	ERCC1	ERCC1	ERCC1	NBN	NBN	NBN	RAD54L	RAD54L	RAD54L	ACTB	ACTB	ACTB	G
H	H2AFX	H2AFX	H2AFX	OGG1	OGG1	OGG1	TP53BP1	TP53BP1	TP53BP1	gDNA	RT	PCR	H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Rysunek 3.12: Projekt płytki PrimePCR custom SYBR plate (Bio-Rad, USA) zawierającej liofilizowane primery wybranych genów. W ramach jednej płytki przewidziano trzy powtórzenia biologiczne eksperymentu. Gen *ACTB* w pozycjach G10 - G12 to gen referencyjny. Pozycje H10 - H12 zawierają primery reakcji kontrolnych.

Listę genów oraz ich rolę w odpowiedzi na uszkodzenie DNA, a także pozycję na płytce do RT-qPCR przedstawia tabela 3.5. Średnią, relatywną zmianę krotności ekspresji sprawdzono w czterech różnych wariantach: w nienapromienionej linii M059K w stosunku do nienapromienionej linii M059J; napromienionej dawką 2 *Gy* linii M059J w stosunku do nienapromienionej linii M059J; napromienionej dawką 2 *Gy* linii M059K w stosunku do nienapromienionej linii M059K; napromienionej dawką 2 *Gy* linii M059K w stosunku do nienapromienionej linii M059K.

Tabela 3.5: Lista genów, które zostały wybrane do badania ekspresji za pomocą metody RT-qPCR. Podstawowa rola poszczególnych genów, rodzaj ścieżki naprawy, w której uczestniczą syntezowane na ich podstawie białka, a także położenie na płycie 96 - dołkowej z primerami [113].

Lp.	Symbol	Rola genu\białka	Rodzaj naprawy	Nr na płycie
1	<i>ATM</i>	Kinaza checkpointowa – sygnalizacja uszkodzeń DNA	DSBR	A1-A3
2	<i>ATR</i>	Kinaza checkpointowa – aktywacja odpowiedzi na uszkodzenia DNA	DSBR	B1-B3
3	<i>BRCA1</i>	Naprawa DNA – rekombinacja homologiczna	DSBR	C1-C3
4	<i>BRCA2</i>	Naprawa DNA – rekombinacja homologiczna	DSBR	D1-D3
5	<i>CHEK1</i>	Zatrzymanie cyklu komórkowego – checkpoint	DSBR	E1-E3
6	<i>CHEK2</i>	Kontrola cyklu komórkowego – checkpoint	DSBR	F1-F3
7	<i>ERCC1</i>	Naprawa DNA – wycinanie uszkodzonych fragmentów	NER	G1-G3
8	<i>H2AFX</i>	Sygnalizacja uszkodzeń DNA – marker pęknięć (γ H2AX)	DSBR	H1-H3
9	<i>LIG1</i>	Ligaza DNA – łączenie przerw w nici	SSBR	A4-A6
10	<i>LIG3</i>	Ligaza DNA – naprawa w jądrze i mitochondriach	SSBR	B4-B6
11	<i>LIG4</i>	Ligaza DNA – końcowy etap łączenia końców	DSBR	C4-C6
12	<i>MRE11A</i>	Detekcja pęknięć DNA – kompleks MRN	DSBR	D4-D6
13	<i>MSH2</i>	Naprawa błędnie sparowanych zasad	MMR	E4-E6
14	<i>MSH3</i>	Naprawa błędnie sparowanych zasad	MMR	F4-F6
15	<i>NBN</i>	Detekcja pęknięć DNA – kompleks MRN	DSBR	G4-G6
16	<i>OGG1</i>	Usuwanie oksydacyjnych uszkodzeń zasad	SSBR	H4-H6
17	<i>PARP1</i>	Detekcja przerw w DNA – rekrutacja białek naprawczych	SSBR	A7-A9
18	<i>PARP2</i>	Odpowiedź komórkowa na uszkodzenia DNA	SSBR	B7-B9
19	<i>PARP3</i>	Stabilność genomu – udział w naprawie DNA	DSBR	C7-C9
20	<i>PRKDC</i>	Katalityczna podjednostka DNA-PK – inicjacja naprawy	DSBR	D7-D9
21	<i>RAD50</i>	Detekcja pęknięć DNA – kompleks MRN	DSBR	E7-E9
22	<i>RAD51</i>	Wymiana nici DNA	DSBR	F7-F9

kontynuacja na następnej stronie

Lp.	Symbol	Rola genu\białka	Rodzaj naprawy	Nr na płytce
23	<i>RAD54L</i>	Helikaza – rozwijanie helisy DNA i stabilizacja kompleksu RAD51	DSBR	G7-G9
24	<i>TP53BP1</i>	Sygnalizacja uszkodzeń DNA – regulacja wyboru szlaku	DSBR	H10-12
25	<i>XRCC1</i>	Koordinacja naprawy jednoniciowych pęknięć	SSBR	A10-A12
26	<i>XRCC2</i>	Rekombinacja homologiczna – stabilizacja RAD51	DSBR	B10-B12
27	<i>XRCC3</i>	Rekombinacja homologiczna – stabilizacja kompleksu RAD51	DSBR	C10-C12
28	<i>XRCC4</i>	Współdziałanie z LIG4 w łączeniu końców DNA	DSBR	D10-D12
29	<i>XRCC5</i>	Białko Ku80 – wiązanie końców DNA	DSBR	E10-E12
30	<i>XRCC6</i>	Białko Ku70 – rekrutacja kompleksu DNA-PK	DSBR	F10-F12

3.6 Analiza statystyczna

Dane eksperymentalne oraz wyniki obliczeń MC poddano analizie statystycznej i ocenie niepewności. W celu opisanego rozkładów korzystano między innymi z funkcji Gaussa i dopasowania prostych metodą najmniejszych kwadratów. Na podstawie uzyskanych parametrów wyznaczano wartości średnie i ich niepewności, stosując standardowe metody statystyczne i propagację błędów.

Program MCNP bazuje na dziesięciu, wewnętrznych testach statystycznych, które rozpatrywane są automatycznie dla każdego obliczenia i sprawdzają przede wszystkim zbieżność i stabilność obliczeń. Wszystkie przeprowadzone w ramach niniejszej pracy symulacje spełniły wymagane kryteria, a program zwracał niepewności wyników w formie względnego błędu procentowego.

W analizach biologicznych średnie z powtórzeń technicznych obliczono jako średnie arytmetyczne z błędem standardowym średniej (SEM). Następnie, z uzyskanych wartości z niezależnych powtórzeń biologicznych średnie globalne jako średnie ważone z uwzględnieniem niepewności poszczególnych pomiarów.

Do bezpośredniego porównania grup danych w badaniach radiobiologicznych zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA), a poziom istotności oznaczono symbolami: $*p \leq 0,05$; $**p \leq 0,01$; $***p \leq 0,001$; $****p \leq 0,0001$; ns - brak istotnych różnic.

Rozdział 4

Wyniki

4.1 Dozymetria układu do napromieniania

Model układu do napromieniania próbek biologicznych ze źródłem powierzchniowym ^{241}Am zbudowany na potrzeby niniejszej pracy został zweryfikowany eksperymentalnie. Wykorzystanie ^{241}Am jako źródła cząstek α o energii zbliżonej do tych emitowanych przez wykorzystywany klinicznie ^{225}Ac stanowi praktyczne rozwiązanie, umożliwiające wiarygodne modelowanie warunków istotnych dla TAT, a jednocześnie zapewniające łatwiejszą dostępność. To podwójne podejście, łączące symulacje MC z walidacją eksperymentalną, zapewnia solidną podstawę do interpretacji efektów radiobiologicznych.

Wyniki obliczeń MC zapewniają szczegółową charakterystykę depozycji energii oraz LET cząstek α w monowarstwie komórek. Uzyskane wartości LET cząstek α , głównie w zakresie $100\text{--}200\text{ keV}/\mu\text{m}$ w jądrze komórkowym charakteryzują się wysoką skutecznością biologiczną w indukowaniu złożonych pęknięć DNA. Takie uszkodzenia są wysoce odporne na mechanizmy naprawy i są uznawane za cytotoksyczne [114]. Zgodnie z wynikami badań radiobiologicznych dostępnych w literaturze, promieniowanie o wysokim LET powoduje śmiertelne uszkodzenia DNA w dużej mierze niezależne od fazy cyklu komórkowego [3]. Model ten podkreśla przede wszystkim fundamentalną zaletę terapeutyczną emiterów α : ich krótki zasięg w połączeniu z bardzo wysokim współczynnikiem LET ogranicza depozycję energii do niewielkiej przestrzeni w komórkach, przy jednoczesnej gęstej jonizacji ośrodka, co prowadzi do licznych i złożonych DSBs [6, 8]. Opisana charakterystyka cząstek α wyjaśnia dlaczego są one o rzędy wielkości bardziej cytotoksyczne niż promieniowanie X , γ , β , a nawet protony przy takiej samej wartości deponowanej dawki [1].

Wykonana analiza strat energii cząstek α na poszczególnych elementach geometrii pozwoliła na scharakteryzowanie wpływu zmian głębokości penetrowanego ośrodka na wartość dawki deponowanej w monowarstwie komórek. Rysunek 2.15 wyraźnie pokazuje gwałtowny spadek pochłoniętej energii poza optymalną głębokość penetracji cząstek α , zjawisko to jest uwarunkowane końcową częścią krzywej Bragga. Ta właściwość jest istotnie korzystna dla oszczędzania sąsiedniej zdrowej tkanki, ale jednocześnie podkreśla ryzyko pozostawienia mikroskopijnych ognisk nowotworu bez leczenia, co jest szczególnie ważne w przypadku wysoce naciekającego nowotworu, takiego jak GBM. Rysunek 2.13 natomiast, pokazuje wyznaczoną na podstawie symulacji, liniową zależ-

ność pochłoniętej dawki od grubości ośrodka w zakresie 0-20 μm , opisaną empiryczną zależnością: Dawka (Gy) = $-0,843(5) \cdot x + 17,56(7)$, gdzie x oznacza grubość medium hodowlanego, przez które przechodzą cząstki α .

Powyżej 20 μm dawka pochłonięta spada do zera, co podkreśla kluczową rolę rozmieszczenia przestrzennego i precyzyjnego umiejscowienia radioizotopu w rejonie nowotworu lub jamie pooperacyjnej. Jeśli źródło jest umieszczone centralnie, energia cząstek α musi być wystarczająca, aby przeniknąć przez guz lub jamę pooperacyjną i zdeponować dawki śmiertelne na ich granicy, gdzie naciekające komórki nowotworowe mają największe prawdopodobieństwo przetrwania. Niewystarczająca energia w tym obszarze nieuchronnie sprzyjałaby nawrotowi guza. Zatem nasze wyniki wskazują, że proste empiryczne zależności dawka-odległość mogą służyć jako cenne narzędzie we wstępnym planowaniu leczenia, definiując minimalny rozmiar targetu oraz optymalne miejsce iniekcji izotopu, aby zmaksymalizować kontrolę guza przy jednoczesnej minimalizacji uszkodzeń ubocznych.

Kluczową obserwacją, potwierdzoną rysunkiem 2.17, jest to, że rozkład LET otrzymany w symulacjach MC obejmuje zakres 0–300 $\text{keV}/\mu\text{m}$, z plateau około 100 zdarzeń w biologicznie istotnym przedziale 60–200 $\text{keV}/\mu\text{m}$. Ten przedział jest szczególnie istotny, ponieważ reprezentuje okno, w którym złożone, nieodwracalne DSBs występują z najwyższą częstotliwością [5, 1, 6]. Powyżej 200–300 $\text{keV}/\mu\text{m}$ obserwuje się spadek efektywności biologicznej z powodu tzw. efektu przesycenia uszkodzeniami (ang. *overkill effect*), polegającego na tym, że przy bardzo dużej gęstości jonizacji dodatkowa energia jest zdeponowana nieefektywnie i nie prowadzi do proporcjonalnego wzrostu uszkodzeń DNA. Z kolei wartości LET poniżej 30–50 $\text{keV}/\mu\text{m}$ prowadzą do łatwiejszych w naprawie uszkodzeń, ograniczając w ten sposób cytotoksyczność [4]. Plateau w zakresie 100–200 $\text{keV}/\mu\text{m}$ stanowi zatem klinicznie najkorzystniejsze okno, odpowiadające letalnemu segmentowi krzywej Bragga, w którym cząstki α osiągają maksymalną efektywność biologiczną.

Co istotne, widmo energetyczne cząstek α emitowanych z łańcucha rozpadu ^{225}Ac ściśle odpowiada temu biologicznemu optimum. Emisje w zakresie 5–8,3 MeV , na przykład 5,8 MeV w przypadku ^{225}Ac oraz 8,3 MeV dla ^{213}Po , odpowiadają głębokości penetracji w zakresie 40–85 μm , w tkance miękkiej. Wraz z utratą energii przez cząstki do poziomu 1–2 MeV , LET gwałtownie rośnie do momentu osiągnięcia przedziału 100–200 $\text{keV}/\mu\text{m}$, zapewniając maksymalną cytotoksyczność w wielu warstwach komórek (3 μm monowarstwa).

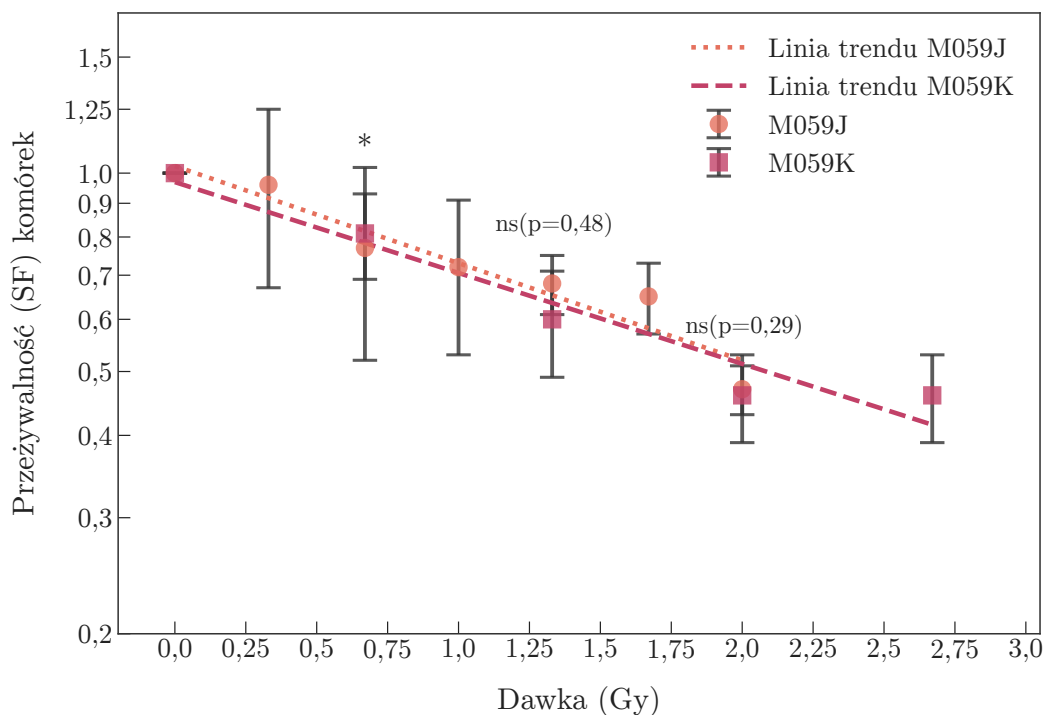
Zbudowany układ eksperymentalny ze źródłem powierzchniowym ^{241}Am i przeprowadzone dla niego symulacje za pomocą MCNP zostały celowo zaprojektowane tak, aby objąć ten biologicznie istotny zakres energii. Wyniki obliczeń potwierdzają, że cząstki α o energiach poniżej 2 MeV generują nieproporcjonalnie dużą liczbę DSBs, co jest zgodne z wynikami Ganjeha et al. [114]. Co więcej, częstotliwość złożonych uszkodzeń DNA wzrasta poniżej 1 MeV , gdzie prawie cała zdeponowana energia jest skupiona w objętości pojedynczej komórki. Wyniki te potwierdzają interpretację, że w biologicznie krytycznym oknie 1–2 MeV , cząstki α dostarczają maksymalną ilość energii do jądra, podczas gdy emisje o wyższej energii (5–8 MeV) są niezbędne do przemieszczenia się cząstek do krawędzi łoża pooperacyjnej lub dotarcia wгłęb zmiany, zanim spowolnią

do optymalnego zakresu LET.

Wyniki badań wskazują, że terapia TAT wykorzystująca emitery α , w tym ^{225}Ac , może znacząco zwiększyć skuteczność leczenia onkologicznego dzięki synergii procesów fizycznych i biologicznych: ograniczonemu zasięgowi, wysokiemu LET oraz precyzyjnej selektywności przestrzennej. Symulacje potwierdzają, że włączenie empirycznie zweryfikowanych zależności dawka–geometria do protokołów planowania leczenia może istotnie poprawić efektywność terapii radioizotopowej w przypadku agresywnych i opornych nowotworów, takich jak GBM.

4.2 Test przeżywalności

Ocenę wpływu promieniowania α na komórki M059J (pozbawione DNA-PKcs) oraz M059K (z prawidłową ekspresją DNA-PKcs) przeprowadzono za pomocą testu przeżywalności. Próbkę linii komórkowej M059J napromieniono dawkami od 0 Gy do 2 Gy: 0 Gy, 0,33 Gy, 0,67 Gy, 1,00 Gy, 1,33 Gy, 1,67 Gy, 2,00 Gy; natomiast linii M059K dawkami z zakresu od 0 Gy do 2,67 Gy: 0 Gy, 0,67 Gy, 1,33 Gy, 2,00 Gy, 2,67 Gy. Ideą testu było również sprawdzenie wpływu statusu DNA-PKcs na długoterminową przeżywalność komórek glejaka. Rysunek 4.1 przedstawia zależność przeżywalności obu linii komórkowych od dawki promieniowania α .



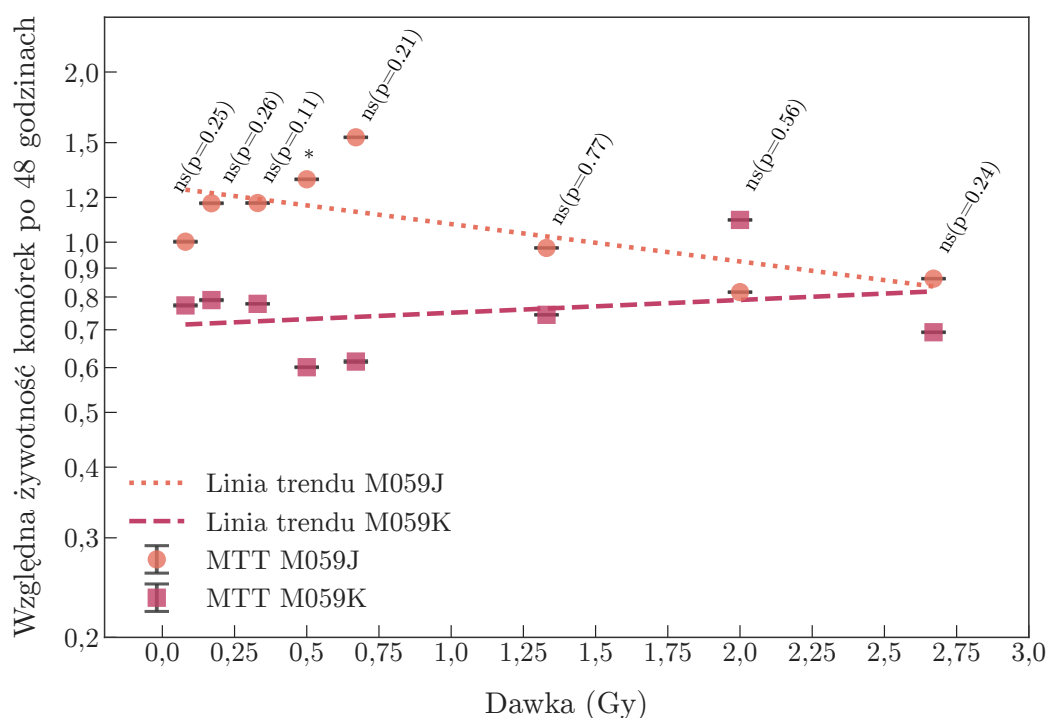
Rysunek 4.1: Krzywa przeżywalności SF komórek glejaka linii M059J oraz M059K w zależności od dawki promieniowania α . Dane przedstawiają wyniki dla komórek linii M059J napromienionych dawkami od 0 Gy do 2 Gy (0 Gy, 0,33 Gy, 0,67 Gy, 1,00 Gy, 1,33 Gy, 1,67 Gy, 2,00 Gy) oraz dla komórek linii M059K napromienionych dawkami od 0 Gy do 2,67 Gy (0 Gy, 0,67 Gy, 1,33 Gy, 2,00 Gy, 2,67 Gy). Do danych eksperymentalnych dopasowane zostały linie trendu.

