

Rozprawa doktorska

**Wpływ wiązek mieszanych
promieniowania jonizującego
na dynamikę naprawy uszkodzeń
DNA w komórkach U2OS**

Adrianna Tartas

Promotorzy:

dr hab. Beata Brzozowska

dr hab. Jarosław Żygierewicz, prof. UW

Zakład Fizyki Biomedycznej

Instytut Fizyki Doświadczalnej

Dyscyplina: **nauki fizyczne**

Warszawa, listopad 2023

Streszczenie

Podwójnoniciowe uszkodzenia DNA są szczególnie szkodliwą formą uszkodzeń, które mogą różnić się stopniem złożoności w zależności od czynnika, który je indukuje. W reakcji na tego typu uszkodzenia, komórki inicjują wieloetapowy proces odpowiedzi biologicznej. Promieniowanie α , charakteryzujące się dużą gęstością jonizacji, wywołuje złożone uszkodzenia skupione w niewielkiej objętości. Pośrednio jonizujące promieniowanie γ indukuje rozproszone, proste uszkodzenia, głównie poprzez produkcję reaktywnych form tlenu. Badania nad wpływem zastosowania promieniowania jonizującego na materiał biologiczny pozostają obszarem intensywnych badań, w szczególności gdy napromienianie odbywa się z wykorzystaniem różnych typów promieniowania dostarczanych razem.

Celem pracy było zbadanie wpływu sekwencyjnych wiązek mieszanych promieniowania jonizującego na odpowiedź biologiczną komórek nowotworowych kostniakomięsaka. Do zbadania efektu oddziaływania dwóch rodzajów promieniowania oraz jego wpływu na indukcję uszkodzeń DNA został wykorzystany test radiobiologiczny, który polega na analizie ognisk naprawczych białka NBS1. Obserwacje obejmowały analizę powstawania i zanikania ognisk, ich rozmiaru, intensywności oraz ruchliwości. Porównane zostały skutki napromienienia komórek promieniowaniem α i γ stosowanymi osobno oraz sekwencyjnie z uwzględnieniem kolejności. Do obserwacji ognisk został użyty mikroskop fluorescencyjny do obrazowania żywych komórek w czasie rzeczywistym.

Przed przystąpieniem do badań radiobiologicznych, przeprowadzona została dozymetria źródeł dostępnych w laboratorium Zakładu Biologii Molekularnej Uniwersytetu w Sztokholmie, które były używane do napromienienia materiału biologicznego. Do sprawdzenia przestrzennego rozkładu dawki źródła promieniowania γ wykorzystane zostały certyfikowane dozymetry aktywne i pasywne, jak i dozymetr krzemowy wykonany w ramach współpracy z Wydziałem Fizyki Uniwersytetu w Sztokholmie. Weryfikacja dozymetryczna źródła promieniowania α została przeprowadzona w oparciu o symulacje komputerowe z wykorzystaniem metod Monte Carlo.

Uzyskane wyniki wskazują na wpływ kolejności stosowania promieniowania charakteryzującego się różnym sposobem oddziaływania na indukcję DNA oraz szybkości i jakości ich naprawy. Ekspozycja na sekwencyjne wiązki mieszane, gdzie promieniowanie α było stosowane jako pierwsze, wywołała silniejszy efekt biologiczny: największą liczbę powstałych ognisk naprawczych o największym rozmiarze oraz najwolniejszej naprawie. Możliwe wyjaśnienia sugerują, że otwarcie chromatyny indukowane przez cząstki α może nasilać uszkodzenia poprzez ekspozycję DNA na rodniki indukowane promieniowaniem γ , lub też aktywacja mechanizmu naprawy jest silniejsza, gdy indukcja uszkodzeń cząstkami α poprzedza uszkodzenia rozproszone indukowane promieniowaniem γ .

Słowa kluczowe

promieniowanie jonizujące, dozymetria, modelowanie metodami Monte Carlo, cząstki α , promieniowanie γ , sekwencyjne wiązki mieszane, uszkodzenia i naprawa DNA

Abstract

Double-strand DNA damage is a particularly cytotoxic form of damage that can vary in complexity depending on the inducing factor. In response to such damage, cells initiate a multistep process of biological response. The α particles, characterized by high ionization density, induce complex damage concentrated in a small volume. Indirectly ionizing γ radiation induces scattered, simple damage, primarily through the production of reactive oxygen species. Studies on the impact of ionizing radiation on biological material remain an area of intensive investigation, especially when irradiation involves the simultaneous use of different types of radiation.

The aim of the study was to investigate the effect of sequential mixed beams of ionizing radiation on the biological response of osteosarcoma tumor cells. To examine the effect of the interaction of two types of radiation and its impact on the induction of DNA damage, a radiobiological test involving the analysis of repair foci of the NBS1 protein was used. The observations included an analysis of the formation and disappearance of foci, their size, intensity and mobility. The effects of cell irradiation with α and γ radiation used separately and sequentially were compared, considering the order of exposure. A fluorescence microscope for real-time imaging to observe the repair foci.

Before performing radiobiological experiments, dosimetry of the sources available in the Department of Molecular Biosciences at the Stockholm University was conducted. These sources were used for irradiating biological material. To verify the spatial distribution of the absorbed dose from the γ radiation source, certified active and passive dosimeters, as well as a silicon dosimeter developed in collaboration with the Department of Physics of the Stockholm University, were employed. Dosimetric verification of the α radiation source was performed through computer simulations using Monte Carlo methods.

The obtained results indicate the influence of the order of irradiation, characterized by different effects on DNA induction as well as the rate and quality of their repair. Exposure to sequential mixed beams, where α radiation was delivered first, resulted in a stronger biological effect: the highest number of formed repair foci with the largest size and the slowest repair. Possible explanations suggest that chromatin opening induced by α particles may enhance damage by exposure of DNA to radicals induced by γ radiation, or the activation of the repair mechanism is stronger when the induction of damage by α particles precedes sparsely radiation-induced damage γ .

Keywords

ionizing radiation, dosimetry, Monte Carlo modeling, α particles, γ radiation, sequential mixed beams, DNA damage and repair

Podziękowania

*W pierwszej kolejności pragnę podziękować **Beacie Brzozowskiej** za nieocenioną pomoc, inspirację i wsparcie, które otrzymałam od początku mojej przygody z fizyką medyczną. Twoja wiedza, doświadczenie i nieoceniona pomoc odegrały kluczową rolę podczas moich studiów i badań.*

*Dziękuję również **Jarosławowi Żygierewiczowi** za cenne uwagi oraz konstruktywną krytykę, które były dla mnie niezwykle pomocne i umożliwiły podniesienie jakości mojej pracy.*

*Wyrazy podziękowania kieruję do **Andrzeja Wójcika** za serdeczne przyjęcie mnie do swojej grupy badawczej oraz za poświęcony czas, cierpliwość i owocną współpracę, której wyniki stanowią istotną część niniejszej rozprawy.*

*Podziękowania należą się również zespołowi z pokoju 4.58: **Mateuszowi Filipkowi**, **Monice Mietelskiej** i **Beacie Pszczółkowskiej**. Dziękuję za Waszą życzliwość i poczucie humoru.*

Pragnę serdecznie podziękować wszystkim osobom, z którymi miałam przyjemność współpracować w trakcie pracy naukowej. Z pewnością duża część satysfakcji z mojej pracy wynika z możliwości współpracy z mądrymi i inspirującymi ludźmi.

*Chciałabym wyrazić swoją wdzięczność osobom, które, choć niezwiązane bezpośrednio z nauką, odegrały ważną rolę w powstaniu niniejszej pracy. Dziękuję moim **Rodzicom** za niekończącą się cierpliwość i motywację. Zawsze byliście moim wsparciem i inspiracją. Dziękuję również mojemu **Mężowi** za nieustające zrozumienie, poświęcenie i wyrozumiałość. Twoja obecność sprawiła, że każdy trudny dzień stał się łatwiejszy, a każdy sukces bardziej radosny. Swojej **Siostrze** dziękuję za codzienną dawkę uśmiechu i motywacji.*

Spis treści

Wykaz skrótów	i
1 Wprowadzenie	1
1.1 Cel pracy	2
1.2 Układ pracy	3
1.3 Spis publikacji	3
2 Oddziaływanie promieniowania jonizującego z materiałą	5
2.1 Promieniowanie korpuskularne	5
2.2 Cząstki neutralne	7
2.3 Dawka i liniowy przekaz energii	10
2.4 DNA	11
2.5 Etapy oddziaływania promieniowania z materiałem biologicznym	13
2.5.1 Etap fizyczny	14
2.5.2 Etap chemiczny	14
2.5.3 Etap biologiczny	15
2.6 Uszkodzenia materiału biologicznego	16
2.6.1 Względna skuteczność biologiczna	17
2.6.2 Współczynnik wzmożenia tlenowego	19
2.7 Naprawa uszkodzeń DNA	19
2.7.1 Ścieżki naprawy DNA	20
2.7.2 Białko NBS1	22
3 Badania radiobiologiczne	23
3.1 Badania <i>in vitro</i>	23
3.1.1 Przeżywalność komórkowa	23
3.1.2 Aberracje chromosomowe i mikrojądra	24
3.1.3 Ogniska naprawcze i ich mobilność	26
3.1.4 i-BLESS	28
3.2 Badania <i>in silico</i>	28
4 Materiały i metody	31
4.1 Materiał komórkowy	31
4.2 Układ eksperymentalny	32
4.2.1 Promieniowanie α	32

4.2.2	Promieniowanie γ	33
4.3	Procedury eksperymentalne	34
4.3.1	Napromienianie sekwencyjnymi wiązkami mieszanymi	34
4.3.2	Mikroskopia fluorescencyjna żywych komórek	37
4.4	Analiza obrazów ognisk naprawczych i prezentacja wyników	38
4.5	Analiza statystyczna	39
5	Dozymetria	41
5.1	Narzędzia	41
5.1.1	Teoretyczna weryfikacja dozymetryczna	41
5.1.2	Doświadczalna weryfikacja dozymetryczna	43
5.2	Wyniki	46
5.2.1	Symulacje MC dla źródła cząstek α	46
5.2.2	Weryfikacja pomiarów dla źródła fotonowego	50
5.3	Dyskusja i wnioski	52
6	Charakterystyka ognisk naprawczych	55
6.1	Kinetyka powstawania i zanikania ognisk naprawczych	55
6.2	Zmiana rozmiaru ognisk naprawczych	57
6.3	Intensywność ognisk naprawczych	60
6.4	Dyskusja i wnioski	63
7	Mobilność ognisk naprawczych	67
7.1	Dyskusja i wnioski	69
8	Podsumowanie i perspektywy	73
A	Protokół laboratoryjny hodowli komórek U2OS	95
B	Dostęp do danych eksperymentalnych	97
C	Materiały uzupełniające	99