Zaobserwowano, iż obie linie komórkowe wykazują zależny od dawki spadek przeżywalności (SF). W zakresie niskich dawek od 0,33 Gy do 1,33 Gy komórki linii M059K wykazują tendencję niższej przeżywalności w porównaniu do komórek linii M059J. Porównując wyniki dla dawek wspólnych obu liniom komórkowym można zaobserwować, iż w przypadku dawki 0,67 Gy przeżywalność jest na podobnym poziomie i wynosi $0,77 \pm 0,25$ dla linii M059J i $0,81 \pm 0,12$ dla M059K. Pomimo nieco wyższej wartości liczbowej dla M059K, ogólny trend sugeruje niższą przeżywalność tej linii w zakresie niskich dawek promieniowania α . Natomiast przy dawce 1,33 Gy SF wynosi odpowiednio $0,68 \pm 0,07$ w przypadku M059J i $0,60 \pm 0,11$ dla M059K.

Dla dawki promieniowania α równej 2 Gy przeżywalność linii M059J wyniosła $0,47 \pm 0,04$ a linii M059K $0,46 \pm 0,07$ co pokazuje, że oddziaływania cząstek o wysokim LET skutkuje zbliżoną przeżywalnością.

4.3 Test cytotoksyczności

W celu zweryfikowania obserwacji wynikającej z testu przeżywalności wykonany został również test żywotności MTT. Obie linie komórkowe napromieniono dawkami 0,08 Gy, 0,17 Gy, 0,33 Gy, 0,5 Gy, 0,67 Gy, 1,33 Gy, 2 Gy, i 2,67 Gy, rozszerzając zakres punktów pomiarowych w obszarze niskich dawek. Wyniki względnej żywotności komórek M059J oraz M059K przedstawia rysunek 4.2.



Rysunek 4.2: Względna żywotność komórek M059J oraz M059K wyznaczona na podstawie testu MTT. Wartości przedstawiają aktywność metaboliczną komórek mierzoną 48 godzin po napromienianiu dawkami promieniowania α równymi: 0,08 Gy, 0,17 Gy, 0,33 Gy, 0,5 Gy, 0,67 Gy, 1,33 Gy, 2 Gy, i 2,67 Gy. Do danych eksperymentalnych dopasowane zostały linie trendu.

Dla dawki 0,67 Gy komórki linii M059J wykazały zwiększoną aktywność metaboliczną ($1,533 \pm 0,002$) podczas, gdy komórki M059K znacząco niższą ($0,615 \pm 0,002$), wskazując na wyższą wrażliwość komórek z prawidłową ekspresją genu kodującego DNA-PKcs w zakresie niskich dawek promieniowania α . Taki wynik potwierdza odmienną wrażliwość obu linii komórkowych w niskich dawkach. Trend ten utrzymuje się, aż do dawki 1,33 Gy, gdzie komórki M059K konsekwentnie wykazują niższą aktywność metaboliczną w porównaniu do M059J.

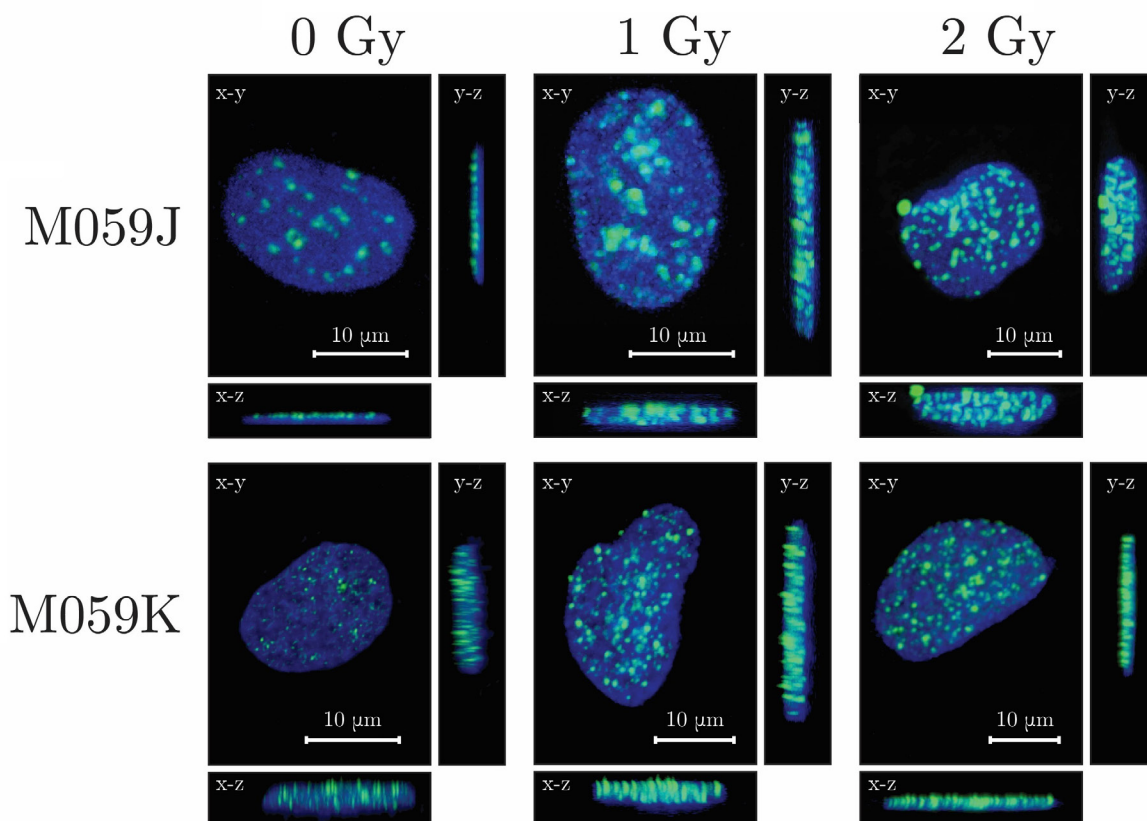
Przy dawce 2 Gy aktywność metaboliczna komórek linii M059J ulega obniżeniu osiągając poziom $0,816 \pm 0,001$, natomiast w przypadku linii M059K obserwuje się lokalny wzrost aktywności równy $1,095 \pm 0,001$. Mimo tego wartość ta pozostaje niższa od maksymalnej aktywności metabolicznej odnotowanej dla linii M059J przy niskich dawkach. Po przekroczeniu dawki 2 Gy aktywność metaboliczna komórek M059J nadal stopniowo się obniża, natomiast w linii M059K przy dawce 2,67 Gy ulega stabilizacji, osiągając poziom zbliżony do wartości obserwowanych przy niższych dawkach.

Wyniki testu MTT demonstrowują, że komórki M059K z dodatnim statusem DNA-PKcs są początkowo bardziej wrażliwe na cytotoksyczność indukowaną cząstkami α , podczas gdy komórki M059J zachowują większą przeżywalność i aktywność metaboliczną przy niskich dawkach promieniowania α .

4.4 Badanie ognisk naprawczych $\gamma H2AX$

W celu wykonania jakościowej oraz ilościowej analizy DDR wywołanej promieniowaniem jonizującym wykonano barwienie immunofluorescencyjne histonu $\gamma H2AX$ będącego markerem DSBs. Po napromienieniu komórki inkubowane były w obecności przeciwciał specyficznych wobec histonu $\gamma H2AX$, a następnie jądra wybarwione zostały barwnikiem DAPI. Tak przygotowane próbki skanowano mikroskopem konfokalnym CLSM (zgodnie z opisem w podrozdziale 2.1.1), aby zwizualizować zmiany morfologiczne komórek w odpowiedzi na promieniowanie. Otrzymane obrazy 3D jąder komórkowych zostały przedstawione na rysunku 4.3. Obrazują one rzuty, na pojedyncze jądro każdej z obu linii komórkowych, w trzech różnych płaszczyznach $x-y$, $x-z$ oraz $y-z$. Komórki poddane zostały ekspozycji na promieniowanie α o dawkach 1 Gy, 2 Gy. Wykonano również nienapromienione próby kontrolne. Przedstawione skany zostały wykonane z wysoką rozdzielczością, a zaprezentowane jądra wybrane losowo.

Na obrazach jąder M059J widać, że w przypadku kontroli, liczba i rozmiar zarejestrowanych foci są znacznie mniejsze w porównaniu do jąder napromienionych. To wskazuje na niski poziom endogennych uszkodzeń DNA. Na skanach dla 1 Gy i 2 Gy można zaobserwować znaczący wzrost sygnału wynikający ze zwiększonej liczby uszkodzeń DSBs.



Rysunek 4.3: Obrazy 3D jąder ognisk naprawczych $\gamma H2AX$ (kolor zielony) w jądrach komórkowych linii komórek M059J oraz M059K (kolor niebieski). Każde z jąder zwiualizowane zostało w trzech płaszczyznach $x-y$, $x-z$ oraz $y-z$ i przedstawia foci powstałe 15 minut po ekspozycji na promieniowanie α . Skany jąder z widocznymi histonami $\gamma H2AX$ odpowiadają dawkom 1 Gy, 2 Gy oraz w próbie kontrolnej (0 Gy).

Podobny charakter sygnału widoczny jest dla linii M59K. Dla próbki kontrolnej liczba i rozmiar foci wykazują niższy charakter w porównaniu do jąder po napromienieniu. Obrazy w płaszczyznach $x-z$ oraz $y-z$ potwierdzają zwiększoną wielkość i intensywność foci $\gamma H2AX$ po działaniu promieniowania. Są one zarówno liczne oraz rozległe co potwierdza fakt, iż promieniowanie jonizujące o wysokim LET powodują złożone DSBs.

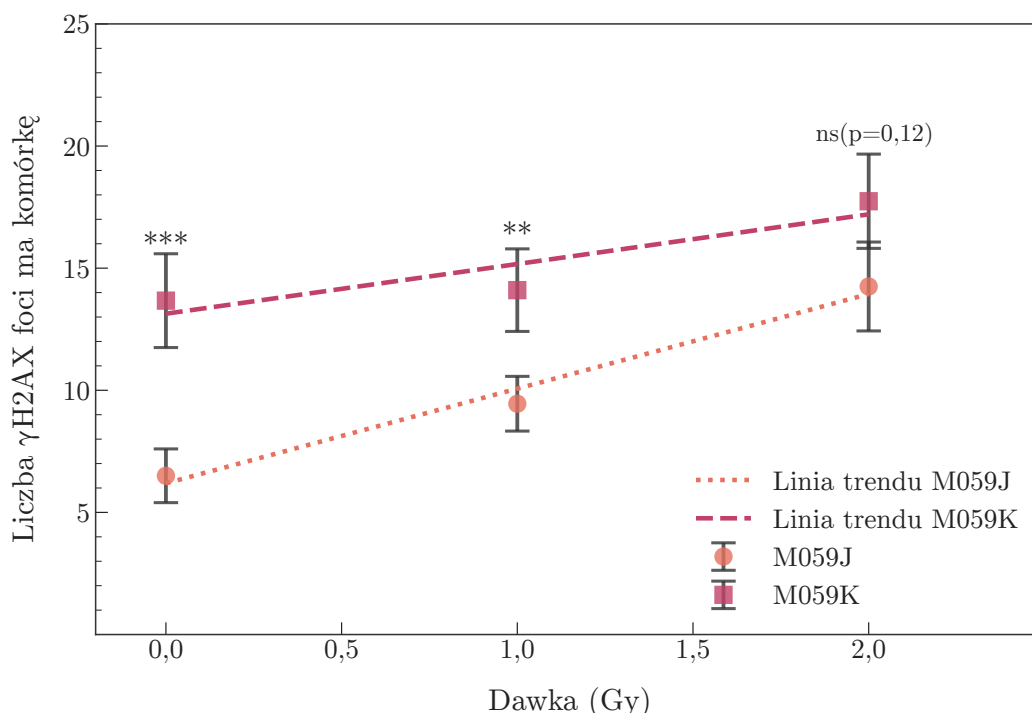
Analizę ilościową foci również przeprowadzono na dwóch liniach komórkowych M059J oraz M059K, napromienionych dawkami 1 Gy oraz 2 Gy, a próbki nienapromienione posłużyły jako kontrola w eksperymencie.

Zależność średniej liczby ognisk naprawczych $\gamma H2AX$ na jądro komórkowe od dawki promieniowania α obu linii komórkowych obrazuje rysunek 4.4. Średnia została wyliczona na podstawie minimum 100 jąder komórkowych dla każdego z wariantów.

W próbce kontrolnej w przypadku linii M059J zliczono średnio $6,50 \pm 1,10$ foci. W odpowiedzi na napromienianie liczba ta wzrasta do $9,45 \pm 1,12$ oraz $14,25 \pm 1,82$ odpowiednio dla dawki 1 Gy i 2 Gy. Oznacza to, iż relatywny wzrost liczby foci względem kontroli wynosi 45 % dla dawki 1 Gy oraz 119 % dla dawki 2 Gy.

Dla porównania, w przypadku linii M059K względny procentowy wzrost liczby ognisk wynosi 3 % po napromienieniu dawką 1 Gy oraz 27 % w odpowiedzi na dawkę

2 Gy. Ich średnia liczba natomiast to $14,10 \pm 1,69$ dla 1 Gy, oraz $17,74 \pm 1,93$ dla 2 Gy.



Rysunek 4.4: Zależności średniej liczby foci $\gamma H2AX$ na pojedyncze jądro komórkowe od dawki promieniowania α dla linii M059J oraz M059K, po 15 minutach od napromieniania.

Ilościowa analiza obrazu uzyskana za pomocą mikroskopii konfokalnej potwierdza zależność liczby ognisk $\gamma H2AX$ od dawki promieniowania w obu liniach komórkowych. Linia komórkowa M059K charakteryzuje się znacznie wyższą średnią liczbą ognisk w odpowiedzi na promieniowanie jonizujące w porównaniu z linią M059J. Jednak przebieg linii trendu dla M059J wskazuje na bardziej dynamiczny wzrost liczby ognisk naprawczych wraz ze wzrostem dawki promieniowania.

4.5 Badanie ekspresji genów

Eksperyment ekspresji genów przeprowadzono za pomocą testu RT-qPCR na dwóch liniach komórkowych M059J i M059K dla próbek napromienionych dawką 2 Gy promieniowania α , a także nienapromienionych próbek kontrolnych. Analizowano ekspresję 30 genów (*ATM*, *ATR*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK1*, *CHEK2*, *ERCC1*, *H2AFX*, *LIG1*, *LIG3*, *LIG4*, *MRE11A*, *MSH2*, *MSH3*, *NBN*, *OGG1*, *PARP1*, *PARP2*, *PARP3*, *PRKDC*, *RAD50*, *RAD51*, *RAD54L*, *TP53BP1*, *XRCC1*, *XRCC2*, *XRCC3*, *XRCC4*, *XRCC5*, *XRCC6*) pełniących kluczową rolę w różnych szlakach naprawy DNA, takich jak: NER, MMR, SSBR, Double-Strand Break Repair (DSBR).

Bazując na wynikach testu przeżywalności oraz testu MTT, do analizy ekspresji genów wybrano dawkę 2 Gy spośród zakresu dawek promieniowania α użytych w tych

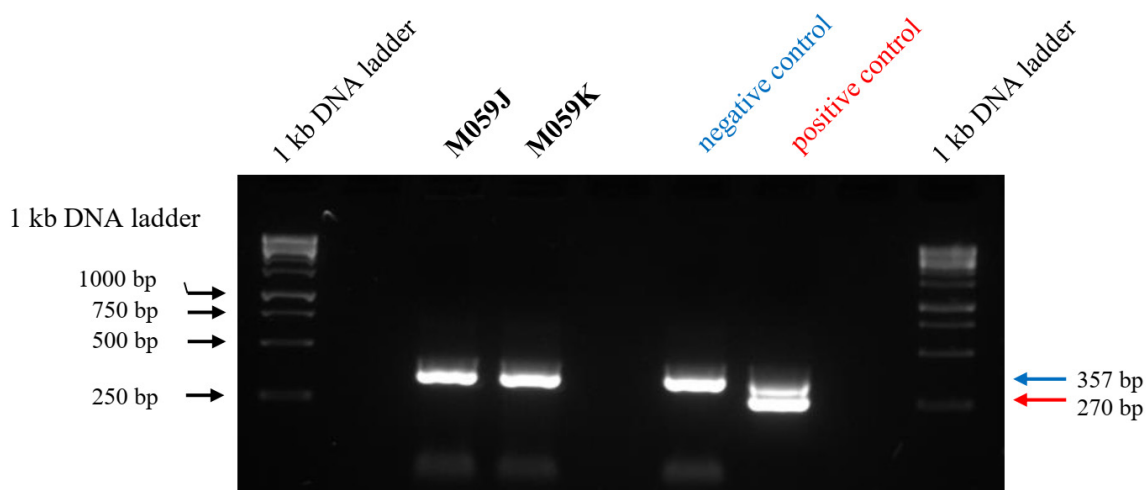
badaniach. Wybrana dawka wywołała istotną, lecz nie całkowitą cytotoksyczność w obu liniach komórkowych, co umożliwiło ocenę odpowiedzi na uszkodzenia DNA. Uwarunkowania te pozwoliły również na analizę aktywnych zmian transkrypcyjnych bez nadmiernej śmierci komórek, która mogłaby zaburzyć profil ekspresji genów.

Ekspresję genów w wybranych próbkach badano względem próbki referencyjnej w ten sposób porównano stopień ekspresji dla czterech wariantów:

- relatywna ekspresja genów M059K 0 Gy w stosunku do M059J 0 Gy,
- relatywna ekspresja genów M059J 2 Gy w stosunku do M059J 0 Gy,
- relatywna ekspresja genów M059K 2 Gy w stosunku do M059K 0 Gy,
- relatywna ekspresja genów M059K 2 Gy w stosunku do M059J 2 Gy.

4.5.1 Badanie obecności mykoplazmy w hodowli komórkowej

Test na obecność mykoplazmy przeprowadzono z wykorzystaniem metody PCR oraz elektroforezy w żelu agarozowym, zgodnie z opisem przedstawionym w podrozdziale 3.5.2. Wyniki uzyskane na podstawie elektroforezy przedstawiono na rysunku 4.5.



Rysunek 4.5: Wyniki analizy przeprowadzonej metodą elektroforezy w żelu agarozowym, służącej do detekcji obecności mykoplazmy, wykazały, że kontrola pozytywna zawiera prążki o długości 270 bp oraz 357 bp (ang. *base pairs* – par zasad). W przypadku kontroli negatywnej oraz próbek linii komórkowych M059J i M059K, negatywnych pod względem obecności mykoplazmy, obserwowano jedynie prążek o długości 357 bp. Pojawienie się prążków o długości poniżej 100 bp wskazuje na tworzenie dimerów starterów. Jako marker masy cząsteczkowej zastosowano drabinę DNA 1 kb, stanowiącą punkt odniesienia do określania długości produktów reakcji PCR.

Prążki znajdujące się skrajnie po prawej oraz po lewej stronie rysunku 4.5 pochodzą od markerów masy cząsteczkowej, stanowiących drabinę DNA 1 kb (ang. *base pairs* – par zasad), będącą punktem odniesienia do określania długości produktów PCR.

Prążki o długości poniżej 100 *kb* powstały w wyniku tworzenia dimerów starterów wykorzystywanych w reakcji PCR.

Kontrola pozytywna wykazuje obecność prążków o długości 270 *bp*, świadczących o obecności mykoplazmy, oraz 357 *bp*. Kontrola negatywna oraz próbki komórkowe M059J i M059K wykazują natomiast wyłącznie prążek o długości 357 *bp*. Odpowiada on produktowi amplifikacji sekwencji kontrolnej, a jego obecność potwierdza prawidłowy przebieg reakcji PCR i odpowiednią jakość DNA wyizolowanego z komórek. Otrzymane wyniki wskazują na brak kontaminacji próbek komórkowych mykoplazmą, która zatem nie będzie miała wpływu na rezultaty analizy ekspresji genów.

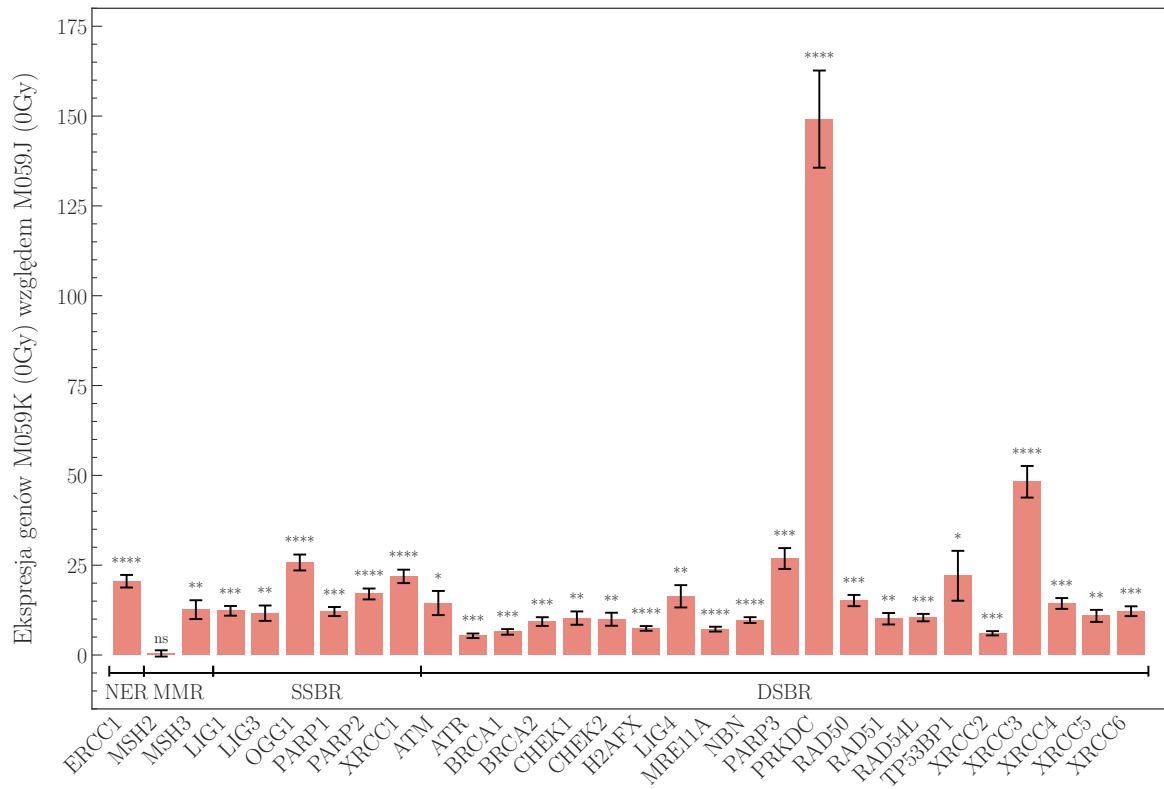
4.5.2 Relatywna ekspresja genów M059K 0 *Gy* w stosunku do M059J 0 *Gy*

Oceny podstawowej aktywności poszczególnych białek z możliwych ścieżek naprawy uszkodzeń DNA, dokonano porównując poziom ekspresji kodujących ich genów w nienapromienionych komórkach. Wyniki ekspresji poszczególnych genów linii M059K (0 *Gy*) zostały znormalizowane przez wyniki dla linii M059J (0 *Gy*).

Najbardziej wyraźną różnicę w poziomie podstawowej ekspresji wykazano dla genu *PRKDC*, kodującego białko DNA-PKcs, uczestniczące w szlaku naprawy dwuniciowych pęknięć DNA metodą NHEJ. Poziom jego ekspresji w linii komórkowej M059K był ~ 150 -krotnie wyższy w porównaniu z linią M059J. Wysoka wartość względnej ekspresji genu *PRKDC* potwierdza obecność i aktywny status białka DNA-PKcs w linii komórkowej M059K. Na rysunku 4.6 zostały przedstawione wartości względnej ekspresji dla każdego z rozpatrywanych genów, obliczone metodą $2^{-\Delta\Delta C_t}$ zgodnie ze wzorem 3.7.

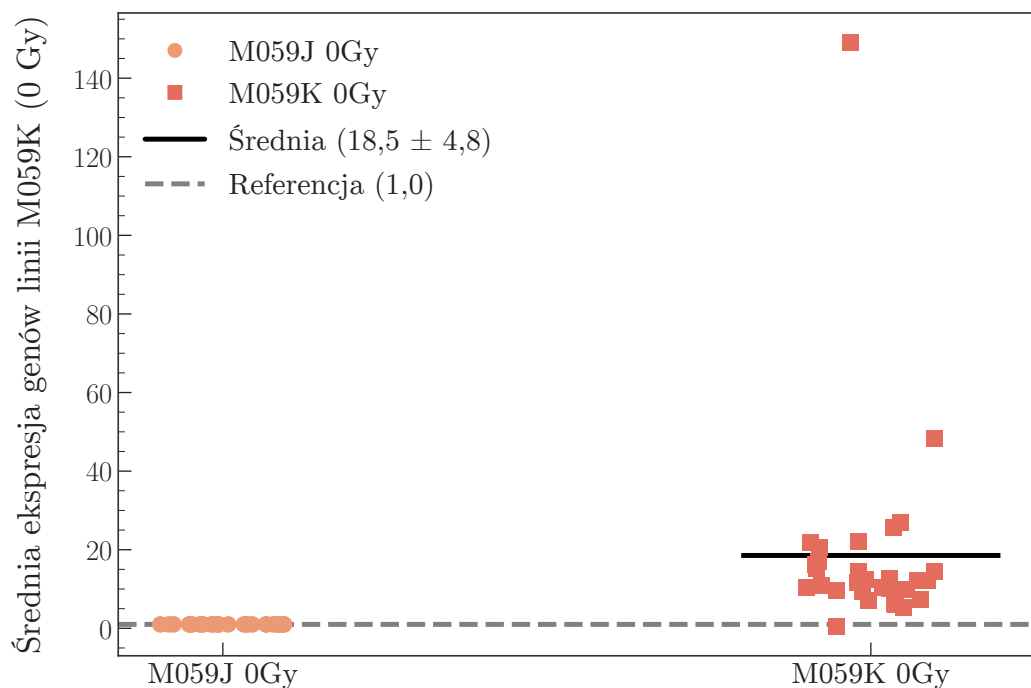
Wyniki przedstawione na rysunku 4.6 obrazują wartości względnej ekspresji genów, uśrednione z trzech powtórzeń biologicznych. Szczegółowe wartości ekspresji dla poszczególnych powtórzeń zaprezentowano na rysunku 4.8, który przedstawia poziom ekspresji zarówno dla linii komórkowej M059K (0 *Gy*), jak i próbki referencyjnej M059J (0 *Gy*). Wyraźne różnice w intensywności barw pomiędzy próbkami sugerują zróżnicowaną odpowiedź transkrypcyjną badanych linii komórkowych na promieniowanie α . Drzewo hierarchiczne na rysunku 4.8 przedstawia grupowanie genów związanych z sygnalizacją uszkodzeń DNA na podstawie podobieństwa ich profili ekspresji.

Dodatkowo gen *XRCC3*, kluczowy w HR będącej jedną z dwóch możliwych ścieżek naprawy DSBs wykazuje ~ 50 - krotnie wyższą ekspresję w komórkach linii M059K względem linii M059J. Podobnie, ekspresję na poziomie zbliżonym do ~ 25 - krotnie większej dla linii M059K wykazuje gen *PARP3* odpowiedzialny za naprawę SSBR oraz DSBR, a także gen *OGG1* wspierający naprawę SSBR. Co świadczy o jednoniciowych oraz dwuniciowych uszkodzeniach DNA wywołanych przez cząstki α o wysokim LET.



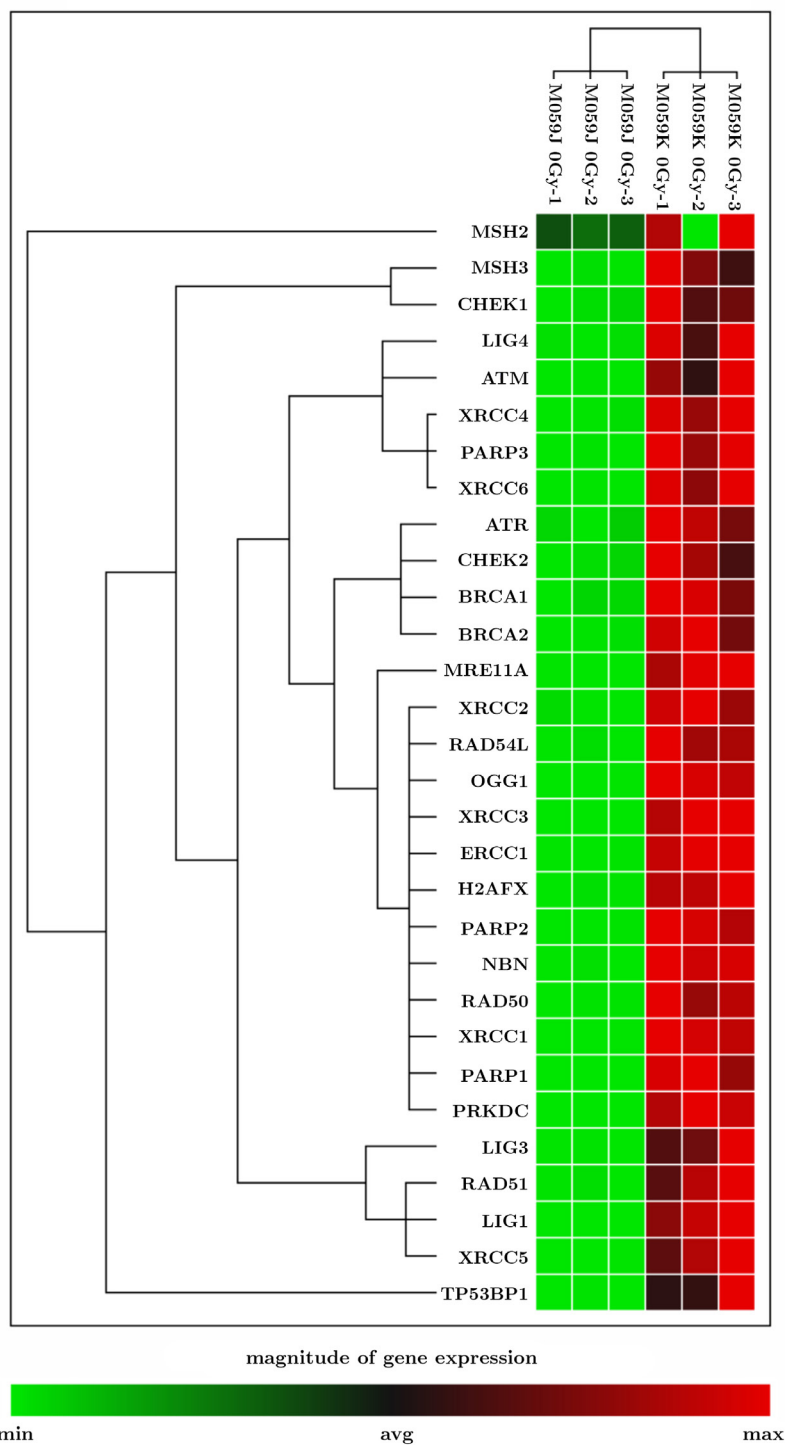
Rysunek 4.6: Relatywna ekspresja poszczególnych genów w komórkach nienapromienionych (0 Gy) linii M059K względem linii M059J (0 Gy). Wybrane geny odpowiadają za syntezę białek odpowiedzialnych za sygnalizację oraz naprawę uszkodzeń DNA ze ścieżek: NER, MMR, SSBR, DSBR. Wartości relatywnej ekspresji zostały policzone zgodnie z metodą $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Otrzymane wyniki ekspresji genów komórek nienapromienianych potwierdzają iż, komórki linii M059K wykazują wyższą średnią ekspresję ($18,5 \pm 4,8$) wszystkich badanych genów w porównaniu z linią M059J, co potwierdza rysunek 4.7.



Rysunek 4.7: Średnia relatywna ekspresja trzydziestu badanych genów w komórkach nienapromienionych (0 Gy) linii M059K względem linii M059J (0 Gy). Pojedynczy punkt odpowiada wartości ekspresji danego genu. Szara przerywana linia wyznacza średnią ekspresję wszystkich genów w komórkach referencyjnych linii M059J, natomiast czarna ciągła linia średnią ekspresję genów komórek linii M059K.

Taki wynik może świadczyć, iż komórki M059K wykazują wysoką, niezależną od bodźców zewnętrzną aktywność wielu genów odpowiedzialnych za naprawę DNA, co odzwierciedla ich wyższy potencjał naprawczy.

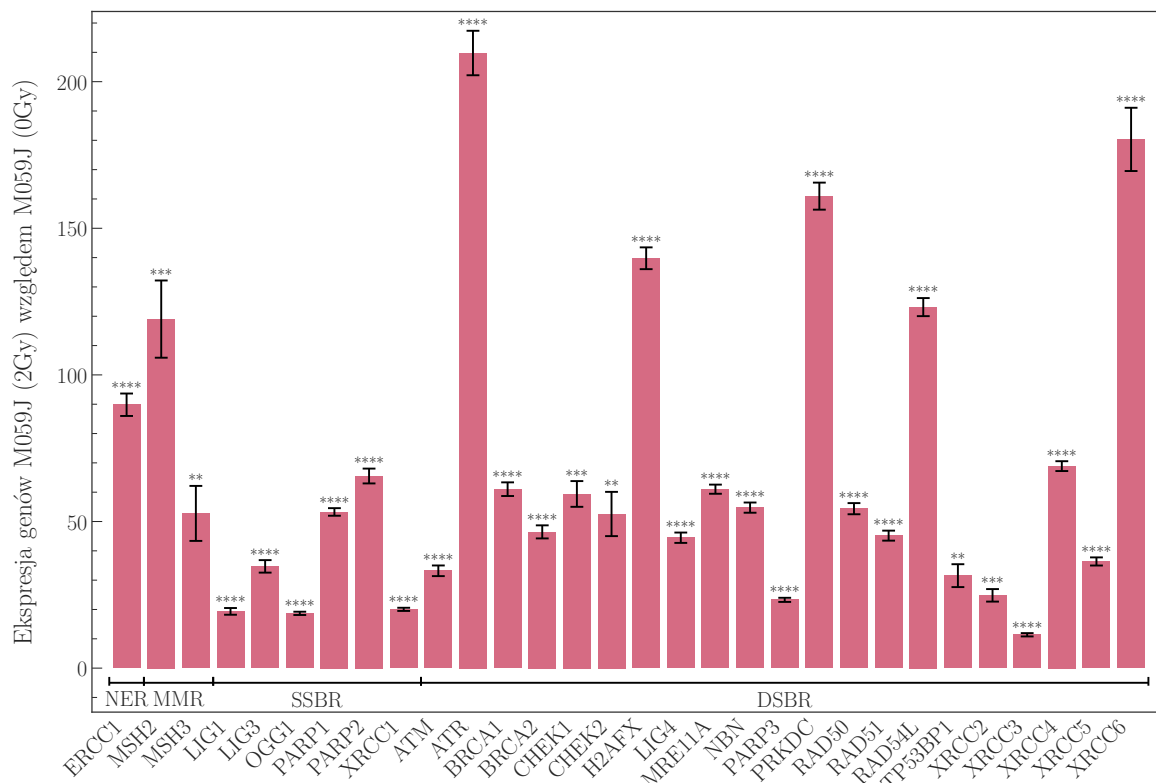


Rysunek 4.8: Dwuwymiarowa analiza klastrowa przedstawiona w formie mapy cieplnej, (ang. *heatmap*) obrazująca poziom ekspresji genów związanych z sygnalizacją uszkodzeń i naprawy DNA w nienapromienionych komórkach M059J oraz M059K. Kolory odpowiadają wartościom ekspresji genów, ang. *magnitude of gene expression* w trzech powtórzeniach biologicznych dla dwóch analizowanych grup próbek. Obserwowane grupowanie genów odzwierciedla podobieństwo ich profili ekspresji.

4.5.3 Relatywna ekspresja genów M059J 2 Gy w stosunku do M059J 0 Gy

Drugą analizowaną grupą, w której badano zmiany poziomu względnej ekspresji genów, była pozbawiona DNA-PKcs linia M059J w wersji napromienionej dawką promieniowania α równą 2 Gy oraz nienapromienionej.

Z rysunku 4.9 wynika, że wszystkie badane geny wykazują wyższy poziom ekspresji w porównaniu z nienapromienioną próbą kontrolną. Wyniki te potwierdzają szeroką i intensywną aktywność transkrypcyjną wielu możliwych ścieżek naprawy DNA.



Rysunek 4.9: Relatywna ekspresja poszczególnych genów w komórkach napromienionych dawką promieniowania α równą 2 Gy względem nienapromienionych (0 Gy) linii M059J. Wybrane geny odpowiadają za syntezę białek odpowiedzialnych za sygnalizację oraz naprawę uszkodzeń DNA ze ścieżek: NER, MMR, SSBR, DSBR. Wartości relatywnej ekspresji zostały policzone zgodnie z metodą $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

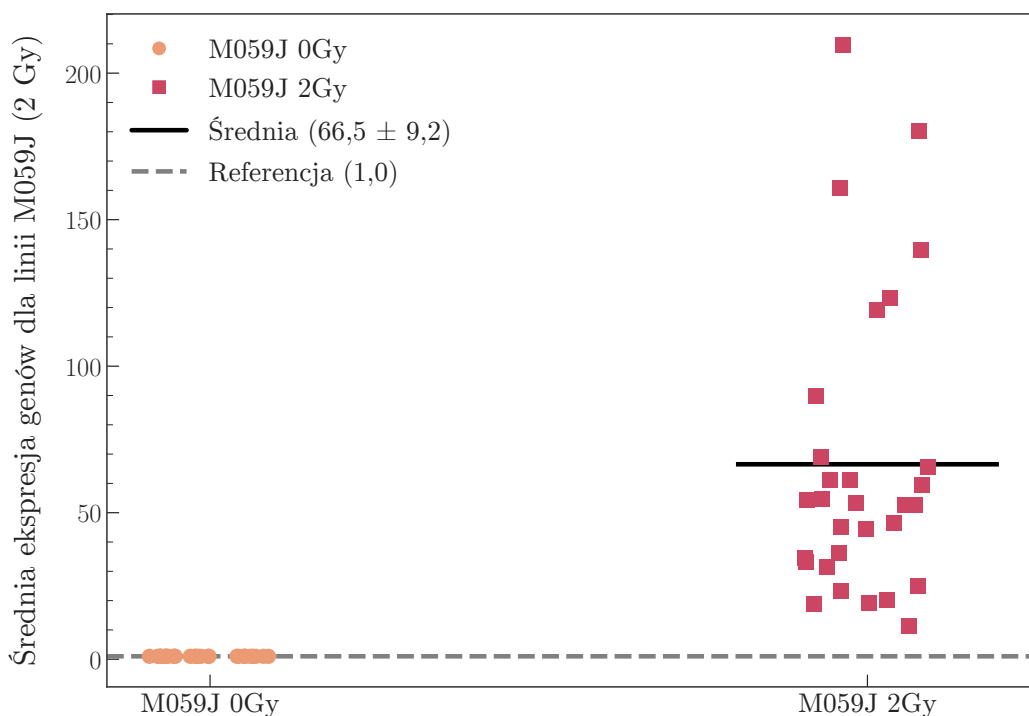
Najwyższą względną ekspresję charakteryzuje się gen *ATR*, którego poziom jest ~ 210 - krotnie wyższy w porównaniu z próbą kontrolną, co świadczy o intensywnej aktywacji sygnalizacji punktów kontrolnych cyklu komórkowego wywołanej uszkodzeniem DNA. Podobnie wysoki poziom ekspresji (~ 140 - krotnie wyższy względem próby kontrolnej) obserwuje się dla genu *H2AFX*, kodującego białko odpowiedzialne za sygnalizację dwuniciowych pęknięć DNA.