Wykaz skrótów

bp	(ang. <i>base pairs</i>) pary zasad
c-NHEJ	(ang. classical non-homologous end joining) standardowa ścieżka niehomologicznego łączenia końców
CV	(ang. <i>coefficient of variation</i>) współczynnik zmienności
DDR	(ang. <i>DNA damage response</i>) odpowiedź na uszkodzenie DNA
DSB	(ang. <i>double-strand break</i>) podwójnoniciowe uszkodzenie
DNA	(ang. <i>deoxyribonucleic acid</i>) kwas deoksyrybonukleinowy
GFP	(ang. <i>green fluorescent protein</i>) białko zielonej fluorescencji
HR	(ang. <i>homologous recombination</i>) rekombinacja homologiczna
ICRU	(ang. <i>International Commission on Radiation Units & Measurements</i> , Międzynarodowa Komisja ds. Jednostek Promieniowania i Pomiarów
IMRT	(ang. <i>intensity modulated radiation therapy</i>) radioterapia z modulacją intensywności wiązki
LET	(ang. <i>linear energy transfer</i>) liniowy przekaz energii
MC	Monte Carlo
MSD	(ang. <i>mean square displacement</i>) średnie przemieszczenie kwadratowe
MRN	kompleks białek, który bierze udział w odpowiedzi na uszkodzenia DNA
NBS1	składnik kompleksu MRN, białko biorące udział w naprawie DNA
NHEJ	(ang. <i>non-homologous end joining</i>) niehomologiczne łączenie końców
OER	(ang. <i>oxygen enhancement ratio</i>) współczynnik wzmożenia tlenowego
RBE	(ang. <i>relative biological effectiveness</i>) względna skuteczność biologiczna
RIF	(ang. <i>radiation-induced focus</i>) ognisko indukowane promieniowaniem jonizującym
SD	(ang. <i>standard deviation</i>) odchylenie standardowe

SF	(ang. <i>surviving fraction</i>) frakcja przeżywalności
SSB	(ang. <i>single-strand break</i>) pojedynczoniciowe uszkodzenie
ssDNA	(ang. <i>single-stranded DNA</i>) jednoniciowe DNA
U2OS	linia komórkowa nowotworu mięsaka kościopochodnego

Rozdział 1

Wprowadzenie

Promieniowanie jest częścią naturalnego środowiska. Na promieniowanie pochodzące z naturalnych, jak i sztucznych źródeł organizm ludzki jest narażony każdego dnia. To promieniowanie składa się z promieniowania kosmicznego, substancji radioaktywnych obecnych w skorupie ziemi (oraz ich produktów rozpadu), a także z radioaktywnych izotopów obecnych w naszych organizmach (Mc Laughlin, 2015). Promieniowanie pochodzące z kosmosu, które jest znaczące dla astronautów w przestrzeni kosmicznej, może również przenikać przez atmosferę i docierać do nas na przykład podczas lotów samolotem (Di Trolio et al., 2015). Promieniotwórczy radon, który jest emitowany ze skorupy ziemskiej, przyczynia się do ekspozycji na promieniowanie α (Tollefsen et al., 2014). Nasze organizmy zawierają naturalne izotopy, takie jak ^{14}C , ^{210}Pb i ^{40}K (ICRP, 2017). Znaczny udział mają również zastosowania medyczne promieniowania. Procedury diagnostyki medycznej oraz terapii pacjentów onkologicznych stają się coraz bardziej powszechne na całym świecie, a ^{137}Cs z opadu radioaktywnego po katastrofie w Czarnobylu oraz inne nuklidy z prób jądrowych są obecne w naszym pożywieniu (Sadasivan and Mishra, 1986). Dla większości ludzi ten poziom promieniowania nie wywołuje mierzalnych negatywnych efektów stochastycznych, takich jak rozwijanie się nowotworów. Niemniej jednak, określenie ewentualnego niebezpieczeństwa związanego z ekspozycją na promieniowanie jonizujące jest jednym z głównych celów badań nad promieniowaniem (Wojcik and Harms-Ringdahl, 2019). Eksperymenty, które są przeprowadzane w celu badania skutków promieniowania, dostarczają informacji o uszkodzeniach materiału genetycznego znajdującego się w komórkach żywych, które są indukowane przez promieniowanie oraz naprawiane.

W wielu badaniach dotyczących wpływu promieniowania jonizującego do indukcji uszkodzeń DNA wykorzystywany był jeden konkretny rodzaj promieniowania. Ważne jest jednak zrozumienie, jaka jest odpowiedź materiału biologicznego, jeśli jest on poddany działaniu różnych rodzajów promieniowania jonizującego podawanych jednocześnie lub w krótkich odstępach czasu. Narażenie na promieniowanie mieszane ma miejsce podczas wypadków radiacyjnych, lotów samolotem, a zwłaszcza w trakcie misji kosmicznych, gdzie promieniowanie mieszane jest wynikiem oddziaływania promieniowania kosmicznego z osłonami statków kosmicznych. Naturalne promieniowanie mieszane występuje w niektórych obszarach na świecie, w tym w Brazylii, w chińskim Yangjian, na indyjskim wybrzeżu Kerala oraz w irańskim Ramsar (Abbasi et al., 2019). Poziom tego promieniowania jest aż o kilkaset razy wyższy niż średnie promieniowanie tła obserwowane w Polsce.

Naturalne narażenie na promieniowanie w Polsce wynosi około 2,58 mSv rocznie (PAA, 2023). W radioterapii z zastosowaniem nowoczesnych technik leczenia pacjentów ekspozycja na promieniowanie mieszane występuje podczas długich sesji terapeutycznych z wykorzystaniem wiązki o modulowanej intensywności (ang. *intensity modulated radiation therapy*, IMRT) (Toma-Dasu et al., 2017). Oddziaływanie wysokoenergetycznego promieniowania jonizującego z ciałem pacjenta czy kolimatorami służącymi do zawężania pola promieniowania, powoduje zwiększenie niepożądanych dawek od wygenerowanego w ten sposób promieniowania rozproszonego (rozproszone promieniowanie X) i wtórnego (neutrony, promieniowanie γ). Podobny efekt występuje w terapii borowo-neutronowej (ang. *Boron Neutron Capture Therapy*, BNCT), w której pacjent jest napromieniany wiązką neutronów o konkretnej energii (neutrony epitermiczne). Neutrony zderzają się z jądrami atomów boru podanych pacjentowi wcześniej w postaci farmaceutyku zawierającego nieradioaktywny izotop tego pierwiastka (Malouff et al., 2021). Jądro boru po wychwycie neutronu ulega rozpadowi na jądro pierwiastka litu oraz cząstkę wysokoenergetycznego promieniowania α .

Szczególnie ważne jest zrozumienie, czy ekspozycja na kilka rodzajów promieniowania jonizującego podawanego w krótkim odstępie czasu prowadzi do oddziaływania addytywnego (czyli sumy oddziaływań poszczególnych rodzajów promieniowania) czy synergicznego (co oznacza osiągnięcie większego efektu biologicznego niż prosta suma efektów oddzielnych składników) (Streffer and Müller, 1987). Nadal nie ma jednoznacznej odpowiedzi, jakie są biologiczne konsekwencje napromienienia materiału komórkowego z wykorzystaniem co najmniej dwóch typów promieniowania jonizującego różniących się między sobą sposobem oddziaływania z atomami ośrodka. Badania, które koncentrują się na odpowiedzi na pytanie, czy narażenie na promieniowanie mieszane prowadzi do tworzenia się kompleksowych uszkodzeń wykraczających poza poziom oczekiwany z addytywnego działania obu rodzajów promieniowania, mogą być pomocne w zrozumieniu, w jaki sposób jakość promieniowania wpływa na biologiczne konsekwencje ekspozycji komórek żywych na promieniowanie jonizujące.

1.1 Cel pracy

Celem niniejszej pracy jest zbadanie wpływu zastosowania sekwencyjnych wiązek mieszanych promieniowania jonizującego na dynamikę powstawania ognisk naprawczych w komórkach nowotworowych mięsaka kościopochodnego. Do napromieniania materiału biologicznego zostało użyte promieniowanie γ oraz cząstki α . Procesy formowania i zanikania ognisk naprawczych zostały zarejestrowane za pomocą mikroskopii poklatkowej. Analiza otrzymanych obrazów umożliwiła scharakteryzowanie przestrzenno-czasowej ewolucji powstawania ognisk.

Dodatkowo przeprowadzona została dozymetria źródeł, którymi napromieniany został materiał biologiczny w czasie eksperymentu. Oprócz dozymetrii doświadczalnej przy użyciu różnego rodzaju detektorów wykonane zostały obliczenia przy pomocy metod Monte Carlo (MC), które umożliwiły scharakteryzowanie sposobu oddziaływania promieniowania jonizującego z materiałem biologicznym.

Wyniki projektu przedstawione w pracy dostarczają wyraźnych (jednak wciąż niekompletnych) argumentów na rzecz prawdziwości hipotezy o różnicy w powstawaniu i naprawie uszkodzeń DNA w wyniku ekspozycji na promieniowanie o różnej charakterystyce oddziaływania z materią stosowane w sekwencyjnych wiązkach mieszanych podawanych w różnej kolejności.

1.2 Układ pracy

Praca doktorska składa się z ośmiu głównych rozdziałów. Pierwszy rozdział stanowi wprowadzenie czytelnika w tematykę badań, motywację zaplanowanych eksperymentów oraz ujęcie tematyki pracy i określenie znaczenia otrzymanych wyników w dziedzinie fizyki medycznej.

W drugim rozdziale, który jest wstępem teoretycznym, zostały omówione podstawy oddziaływania promieniowania jonizującego z materiałem biologicznym. Przedstawione zostały parametry i wielkości służące do opisu jakości i efektywności promieniowania w kontekście indukcji uszkodzeń DNA, a także mechanizmy naprawy komórek w przypadku uszkodzeń materiału genetycznego. Trzeci rozdział poświęcony jest wybranym testom radiobiologicznym, istotnym w badaniu oddziaływania promieniowania jonizującego z materiałem komórkowym, prezentując techniki szczególnie istotne w kontekście pracy.

Rozdział czwarty prezentuje użyte w eksperymentach radiobiologicznych materiały i metody, szczegółowo opisując układ doświadczalny. Sekcja ta dostarcza informacji dotyczących procesu napromieniania komórek oraz obserwacji ognisk naprawczych pod mikroskopem fluorescencyjnym. Ze względu na prowadzenie badań z wykorzystaniem źródeł promieniotwórczych, przeprowadzone zostały pomiary dozymetryczne, co zostało szczegółowo omówione w rozdziale piątym. Przedstawiona została również charakterystyka dozymetryczna użytych w projekcie źródeł promieniowania jonizującego.