Podwyższony poziom ekspresji stwierdzono również dla genu *XRCC6* (~ 180 - krotnie względem próby kontrolnej), co może świadczyć o próbie aktywacji naprawy poprzez NHEJ, kompensującej w ten sposób brak DNA-PKcs. Warto również zwrócić uwagę

na wysoką ekspresję genu *PRKDC* – mimo że gen ten jest nieobecny w komórkach M059J, jego transkrypcja wzrosła ~ 160 - krotnie, co sugeruje próbę uruchomienia klasycznego szlaku NHEJ na poziomie mRNA.

Geny kodujące białka z pozostałych ścieżek naprawy DNA również wykazują zwiększony poziom ekspresji, między innymi: *RAD54L* (~ 130 - krotność względem próby kontrolnej) należący do ścieżki HR; *MSH2* (~ 120 - krotność względem próby kontrolnej) i *MSH3* (~ 50 - krotność względem próby kontrolnej) ze ścieżki MMR; oraz *ERCC1* (~ 90 - krotność względem próby kontrolnej) ze ścieżki NER.

Wysoką aktywność ekspresji genów pochodzących ze wszystkich analizowanych szlaków naprawczych potwierdza również rysunek 4.10; średni poziom ekspresji względem nienapromienionej próby kontrolnej wynosi $66,5 \pm 9,2$.

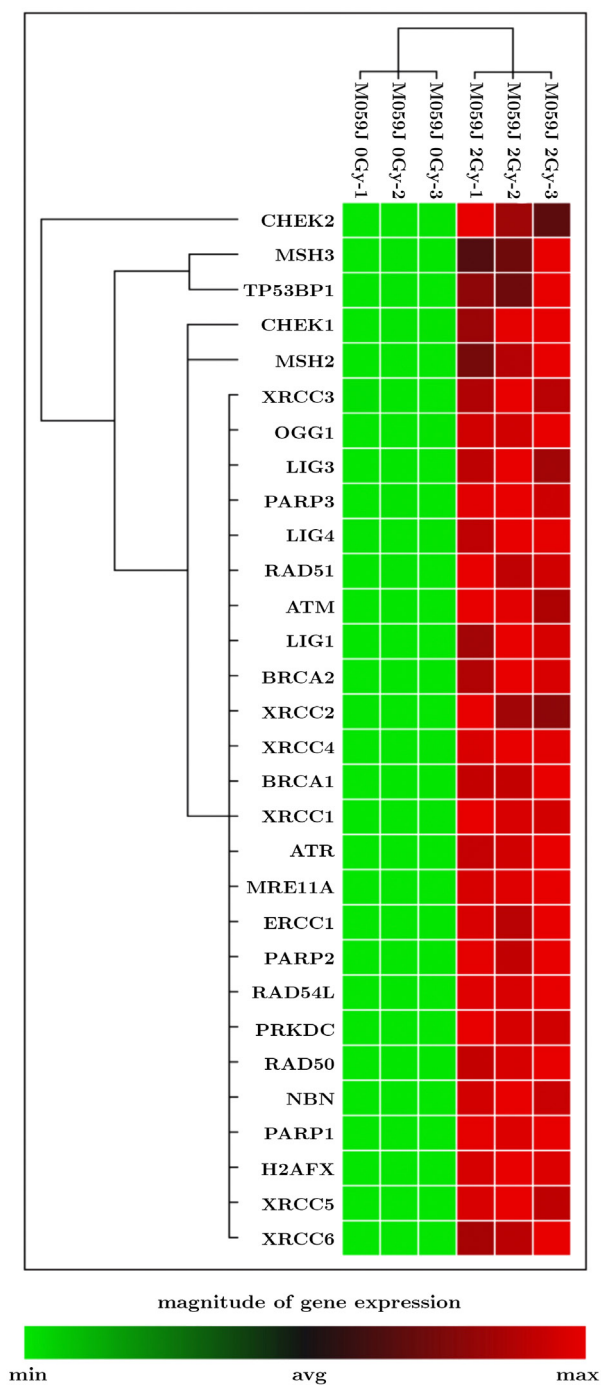


Rysunek 4.10: Średnia relatywna ekspresja trzydziestu badanych genów w komórkach napromienionych dawką promieniowania α równą 2 Gy względem nienapromienionych (0 Gy) linii M059J. Pojedynczy punkt odpowiada wartości ekspresji danego genu. Szara przerywana linia wyznacza średnią ekspresję wszystkich genów w referencyjnych komórkach nienapromienionych, natomiast czarna ciągła linia średnią ekspresję genów komórek napromienionych dawką 2 Gy , linii M059J.

Znaczącą różnicę między ekspresją genów w próbce napromienionej cząstkami α a próbą kontrolną przedstawia rysunek 4.11. Wyniki wszystkich trzech powtórzeń dla próby kontrolnej pozostają na minimalnym poziomie, natomiast dla komórek napromienionych utrzymują się na maksymalnych wartościach, z niewielkimi wyjątkami.

Uzyskane wyniki wskazują, że napromienienie cząstkami α wywołuje szeroką odpowiedź transkrypcyjną w komórkach M059J, obejmującą aktywację kinaz punktów kontrolnych, mechanizmów HR, elementów odpowiedzialnych za łączenie końców DNA

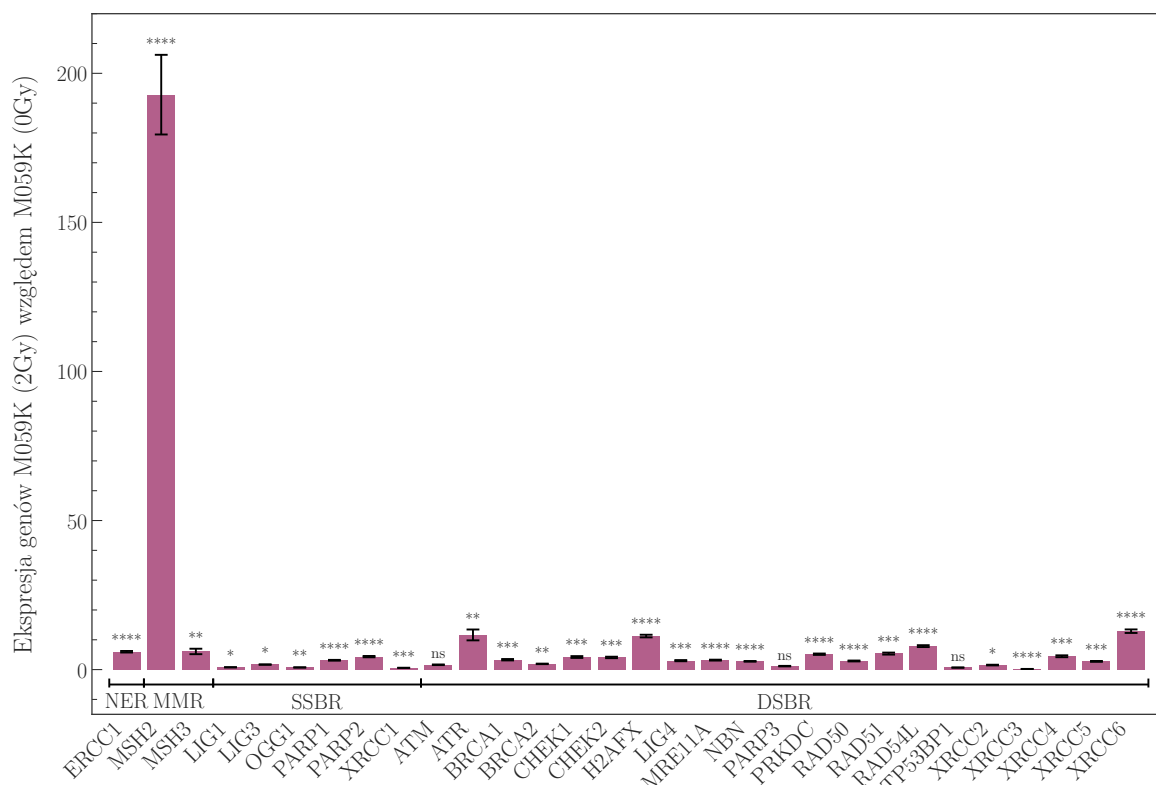
oraz ścieżek naprawy NER, co odzwierciedla kompensacyjną adaptację do braku białka DNA-PKcs.



Rysunek 4.11: Dwuwymiarowa analiza klastrowa przedstawiona w formie mapy ciepłej, (ang. *heatmap*) obrazująca poziom ekspresji genów związanych z sygnalizacją uszkodzeń i naprawy DNA w komórkach napromienionych dawką promieniowania α równą 2 Gy i nienapromienionych (0 Gy) linii M059J. Kolory odpowiadają wartościom ekspresji genów, ang. *magnitude of gene expression* w trzech powtórzeniach biologicznych dla dwóch analizowanych grup próbek. Obserwowane grupowanie genów odzwierciedla podobieństwo ich profili ekspresji.

4.5.4 Relatywna ekspresja genów M059K 2 Gy w stosunku do M059K 0 Gy

Trzecią analizowaną grupą była linia M059K z prawidłową ekspresją genu kodującego DNA-PKcs, napromieniona dawką 2 Gy promieniowania α , wraz z próbką kontrolną. Wyniki wskazują na znacznie węższy zakres odpowiedzi transkrypcyjnej w porównaniu do linii M059J z delecją białka DNA-PKcs, co przedstawiono na rysunku 4.12.



Rysunek 4.12: Relatywna ekspresja poszczególnych genów w komórkach napromienionych dawką promieniowania α równą 2 Gy względem nienapromienionych (0 Gy) linii M059K. Wybrane geny odpowiadają za syntezę białek odpowiedzialnych za sygnalizację oraz naprawę uszkodzeń DNA ze ścieżek: NER, MMR, SSBR, DSBR. Wartości relatywnej ekspresji zostały policzone zgodnie z metodą $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Największy wzrost poziomu ekspresji zaobserwowano dla genu *MSH2*, którego poziom był ~ 190 - krotnie wyższy w próbce napromienionej w porównaniu z próbą kontrolną. Gen ten koduje białko uczestniczące w ścieżce MMR, co sugeruje, że w przypadku linii M059K napromienionej cząstkami o wysokim LET dominuje naprawa MMR.

Drugi co do wielkości wzrost ekspresji zaobserwowano dla genu *XRCC6*, kodującego białko Ku70, którego poziom wynosił ~ 13 - krotność wartości kontrolnej. Może to świadczyć o zaangażowaniu ścieżki NHEJ w naprawę uszkodzeń DNA. W przypadku HR najwyższy poziom ekspresji odnotowano dla genu *RAD54L* (~ 8 - krotność względem próbki nienapromienionej).

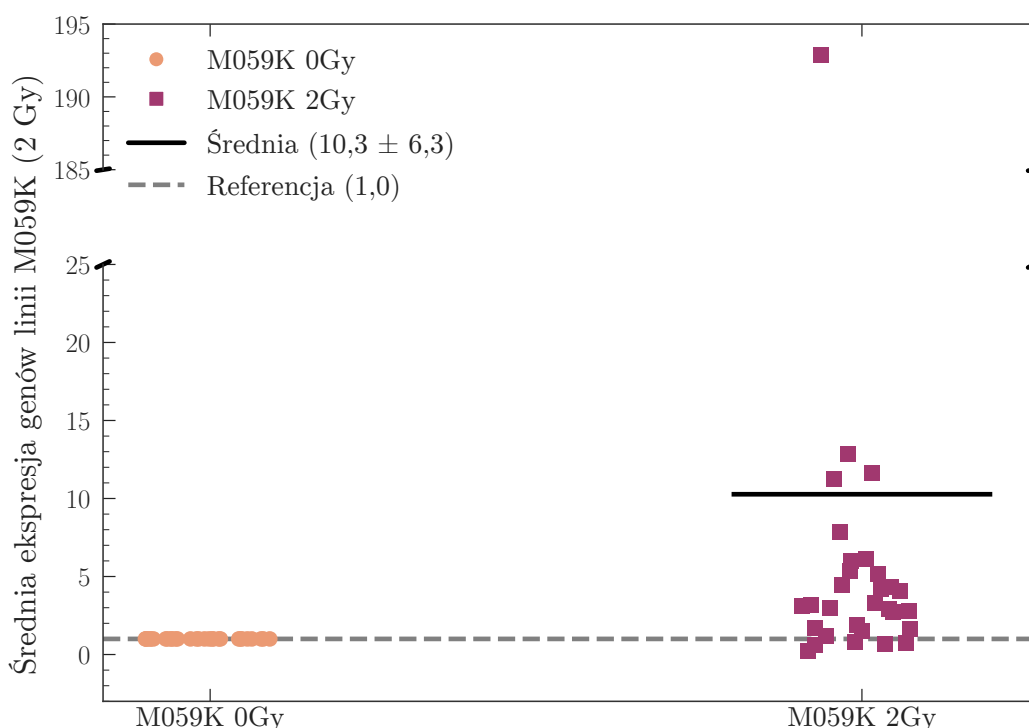
Podwyższony poziom ekspresji zaobserwowano również dla genów odpowiedzialnych za syntezę białek sygnalizujących uszkodzenia DNA (*H2AFX* – ~ 11 - krotnie wyższa

ekspresja) oraz inicjujących zatrzymanie cyklu komórkowego (*ATR* – ~ 12 - krotnie wyższa ekspresja).

Inne geny związane z naprawą DNA, w tym *ERCC1*, *XRCC4*, *RAD50*, *PRKDC* oraz *CHEK2*, wykazały jedynie umiarkowany wzrost ekspresji (~ 6 – 3 - krotny). Większość pozostałych genów wykazała minimalne lub umiarkowane zmiany transkrypcyjne, co dobrze ilustruje rysunek 4.13. Średni poziom ekspresji wszystkich genów w komórkach napromienionych linii M059K wynosił $10,3 \pm 6,3$.

Otrzymane wyniki sugerują, że napromienione komórki M059K opierają się głównie na swojej istniejącej zdolności do naprawy DNA, a nie na szerokiej aktywacji transkrypcyjnej szlaków naprawczych.

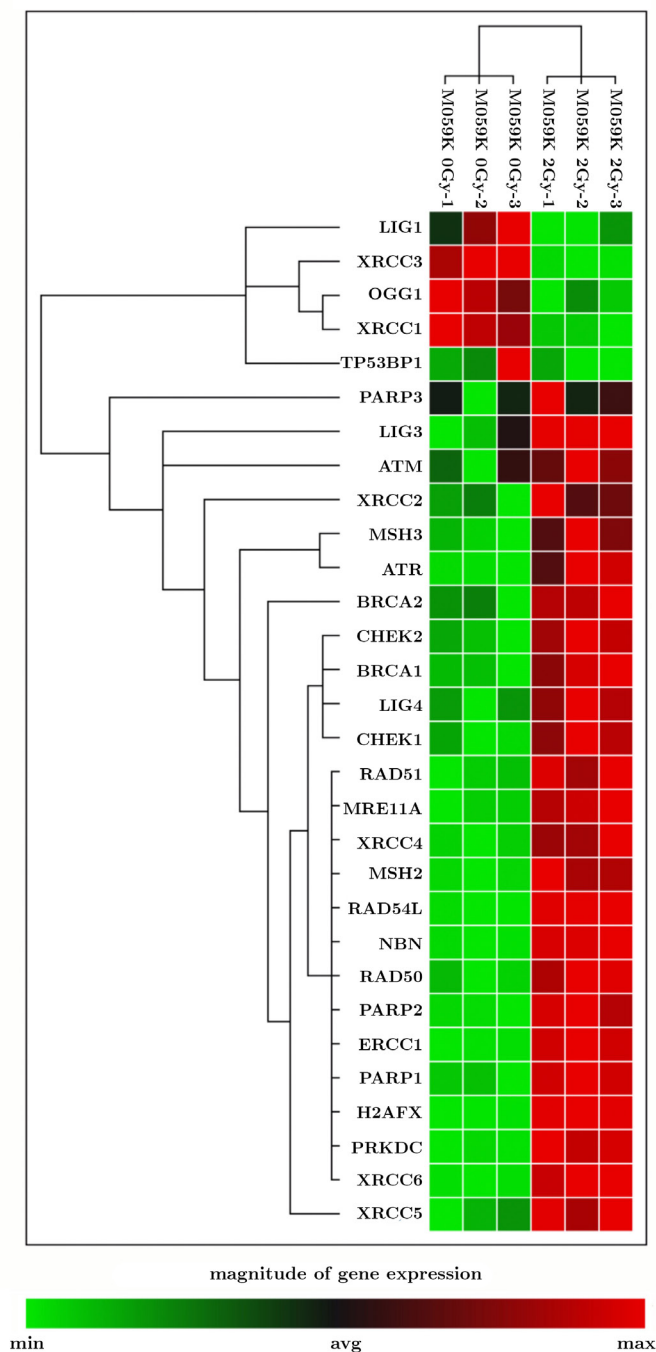
Dodatkowo, rysunek 4.14 pokazuje, że niektóre geny (*LIG1*, *XRCC3*, *OGG1*, *XRCC1*) wykazują wyższą ekspresję w komórkach nienapromienionych, co może wskazywać na ich bazalną aktywność związaną z podstawowymi procesami replikacji i naprawy DNA, niezależną od działania czynników uszkodzających.



Rysunek 4.13: Średnia relatywna ekspresja trzydziestu badanych genów w komórkach napromienionych dawką promieniowania α równą 2 Gy względem nienapromienionych (0 Gy) linii M059K. Pojedynczy punkt odpowiada wartości ekspresji danego genu. Szara przerywana linia wyznacza średnią ekspresję wszystkich genów w referencyjnych komórkach nienapromienionych, natomiast czarna ciągła linia – średnią ekspresję genów komórek napromienionych dawką 2 Gy , linii M059K.

Uzyskane wyniki wskazują, że w odpowiedzi na napromienienie cząstkami α , komórki M059K z prawidłową ekspresją białka DNA-PKcs aktywują głównie elementy naprawy MMR oraz NHEJ, przy ograniczonej indukcji genów związanych z HR i SSBR. Tak zawężona odpowiedź transkrypcyjna prawdopodobnie świadczy o tym, że podstawowa

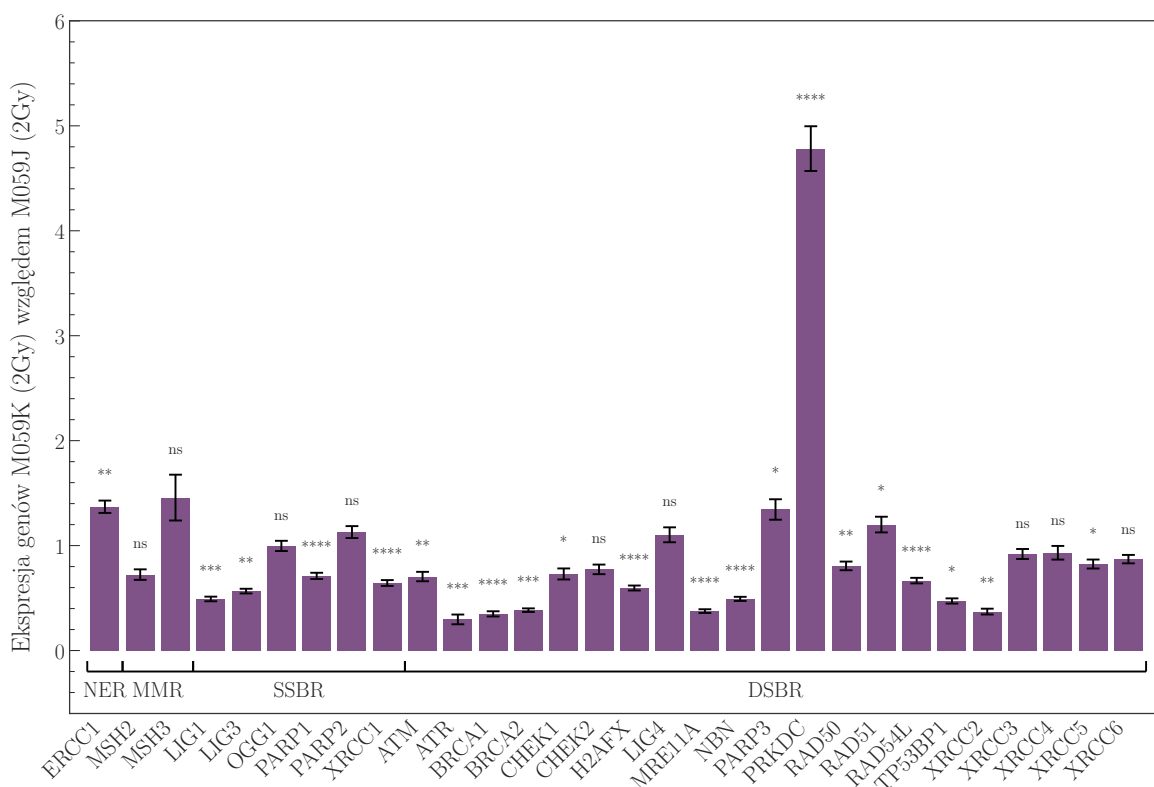
aktywność mechanizmów naprawczych zależnych od DNA-PKcs jest wystarczająca do naprawy uszkodzeń indukowanych promieniowaniem o wysokim LET.



Rysunek 4.14: Dwuwymiarowa analiza klastrowa przedstawiona w formie mapy ciepłej, (ang. *heatmap*) obrazująca poziom ekspresji genów związanych z sygnalizacją uszkodzeń i naprawą DNA w komórkach napromienionych dawką promieniowania α równą 2 Gy i nienapromienionych (0 Gy) linii M059K. Kolory odpowiadają wartościom ekspresji genów, ang. *magnitude of gene expression* w trzech powtórzeniach biologicznych dla dwóch analizowanych grup próbek. Obserwowane grupowanie genów odzwierciedla podobieństwo ich profili ekspresji.

4.5.5 Relatywna ekspresja genów M059K 2 Gy w stosunku do M059J 2 Gy

W czwartej analizowanej grupie, w której zarówno komórki M059J, jak i M059K zostały napromienione dawką 2 Gy, jedynie kilka genów związanych z naprawą DNA wykazało istotne różnice w poziomie ekspresji między liniami komórkowymi, co można zaobserwować na rysunku 4.15. Zgodnie z oczekiwaniami, najbardziej wyraźną różnicę odnotowano dla genu *PRKDC*, którego ekspresja pozostała istotnie wyższa w komórkach M059K (~ 5 - krotnie) w porównaniu z M059J, co potwierdza fenotyp linii M059K z prawidłowo funkcjonującym białkiem DNA-PKcs, nawet po napromienieniu.

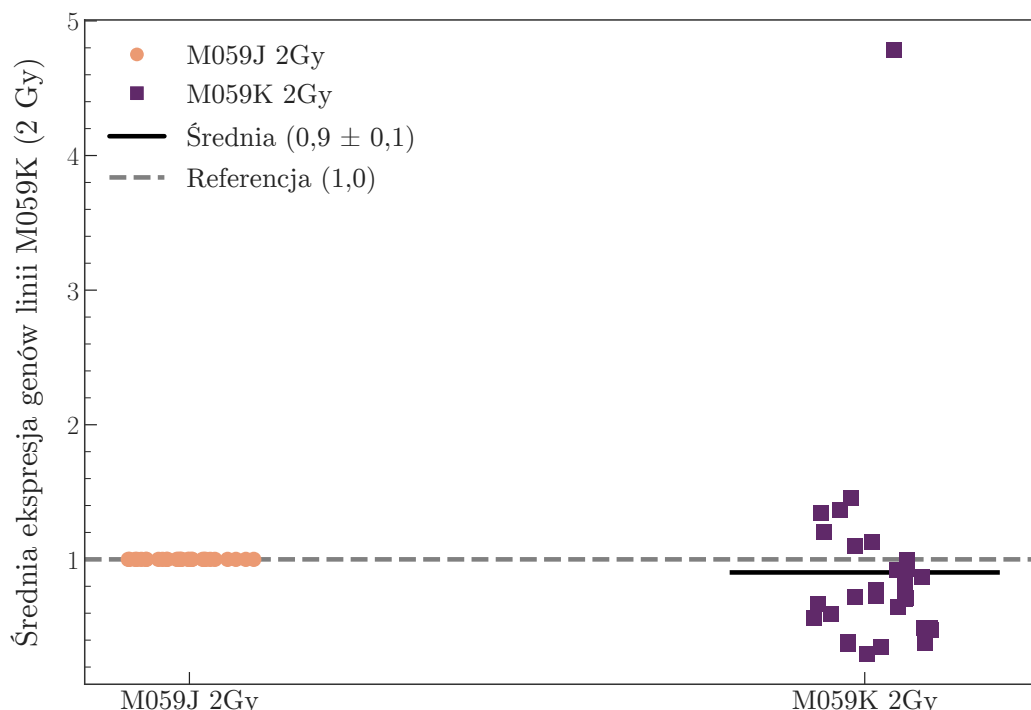


Rysunek 4.15: Relatywna ekspresja poszczególnych genów w komórkach linii M059K względem linii M059J napromienionych dawką promieniowania α równą 2 Gy. Wybrane geny odpowiadają za syntezę białek odpowiedzialnych za sygnalizację oraz naprawę uszkodzeń DNA ze ścieżek: NER, MMR, SSBR, DSBR. Wartości relatywnej ekspresji zostały policzone zgodnie z metodą $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Ponadto *MSH3*, element ścieżki naprawy MMR, wykazywał umiarkowanie wyższą ekspresję w komórkach M059K ($\sim 1,5$ - krotnie), co sugeruje silniejszą aktywację mechanizmu tej ścieżki naprawy w komórkach z obecnym DNA-PKcs, w warunkach stresu wywołanego uszkodzeniem DNA. Gen *ERCC1*, uczestniczący w naprawie NER, również wykazywał wyższą ekspresję w komórkach M059K w porównaniu z M059J, choć w mniejszym stopniu ($\sim 1,4$ - krotnie).

Mimo wyższego poziomu ekspresji wymienionych powyżej genów średnia ekspresja wszystkich rozpatrywanych dla napromienionej linii M059K ($0,9 \pm 0,1$) pozostaje niższa

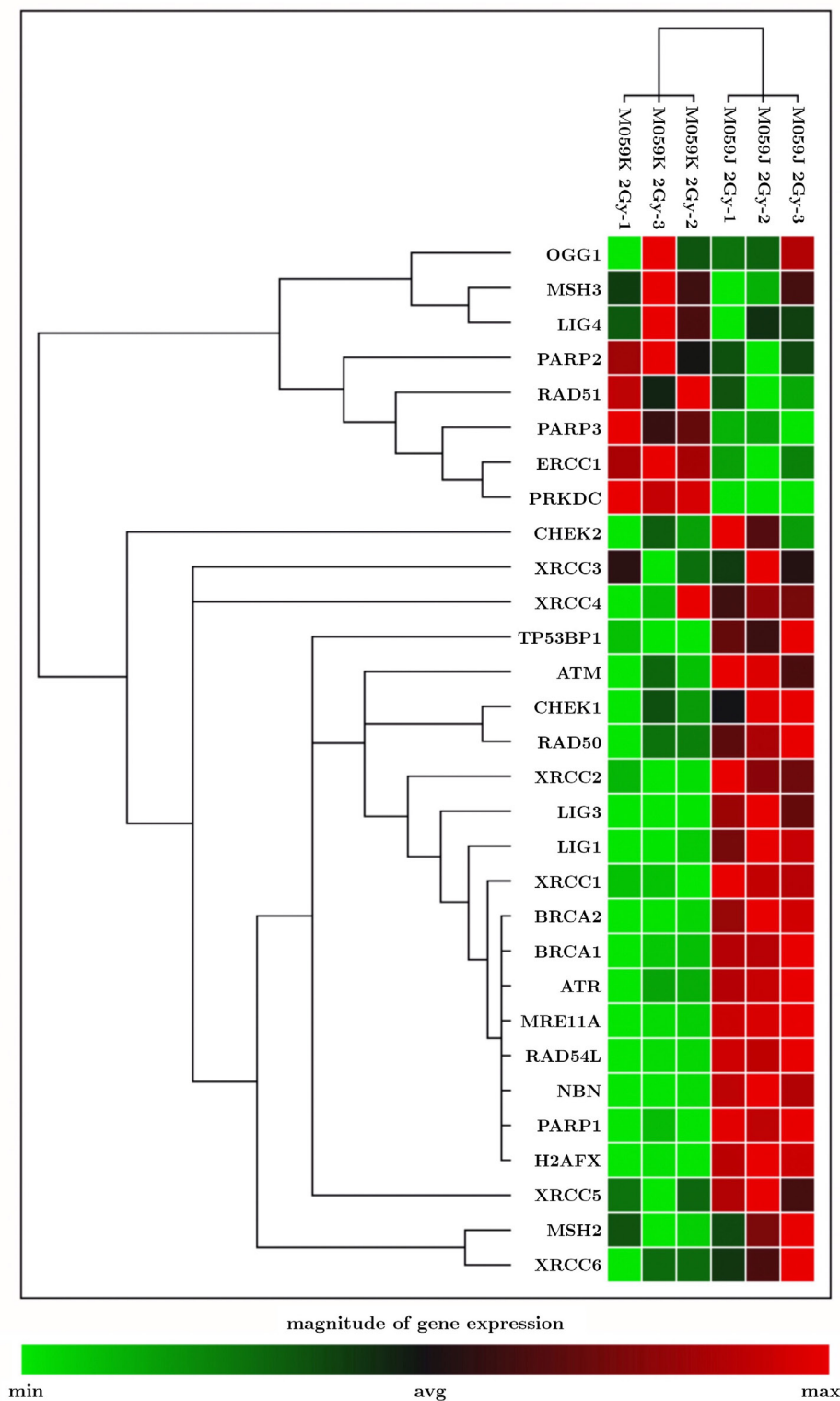
w porównaniu z napromienioną próbką kontrolną linii M059J, co można zobaczyć na rysunku 4.16.



Rysunek 4.16: Średnia relatywna ekspresja trzydziestu badanych genów w komórkach napromienionych dawką promieniowania α równą 2 Gy linii M059K względem linii M059J. Pojedynczy punkt odpowiada wartości ekspresji danego genu. Szara przerywana linia wyznacza średnią ekspresję wszystkich genów w referencyjnych komórkach linii M059J 2 Gy, natomiast czarna ciągła linia średnią ekspresję genów komórek linii M059K 2 Gy.

Uzyskane wyniki wskazują, że po napromienieniu cząstkami α większość genów naprawy DNA ulega podobnej indukcji w obu liniach komórkowych, natomiast różnice w ekspresji *PRKDC*, *MSH3* i *ERCC1* odzwierciedlają odmienne zdolności naprawcze wynikające z obecności lub braku białka DNA-PKcs.

To w jaki sposób rozkłada się stopień ekspresji wszystkich badanych genów, dla każdego powtórzenia napromienionych komórek linii M059J oraz M059K można zobaczyć na rysunku 4.17.



Rysunek 4.17: Dwuwymiarowa analiza klastrowa przedstawiona w formie mapy ciepłej, (ang. *heatmap*) obrazująca poziom ekspresji genów związanych z sygnalizacją uszkodzeń i naprawy DNA w komórkach napromienionych dawką promieniowania α równą 2 Gy linii M059J oraz M059K. Kolory odpowiadają wartościom ekspresji genów, ang. *magnitude of gene expression* w trzech powtórzeniach biologicznych dla dwóch analizowanych grup próbek. Obserwowane grupowanie genów odzwierciedla podobieństwo ich profili ekspresji.

Badane linie GBM różnią się aktywnością białka DNA-PKcs, które pełni kluczową rolę w naprawie DSBs. Linia M059J charakteryzuje się delecją genu kodującego DNA-PKcs, natomiast M059K posiada jego prawidłowo funkcjonującą formę, co umożliwia jej skuteczniejszą naprawę DSBs. Różnica ta istotnie wpływa na reakcję komórek na promieniowanie α , które indukuje złożone, trudne do naprawy uszkodzenia DNA [115].

Wcześniejsze badania wykazały, że komórki M059J są 30-krotnie bardziej wrażliwe na promieniowanie niż M059K, co wynika z upośledzonej naprawy pęknięć dwuniciowych spowodowanej brakiem DNA-PKcs [116]. Potwierdzają to także wyniki analiz biochemicznych, według których w M059J proces naprawy DNA przebiega wolniej, a liczba uszkodzeń jest większa niż w M059K [117].

Uzyskane wyniki ujawniają wyraźne różnice w odpowiedzi transkrypcyjnej na uszkodzenia DNA między liniami M059J i M059K. Brak ekspresji genu *PRKDC* w M059J potwierdza niedobór DNA-PKcs spowodowany mutacją przesuwającą ramkę odczytu [118]. Co więcej, uzupełnienie *PRKDC* w M059J przywraca funkcję DNA-PKcs oraz odporność na promieniowanie, co wskazuje, że brak tego białka stanowi główny defekt tej linii [119]. Z kolei doniesienia literaturowe wskazują, że niedobór DNA-PKcs w GBM może ograniczać angiogenezę i migrację komórek po napromienianiu, sugerując, iż farmakologiczne hamowanie jego syntezy może zwiększać skuteczność radioterapii poprzez spowolnienie progresji guza [75].

W komórkach M059K, zawierających funkcjonalne DNA-PKcs, w warunkach bez napromieniania stwierdzono wyższą ekspresję licznych genów związanych z naprawą DNA, w tym *PRKDC*, *XRCC3*, *PARP3* i *OGG1*. W tabeli 4.1 zestawiono geny o najwyższej aktywności transkrypcyjnej komórek nienapromienionej linii M059K względem M059J oraz dla pozostałych wariantów eksperymentalnych. Wyniki dla pierwszego wariantu (M059K 0 Gy względem M059J 0 Gy) wskazują na konstytutywną aktywację mechanizmów odpowiedzialnych za SSBR i DSBR, co jest zgodne z doniesieniami o podwyższonej bazowej aktywności szlaków naprawczych w guzach z funkcjonalnym DNA-PKcs.

Tabela 4.1: Geny o najwyższej relatywnej ekspresji dla czterech badanych wariantów: M059K 0 Gy, M059J 2 Gy, M059K 2 Gy, M059K 2 Gy; względem odpowiadających im kontroli: M059J 0 Gy, M059J 0 Gy, M059K 0 Gy, M059J 2 Gy.

Badany wariant	M059K 0 Gy	M059J 2 Gy	M059K 2 Gy	M059K 2 Gy
Kontrola	M059J 0 Gy	M059J 0 Gy	M059K 0 Gy	M059J 2 Gy
Geny o najwyższej ekspresji	<i>PRKDC</i>	<i>ATR</i>	<i>MSH2</i>	<i>PRKDC</i>
	<i>XRCC3</i>	<i>XRCC6</i>	<i>XRCC6</i>	<i>MSH3</i>
	<i>PARP3</i>	<i>H2AFX</i>	<i>ATR</i>	<i>ERCC1</i>
	<i>OGG1</i>	<i>RAD54L</i>	<i>H2AFX</i>	<i>PARP3</i>

W przeciwnym wariantcie - w komórkach M059J pozbawionych DNA-PKcs, a więc

z niesprawnym klasycznym szlakiem NHEJ - obserwuje się niską bazową ekspresję większości genów naprawy DNA. Po napromienianiu cząstkami α dochodzi jednak do wyraźnego wzrostu transkrypcji genów związanych z różnymi mechanizmami naprawy. Po dawce 2 Gy szczególnie wzrastają poziomy ekspresji genów *ATR*, *XRCC6* i *H2AFX* (tabela 4.1), co sugeruje silną aktywację sygnalizacji uszkodzeń, zatrzymanie cyklu komórkowego oraz kompensacyjne uruchomienie szlaków HR i punktów kontrolnych.

Zgodnie z danymi literaturowymi, komórki M059J pozbawione aktywności DNA-PKcs ulegają wyraźnemu zatrzymaniu w fazie G2/M po napromienianiu [79, 116]. Mimo braku DNA-PKcs aktywują one punkt kontrolny G2/M, prawdopodobnie dzięki działaniu innych białek, takich jak CHK1 i CHK2 [120, 121]. W związku z tym silna aktywacja transkrypcyjna obserwowana w M059J może wynikać częściowo z redystrybucji cyklu komórkowego sterowanej przez te punkty kontrolne.

Białko *ATR*, ang. *Ataxia Telangiectasia and Rad3-related* odgrywa kluczową rolę w reakcji komórek na uszkodzenia DNA, szczególnie w rozpoznawaniu uszkodzeń wywołanych promieniowaniem jonizującym i aktywacji dalszych szlaków odpowiedzialnych za zatrzymanie cyklu komórkowego i naprawę DNA [122]. Zgodnie z literaturą, brak DNA-PKcs skutkuje mniej wydajną naprawą DSBs, natomiast ekspresja *ATR* może kompensować ten niedobór.

Gen *XRCC6*, kodujący białko Ku70, jest kluczowym elementem szlaku NHEJ, niezbędnym do naprawy pęknięć dwuniciowych indukowanych promieniowaniem jonizującym. Z danych literaturowych wynika, że jego ekspresja może wzrastać w odpowiedzi na promieniowanie [123].

Podobnie, wyniki wcześniejszych badań na liniach glejaka, w tym M059J, wskazują, że poziom γ -H2AX wzrasta po napromienianiu, co świadczy o uszkodzeniu DNA i jest zgodne z obserwowanymi wysokimi poziomami ekspresji genu *H2AFX* kodującego histon H2AX [124].

Inne doniesienia wskazują, że po napromienianiu komórek M059J cząstkami α zwiększa się rekrutacja białka *RAD51*, blisko spokrewnionego z *RAD54L* w szlaku HR [118]. Akumulacja *RAD51* sugeruje wzmożoną aktywność HR w odpowiedzi na niedobór NHEJ, co oznacza, że *RAD54L* może być również silniej aktywowany w tych warunkach.

Z kolei komórki M059K wykazują znacznie węższą odpowiedź transkrypcyjną na napromienianie, obejmującą głównie aktywację *MSH2* oraz umiarkowany wzrost ekspresji *XRCC6* i *ATR* (tabela 4.1). Wskazuje to, że naprawa MMR może uczestniczyć w reakcji na złożone uszkodzenia DNA, wykraczając poza klasyczną rolę korekty błędnych par zasad.

MSH2 jest kluczowym białkiem systemu MMR, biorącym udział w naprawie niezgodności DNA oraz pęknięć dwuniciowych i uszkodzeń zasad wywołanych promieniowaniem jonizującym [125]. Z literatury wynika, że niedobór *MSH2* prowadzi do zwiększonej wrażliwości na promieniowanie, zaburzeń mechanizmów naprawy DNA oraz nieprawidłowej odpowiedzi punktów kontrolnych cyklu komórkowego [126].

Wyniki dla linii M059K sugerują zatem, że komórki z prawidłową funkcją DNA-PKcs zachowują wysoką podstawową zdolność naprawy DNA i w mniejszym stopniu polegają na przeprogramowaniu transkrypcyjnym po uszkodzeniu, co jest zgodne z rolą

DNA-PKcs w szybkiej DSBR poprzez konstytutywną aktywność szlaku NHEJ.

Porównanie napromienionych komórek M059K i M059J ujawnia, że jedynie geny *PRKDC*, *MSH3* i *ERCC1* (tabela 4.1) wykazują wyższą ekspresję w komórkach M059K, co odzwierciedla sprawność szlaków NHEJ, MMR i NER. Choć *MSH3* należy do systemu MMR, literatura nie podaje danych dotyczących jego poziomu ekspresji po napromienianiu.

Białko *ERCC1*, uczestniczące w szlaku NER, jest istotne dla naprawy uszkodzeń DNA wywołanych promieniowaniem. Doniesienia wskazują, że promieniowanie jonizujące indukuje jego ekspresję w różnych typach komórek, m.in. raka prostaty czy glejaka, choć nie badano tego w liniach M059 [127, 128].

Podsumowując, uzyskane profile transkrypcyjne wskazują, że w przypadku braku DNA-PKcs komórki glejaka kompensują ten niedobór, aktywując liczne alternatywne mechanizmy naprawcze, natomiast komórki ze sprawnym DNA-PKcs wykorzystują istniejące ścieżki naprawy DNA, wprowadzając jedynie niewielkie zmiany transkrypcyjne.