W kolejnych dwóch rozdziałach zostały zebrane i omówione najważniejsze wyniki analizy obrazów ognisk naprawczych znajdujących się w jądrach komórkowych poddanych działaniu promieniowania jonizującego. Określone zostały parametry opisujące proces naprawy uszkodzeń w materiale genetycznym. W rozdziale szóstym zawarte są informacje dotyczące liczby i rozmiarów ognisk naprawczych, jak również ich intensywności. Natomiast w rozdziale siódmym opisana została analiza mobilności ognisk naprawczych w oparciu o podstawy teorii ruchów Browna.

Ostatni rozdział zawiera wnioski, które stanowią odpowiedzi na postawione w ramach celu pracy pytania, a także sugestie dotyczące ewentualnych kierunków rozszerzenia badań w przyszłości.

1.3 Spis publikacji

Wyniki prezentowane w niniejszej rozprawie były opublikowane w następujących artykułach:

Tartas, A., Lundholm, L., Scherthan, H., Wojcik, A., Brzozowska, B. (2023). The order of sequential exposure of U2OS cells to gamma and alpha radiation influen-

ces the formation and decay dynamics of NBS1 foci. *PLOS One*, 18(6), e0286902. 10.1371/journal.pone.0286902

Tartas, A., Filipek, M., Pietrzak, M., Wojcik, A., Brzozowska, B. (2023). Modeling of dose and linear energy transfer homogeneity in cell nuclei exposed to alpha particles under various setup conditions. *International Journal of Radiation Biology*, 1–9. 10.1080/09553002.2023.2161659

Baiocco, G., Bartzsch, S., Conte, V., Friedrich, T., Jakob, B., **Tartas, A.**, Villagrasa, C., Prise, K. M. (2022). A matter of space: how the spatial heterogeneity in energy deposition determines the biological outcome of radiation exposure. *Radiation and Environmental Biophysics*, 61(4), 545–559. 10.1007/s00411-022-00989-z

Brzozowska, B., **Tartas, A.**, Wojcik, A. (2020). Monte Carlo modeling of DNA lesions and chromosomal aberrations induced by mixed beams of alpha particles and X-rays. *Frontiers in Physics*, 8. 10.3389/fphy.2020.567864

Dodatkowo poniżej znajduje się lista publikacji, których jestem współautorką, ale wyniki tych badań nie dotyczą bezpośrednio zagadnień prezentowanych w rozprawie.

Akuwudike, P., **Tartas, A.**, López-Riego, M., Toma-Dasu, I., Wojcik, A., Lundholm, L. (2022). Cell type-specific patterns in the accumulation of DNA damage following multifractional radiation exposure. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21), 12861. 10.3390/ijms232112861

Pszczółkowska, B., Olejarz, W., Filipek, M., **Tartas, A.**, Kubiak-Tomaszewska, G., Żołnierzak, A., Życieńska, K., Ginter, J., Lorenc, T., Brzozowska, B. (2022). Exosome secretion and cellular response of DU145 and PC3 after exposure to alpha radiation. *Radiation and Environmental Biophysics*, 61(4), 639–650. 10.1007/s00411-022-00991-5

Gałecki, M., **Tartas, A.**, Szymanek, A., Sims, E., Lundholm, L., Sollazzo, A., Cheng, L., Fujishima, Y., Yoshida, M. A., Żygierewicz, J., Wojcik, A., Brzozowska-Wardecka, B. (2019). Precision of scoring radiation-induced chromosomal aberrations and micronuclei by unexperienced scorers. *International Journal of Radiation Biology*, 95(9), 1251–1258. 10.1080/09553002.2019.1625462

Brzozowska, B., Gałecki, M., **Tartas, A.**, Ginter, J., Kaźmierczak, U., Lundholm, L. (2019). Freeware tool for analysing numbers and sizes of cell colonies. *Radiation and Environmental Biophysics*, 58(1), 109–117. 10.1007/s00411-018-00772-z

Rozdział 2

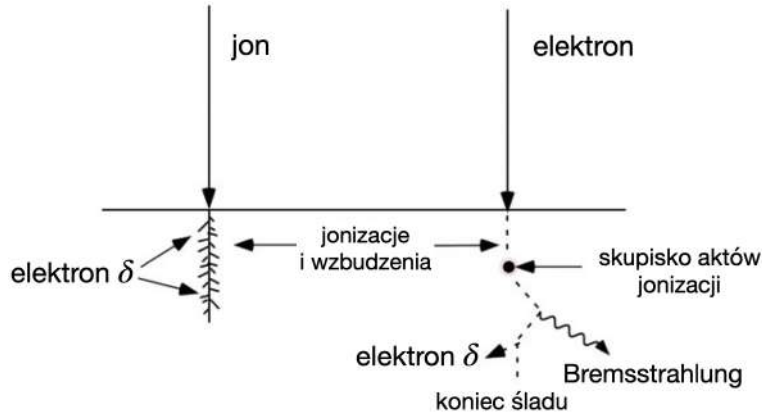
Oddziaływanie promieniowania jonizującego z materią

Promieniowanie jonizujące dzieli się na cząstki naładowane (promieniowanie bezpośrednio jonizujące), takie jak leptony, cząstki α , protony i inne jony, oraz cząstki neutralne (promieniowanie pośrednio jonizujące), takie jak fotony (promieniowanie rentgenowskie lub promieniowanie γ) i neutrony. Ze względu na zastosowania promieniowania jonizującego do celów medycznych, interesujące jest oddziaływanie cząstek α , elektronów, a także fotonów z materiałem biologicznym. Ważne jest również badanie efektów oddziaływania protonów i innych ciężkich cząstek naładowanych, które są wykorzystywane w hadronoterapii. Zastosowanie w niniejszej pracy promieniowania α , którego charakterystyka oddziaływania z materią jest opisana krzywą Bragga, podobnie jak w przypadku protonów i innych ciężkich cząstek naładowanych, umożliwia wykorzystanie wyników i ich interpretację również w kontekście protonoterapii (Hotta and Mizuno, 2023).

Do opisu sposobu interakcji promieniowania z materią ważne jest określenie prawdopodobieństwa zajścia zdarzenia, w którym cząstka promieniowania oddziałuje z atomami ośrodka. Wielkością służącą do opisu tych procesów jest przekrój czynny. Zrozumienie pojęcia przekroju czynnego dla konkretnego rodzaju promieniowania jest kluczowe do analizy biologicznych skutków tego oddziaływania.

2.1 Promieniowanie korpuskularne

Kiedy ciężka cząstka naładowana przechodzi przez materię, jej kulombowskie pole elektryczne oddziałuje z elektronami związanymi w atomie i jądrami atomów w ośrodku. Zwykle tylko niewielka część energii kinetycznej jest tracona podczas każdego zderzenia, a cząstka uczestniczy w wielu interakcjach, zanim przekaże całą swoją energię materii. Oddziaływania te powodują wzbudzenia i jonizacje atomów oraz emisję promieniowania elektromagnetycznego. W zależności od rodzaju naładowanej cząstki różne procesy oddziaływania są mniej lub bardziej istotne. Sposób oddziaływania z materią jest inny dla lekkich cząstek naładowanych (elektrony i pozytony) i ciężkich cząstek naładowanych (jony). Na Rysunku 2.1 został przedstawiony uproszczony sposób transportu cząstek naładowanych (jonów i elektronów) w materii.



Rysunek 2.1: Schematyczny diagram transportu jonu i elektronu przez materię, który jest zmodyfikowanym rysunkiem pochodzącym z (Nilsson and Brahme, 2014). Ciężka cząstka naładowana (jon) wzbudza i jonizuje atomy na swojej drodze. Jest cięższa w porównaniu z elektronami, więc podczas każdego zderzenia przenosi tylko bardzo małą ilość swojej energii i zmienia kierunek ruchu w przypadku elastycznego rozpraszania z jądrem.

Mechanizmy, dzięki którym naładowane cząstki tracą energię lub są rozpraszane, można podzielić na cztery główne typy oddziaływań: zderzenia niesprężyste z elektronami związanymi w atomie, zderzenia niesprężyste z jądrem atomowym, rozpraszanie sprężyste na jądrze atomowym oraz zderzenia sprężyste z elektronami w atomie. Dominującym mechanizmem, dzięki któremu cząstki naładowane zarówno o małym, jak i dużym ładunku, tracą swoją energię, jest zderzenie niesprężyste z elektronami znajdującymi się na powłokach atomu. W wyniku takiego zderzenia następuje wzbudzenie i jonizacja. Często energia przekazywana emitowanemu elektronowi jest na tyle wysoka, że umożliwia elektronowi jonizację kolejnych atomów. Taki wtórny elektron nazywany jest elektronem δ . Jeżeli energia nie jest wystarczająco wysoka, tylko kilka atomów zostanie zjonizowanych, a blisko siebie powstanie skupisko często trzech do czterech aktów jonizacji. Zderzenia niesprężyste z jądrem zachodzą, gdy naładowana cząstka przechodzi w pobliżu jądra atomowego i ulega rozproszeniu. Przy zmianie kierunku ruchu cząstka traci energię, która jest emitowana w postaci promieniowania hamowania (Bremsstrahlung). Przekrój czynny dla tego procesu jest istotny w obszarze energii stosowanych w fizyce medycznej.

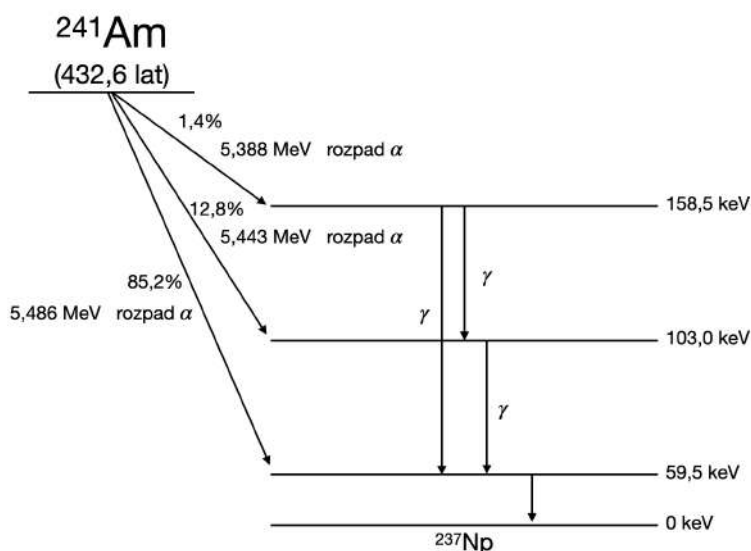
Straty energii kinetycznej ciężkiej cząstki naładowanej przy przechodzeniu przez ośrodek materialny są wyrażane za pomocą wzoru Bethgo-Blocha, którego postać jest następująca:

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

$\frac{dE}{dx}$ jest stratą energii cząstki na jednostkę drogi dx , z to ładunek cząstki, Z i A są wielkościami charakteryzującymi (jednorodny) ośrodek, N_A to stała Avogadro, r_e to klasyczny promień elektronu $r_e = \frac{e^2}{m_e c^2}$, $\beta = \frac{v}{c}$ to prędkość cząstki, γ jest czynnikiem Lorentza $(1 - \beta^2)^{-\frac{1}{2}}$, a I to stała jonizacji dla danego ośrodka (Skrzypczak and Szeffiński, 2012).