Rozdział 5

Podsumowanie

Badania radiobiologiczne wykonane na liniach komórkowych M059J oraz M059K wymagały przeprowadzenia szczegółowej charakterystyki parametrów fizycznych cząstek α deponowanych w materiale biologicznym oraz szczegółowej dozymetrii układu do napromieniania z powierzchniowym źródłem ^{241}Am . Istotne było wyznaczenie takich parametrów cząstek α jak: rozkład energii, liniowy przekaz energii (LET), czy liczba cząstek padających na określoną powierzchnię próbki. Zapewnienie porównywalności otrzymanych wyników radiobiologicznych z wynikami badań dostępnymi w literaturze wymagało precyzyjnego wyznaczenia dawki deponowanej w komórkach.

Układ eksperymentalny zaprojektowany do badań na komórkach stanowi wartościowe narzędzie badawcze, ponieważ źródło ^{241}Am dostarcza cząstek α z zakresu energii emitowanych przez izotopy stosowane między innymi w celowanej terapii α , takie jak ^{225}Ac , ^{211}At lub ^{212}Bi . Jednocześnie zapewnia ono długookresowe źródło ze względu na czas połowicznego zaniku ^{241}Am wynoszący 432,6(6) lat [17], umożliwiające prowadzenie powtarzalnych eksperymentów w warunkach laboratoryjnych.

Przed rozpoczęciem badań radiobiologicznych niezbędne było oszacowanie strat energii cząstek α na poszczególnych elementach układu oraz przede wszystkim w komórkowym targecie. Z uwagi na charakter oddziaływań ciężkich cząstek naładowanych z materią konieczne było precyzyjne wyznaczenie wymiarów poszczególnych materiałów, przez które kolejno przechodziły cząstki α , zanim dotarły do docelowej próbki komórkowej. Za pomocą mikroskopii konfokalnej wyznaczono wysokość warstwy medium hodowlanego oraz wymiary monowarstwy komórek.

Szczegóły dotyczące wykorzystywanego układu zostały zaimplementowane do programu MCNP, służącego do obliczeń transportu promieniowania. Zastosowany model pozwolił na obliczenie rozkładu energii cząstek α , uśrednionej w objętości próbki, mieszczącej się w przedziale od 0 do 1600 keV, w którym, zgodnie z dostępną literaturą, dochodzi do licznych dwuniciowych pęknięć DNA [114].

Otrzymane z obliczeń wartości LET, również uśrednione w objętości próbki komórek o średnicy 3 cm i wysokości 3 μm , znajdowały się w zakresie od 0 do 260 keV/ μm , z wyraźnym plateau od 60 do 200 keV/ μm . Wskazany przedział LET, zgodnie z danymi literaturowymi, charakteryzuje się wysoką efektywnością biologiczną [19], gdyż prowadzi do gęstych jonizacji, a co za tym idzie, złożonych uszkodzeń DNA i w konsekwencji śmierci komórki.

W obliczeniach Monte Carlo istotnym aspektem była również weryfikacja poziomu jednorodności napromieniania w celu zapewnienia homogenicznego sposobu podania dawki pochodzącej od ciężkich cząstek naładowanych. Zgodnie z rysunkiem 2.14 różnice poziomu względnej jednorodności w całej objętości próbki nie przekraczały 1%, co sugeruje, że każda komórka, której zdolność proliferacji oceniano na podstawie testu przeżywalności, otrzymała taką samą dawkę promieniowania pochodzącą od cząstek α .

Z kolei wartość dawki w objętości monowarstwy komórek policzono na podstawie całkowitej depozycji energii na sekundę. Na tej podstawie wyznaczano czas konieczny do zdeponowania dawki równej 1 Gy. Mając świadomość poziomu precyzji pomiarów wykonanych za pomocą mikroskopii konfokalnej oraz fluktuacji wysokości medium hodowlanego na komórkach, oszacowano, iż dawka deponowana w komórkach jest obciążona 50% niepewnością.

Ograniczenia układu, związane z poziomem medium hodowlanego, skłoniły do wykonania dalszych obliczeń pokazujących zależność dawki w komórkach od wysokości warstwy medium. Otrzymane wyniki reprezentują cenny model pokazujący zależność dawka-grubość warstwy medium dla cząstek α o pożądanym zakresie energii i LET, co stanowi wartościowy wkład w planowanie terapii z wykorzystaniem emiterów promieniowania α . Poniżej 20 μm dawka spada do zera - informacja ta stanowi wskazówkę dotyczącą optymalnego miejsca lokowania emitery α w przestrzeni zmiany nowotworowej w celu uzyskania możliwie najlepszego efektu terapeutycznego.

W dalszych rozważaniach pominięto wkład do dawki pochodzący od promieniowania γ , również emitowanego przez ^{241}Am , ponieważ był on o cztery rzędy wielkości niższy niż od cząstek α przy tym samym czasie ekspozycji komórek na źródło.

Walidacji wyników obliczeń MC dokonano na tych poziomach układu, na których umożliwiały to dostępne metody detekcyjne. Pomiary z wykorzystaniem detektora krzemowego wskazały precyzję symulacji na poziomie 4%. Natomiast pomiary z użyciem detektorów śladowych umożliwiły porównanie rozkładu energii oraz liczby cząstek α wchodzących do medium hodowlanego.

Liczbę cząstek na poziomie jądra komórkowego wyznaczono na podstawie transportu promieniowania w programie MCNP. Dla czasu odpowiadającego depozycji 2 Gy wynosiła ona średnio 33 trafienia na jądro komórkowe. Wartość tę można porównać z liczbą ognisk naprawczych γH2AX dwuniciowych uszkodzeń DNA, wyznaczonych za pomocą analizy immunofluorescencyjnej. Wyniki otrzymane po 15 minutach od napromienienia potwierdzają tendencję wzrostu liczby foci γH2AX wraz z deponowaną dawką [124, 97]. Ich liczba dla dawki 2 Gy dla linii M059J i M059K wynosiła odpowiednio $14,25 \pm 1,82$ oraz $17,74 \pm 1,93$, co daje wartości zbliżone, choć nieco niższe od wyliczonej liczby deponowanych cząstek na jądro komórkowe. Może to wynikać z faktu nakładania się foci γH2AX związanych z kompleksowymi uszkodzeniami DNA (co uwidacznia się na rysunku 4.3) lub z różnic w tempie tworzenia ognisk naprawczych, które, zgodnie z otrzymanymi wynikami, jest wyższe w przypadku linii M059J. Zebrane wnioski wskazują na potrzebę wykonania eksperymentu wyznaczającego kinetykę ognisk naprawczych, obrazujących zmiany ich liczby w czasie, co odwzorowuje tempo sygnalizacji oraz naprawy uszkodzeń DNA po napromienieniu.

Wyniki testu przeżywalności komórek wykazują tendencję odwrotną do obser-

wowanej w przypadku liczby ognisk γ H2AX - wartość przeżywalności maleje wraz ze wzrostem dawki promieniowania. Dla dawki 2 Gy linia komórkowa M059K wykazuje przeżywalność na poziomie $0,46 \pm 0,07$, natomiast linia M059J - $0,47 \pm 0,04$. Jest to zatem dawka, przy której przeżywa mniej niż 50 % badanej populacji. Jednak w warunkach wykorzystywanego układu do napromieniania zwiększenie dawki znacznie ponad wybraną, maksymalną wartość (2,67 Gy) wymagałoby wydłużenia czasu ekspozycji próbek na źródło, co wiązałoby się z ryzykiem parowania, zmiany pH podłoża hodowlanego i wahań temperatury, które mogłyby zakłócić wyniki testu klonogenego i pozostałych badań. Nie mniej jednak poziom przeżywalności po napromienianiu cząstkami α o wysokim LET w przypadku obu linii komórkowych jest na podobnym poziomie, co jest zgodne z literaturą [79].

Linia M059K mimo opisywanej w literaturze niższej radiowrażliwości, związanej z poprawną ekspresją kinazy białkowej DNA-PKcs, odpowiedzialnej za indukcję białek ze szlaku NHEJ [73, 74], wykazywała w przedziale niższych dawek, od 0,33 Gy do 1,33 Gy, w porównaniu do linii M059J, trend przemawiający za niższą promieniowrażliwością. Obserwację tą postanowiono zweryfikować na podstawie testu cytotoksyczności (MTT) rozszerzając odpowiednio zakres niskich dawek (0,08 Gy, 0,17 Gy, 0,33 Gy, 0,5 Gy, 0,67 Gy, 1,33 Gy). Komórki M059K okazały się być początkowo bardziej wrażliwe na cytotoksyczność indukowaną cząstkami α , podczas gdy komórki M059J wykazały wyższą aktywność metaboliczną przy niskich dawkach promieniowania α . Zatem wyniki frakcji przeżywającej po 12 dniach odzwierciedlają aktywność metaboliczną mierzoną po czterech godzinach od napromieniania.

Dotychczas opisane rezultaty przedstawiają odpowiedź biologiczną komórek glejaka na poziomie komórkowym oraz jądra komórkowego, natomiast przeprowadzone kolejno badania poziomu ekspresji genów świadczą o wpływie cząstek α , o wysokim LET na poziomie DNA. Analizę ekspresji genów przeprowadzono za pomocą metody RT-qPCR, co pozwoliło na ocenę średniej, relatywnej do próbki referencyjnej ekspresji 30 genów kodujących białka biorące udział w procesie wykrywania, sygnalizowania oraz naprawy uszkodzeń DNA. Zbadano cztery różne wariaty poziomu relatywnej ekspresji: w nienapromienionej linii M059K w stosunku do nienapromienionej linii M059J; napromienionej dawką 2 Gy linii M059J w stosunku do nienapromienionej linii M059J; napromienionej dawką 2 Gy linii M059K w stosunku do nienapromienionej linii M059K; napromienionej dawką 2 Gy linii M059K w stosunku napromienionej dawką 2 Gy linii M059J.

W komórkach M059K, zawierających funkcjonalne DNA-PKcs, w warunkach bez napromieniania stwierdzono wyższą ekspresję licznych genów związanych z naprawą DNA, w tym *PRKDC*, *XRCC3*, *PARP3* i *OGG1*. W drugim analizowanym wariancie, tj. w komórkach M059J pozbawionych DNA-PKcs obserwuje się niską bazową ekspresję większości genów naprawy DNA. Po napromienianiu cząstkami α dochodzi jednak do wyraźnego wzrostu transkrypcji genów związanych z różnymi mechanizmami naprawy takich jak: *ATR*, *XRCC6* i *H2AFX* odpowiedzialnych za sygnalizację uszkodzeń, zatrzymanie cyklu komórkowego oraz uruchomienie szlaków HR i punktów kontrolnych.

Dostępne wyniki badań radiobiologicznych na linii komórkowej M059J, wskazują, że poziom γ -H2AX wzrasta po napromienianiu, co świadczy o uszkodzeniu DNA i jest zgodne z obserwowanymi wysokimi poziomami ekspresji genu *H2AFX* kodującego

histon H2AX [124]. Tę interpretację dodatkowo potwierdza analiza γ H2AX, która ujawniła zależną od dawki indukcję ognisk w obu liniach komórkowych. Linia M059J wykazywała większe i bardziej złożone ogniska indukowane promieniowaniem, co jest efektem wolniejszej naprawy DSB w wyniku braku genu kodującego DNA-PKcs.

Komórki M059K wykazały ograniczoną odpowiedź transkrypcyjną na napromienianie cząstkami α , polegającą głównie na aktywacji *MSH2* oraz niewielki wzrost ekspresji genów *XRCC6* i *ATR*. Natomiast w przypadku ostatniej porównywanej grupy wskazały podwyższoną ekspresję genów *PRKDC*, *MSH3* i *ERCC1*, co świadczy o aktywacji szlaków naprawy NHEJ, MMR i NER.

Wykonane badania są pierwszymi, które łączą napromienianie komórek glejaka wielopostaciowego w badanym układzie ze źródłem powierzchniowym ^{241}Am , z analizą ekspresji genów. Wykonane eksperymenty fizyczne oraz radiobiologiczne nie tylko potwierdzają techniczną wykonalność i powtarzalność systemu napromieniania, lecz także zapewniają szeroki przegląd odpowiedzi na uszkodzenia DNA w komórkach glejaka wielopostaciowego z niedoborem DNA-PKcs w porównaniu z komórkami o prawidłowym poziomie aktywności tego białka, po napromienianiu cząstkami α o wysokim LET.

Wyniki tych interdyscyplinarnych badań wskazują na silną indukcję *ATR*, *H2AFX* i *RAD54L* w komórkach M059J z niedoborem DNA-PKcs, co świadczy o kompensacyjnej odpowiedzi na uszkodzenia DSBs, na drodze szlaku HR oraz punktów kontrolnych, co może czynić takie guzy szczególnie wrażliwymi na inhibitory ATR, inhibitory PARP lub blokadę punktów kontrolnych w połączeniu z radioterapią. Z kolei ograniczona odpowiedź transkrypcyjna obserwowana w komórkach M059K z prawidłowym poziomem DNA-PKcs podkreśla ich konstytutywną zdolność do naprawy DSBs na drodze NHEJ i sugeruje, że farmakologiczne hamowanie DNA-PKcs może być wykorzystane do uwrażliwienia takich guzów na promieniowanie.

Podsumowując, szczegółowa walidacja strat energii cząstek α w zależności od początkowej energii kinetycznej i drogi przebytej w docelowym ośrodku, a także profilowanie ekspresji genów naprawy DNA oraz statusu DNA-PKcs może pomóc w opracowaniu strategii leczenia pacjentów z glejakiem wielopostaciowym pod kątem spersonalizowanej radioterapii z wykorzystaniem ciężkich cząstek naładowanych i terapii ukierunkowanych na naprawę DNA.

Przeprowadzone badania dowodzą, że nawet nieznaczne zmiany w geometrii układu – takie jak grubość warstwy pożywki, wysokość komórek czy obecność dodatkowej bariery biologicznej – mogą istotnie wpływać na rozkład zdeponowanej dawki i lokalny LET, a tym samym determinować biologiczny efekt napromieniania. Tak subtelne różnice, rzędu pojedynczych mikrometrów, mogą prowadzić do zdeponowania dawki poniżej progu skuteczności terapeutycznej, umożliwiając przeżycie komórek nowotworowych i zwiększając prawdopodobieństwo nawrotu choroby.

Analiza wykazała ponadto, że zróżnicowana aktywacja szlaków odpowiedzi na uszkodzenia DNA w komórkach z obecnym i nieobecnym białkiem DNA-PKcs odzwierciedla odmienne strategie adaptacyjne i może stanowić potencjalny cel dla terapii skojarzonych. Wyniki te wskazują, że integracja precyzyjnych modeli fizycznych depozycji energii z analizą procesów naprawy DNA na poziomie komórkowym stanowi zasadniczy kierunek dalszego rozwoju terapii z wykorzystaniem promieniowania α .

Takie podejście może umożliwić nie tylko dokładniejsze przewidywanie odpowiedzi komórek na napromienianie, lecz także optymalizację parametrów leczenia, w celu maksymalizacji skuteczności biologicznej przy jednoczesnym ograniczeniu ryzyka nawrotu nowotworu.

Referencje

- [1] F. Graf et al. „DNA Double Strand Breaks as Predictor of Efficacy of the Alpha-Particle Emitter Ac-225 and the Electron Emitter Lu-177 for Somatostatin Receptor Targeted Radiotherapy”. *PLOS ONE* 9 (2014), 1-10. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088239>.
- [2] K. P. Chatzipapas et al. „Quantification of DNA double-strand breaks using Geant4-DNA”. *Medical Physics* 46 (2019), 405-413. URL: <https://aapm.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mp.13290>.
- [3] N. Tang et al. „Influence of chromatin compaction on simulated early radiation-induced DNA damage using Geant4-DNA”. *Medical Physics* 46 (2019), 1501-1511. URL: <https://aapm.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mp.13405>.
- [4] S. Ghaseminejad et al. „Framework to calculate ^{225}Ac , ^{177}Lu , and ^{161}Tb radiation dose and biological effect in metastatic castration-resistant prostate cancer treatment”. *Medical Physics* 52 (2025), e18035. URL: <https://aapm.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mp.18035>.
- [5] M. R. Raju et al. „Radiobiology of alpha particles. IV. Cell inactivation by alpha particles of energies 0.4–3.5 MeV”. *Radiation Research* 133 (1993), 289-296. URL: <https://www.jstor.org/stable/3578212>.
- [6] N. K. Tafreshi et al. „Development of Targeted Alpha Particle Therapy for Solid Tumors”. *Molecules* 24 (2019), 4314. URL: <https://doi.org/10.3390/molecules24234314>.
- [7] P. Yae Won et al. „The 2021 WHO Classification for Gliomas and Implications on Imaging Diagnosis: Part 1—Key Points of the Fifth Edition and Summary of Imaging Findings on Adult-Type Diffuse Gliomas”. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 58 (2023), 677-689. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jmri.28743>.
- [8] B. Oronsky et al. „A Review of Newly Diagnosed Glioblastoma”. *Frontiers in Oncology* 10 (2021), 574012. URL: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2020.574012>.
- [9] M. Maleszewska et al. „Decoding glioblastoma’s diversity: Are neurons part of the game?” *Cancer Letters* 620 (2025), 217666. URL: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2025.217666>.

- [10] Y. S. Kim et al. „An overview of targeted alpha therapy”. *Tumour Biology* 33 (2012), 573-590. URL: <https://doi.org/10.1007/s13277-011-0286-y>.
- [11] J. Kunikowska et al. „Targeted α -Emitter Therapy of Neuroendocrine Tumors”. *Seminars in Nuclear Medicine* 50 (2020), 171-176. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000129981930100X>.
- [12] R. F. Barth et al. „Current status of boron neutron capture therapy of high grade gliomas and recurrent head and neck cancer”. *Radiation Oncology* 7 (2012), 146. URL: <https://doi.org/10.1186/1748-717X-7-146>.
- [13] T. Kageji et al. „Boron neutron capture therapy (BNCT) for newly-diagnosed glioblastoma: comparison of clinical results obtained with BNCT and conventional treatment”. *Journal of Medical Investigation* 61 (2014), 254-263. URL: <https://doi.org/10.2152/jmi.61.254>.
- [14] G. E. Knoll. *Radiation Detection and Measurement*. 3 wyd. Nowy Jork: John Wiley & Sons, 2000. ISBN: 0-471-07338-5.
- [15] M. G. Stabin. *Radiation Protection and Dosimetry: An Introduction to Health Physics*. Nowy Jork: Springer, 2007. ISBN: 978-0-387-49982-6.
- [16] P. Sigmund. *Particle Penetration and Radiation Effects: General Aspects and Stopping of Swift Point Charges*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2006. ISBN: 10 3-540-31713-9.
- [17] M. S. Basunia. „Nuclear Data Sheets for $A = 237$ ”. *Nuclear Data Sheets* 107 (2006), 2323-2422. URL: <https://doi.org/10.1016/j.nds.2006.07.001>.
- [18] National Nuclear Data Center. *Baza danych ENSDF/XUNDL – Rozpad alfa ^{241}Am do ^{237}Np* . <https://www.nndc.bnl.gov/ensdf/>. 2024.
- [19] E. J. Hall et al. *Radiobiology for the Radiologist*. 8 wyd. Wolters Kluwer, 2018.
- [20] Laser2 COTS. *What is LET (Linear Energy Transfer)?* 2025. URL: <https://www.laser2cots.com/en/article/6.LET.html> (dostęp 21.10.2025).
- [21] International Commission on Radiation Units and Measurements (ICRU). *Fundamental Quantities and Units for Ionizing Radiation: ICRU Report 85a (Revised)*. Sprawozdanie techniczne. Revised version of ICRU Report 85. 2011. URL: <https://www.icru.org/report/fundamental-quantities-and-units-for-ionizing-radiation-icru-report-85a-revised/>.
- [22] N. Suntharalingam et al. „Basic Radiobiology”. *Review of Radiation Oncology Physics: A Handbook for Teachers and Students*. Dostęp: 2025-10-21. 2005. Rozdz. 14, s. 527-560. URL: https://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/Pub1196_web.pdf.
- [23] *Ustawa z dnia 29 listopada 2000 r. – Prawo atomowe*. Dziennik Ustaw Rzeczypospolitej Polskiej, poz. 1277. tekst jednolity. 2024. URL: <https://dziennikustaw.gov.pl/D2024000127701.pdf>.
- [24] E. P. Solomon et al. *Biology*. 7 wyd. Belmont, CA: Brooks/Cole, 2005.