Promieniowanie α

Przykładem cząstek naładowanych jest promieniowanie α , które powstaje w wyniku rozpadu jądrowego. Cząstki α są zbudowane z dwóch protonów i dwóch neutronów (tak jak jądra ${}^4_2\text{He}^{+2}$) i mają ładunek dodatni. Typowym izotopem, który jest źródłem cząstek α jest ${}^{241}\text{Am}$.



Rysunek 2.2: Schemat rozpadu promieniotwórczego ${}^{241}\text{Am}$ obejmujące trzy główne kanały rozpadu α , który został wykonany na podstawie (Malain and Kanchana, 2019).

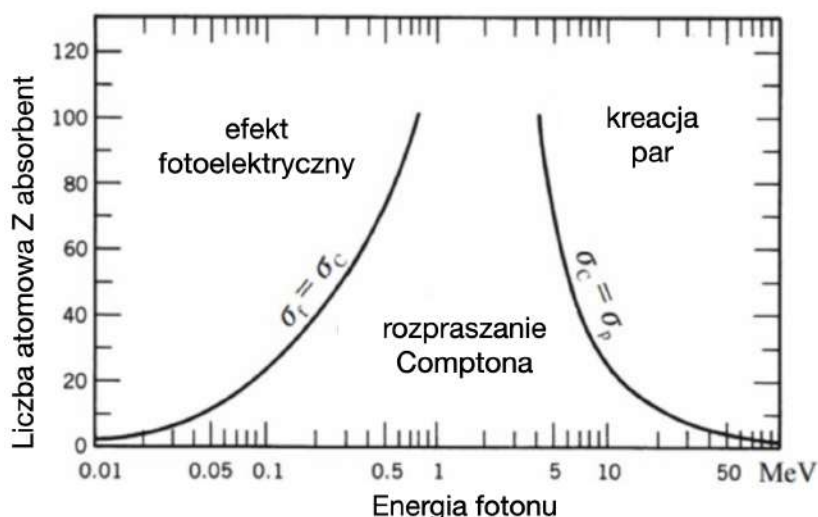
${}^{241}\text{Am}$ rozpada się do neptunu ${}^{237}\text{Np}$ emitując cząstki α o energiach 5443 keV, 5486 keV i 5390 keV. Czas połowicznego zaniku wynosi 432,2 lat (Malain and Kanchana, 2019). Schemat rozpadu promieniotwórczego izotopu ${}^{241}\text{Am}$ został przedstawiony na Rysunku 2.2. Głównym produktem ubocznym rozpadu izotopu jest promieniowanie γ o energii 59,54 keV.

Promieniowanie α jest bardzo silnie pochłaniane przez materię. Charakteryzuje się ono dużo mniejszą przenikliwością niż promieniowanie γ . Cząstki α o energiach od 4 do 10 MeV mają w powietrzu zasięg od 5 do 11 cm. Dla tych samych energii zasięg cząstek α w wodzie wynosi od 20 do 100 μm (Song et al., 2012).

2.2 Cząstki neutralne

Promieniowanie elektromagnetyczne jest rozprzestrzeniającym się w przestrzeni zaburzeniem pola elektromagnetycznego. Obejmuje ono pełne spektrum promieniowania, włączając w to zakres fal radiowych i mikrofalowych, promieniowanie podczerwone, światło widzialne, promieniowanie ultrafioletowe, promieniowanie rentgenowskie oraz promieniowanie γ . W opisie kwantowym promieniowanie elektromagnetyczne jest traktowane jako strumień nieposiadających masy cząstek elementarnych zwanych fotonami.

Oddziaływanie fotonów z materią polega głównie na wybijaniu z atomu lub wytwarzaniu wtórnych cząstek naładowanych, leptonów, takich jak elektrony i pozytony. To



Rysunek 2.3: Zależność przekroju czynnego absorpcji kwantu γ w absorbencie, w funkcji energii. Krzywe na wykresie reprezentują wartości, dla których przekrój czynny dla efektu Comptona (σ_c) jest równy przekrojowi czynnemu dla efektu fotoelektrycznego (σ_f) lub kreacji par (σ_p). Wykres pochodzi z (Hyun et al., 2018) i został zmodyfikowany na potrzeby pracy.

właśnie leptonu deponują energię w materiale poprzez jonizacje i wzbudzenia opisane w Rozdziale 2.1. Najważniejszymi procesami, w których fotony oddziałują z materią, są: efekt fotoelektryczny, efekt Comptona, rozpraszanie Rayleigha i Thomsona oraz kreacja par w polu jądra atomowego i analogiczna kreacja tych cząstek w polu innego elektronu (inaczej kreacja tripletu). Zależność występowania rodzaju oddziaływania w funkcji energii fotonu została przedstawiona na Rysunku 2.3.

Dla niskich energii fotonów, poniżej 100 keV, efekt fotoelektryczny jest dominującym procesem interakcji w materiałach o średniej i dużej liczbie atomowej. W procesie fotoelektrycznym foton jest całkowicie absorbowany przez atom, a energia jest przekazywana elektronowi. Efekt zachodzi dla elektronów związanych w atomie na wewnętrznych powłokach, aby została spełniona zasada zachowania energii i pędu. Zjonizowany w wyniku efektu fotoelektrycznego atom znajduje się w stanie wzbudzone. Powrót do stanu podstawowego, który polega na wypełnieniu luki po oderwanym elektronie elektronem z wyższej powłoki, odbywa się przy emisji promieniowania charakterystycznego (Chelkowski et al., 2014).

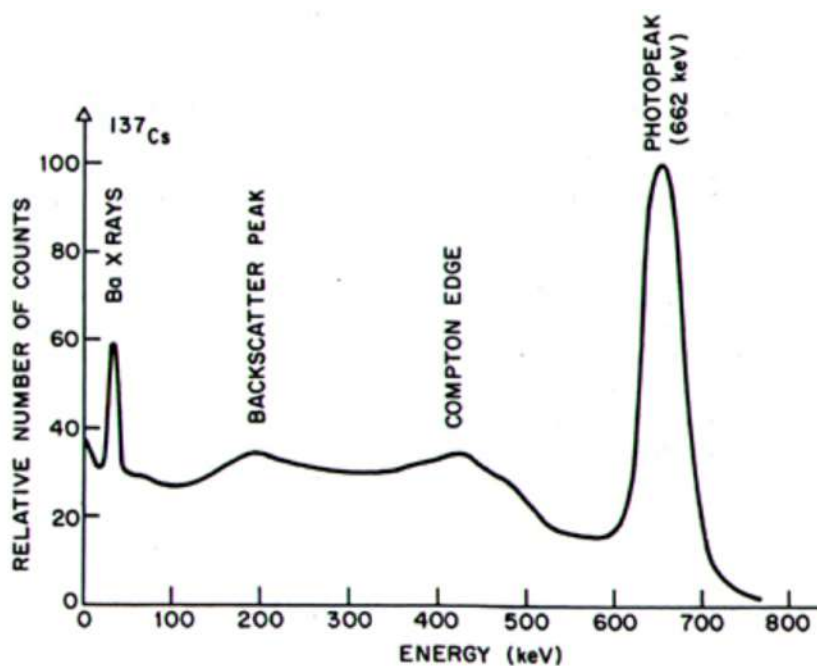
Efekt Comptona to zjawisko rozpraszania fotonu o wysokiej częstotliwości po interakcji ze swobodnym lub słabo związanym elektronem, w wyniku którego następuje zwiększenie długości fali fotonu (zmniejszenie jego energii). Część energii przekazywana jest rozproszonemu elektronowi, a kierunek poruszania się fotonu ulega zmianie (Workman et al., 2022; Yao et al., 2006). Procesy, w których foton jest rozpraszany bez zmiany długości fali, są nazywane rozpraszaniem Thomsona i Rayleigha (Strzałkowski, 1979). W podejściu klasycznym zmienne pole elektryczne fali padającej na atom wzbudza drgania elektronu. Elektron wykonując ruch drgający, emituje promieniowanie. Rozpraszanie Thomsona zachodzi dla swobodnych elektronów, natomiast rozpraszanie Rayleigha — dla elektronów

związanych w atomie (Wade and Drake, 2019).

W procesie kreacji par, promieniowanie fotonowe oddziałuje z polem elektrycznym w pobliżu jądra atomu, w wyniku czego powstaje elektron i pozyton. Każda powstała cząstka ma energię spoczynkową równą 511 keV. Warunkiem koniecznym do zajścia procesu kreacji par jest energia fotonu, która musi być większa niż suma energii spoczynkowych elektronu i pozytonu (1,022 MeV) (Moz et al., 1969). W procesie kreacji tripletu foton o wysokiej energii oddziałuje z elektronem w materii. Energia przekazana temu elektronowi jest na tyle duża, że może on ulec dalszym oddziaływaniom. Prowadzi to do pojawienia się trzech produktów (tripletu): wybitego elektronu, pozytonu i dodatkowego elektronu wybitego w wyniku wtórnego oddziaływania (Aurenche et al., 2000).

Promieniowanie γ

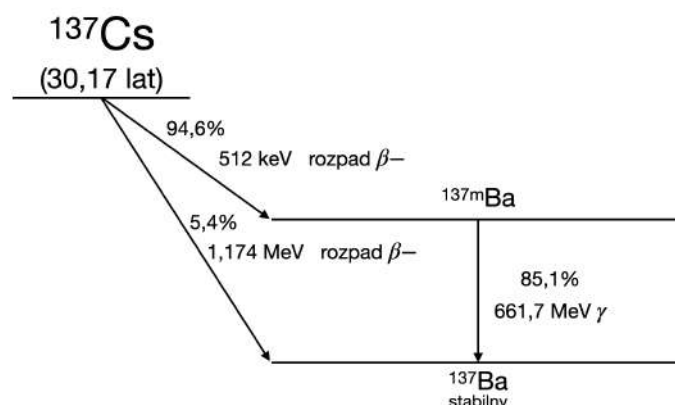
Promieniowanie γ jest rodzajem promieniowania elektromagnetycznego o wysokiej energii i krótkiej długości fali. Jest ono emitowane przez jądro atomu podczas rozpadu promieniotwórczego lub reakcji jądrowych. Występuje, gdy jądro przechodzi ze stanu wzbudzonego do stanu o niższej energii, uwalniając nadmiar energii w postaci kwantu γ . Przykładem izotopu emitującego promieniowanie γ jest ^{137}Cs . Jest to radioaktywny izotop wytworzony przez człowieka, którego okres półtrwania wynosi 30 lat. Widmo promieniowania γ pochodzącego z izotopu ^{137}Cs zostało przedstawione na Rysunku 2.4.