- [25] T. L. Clarke et al. „DNA repair as a shared hallmark in cancer and ageing”. *Molecular Oncology* 16 (2022), 3352-3379. URL: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1878-0261.13285>.
- [26] K. P. Singh et al. „Mechanisms and Measurement of Changes in Gene Expression”. *Biological Research For Nursing* 20 (2018), 369-382. URL: <https://doi.org/10.1177/1099800418772161>.
- [27] Tocris. *Cancer Research Product Guide 2016*. Dostęp: 2025-10-16. 2016. URL: <https://resources.tocris.com/pdfs/literature/product-guides/cancer-guide-2016.pdf>.
- [28] M. B. Kastan et al. „Cell-cycle checkpoints and cancer”. *Nature* 432 (2004), 316-323. URL: <https://doi.org/10.1038/nature03097>.
- [29] C. Q. X. Yam et al. „DNA damage checkpoint execution and the rules of its disengagement”. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* Volume 10 - 2022 (2022). URL: <https://www.frontiersin.org/journals/cell-and-developmental-biology/articles/10.3389/fcell.2022.1020643>.
- [30] L. Lundholm et al. „Radiobiological Principles”. *Radiation Protection and Dose Optimisation – A Technologist’s Guide*. Dostęp: 2025-10-21. 2016. Rozdz. 4, s. 46-55. URL: https://eanm.org/wp-content/uploads/2024/06/EANM_2016-TG_RadiationProtection_lowres.pdf.
- [31] D. T. Goodhead. „Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA”. *International Journal of Radiation Biology* 65 (1994), 7-17. URL: <https://doi.org/10.1080/09553009414550021>.
- [32] A. Mol et al. „Indukowane mutagenami uszkodzenia DNA i mechanizmy ich powstawania”. *Postępy Biologii Komórki* 38 (2011), 491-505. URL: <https://pbkom.eu/pl/content/indukowane-mutagenami-uszkodzenia-dna-i-mechanizmy-ich-powstawania>.
- [33] J. Moon et al. „DNA damage and its role in cancer therapeutics”. *International Journal of Molecular Sciences* 24 (2023), 4741. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms24054741>.
- [34] R. Brem et al. „XRCC1 is required for DNA single-strand break repair in human cells”. *Nucleic Acids Research* 33 (2005), 2512-2520. URL: <https://doi.org/10.1093/nar/gki543>.
- [35] B. Tudek. „Różne twarze naprawy DNA – Nobel 2015 w dziedzinie chemii”. *Kosmos* 65 (2016), 309-322. URL: <http://kosmos.icm.edu.pl/PDF/2016/309.pdf>.
- [36] N. Chatterjee et al. „Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis”. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 58 (2017), 235-263. URL: <https://doi.org/10.1002/em.22087>.
- [37] R. Paduch et al. „Types of cell death”. *Pomeranian Journal of Life Sciences* 61 (2015), 411-418. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29522663/>.

- [38] D. Eriksson et al. „Radiation-induced cell death mechanisms”. *Tumor Biology* 31 (2010), 363-372. URL: <https://doi.org/10.1007/s13277-010-0042-8>.
- [39] D. Chowdhury et al. „Charity begins at home: non-coding RNA functions in DNA repair”. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14 (2013), 181-189. URL: <https://doi.org/10.1038/nrm3523>.
- [40] A. N. Blackford et al. „ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response”. *Molecular Cell* 66 (2017), 801-817. URL: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.015>.
- [41] K. Maliszewska-Olejniczak et al. „Molecular Mechanisms of Specific Cellular DNA Damage Response and Repair Induced by the Mixed Radiation Field During Boron Neutron Capture Therapy”. *Frontiers in Oncology* Volume 11 - 2021 (2021). URL: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2021.676575>.
- [42] C. Brochier et al. „Chromatin Modifications Associated with DNA Double-strand Breaks Repair as Potential Targets for Neurological Diseases”. *Neurotherapeutics* 10 (2013), 817-830. URL: <https://doi.org/10.1007/s13311-013-0210-9>.
- [43] K. Meek et al. „The DNA-dependent protein kinase: the director at the end”. *Immunological Reviews* 200 (2004), 132-141. URL: <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00162.x>.
- [44] A. J. Davis et al. „DNA double strand break repair via non-homologous end-joining”. *Translational Cancer Research* 2 (2013), 130-143. URL: <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-676X.2013.04.02>.
- [45] Eckert & Ziegler. *Certyfikat źródła promieniotwórczego Am-241, model AP1*. Dokument papierowy. Wystawiony przez Eckert & Ziegler, nr certyfikatu 130218. 2018.
- [46] Z. Szepliński et al. „Radiobiological research and dosimetry using a flat alpha source”. *RAP Conference Proceedings* 4 (2019), 7-9. URL: <https://www.rap-proceedings.org/paper.php?id=2#>.
- [47] S. W. Paddock. „Principles and practices of laser scanning confocal microscopy”. *Molecular Biotechnology* 16 (2000), 127-149. URL: <https://doi.org/10.1385/MB:16:2:127>.
- [48] A. D. Elliott. „Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices”. *Current Protocols in Cytometry* 92 (2020), e68. URL: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cpcy.68>.
- [49] B. P. Takbhate et al. „A Narrative Review on Confocal Laser Scanning Microscopy: Principle, Applications, Advancements and Challenges”. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 18 (2024), KE07-KE11. URL: [https://jcdr.net/articles/PDF/20245/73869_CE\[Ra1\]_QC\(RD\)_F\(IS\)_PF1\(RI_SS\)_PFA\(KM\)_PB\(RI_SS\)_PN\(SS\).pdf](https://jcdr.net/articles/PDF/20245/73869_CE[Ra1]_QC(RD)_F(IS)_PF1(RI_SS)_PFA(KM)_PB(RI_SS)_PN(SS).pdf).

- [50] J. Schindelin et al. „Fiji: an open-source platform for biological-image analysis”. *Nature Methods* 9 (2012), 676-682. URL: <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.
- [51] A. B. Schroeder et al. „The ImageJ ecosystem: Open-source software for image visualization, processing, and analysis”. *Protein Science* 30 (2021), 234-249. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pro.3993>.
- [52] C. J. Werner et al. *MCNP Version 6.2 Release Notes*. Sprawozdanie techniczne. 2018. URL: <https://www.osti.gov/biblio/1419730>.
- [53] T. Goorley et al. „Initial MCNP6 Release Overview”. *Nuclear Technology* 180 (2012), 298-315. URL: <https://doi.org/10.13182/NT11-135>.
- [54] Los Alamos National Laboratory (LANL). „ACE Continuous-energy data for use in codes like MCNP®” (2025). URL: <https://nucleardata.lanl.gov/libraries/ace/>.
- [55] R. M. Evan et al. *MCNP Code V.6.3.0 Release Notes*. Sprawozdanie techniczne. Los Alamos National Laboratory (LANL), Los Alamos, NM (United States), 2023. URL: <https://www.osti.gov/biblio/1909545>.
- [56] Z. Cai et al. „(MCNP) Modeling of the Cellular Dosimetry of ^{64}Cu : Comparison with MIRDcell S Values and Implications for Studies of Its Cytotoxic Effects”. *Society of Nuclear Medicine* 58 (2017), 339-345. URL: <https://jnm.snmjournals.org/content/58/2/339>.
- [57] G. Tamborino et al. „Cellular dosimetry of ^{177}Lu Lu-DOTA-[Tyr3]octreotate radionuclide therapy: the impact of modeling assumptions on the correlation with in vitro cytotoxicity”. *EJNMMI Physics* 7 (2020). URL: <https://doi.org/10.1186/s40658-020-0276-5>.
- [58] Z. Cai et al. „Cellular dosimetry of ^{197}Hg , $^{197\text{m}}\text{Hg}$ and ^{111}In : comparison of dose deposition and identification of the cell and nuclear membrane as important targets”. *International Journal of Radiation Biology* 99 (2023), 53-63. URL: <https://doi.org/10.1080/09553002.2020.1849850>.
- [59] C. J. Werner et al. *MCNP User's Manual Code Version 6.2*. Sprawozdanie techniczne. Los Alamos, NM, USA: Los Alamos National Laboratory, 2017. URL: https://mcnp.lanl.gov/pdf_files/TechReport_2018_LANL_LA-UR-18-20808_WernerBullEtAl.pdf.
- [60] K. Zieb et al. *Review of heavy charged particle transport in MCNP6.2*. Sprawozdanie techniczne. 2018, s. 77-87. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168900218300020>.
- [61] R. J. McConn et al. *Compendium of Material Composition Data for Radiation Transport Modeling*. Sprawozdanie techniczne. Radiation Portal Monitor Project. Pacific Northwest National Laboratory, 2011.

- [62] M. Araszkievicz et al. „The irradiation system for studying biological effects in glioblastoma cell lines after exposure to high LET α particles appearing in BNCT therapy”. *Acta Physica Polonica B Proceedings Supplement* 17 (2024), 3-A36. URL: <https://doi.org/10.5506/APhysPolBSupp.17.3-A36>.
- [63] G. Zhang et al. „Efficient Preparation of Poly(allyl diglycol carbonate) (PADC) Nuclear Track Detectors: UV Photopolymerization”. *Polymers* 16 (2024). ISSN: 2073-4360. URL: <https://www.mdpi.com/2073-4360/16/13/1891>.
- [64] A. Szydłowski et al. „Influence of intensive γ and electron radiation on tracks formation in the PM-355 detectors”. *Radiation Measurements* 36 (2003), 111-113. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350448703001057>.
- [65] S. Gaillard et al. „Production and validation of CR-39-based dishes for alpha-particle radiobiological experiments”. *Radiation Research* 163 (2005), 343-350. URL: <https://hal.science/hal-00516007>.
- [66] T. W. Jeong et al. „CR-39 track detector for multi-MeV ion spectroscopy”. *Scientific Reports* 7 (2017). URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02331-w>.
- [67] A. Malinowska et al. „Calibration of new batches and a study of applications of nuclear track detectors under the harsh conditions of nuclear fusion experiments”. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 281 (2012), 56-63. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168583X12002030>.
- [68] L. C. Takahashi et al. „Radon dosimetry using Solid State Nuclear Track Detectors in different environments: a review”. *Applied Radiation and Isotopes* 186 (2022), 110217. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969804322001142>.
- [69] J. F. Ziegler. *SRIM - The Stopping and Range of Ions in Matter*. <http://www.srim.org/>. Dostęp: 2025-09-29. 2013.
- [70] Carter L. L. et al. „MCNP visual editor computer code manual”. 1995. URL: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:60856383>.
- [71] American Type Culture Collection (ATCC). *M059J [M059J human glioblastoma cell line] – karta produktu*. Dostęp: 2025-10-21. 2025. URL: <https://www.atcc.org/products/crl-2366>.
- [72] American Type Culture Collection (ATCC). *M059K [M059K human glioblastoma cell line] – karta produktu*. Dostęp: 2025-10-21. 2025. URL: <https://www.atcc.org/products/crl-2365>.
- [73] T. Saleh et al. „Effect of autophagy inhibitors on radiosensitivity in DNA repair-proficient and -deficient glioma cells”. *Medicina* 58 (2022), 889. URL: <https://doi.org/10.3390/medicina58070889>.

- [74] M. J. Allalunis-Turner et al. „Isolation of two cell lines from a human malignant glioma specimen differing in sensitivity to radiation and chemotherapeutic drugs”. *Radiation Research* 134 (1993), 349-354. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8316628/>.
- [75] Y. Liu et al. „DNA-PKcs deficiency inhibits glioblastoma cell-derived angiogenesis after ionizing radiation”. *Journal of Cellular Physiology* 230 (2015), 1094-1103. URL: <https://doi.org/10.1002/jcp.24841>.
- [76] K. Akopiants et al. „Tracking the processing of damaged DNA double-strand break ends by ligation-mediated PCR: Increased persistence of 3'-phosphoglycolate termini in SCAN1 cells”. *Nucleic Acids Research* 42 (2013), 3125-3137. URL: <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1347>.
- [77] L. Bee et al. „The efficiency of homologous recombination and non-homologous end joining systems in repairing double-strand breaks during cell cycle progression”. *PLOS ONE* 8 (2013), e69061. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069061>.
- [78] G. Chen et al. „Glioblastoma cells deficient in DNA-dependent protein kinase are resistant to cell death”. *Journal of Cellular Physiology* 203 (2004), 127-132. URL: <https://doi.org/10.1002/jcp.20230>.
- [79] Å. Holgersson et al. „Low and high LET radiation-induced apoptosis in M059J and M059K cells”. *International Journal of Radiation Biology* 79 (2003), 611-621. URL: <https://doi.org/10.1080/09553000310001596995>.
- [80] A. Munshi et al. „Clonogenic cell survival assay”. *Methods in molecular medicine* 110 (2005), 21-28. URL: <https://doi.org/10.1385/1-59259-869-2:021>.
- [81] N. A. P. Franken et al. „Clonogenic assay of cells in vitro”. *Nature Protocols* 1 (2006), 2315-2319. URL: <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>.
- [82] H. Rafehi et al. „Clonogenic Assay: Adherent Cells”. *Journal of Visualized Experiments* 49 (2011), e2573. URL: <https://app.jove.com/2573>.
- [83] T. T. Puck et al. „ACTION OF X-RAYS ON MAMMALIAN CELLS”. *Journal of Experimental Medicine* 103 (1956), 653-666. URL: <https://doi.org/10.1084/jem.103.5.653>.
- [84] N. Brix et al. „Analysis of clonogenic growth in vitro”. *Nature Protocols* 16 (2021), 4963-4991. URL: <https://doi.org/10.1038/s41596-021-00615-0>.
- [85] X. Yang et al. „Clonogenic Assay”. *Bio-protocol* 2 (2012), e187. URL: <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.187>.
- [86] M. Bukowicki. „Głębokie sieci neuronowe w analizie obrazów na przykładzie projektów realizowanych w Centrum Uczenia Maszynowego UW”. Referat wygłoszony podczas 48. Zjazdu Fizyków Polskich, Gdańsk, 1--7 września 2023. 2023. URL: <https://center4ml.idub.uw.edu.pl>.
- [87] G. Jocher et al. *YOLOv5 by Ultralytics*. Wersja 7.0. 2020. URL: <https://github.com/ultralytics/yolov5>.

- [88] F. C. Akyon et al. „Slicing Aided Hyper Inference and Fine-tuning for Small Object Detection”. *2022 IEEE International Conference on Image Processing (ICIP)* (2022), 966-970. URL: <https://ieeexplore.ieee.org/document/9897990>.
- [89] Google Research. *Google Colaboratory*. <https://colab.research.google.com>. Dostęp: 2025-10-10.
- [90] Project Jupyter. *Jupyter Notebook*. <https://jupyter.org>. Dostęp: 2025-10-10.
- [91] *CVAT: Computer Vision Annotation Tool*. <https://www.cvat.ai/>. Dostęp: 2025-10-10. 2025.
- [92] M. Ghasemi et al. „The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis”. *International Journal of Molecular Sciences* 22 (2021). URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/23/12827>.
- [93] E. V. Sazonova et al. „Drug toxicity assessment: cell proliferation versus cell death”. *Cell Death Discovery* 8 (2022), 417. URL: <https://doi.org/10.1038/s41420-022-01207-x>.
- [94] K. Buch et al. „Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT assay – a comparative study”. *Radiation Oncology* 7 (2012). URL: <https://doi.org/10.1186/1748-717X-7-1>.
- [95] M. Lobka et al. „Design, synthesis and evaluation of lysine- and leucine-rich hydrocarbon-stapled peptides as antibacterial agents”. *European Journal of Medicinal Chemistry* 290 (2025), 117445. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523425002107>.
- [96] L. Jezkova et al. „Particles with similar LET values generate DNA breaks of different complexity and reparability: a high-resolution microscopy analysis of γ H2AX/53BP1 foci”. *Nanoscale* 10 (2018), 1162-1179. URL: <https://doi.org/10.1039/C7NR06829H>.
- [97] U. S. Lee et al. „Characterization of γ -H2AX foci formation under alpha particle and X-ray exposures for dose estimation”. *Scientific Reports* 12 (2022), 3761. URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07653-y>.
- [98] A. Jucha et al. „FociCounter: a freely available PC programme for quantitative and qualitative analysis of γ -H2AX foci”. *Mutation Research* 696 (2010), 16-20. URL: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.12.004>.
- [99] K. Maliszewska-Olejniczak et al. „Immunofluorescence Imaging of DNA Damage and Repair Foci in Human Colon Cancer Cells”. *Journal of Visualized Experiments (JoVE)* (2020), e61399. URL: <https://doi.org/10.3791/61399>.
- [100] A. Jucha et al. *FociCounter: a freely available PC programme for quantitative and qualitative analysis of γ -H2AX foci*. Dostęp: 2025-10-23. 2009. URL: <https://focicounter.sourceforge.net/>.
- [101] E. Silva et al. „Transcriptional responses to DNA damage”. *DNA Repair (Amst)* 79 (2019), 40-49. ISSN: 1568-7864. URL: <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.05.002>.

- [102] G. Adams. „A beginner’s guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR”. *The Biochemist* 42 (2020), 48-53. URL: <https://doi.org/10.1042/BI020200034>.
- [103] K. V. Morris et al. „The rise of regulatory RNA”. *Nature Reviews Genetics* 15 (2014), 423-437. URL: <https://doi.org/10.1038/nrg3722>.
- [104] K. J. Livak et al. „Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method”. *Methods* 25 (2001), 402-408.
- [105] I. M. Artika et al. „Real-Time Polymerase Chain Reaction: Current Techniques, Applications, and Role in COVID-19 Diagnosis”. *Genes* 13 (2022). URL: <https://www.mdpi.com/2073-4425/13/12/2387>.
- [106] QIAGEN. *RNeasy Mini Handbook*. <https://www.qiagen.com/cn/resources/resourcedetail?id=f646813a-efbb-4672-9ae3-e665b3045b2b&lang=en>. Dostęp: 2025-10-14. 2023.
- [107] Bio-Rad Laboratories, Inc. *iScript cDNA Synthesis Kit, Instruction Manual (Inst-653 Ver D #4106228)*. <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4106228.pdf>. Dostęp: 2025-10-14. 2015.
- [108] Bio-Rad Laboratories, Inc. *iTaq Universal SYBR® Green Supermix — Product Information (Ver B #10000068167 / 10041157)*. <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10000068167.pdf>. Dostęp: 2025-10-14. 2019.
- [109] C. J. Miller et al. „Mycoplasma infection significantly alters microarray gene expression profiles”. *BioTechniques* 35 (2003), 812-814. URL: https://www.dkfz.de/genomics-proteomics/fileadmin/downloads/ContaminationControl/Miller_2003.pdf.
- [110] A. Dunisławska et al. „Kontaminacje w zwierzęcych kulturach komórkowych”. *Medycyna Weterynaryjna* 73 (2017), 69-73.
- [111] Biological Industries Israel Beit Haemek Ltd. *EZ-PCR Mycoplasma Detection Kit – Instructions for Use*. <https://api.sartorius.com/document-hub/dam/download/73134/EZ-PCR-Mycoplasma-Detection-Kit-Instructions-For-Use-en-B.pdf>. Dostęp: 2025-10-21. 2012.
- [112] K. Maliszewska-Olejniczak et al. „BKCa channel as a novel regulator of cellular DNA damage response in human bronchial epithelial cells in the presence of particulate matter”. *Scientific Reports* 15 (2025), 22789. URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-025-03824-9>.
- [113] National Center for Biotechnology Information (NCBI). *RefSeq: NCBI Reference Sequence Database*. Dostęp: 2025-10-21. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>.
- [114] Z. A. Ganjeh et al. „Simulation of direct DNA damages caused by alpha particles versus protons”. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 473 (2020), 10-15. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168583X20301816>.