Rysunek 2.4: Fotonowe widmo energetyczne dla izotopu ^{137}Cs (Mendes et al., 2022).

^{137}Cs to sztucznie wytworzony radioaktywny izotop. Rozpada się poprzez rozpad β^- (proces rozpadu jądra atomowego, w którym neutron przekształca się w proton z wytworzeniem cząstki β^- , czyli elektronu) do izotopu ^{137}Ba . Podczas tego rozpadu, 94,6% atomów ^{137}Cs przechodzi do metastabilnego stanu wzbudzonego baru ^{137m}Ba . Stan ten

ma okres półtrwania równy 156 s. Podczas przejścia ze stanu wzbudzonego do stanu podstawowego, ^{137m}Ba emituje kwant promieniowania γ o energii równiej 661,6 keV. Schemat rozpadu został przedstawiony na Rysunku 2.5.



Rysunek 2.5: Schemat rozpadu promieniotwórczego izotopu ^{137}Cs , który został wykonany na podstawie (Podgoršak et al., 2006).

2.3 Dawka i liniowy przekaz energii

Według raportu Międzynarodowej Komisji ds. Jednostek i Pomiarów Promieniowania (ang. *International Commission on Radiation Units & Measurements*, ICRU) (ICRU, 2011) dawka promieniowania jonizującego (D) odnosi się do ilości energii (E) zdeponowanej w materii przez promieniowanie jonizujące na jednostkę masy (m) i jest wyrażana wzorem:

$$D = \frac{E}{m}. \quad (2.2)$$

Badając aspekty oddziaływań promieniowania jonizującego w komórkach, dla uproszczenia stosowane jest założenie, że jądro komórkowe składa się głównie z wody, jako materiału równoważnego tkance oraz genomowemu DNA. W tym przypadku dawka jest obliczana dla masy, która jest iloczynem gęstości wody (ρ) i objętości (V) napromienianego obiektu:

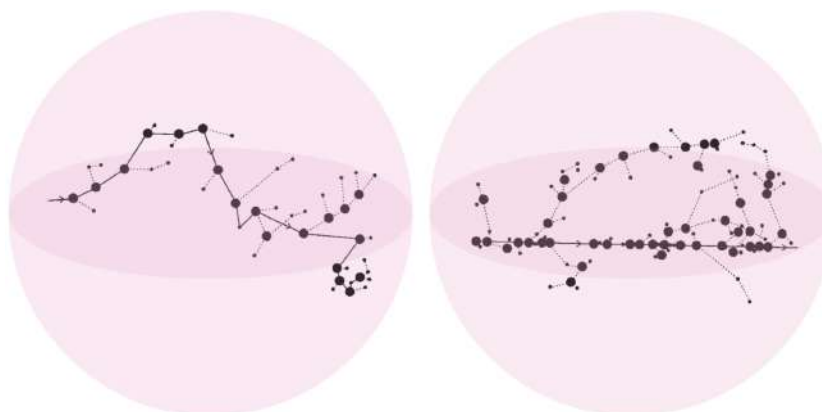
$$D = \frac{E}{\rho V}. \quad (2.3)$$

Dawkę w jednostkach SI wyraża się w dżulach na kilogram masy absorbentu [J/kg]. Specjalną jednostką dawki pochłoniętej jest grej [Gy].

Ważną właściwością promieniowania jonizującego jest jego liniowy przekaz energii (ang. *linear energy transfer*, LET). Makroskopowo określa on ilość energii (dE) promieniowania jonizującego zdeponowaną w ośrodku na jednostkę przebytej odległości (dx) (Seltzer et al., 2011). Jest on opisany wzorem:

$$\text{LET} = \frac{dE}{dx}. \quad (2.4)$$

LET jest zwykle wyrażany w jednostkach kiloelektronowoltów na mikrometr ($\text{keV}/\mu\text{m}$) lub megaelektronowoltów na centymetr (MeV/cm). Ta wielkość dostarcza informacji o gęstości jonizacji oraz pośrednio o biologicznych skutkach promieniowania (Rossi, 1960). Promieniowanie o wysokim LET, które deponuje znaczną ilość energii w małym obszarze, ma większe konsekwencje biologiczne. W przeciwieństwie do tego energia promieniowania o niskim LET jest deponowana w większym obszarze i jest mniej prawdopodobne, że spowoduje poważne uszkodzenia (Brzozowska et al., 2020). Na Rysunku 2.6 zostały przedstawione symulowane struktury torów dla cząstek naładowanych o różnej masie: elektronu i cząstki α .



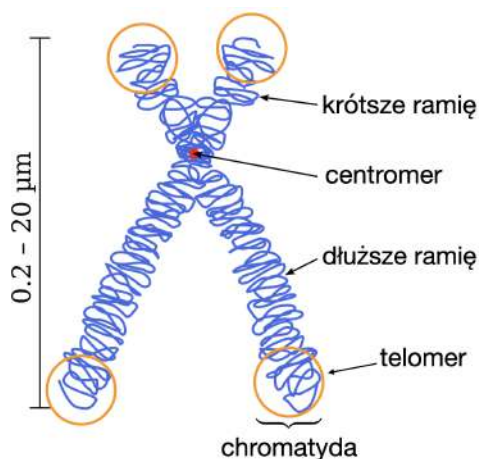
Rysunek 2.6: Krótkie fragmenty symulowanych torów elektronu o niskiej energii (po lewej stronie) i niskoenergetycznej cząstki α (po prawej stronie) w materii. Duże kropki oznaczają jonizację, a małe wzbudzenia (reprodukcja z (Goodhead, 1999)).

Zgodnie z wzorem 2.4 wartość LET dla danej cząstki zależy od jej energii. Wiązka promieniowania stosowana w radioterapii zazwyczaj składa się z cząstek o różnych energiach, co oznacza różne wartości LET. Coraz większe zainteresowanie budzi sposób obliczania LET np. w terapii protonowej (zastosowanie ciężkich cząstek naładowanych), w celu oceny wpływu tej wielkości na efekty biologiczne promieniowania jonizującego (Bertolet et al., 2019). Podawanie uśrednionej wartości jest obecnie powszechną praktyką w badaniach radiobiologicznych. Koncepcja LET i jej ograniczenia zostały przedstawione w Raporcie 16 ICRU (ICRU, 1970), w którym zostało podkreślone to, że podawanie średniej wartości LET rzadko jest zadowalająca. Dlatego rozwijane są nowe modele obliczania LET, np.: LET_f , który reprezentuje średnią zdolność hamowania cząstek, ważoną po widmie fluencji czy LET_d , w którym czynnikiem wagowym jest udział dawki każdego zdarzenia (Garbacz et al., 2021; Paganetti, 2014; Smith et al., 2021).

2.4 DNA

W komórkach eukariotycznych kwas deoksyrybonukleinowy, czyli DNA, pełni kluczową rolę w kodowaniu i przechowywaniu informacji genetycznej niezbędnej do prawidłowego funkcjonowania komórki, jej rozwoju i dziedziczenia. DNA w komórkach eukariotycznych jest zlokalizowane w jądrze komórkowym, które stanowi otoczkę ochronną, zabezpiecza-

jącą materiał genetyczny przed potencjalnymi uszkodzeniami. To właśnie w jądrze DNA jest skondensowane i związane z białkami histonowymi, co pomaga w uporządkowaniu i kondensacji materiału genetycznego do bardziej kompaktowej formy. Ten kompleks DNA i białek histonowych jest nazywany chromatyną. Bardziej skondensowaną formą chromatyny jest chromosom, który jest zbudowany z dwóch siostrzanych chromatyd połączonych ze sobą centromerem (Hall and Giaccia, 2018). Fragmenty chromosomu zlokalizowane na końcach, które zabezpieczają go przed uszkodzeniem, są nazywane telomerami. Uproszczony schemat chromosomu został przedstawiony na Rysunku 2.7.



Rysunek 2.7: Chromosom komórki eukariotycznej. Schemat jest reprodukcją obrazu znajdującego się na stronie: <https://en.wikipedia.org/wiki/Chromosome>.

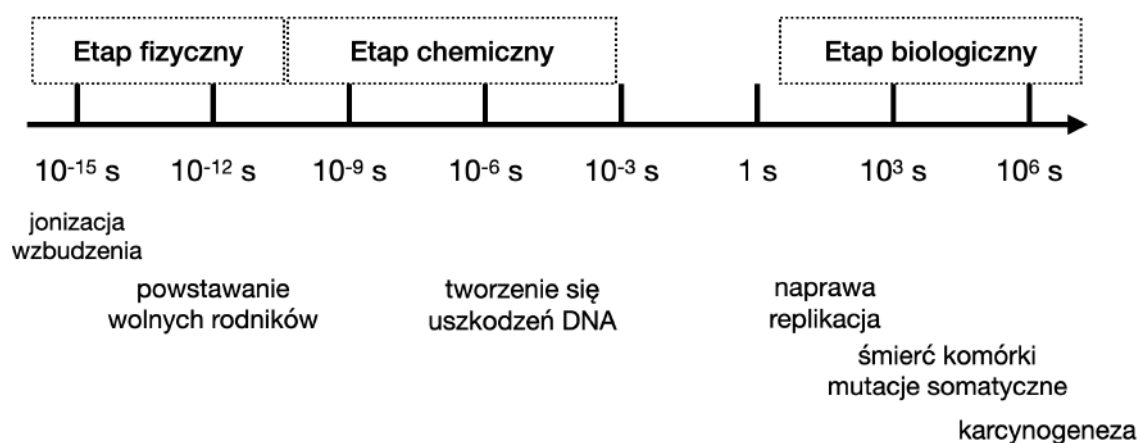
Chromatyna może występować w dwóch formach reprezentujących różne stany kondensacji i ekspresji genów. Są nimi heterochromatyna i euchromatyna. Heterochromatyna jest wysoce skondensowaną formą chromatyny. Pod mikroskopem wydaje się ciemna i zazwyczaj nie bierze udziału w aktywnej transkrypcji. Składa się z ciasno upakowanego DNA i często jest bogata w powtarzające się sekwencje. Heterochromatyna zwykle znajduje się na obrzeżach jądra komórkowego oraz wokół centromerów i telomerów chromosomów (Grewal and Jia, 2007; Allshire and Madhani, 2018). Natomiast euchromatyna jest mniej skondensowaną i bardziej rozbudowaną formą chromatyny (Venkatesh and Workman, 2015). Pod mikroskopem wydaje się jaśniejsza i często jest powiązana z aktywną transkrypcją i ekspresją genów. Przejścia między heterochromatyną i euchromatyną odgrywają kluczową rolę w regulacji ekspresji genów. Geny wymagające ekspresji zwykle znajdują się w euchromatynie, podczas gdy geny, które powinny zostać wyciszone lub nie są potrzebne w określonym czasie, często znajdują się w heterochromatynie (Francis et al., 2004).

Czynnikiem wpływającym na reorganizację chromatyny z euchromatyny do heterochromatyny i odwrotnie, w zależności od potrzeb komórki, jest faza cyklu komórkowego. Cykl komórkowy jest wysoce regulowanym procesem, któremu ulega komórka eukariotyczna podczas wzrostu, replikacji swojego DNA, przygotowania do podziału komórki i ostatecznie podziału na dwie komórki potomne. Cykl komórkowy można podzielić na kilka kluczowych etapów. Pierwszym z nich jest interfaza. Jest to najdłuższa faza cyklu

komórkowego i obejmuje trzy podfazy: G1 (przerwa 1), S (synteza) i G2 (przerwa 2). Podczas interfazy komórka rośnie, pełni swoje normalne funkcje i replikuje swoje DNA. W czasie mitozy jądro komórkowe dzieli się, a materiał genetyczny jest równomiernie rozdzielany na dwa jądra potomne. W rezultacie powstają dwie identyczne komórki potomne. Ostatnim etapem jest cytokineza, w której cytoplazma komórki jest podzielona na dwie części, tworząc dwie odrębne komórki potomne (Schafer, 1998). Największa wrażliwość komórek na promieniowanie występuje w późnej fazie G2 oraz podczas podziału mitotycznego. Z biegiem fazy G1 ich wrażliwość wzrasta. Z kolei najmniej wrażliwe są komórki w fazie S (Krajewski, 2009).

2.5 Etapy oddziaływania promieniowania z materiałem biologicznym

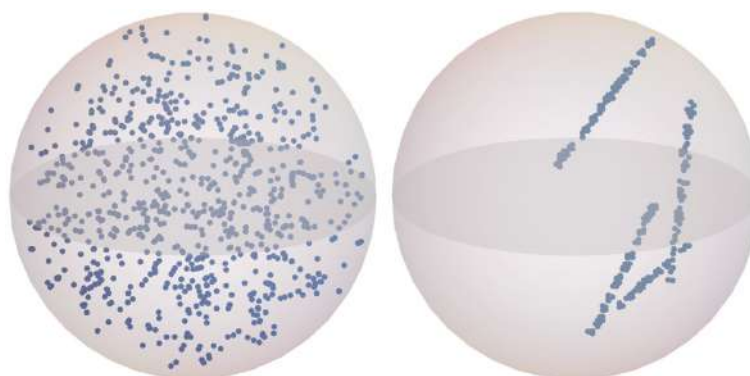
Promieniowanie jonizujące może oddziaływać na różne poziomy materii o różnej organizacji biologicznej, począwszy od poziomu molekularnego po komórki, tkanki i całe organizmy. Efekty te wynikają z oddziaływania promieniowania ze składnikami organizmów żywych, co może powodować zmiany strukturalne, zaburzając funkcję i odpowiedź komórki. Uszkodzenie wywołane promieniowaniem jonizującym wpływa na syntezę DNA (Berg and Stryer, 2002) powodując aberracje chromosomowe (Obe et al., 2002) i mutacje (Little, 2000) oraz zmiany w podziale komórkowym (Goodarzi and Jeggo, 2013). Zostaną one szczegółowo opisane w Rozdziale 2.6. Najbardziej istotne dla funkcjonowania organizmu skutki wywołuje oddziaływanie promieniowania z jądrem komórkowym, a w szczególności genomowym DNA (Osborne et al., 2000). Mechanizm tego oddziaływania można podzielić na trzy etapy: fizyczny, chemiczny i biologiczny. Czasy trwania poszczególnych etapów oraz najważniejsze procesy zostały przedstawione na Rysunku 2.8.



Rysunek 2.8: Skale czasowe głównych etapów, które prowadzą do biologicznych skutków promieniowania jonizującego. Pod osią przedstawione zostały główne procesy, które zachodzą w czasie oddziaływania promieniowania z materią. Rysunek został wykonany na podstawie artykułu (Mozumder and Hatano, 2003).

2.5.1 Etap fizyczny

Etap fizyczny obejmuje bezpośrednie oddziaływanie promieniowania z genomowym DNA. Promieniowanie może przenikać przez komórki i wywoływać jonizacje bezpośrednio w cząsteczkach DNA. To prowadzi do powstania jonów i wzbudzenia atomów w wyniku oddziaływania z atomami helisy. Efekt, w którym energia jest bezpośrednio deponowana w DNA, jest określany mianem efektu bezpośredniego. Przestrzenny rozkład jonizacji w objętości sferycznych jąder komórkowych poddanych działaniu promieniowania X i promieniowania α został przedstawiony na Rysunku 2.9. Podczas gdy akty jonizacji wywołane promieniowaniem fotonowym są jednorodnie rozłożone w całej objętości jądra komórkowego, akty jonizacji cząstek α są skupione wzdłuż ich toru.



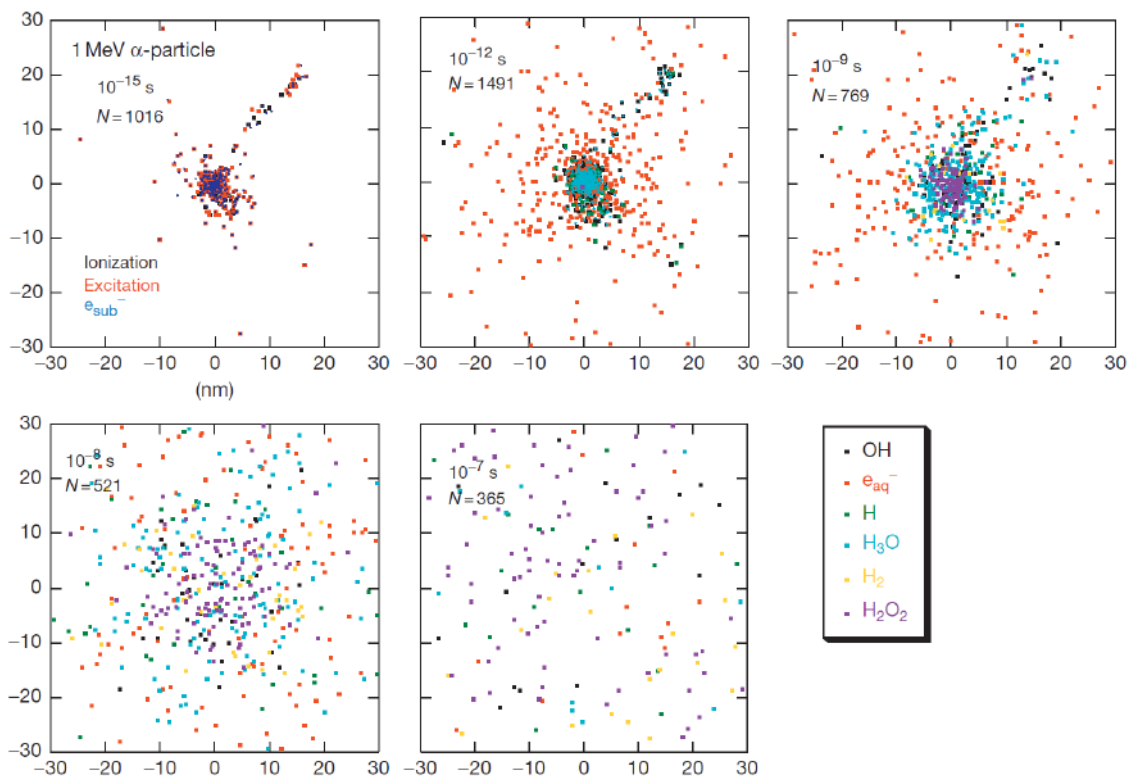
Rysunek 2.9: Przestrzenny rozkład jonizacji w przykładowym jądrze limfocytu po napromienieniu promieniowaniem X (lewy panel) i cząstkami α (prawy panel) dawką 1 Gy, symulowane w oparciu o metody MC (Brzozowska et al., 2020).

Promieniowanie może również oddziaływać z ośrodkiem, w którym znajduje się DNA, powodując dysocjację cząsteczek wody znajdujących się w jądrze komórkowym. W tym procesie wytwarzane są reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS) i ich produkty molekularne, które oddziałują z DNA. Jest to efekt pośredni oddziaływania promieniowania jonizującego.

2.5.2 Etap chemiczny

W etapie chemicznym dochodzi do reakcji chemicznych między elektronami oraz zjonizowanymi i wzbudzonymi cząsteczkami wody. Powstające w etapie fizycznym ROS, np. rodniki hydroksylowe ($\bullet\text{OH}$), uwodniony elektron (e_{aq}^-), atom wodoru (H), jon hydroniowy (H_3O^+) i nadtlenek wodoru (H_2O_2), mogą dyfundować i reagować z cząsteczką DNA, uszkadzając ją poprzez utlenianie jej składników chemicznych (Dertinger and Jung, 1970). Na Rysunku 2.10 została przedstawiona czasowa ewolucja powstawania i dyfuzji przejściowych form wytwarzanych w wodzie, w warunkach normalnych (pH równe 7, ciśnienie 1 atm., temperatura 25°C), które powstały w wyniku oddziaływania cząstki α o energii 1 MeV w oparciu o metody Monte Carlo (Nikjoo and Liamsuwan, 2014). Dla punktu czasowego 10^{-15} s widać wyraźną strukturę toru cząstki α . W 10^{-12} s, kiedy reakcje fizykochemiczne ustają, ścieżka zaczyna tracić swoją strukturę ze względu na dyfuzję wolnych

rodników. W 10^{-7} s niewidoczny staje się ślad cząstki, a reaktywne formy tlenu są równomiernie rozprzestrzenione w obszarze $60 \text{ nm} \times 60 \text{ nm}$.



Rysunek 2.10: Czasowa ewolucja rodników wodnych i produktów molekularnych ($\bullet\text{OH}$, e_{aq}^- , H , H_3O^+ , H_2 i H_2O_2) powstających w wyniku oddziaływania cząstki α o energii 1 MeV wytwarzanych z czystą wodą w warunkach normalnych (Nikjoo and Liamsuwan, 2014).