- [115] Z. Nikitaki et al. „Measurement of complex DNA damage induction and repair in human cellular systems after exposure to ionizing radiations of varying linear energy transfer (LET)”. *Free Radical Research* 50 (2016), S64-S78. URL: <https://doi.org/10.1080/10715762.2016.1232484>.
- [116] M. J. Allalunis-Turner et al. „Radiation-Induced DNA Damage and Repair in Cells of a Radiosensitive Human Malignant Glioma Cell Line”. *Radiation Research* 144 (1995), 288-293. URL: <http://www.jstor.org/stable/3578948>.
- [117] Å. Holgersson et al. „Different G2/M accumulation in M059J and M059K cells after exposure to DNA double-strand break-inducing agents”. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 61 (2005), 915-921. URL: <http://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2004.10.036>.
- [118] J. A. Anderson et al. „Participation of DNA-PKcs in DSB Repair after Exposure to High- and Low-LET Radiation”. *Radiation Research* 174 (2010), 195-205. URL: <https://doi.org/10.1667/RR2071.1>.
- [119] B. S. Hoppe et al. „Complementation of the radiosensitive M059J cell line”. *Radiation Research* 153 (2000), 125-130. URL: [https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2000\)153\[0125:COTRMC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2000)153[0125:COTRMC]2.0.CO;2).
- [120] S. Zenvirt et al. „Status of p53 in human cancer cells does not predict efficacy of CHK1 kinase inhibitors combined with chemotherapeutic agents”. *Oncogene* 29 (2010), 6149-6159. URL: <https://doi.org/10.1038/onc.2010.343>.
- [121] H. Niida et al. „DNA damage checkpoints in mammals”. *Mutagenesis* 21 (2006), 3-9. URL: <https://doi.org/10.1093/mutage/gei063>.
- [122] E. J. Brown et al. „Essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance”. *Genes & Development* 17 (2003), 615-628. URL: <https://doi.org/10.1101/gad.1067403>.
- [123] L.-Y. Zhang et al. „Effects of expression level of DNA repair-related genes involved in the NHEJ pathway on radiation-induced cognitive impairment”. *Journal of Radiation Research* 54 (2013), 235-242. URL: <https://doi.org/10.1093/jrr/rrs095>.
- [124] H. Mahrhofer et al. „Radiation induced DNA damage and damage repair in human tumor and fibroblast cell lines assessed by histone H2AX phosphorylation”. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 64 (2006), 573-580. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2005.09.037>.
- [125] A. Franchitto et al. „The mammalian mismatch repair protein MSH2 is required for correct MRE11 and RAD51 relocalization and for efficient cell cycle arrest induced by ionizing radiation in G2 phase”. *Oncogene* 22 (2003), 2110-2120. URL: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206254>.
- [126] J. L. McFaline-Figueroa et al. „Minor changes in expression of the mismatch repair protein MSH2 exert a major impact on glioblastoma response to temozolomide”. *Cancer Research* 75 (2015), 3127-3138. URL: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3616>.

- [127] A. Yacoub et al. „Epidermal Growth Factor and Ionizing Radiation Up-regulate the DNA Repair Genes XRCC1 and ERCC1 in DU145 and LNCaP Prostate Carcinoma through MAPK Signaling”. *Radiation Research* 159 (2003), 439-452. URL: [https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2003\)159\[0439:EGFAIR\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2003)159[0439:EGFAIR]2.0.CO;2).
- [128] Z. G. Liu et al. „Relationship between methylation status of ERCC1 promoter and radiosensitivity in glioma cell lines”. *Cell Biology International* 33 (2009), 1111-1117. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1065699509001826>.

Dodatek

Pliki wejściowe do programu MCNP

Kod 6.1: Główny input do obliczeń charakterystyki cząstek α ze źródła ^{241}Am .

```
1      c
2      c
3      c -----definicja komórek-----
4      1  1  -0.001205  -1  9                      imp:A=1  $
5      2  5  -19.32      -9  2  -3                  imp:A=1  $ Am 0.4  $\mu\text{m}$ 
6      3  3  -19.32      -9  3  -4                  imp:A=1  $ Au 0.8  $\mu\text{m}$ 
7      4  4  -1.380000  -9  4  -5                  imp:A=1  $ Mylar 6  $\mu\text{m}$ 
8      5  1  -0.001205  -9  5  -6                  imp:A=1  $ pow. 6.8 mm
9      6  7  -1.31       -9  6  -7                  imp:A=1  $ detektor PADC
10     7  6  -1.03       -8  7  -12 fill=9          imp:A=1  $ komórki 3  $\mu\text{m}$ 
11     15 0                -15 u=9 lat=1 fill=-300:300 -300:300 & $
12     0:0 2 361200r                      imp:A=1  $
13     8  2  -1.0        -9  7  -12  8              imp:A=1  $ poza szkłem
14     9  1  -0.001205  -9  12 -10                  imp:A=1  $
15     10 1  -0.001205  -9  11 -2                   imp:A=1  $
16     c siatka
17     11 6  -1.03       -14          u=2 vol=0.0002667 imp:A=1  $ jądro
18     12 6  -1.03       -13 14      u=2 vol=0.0013983 imp:A=1  $ cytoplazma
19     13 2  -1.0        13          u=2 vol=0.0004555 imp:A=1  $ oczko siatki
20     1000 0  1                      imp:A=0  $ świat
21
22     c -----definicja powierzchni-----
23     1  rpp  -20 20  -20 20  -20 20              $ granice
24     2  pz   0                      $ start źródła
25     3  pz   0.00004                 $ źródło | złoto
26     4  pz   0.00012                 $ złoto | Mylar
27     5  pz   0.00072                 $ Mylar | powietrze
28     6  pz   0.68072                 $ powietrze | medium
29     61 pz   0.682525                 $ poziom pożywki 18.05 mm
30     7  pz   0.78072                 $ detektor 1 mm
31     8  cz   0 0 1.5                 $ r=1.5 cm
32     9  cz   0 0 2.5                 $ r=2.5 cm
33     10 pz   20                      $
34     11 pz  -20                      $
35     12 pz   0.78102                 $ komórki 3  $\mu\text{m}$ 
36     13 cz   0 0 0.0025                 $
37     14 cz   0 0 0.0010                 $
```

```

38 15 box -0.0025 -0.0025 0.682525 0.0050 0 0 0 0.0050 0 & $
39 0 0 0.0003 $ rozmiar wokseli
40 16 pz 0.68200 $
41 17 pz 0.683 $
42
43 c -----karta danych-----
44 mode A
45 m1 6012 -0.000124 $ C
46 7014 -0.755268 $ N
47 8016 -0.231781 $ O
48 18040 -0.012827 $ Ar
49 m2 1001 -0.111894 $
50 8016 -0.888106 $ woda
51 m3 79197 -1.000000 $ Au
52 m4 1001 -0.041960 $
53 6000 -0.625016 $
54 8016 -0.333024 $ Mylar
55 m5 8016 -0.0049725 $ O
56 95241 -0.0375275 $ Am
57 79197 -1 $ Au
58 m6 1001 -0.110667 $ Brain (ICRP) 1.03
59 6000 -0.12542 $
60 7014 -0.01328 $
61 8016 -0.737723 $
62 11023 -0.00184 $
63 12000 -0.00015 $
64 15031 -0.00354 $
65 16000 -0.00177 $
66 17000 -0.00236 $
67 19000 -0.00310 $
68 20000 -0.00009 $
69 26000 -0.00005 $
70 30000 -0.00001 $
71 m7 1001 0.4865 $ H-1 PADC
72 6000 0.3243 $ C-12
73 8000 0.189 $ O-16
74 PHYS:A 6 3J 0 $
75 CUT:A J 0 $
76 lost 1000000 $
77 sdef POS 0 0 0.00002 RAD=D1 EXT=D2 AXS 0 0 1 ERG=D3 $
78 SI3 L 5.388 5.4428 5.48556 5.5445 $ 4 energie (MeV)
79 SP3 0.017 0.131 0.848 0.004 $ intensywności
80 SI1 0 2.5 $ prom. wew./zewn. (cm)
81 SP1 -21 1 $
82 SI2 -0.00002 0.00002 $ wysokość (m)
83 SP2 -21 0 $ stały
84 f1:A 2 4 $ Tally F1
85 c1 0 1 $
86 f11:A 9 $
87 fs11 -2 -4 $
88 f2:A 6 7 $ Tally F2
89 c2 0 1 $
90 fm2 4367201 $

```

91	f4:A 6	\$ Tally F4
92	fm4 4367201	\$
93	fs4 -61	\$
94	sd4	\$
95	ft4 LET	\$ LET
96	f6:A 7 6 11 12 13	\$ Tally F6
97	fm6 4367201	\$
98	e0 0 49i 5	\$
99	e4 0 29i 3000	\$
100	nps 1e+8	\$
101	print	\$

Kod 6.2: Input do weryfikacji jednorodności depozycji cząstek α ze źródła ^{241}Am

1	c						
2	c						
3	c	-----definicja komórek-----					
4	1	1	-0.001205	-1	8	imp:A=1	\$
5	2	5	-19.32	-8	2 -3	imp:A=1	\$ Am 0.4 μm
6	3	3	-19.32	-8	3 -4	imp:A=1	\$ Au 0.8 μm
7	4	4	-1.380000	-8	4 -5	imp:A=1	\$ Mylar 6 μm
8	5	1	-0.001205	-8	5 -6	imp:A=1	\$ pow. 6.8 mm
9	6	6	-1.03	11	-8 7 -35	imp:A=1	\$ komórki 3 μm
10	7	1	-0.001205	-8	35 -9	imp:A=1	\$
11	8	1	-0.001205	-8	10 -2	imp:A=1	\$
12	10	6	-1.03	12	-11 7 -35	imp:A=1	\$
13	11	6	-1.03	13	-12 7 -35	imp:A=1	\$
14	12	6	-1.03	14	-13 7 -35	imp:A=1	\$
15	13	6	-1.03	15	-14 7 -35	imp:A=1	\$
16	14	6	-1.03	16	-15 7 -35	imp:A=1	\$
17	15	6	-1.03	17	-16 7 -35	imp:A=1	\$
18	16	6	-1.03	18	-17 7 -35	imp:A=1	\$
19	17	6	-1.03	19	-18 7 -35	imp:A=1	\$
20	18	6	-1.03	20	-19 7 -35	imp:A=1	\$
21	19	6	-1.03	21	-20 7 -35	imp:A=1	\$
22	20	6	-1.03	22	-21 7 -35	imp:A=1	\$
23	21	6	-1.03	23	-22 7 -35	imp:A=1	\$
24	22	6	-1.03	24	-23 7 -35	imp:A=1	\$
25	23	6	-1.03	25	-24 7 -35	imp:A=1	\$
26	24	6	-1.03	26	-25 7 -35	imp:A=1	\$
27	25	6	-1.03	27	-26 7 -35	imp:A=1	\$
28	26	6	-1.03	28	-27 7 -35	imp:A=1	\$
29	27	6	-1.03	29	-28 7 -35	imp:A=1	\$
30	28	6	-1.03	30	-29 7 -35	imp:A=1	\$
31	29	6	-1.03	31	-30 7 -35	imp:A=1	\$
32	30	6	-1.03	32	-31 7 -35	imp:A=1	\$
33	31	6	-1.03	33	-32 7 -35	imp:A=1	\$
34	32	6	-1.03	34	-33 7 -35	imp:A=1	\$
35	33	6	-1.03	-34	7 -35	imp:A=1	\$
36	34	2	-1.0	12	-11 -7 6	imp:A=1	\$
37	35	2	-1.0	13	-12 -7 6	imp:A=1	\$
38	36	2	-1.0	14	-13 -7 6	imp:A=1	\$
39	37	2	-1.0	15	-14 -7 6	imp:A=1	\$

40	38	2	-1.0	16	-15	-7	6	imp:A=1	\$
41	39	2	-1.0	17	-16	-7	6	imp:A=1	\$
42	40	2	-1.0	18	-17	-7	6	imp:A=1	\$
43	41	2	-1.0	19	-18	-7	6	imp:A=1	\$
44	42	2	-1.0	20	-19	-7	6	imp:A=1	\$
45	43	2	-1.0	21	-20	-7	6	imp:A=1	\$
46	44	2	-1.0	22	-21	-7	6	imp:A=1	\$
47	45	2	-1.0	23	-22	-7	6	imp:A=1	\$
48	46	2	-1.0	24	-23	-7	6	imp:A=1	\$
49	47	2	-1.0	25	-24	-7	6	imp:A=1	\$
50	48	2	-1.0	26	-25	-7	6	imp:A=1	\$
51	49	2	-1.0	27	-26	-7	6	imp:A=1	\$
52	50	2	-1.0	28	-27	-7	6	imp:A=1	\$
53	51	2	-1.0	29	-28	-7	6	imp:A=1	\$
54	52	2	-1.0	30	-29	-7	6	imp:A=1	\$
55	53	2	-1.0	31	-30	-7	6	imp:A=1	\$
56	54	2	-1.0	32	-31	-7	6	imp:A=1	\$
57	55	2	-1.0	33	-32	-7	6	imp:A=1	\$
58	56	2	-1.0	34	-33	-7	6	imp:A=1	\$
59	57	2	-1.0	11	-8	-7	6	imp:A=1	\$
60	58	2	-1.0	-34	-7	6		imp:A=1	\$
61	1000	0	1					imp:A=0	\$
62									
63	c	-----definicja powierzchni-----							
64	1	rpp	-20 20 -20 20 -20 20					\$	granica
65	2	pz	0					\$	start źródła
66	3	pz	0.00004					\$	źródło Au
67	4	pz	0.00012					\$	Au Mylar
68	5	pz	0.00072					\$	Mylar powietrze
69	6	pz	0.68072					\$	pow. komórki
70	7	pz	0.682525					\$	medium 18.05 mm
71	8	cz	0 0 2.5					\$	
72	9	pz	20					\$	
73	10	pz	-20					\$	
74	11	cz	0 0 2.4					\$	
75	12	cz	0 0 2.3					\$	
76	13	cz	0 0 2.2					\$	
77	14	cz	0 0 2.1					\$	
78	15	cz	0 0 2.0					\$	
79	16	cz	0 0 1.9					\$	
80	17	cz	0 0 1.8					\$	
81	18	cz	0 0 1.7					\$	
82	19	cz	0 0 1.6					\$	
83	20	cz	0 0 1.5					\$	
84	21	cz	0 0 1.4					\$	
85	22	cz	0 0 1.3					\$	
86	23	cz	0 0 1.2					\$	
87	24	cz	0 0 1.1					\$	
88	25	cz	0 0 1.0					\$	
89	26	cz	0 0 0.9					\$	
90	27	cz	0 0 0.8					\$	
91	28	cz	0 0 0.7					\$	
92	29	cz	0 0 0.6					\$	

```

93      30  cz    0 0 0.5                                $
94      31  cz    0 0 0.4                                $
95      32  cz    0 0 0.3                                $
96      33  cz    0 0 0.2                                $
97      34  cz    0 0 0.1                                $
98      35  pz    0.682825                                $ komórki | reszta
99
100     c -----karta danych-----
101     mode A
102     m1  6012  -0.000124                                $ C
103           7014  -0.755268                                $ N
104           8016  -0.231781                                $ O
105           18040 -0.012827                                $ Ar
106     m2  1001  -0.111894                                $
107           8016  -0.888106                                $ woda
108     m3  79197 -1.000000                                $ Au
109     m4  1001  -0.041960                                $
110           6000  -0.625016                                $
111           8016  -0.333024                                $ Mylar
112     m5  8016  -0.0049725                               $ O
113           95241 -0.0375275                              $ Am
114           79197 -1                                       $ Au
115     m6  1001  -0.110667                                $ Brain (ICRP)
116           6000  -0.12542                                $
117           7014  -0.01328                                $
118           8016  -0.737723                                $
119           11023 -0.00184                                $
120           12000 -0.00015                                $
121           15031 -0.00354                                $
122           16000 -0.00177                                $
123           17000 -0.00236                                $
124           19000 -0.0031                                 $
125           20000 -0.00009                                $
126           26000 -0.00005                                $
127           30000 -0.00001                                $
128     PHYS:A  6 3J 0                                     $
129     CUT:A   J 0                                         $
130     sdef POS 0 0 0.00002 RAD=D1 EXT=D2 AXS 0 0 1 ERG=D3  $
131     SI3  L 5.388 5.4428 5.48556 5.5445                $ energie (MeV)
132     SP3    0.017 0.131 0.848 0.004                    $ intensywności
133     SI1    0 2.5                                         $ promienie (cm)
134     SP1   -21 1                                          $
135     SI2   -0.00002 0.00002                             $ wysokość (m)
136     SP2   -21 0                                          $
137     f1:A  2 4                                           $ Tally F1
138     c1 0 1                                              $
139     f11:A  8                                             $
140     fs11 -2 -4                                           $
141     f4:A  6 10-33                                        $ Tally F4
142     fm4  4367201                                         $
143     f6:A  6 10-33                                        $
144     fm6  4367201                                         $ Tally F6
145     e0 0 49i 5                                          $

```

146	nps 1e+10	\$
147	print	\$

Kod 6.3: Input do obliczeń depozycji cząstek α ze źródła ^{241}Am w detektorze krzemowym

```

1      c
2      c
3      c -----definicja komórek-----
4      1  1  -0.001205  -1  9                      imp:A=1      $
5      2  5  -19.32      -9  2  -3                  imp:A=2      $ Am 0.4  $\mu\text{m}$ 
6      3  3  -19.32      -9  3  -4                  imp:A=4      $ Au 0.8  $\mu\text{m}$ 
7      4  4  -1.380000  -9  4  -5                  imp:A=8      $ Mylar 6  $\mu\text{m}$ 
8      5  6  -0.9        -9  8  5  -6              imp:A=16     $ ring 3 mm
9      6  7  -2.698900  -9  8  6  -7              imp:A=32     $ kolimator 1
10     7  1  -0.00000936 -9  7  -12              imp:A=64     $ próżnia
11     8  1  -0.001205  -9  15 -10              imp:A=1      $
12     9  1  -0.001205  -9  11 -2              imp:A=1      $
13     10 1  -0.00000936 -8  5  -6              imp:A=16     $ próżnia
14     11 1  -0.00000936 -8  6  -7              imp:A=32     $ próżnia
15     12 7  -2.698900  -9  8  12 -14           imp:A=128    $ kolimator 2
16     13 1  -0.00000936 -8  12 -14           imp:A=128    $ próżnia
17     14 8  -2.330000  -8  14 -15           imp:A=256    $ detektor
18     15 1  -0.001205  -9  8  14 -15         imp:A=256    $
19     1000 0  1                      imp:A=0      $ świat
20
21     c -----definicja powierzchni-----
22     1  rpp -20 20 -20 20 -20 20              $
23     2  pz  0                      $ początek źródła
24     3  pz  0.00004                  $ granica źródła | Au
25     4  pz  0.00012                  $ Au | Mylar
26     5  pz  0.00072                  $ Mylar | ring
27     6  pz  0.30072                  $ ring | kolimator
28     7  pz  0.55072                  $ kolimator 1 | próżnia
29     8  cz  0 0 1.0                  $
30     9  cz  0 0 2.5                  $
31     10 pz  20                      $
32     11 pz  -20                      $
33     12 pz  3.82072                  $ próżnia | kolimator 2
34     13 cz  0 0 0.3                  $
35     14 pz  4.12072                  $ kolimator 2 | detektor
36     15 pz  4.120925                 $
37
38     c -----karta danych-----
39     mode A
40     m1 6012 -0.000124                $ C
41         7014 -0.755268                $ N
42         8016 -0.231781                $ O
43         18040 -0.012827                $ Ar
44     m2 1001 -0.111894                $
45         8016 -0.888106                $ woda
46     m3 79197 -1.000000                $ Au
47     m4 1001 -0.041960                $
48         6000 -0.625016                $

```

49	8016	-0.333024	\$ Mylar
50	m5 8016	-0.0049725	\$ 0
51	95241	-0.0375275	\$ Am
52	79197	-1	\$ Au
53	m6 1001	-0.143711	\$ PP
54	6000	-0.856289	\$
55	m7 13027	-1.000000	\$ Al
56	m8 14000	-1.000000	\$ Si
57	PHYS:A 6 3J 0		\$
58	CUT:A J 0		\$
59	sdef POS 0 0 0.00002 RAD=D1 EXT=D2 AXS 0 0 1 ERG=D3		\$
60	SI3 L 5.388 5.4428 5.48556 5.5445		\$ energie (MeV)
61	SP3 0.017 0.131 0.848 0.004		\$ intensywności
62	SI1 0 2.5		\$ promienie (cm)
63	SP1 -21 1		\$
64	SI2 -0.00002 0.00002		\$ wysokość (m)
65	SP2 -21 0		\$
66	f1:A 2 4		\$ Tally F1
67	c1 0 1		\$
68	f11:A 9		\$
69	fs11 -2 -4		\$
70	f2:A 14		\$
71	fm2 4367201		\$ Tally F2
72	f4:A 14		\$
73	fm4 4367201		\$ Tally F4
74	f14:A 14		\$
75	ft14 geb 0.657 -0.272 0		\$
76	fm14 4367201		\$ Tally F6
77	e0 1.0 98i 5.7		\$
78	nps 1e+10		\$
79	print		\$