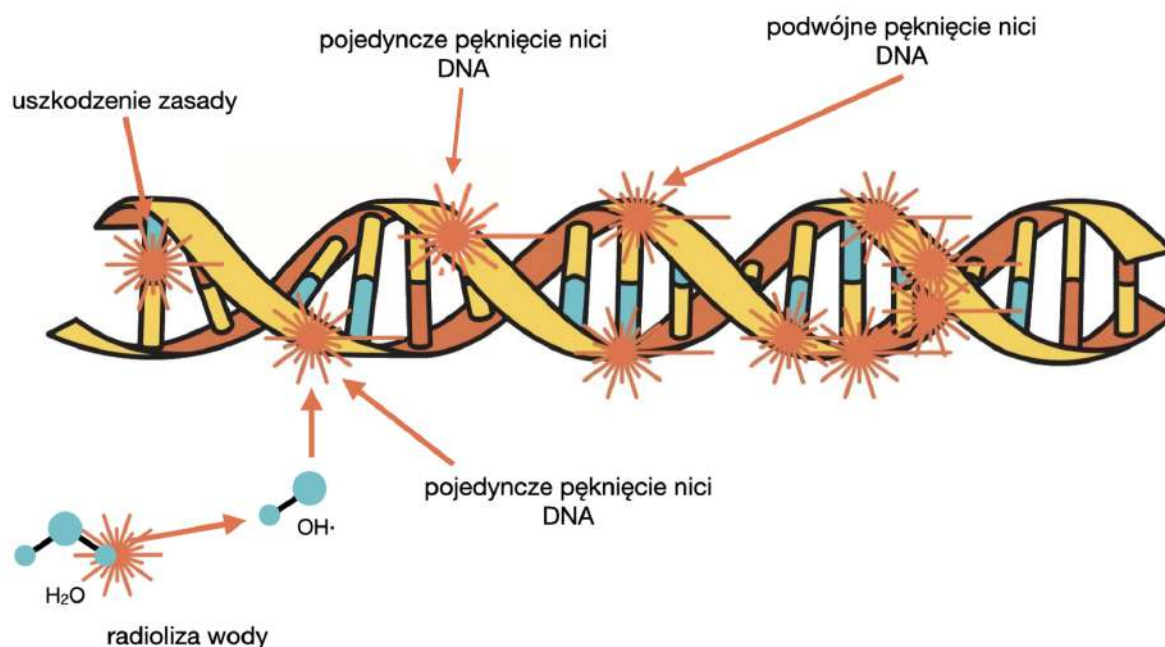
2.5.3 Etap biologiczny

W etapie biologicznym zachodzi proces rozpoznawania i naprawy uszkodzenia DNA oraz jej wpływu na procesy życiowe komórek. Komórki mają skomplikowane mechanizmy naprawy, w wyniku których uszkodzenia wywołane promieniowaniem są naprawiane. Nieprawidłowa naprawa uszkodzonego DNA może prowadzić do mutacji i niestabilności genomu, co może potencjalnie skutkować rozwojem nowotworu (Hakem, 2008). Uszkodzenie DNA uruchamia punkty kontrolne cyklu komórkowego poprzez szereg molekularnych szlaków sygnałowych, które tymczasowo wstrzymują podział komórki, dając czas na naprawę DNA. Jeśli naprawa się powiedzie, komórki będą mogły kontynuować podział. W przeciwnym razie uszkodzone komórki mogą ulec apoptozie (programowanej śmierci komórki), aby zapobiec rozprzestrzenianiu się nieprawidłowości genetycznych. Promieniowanie może zakłócać funkcjonowanie tkanek, wpływając na normalną proliferację i różnicowanie komórek. Tkanki z szybko dzielącymi się komórkami, takie jak szpik kostny i wyściółka jelit, są szczególnie wrażliwe na promieniowanie. Wysokie dawki promieniowania mogą prowadzić do ostrego uszkodzenia ważnych narządów, potencjalnie powodując dysfunkcję i niewydolność narządów. Efekty specyficzne dla narządów różnią się w zależności od

wrażliwości na promieniowanie (Janiak and Wójcik, 2005).

2.6 Uszkodzenia materiału biologicznego

Promieniowanie jonizujące ma zdolność do wywoływania różnych uszkodzeń struktury DNA, takich jak pęknięcia pojedynczej i podwójnej nici DNA, zmiany w sekwencji zasad, utratę (inaczej delecję) fragmentów DNA. Uszkodzenia te mogą prowadzić do powstawania zakłóceń w replikacji DNA, transkrypcji genów i naprawie DNA, co może skutkować mutacjami, uszkodzeniami genetycznymi, a nawet śmiercią komórki (Hall and Giaccia, 2018; Lomax et al., 2013; Mavragani et al., 2017). Obecność uszkodzeń w DNA aktywuje reakcję obronną komórek w celu naprawy materiału genetycznego. Wewnątrz komórek istnieją specjalne mechanizmy naprawy DNA, które potrafią identyfikować i usuwać różne rodzaje uszkodzeń w celu przywrócenia integralności materiału genetycznego.



Rysunek 2.11: Rodzaje uszkodzeń DNA w wyniku oddziaływania promieniowania jonizującego ze schematycznie przedstawioną cząsteczką DNA. Uszkodzenie może wystąpić w wyniku bezpośredniego oddziaływania promieniowania z cząsteczką DNA lub pośrednio w wyniku oddziaływania produktów radiolizy wody.

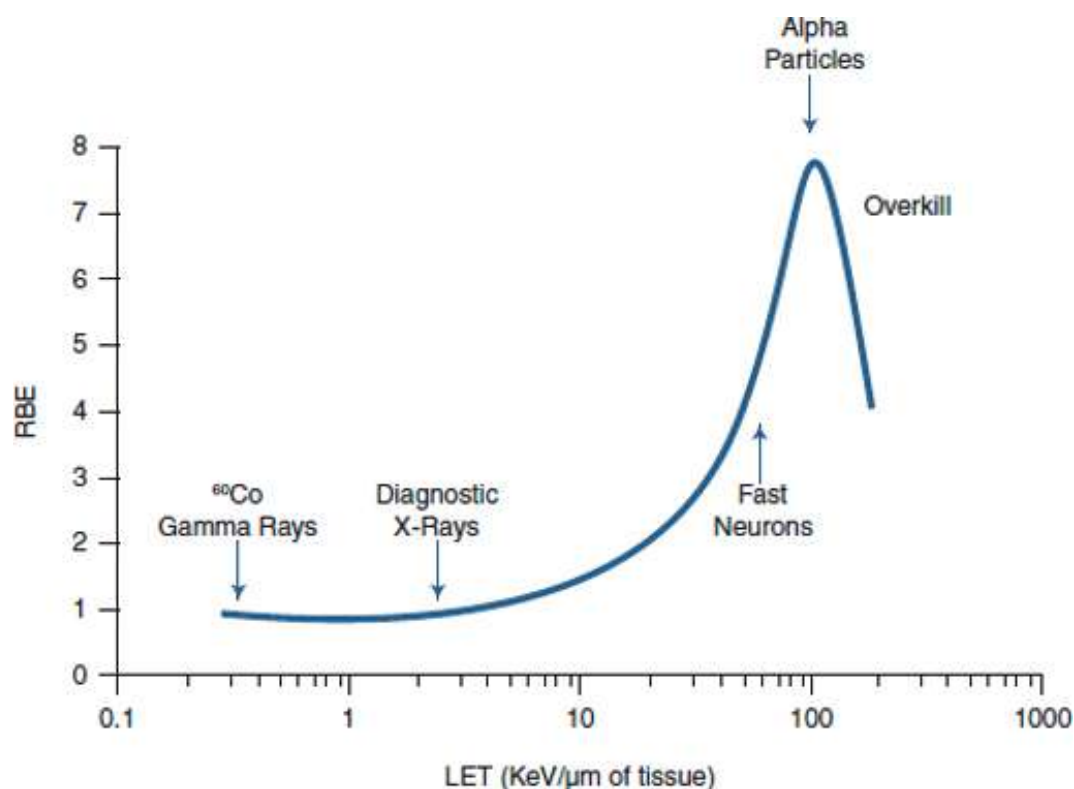
Na Rysunku 2.11 zostały przedstawione trzy główne rodzaje uszkodzeń. Pojedynczo-niciowe pęknięcie struktury DNA (ang. *single-strand break*, SSB) to rodzaj uszkodzenia, który występuje, gdy pęknie jedna z dwóch nici podwójnej helisy DNA. Oznacza to, że uszkodzona jest tylko jedna strona cząsteczki DNA, podczas gdy nić komplementarna pozostaje nienaruszona. Powszechnie przyjmuje się, że SSB, które wpływają na pojedynczy nukleotyd lub parę nukleotydów połączonych parą zasad, mogą wystąpić w obrębie 1-2 skrętów helisy i tworzyć skupisko takich uszkodzeń. Termin *skupisko uszkodzeń* odnosi się do zmian w DNA, które są oddalone od siebie o nie więcej niż 10 par zasad (ang. *base pairs*, bp). W kontekście napromieniania materiału biologicznego najważniejszym rodzajem

uszkodzenia DNA, który ma istotny wpływ na śmierć komórek i powstawanie mutacji, jest podwójnoniciowe pęknięcie DNA (ang. *double-strand break*, DSB) (Toulany, 2019). Proste DSB składa się z dwóch pojedynczych przerw w nici DNA, oddalonych od siebie o 10 bp lub mniej. Ważne jest zrozumienie, że DSB mogą mieć różny poziom złożoności, co oznacza, że przerwy w nici DNA mogą występować z dodatkowymi uszkodzeniami w obrębie 1–2 skrętów helisy. W przypadku, gdy DSB jest związane z dodatkowymi modyfikacjami w DNA, określane jest jako złożone DSB.

Istnienie uszkodzeń DNA o zróżnicowanym poziomie złożoności zostało udowodnione za pomocą wielu badań w oparciu o symulacje struktury torów cząstek. Te badania oprócz analizy procesów zachodzących w etapie fizycznym, obejmowały również analizę etapu chemicznego i uzyskanie liczby indukowanych uszkodzeń w DNA (Goodhead, 1994; Friedland et al., 2017; Nikjoo et al., 1999, 2016; Chatzipapas et al., 2020).

2.6.1 Względna skuteczność biologiczna

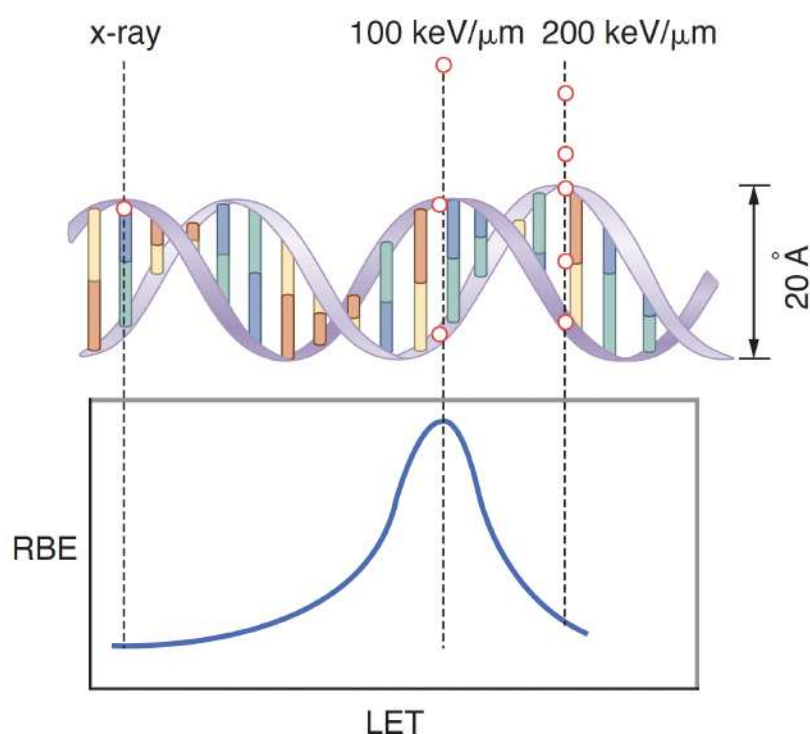
Względna skuteczność biologiczna (ang. *relative biological effectiveness*, RBE) to termin, który jest używany w radiobiologii do porównywania skuteczności biologicznej różnych rodzajów promieniowania jonizującego.



Rysunek 2.12: Względna skuteczność biologiczna w funkcji liniowego przekazu energii (Bushberg et al., 2012)

RBE uwzględnia zdolność danego rodzaju promieniowania do wywołania uszkodzeń biologicznych, szczególnie w zakresie ich wpływu na komórki i tkanki. Wartość RBE określona przez porównanie odpowiedzi biologicznej (np. powstawanie uszkodzeń DNA), wy-

wołanej oddziaływaniem promieniowania referencyjnego, z odpowiedzią biologiczną spowodowaną przez testowane promieniowanie. Na wartość RBE mają wpływ różne czynniki, m.in. rodzaj promieniowania, dawka całkowita, moc dawki, sposób frakcjonowania dawki, badany efekt biologiczny, czy też wartość LET promieniowania. Promieniowanie o wysokim LET, takie jak cząstki α , ma wyższy parametr RBE w porównaniu z promieniowaniem o niskim LET, takim jak promieniowanie γ . Przyczyną jest depozycja większej ilości energii w mniejszym obszarze jądra komórkowego, co powoduje skumulowanie większej liczby uszkodzeń biologicznych w tym miejscu. Zależność RBE od wartości LET została przedstawiona na Rysunku 2.12.



Rysunek 2.13: Depozycje energii (oznaczone kropkami) i odpowiadające im wartości LET oraz RBE na przykładzie promieniowania o 3 wartościach LET: 1 keV/ μm , 100 keV/ μm i 200 keV/ μm (Hall and Giaccia, 2018). Promieniowanie jonizujące o LET równym około 100 keV/ μm charakteryzuje się największą wartością RBE. W przypadku tego oddziaływania promieniowania średnia odległość między zdarzeniami jonizującymi pokrywa się ze średnicą podwójnej helisy DNA (tj. około 20 Å, czyli 2 nm), co wiąże się z wysokim prawdopodobieństwem indukcji DSB.

Wraz ze wzrostem wartości LET wzrasta wartość RBE. Dla promieniowania fotonowego (promieniowanie γ i promieniowanie X), dla którego wartość LET wynosi ok. 1 keV/ μm , RBE przyjmuje wartość 1. W przedziale od 10 do 100 keV/ μm wartość RBE wzrasta wykładniczo. Promieniowanie o wartości LET około 100 keV/ μm , którego przykładem jest promieniowanie α , jest optymalne pod względem wywoływania efektu biologicznego (Hall and Giaccia, 2018). Ekspozycja na to promieniowanie ma największe prawdopodobieństwo indukcji DSB w wyniku przejścia pojedynczej naładowanej cząstki. Dla wyższych wartości LET występuje efekt *overkill*. Wiązki promieniowania o wartości LET wyższej

niż optymalna są mniej skuteczne biologicznie, ponieważ część energii jest tracona z powodu osiągnięcia maksymalnego potencjalnego uszkodzenia (Zeman et al., 2020). Efekt ten został przedstawiony na Rysunku 2.13.

2.6.2 Współczynnik wzmożenia tlenowego

Czynnikiem, który uwrażliwia komórki na promieniowanie, jest wolny tlen cząsteczkowy. Przy ciśnieniu spadającym poniżej 10 mmHg w tkance uważa się, że komórki są niedotlenione i wykazują rosnącą oporność na promieniowanie. Współczynnik wzmożenia tlenowego (ang. *oxygen enhancement ratio*, OER) jest określany jako stosunek dawki promieniowania wymaganej do wywołania konkretnego efektu biologicznego w obecności tlenu do dawki potrzebnej do wywołania tego samego efektu w warunkach beztlenowych. Określa ilościowo, o ile skuteczniejsze jest promieniowanie w komórkach bogatych w tlen w porównaniu do sytuacji, gdy tlen jest w nich nieobecny (Hall and Giaccia, 2018).

Wartość OER różni się w zależności od rodzaju tkanki, rodzaju promieniowania i rozpatrywanego efektu biologicznego. Komórki nowotworowe są często niedotlenione w porównaniu do komórek zdrowych, a OER pomaga zrozumieć, w jaki sposób niższe stężenie tlenu może wpływać na reakcję nowotworów na terapię z wykorzystaniem promieniowania jonizującego (Denekamp et al., 1977). W przypadku typowej radioterapii fotonowej, dla dawek wynoszących około 2 Gy, OER wynosi od około 2,5 do 3, co oznacza, że promieniowanie jest 2,5 do 3 razy skuteczniejsze w zabijaniu komórek, gdy obecny jest tlen. Jednak przy braku tlenu (warunki niedotlenienia) promieniowanie jest mniej skuteczne. Uwrażliwienie na tlen zostało ogólnie wyjaśnione hipotezą, w której obecność tlenu wzmacnia wytwarzanie wolnych rodników szkodliwych dla DNA przyczyniających się do zabijania komórek (Hall and Giaccia, 2018).

Wartość współczynnika OER maleje wraz ze wzrostem wartości LET, ponieważ w obszarach, gdzie gęstość jonizacji jest duża, zachodzi więcej oddziaływań bezpośrednich i jest mniejsze prawdopodobieństwo interakcji pośrednich z cząstkami znajdującymi się poza tymi obszarami (Barendsen et al., 1966). Stanowi to podstawę rosnącego zainteresowania zastosowaniem ciężkich jonów w radioterapii, na które w mniejszym stopniu wpływa niedotlenienie komórek nowotworowych (IAEA, 2008). Zubożenie tlenowe, które powstaje w wyniku napromienienia komórek techniką FLASH, czyli dostarczenia dużej dawki w krótkim czasie, stanowi również interesujący temat badawczy, którym zajmuje się coraz więcej naukowców (Esplen et al., 2020; Hughes and Parsons, 2020).

2.7 Naprawa uszkodzeń DNA

Skuteczne mechanizmy identyfikacji, sygnalizacji i naprawy uszkodzeń DNA, znane jako odpowiedź na uszkodzenie DNA (ang. *DNA damage response*, DDR) są niezbędne do rozpoczęcia reakcji na uszkodzenia DNA, czyli mechanizmów naprawy. Mechanizmy mogą być wywołane zarówno przez procesy metaboliczne wewnątrzkomórkowe, jak i czynniki zewnętrzne, takie jak promieniowanie jonizujące.

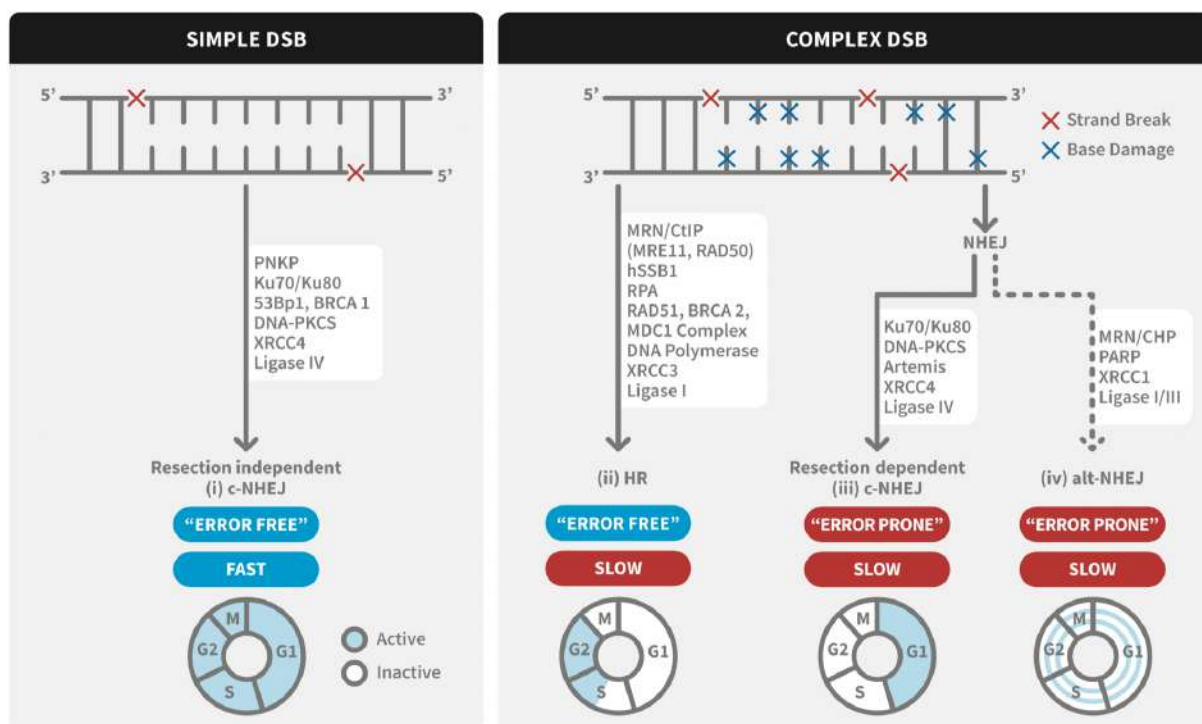
Istnieje kilka ścieżek DDR i każda z nich to proces kompleksowy i wieloetapowy. Wybór ścieżek DDR jest kształtowany przez strukturę i rozmieszczenie uszkodzeń w DNA,

zwłaszcza DSB. Niedostateczna zdolność komórki do odpowiedzi na uszkodzenia DNA może prowadzić do różnych zaburzeń genetycznych i zwiększać ryzyko wystąpienia nowotworów (Maynard et al., 2015). Szczególnie mutagenne i potencjalnie śmiertelne są złożone DSB, które stanowią wyzwanie dla mechanizmów naprawczych (O'Driscoll and Jeggo, 2006). Po początkowym rozpoznaniu rodzaju i miejsca uszkodzenia, po którym następuje przekazanie sygnałów wewnątrz jądra komórkowego, komórka staje przed wyborem jednej z kilku dostępnych ścieżek naprawy (Melo and Toczyski, 2002). Ścieżki te obejmują naprawę uszkodzeń DNA, różne strategie zatrzymania cyklu komórkowego lub aktywację mechanizmów prowadzących do programowanej śmierci komórki.

2.7.1 Ścieżki naprawy DNA

Istnieją dwa główne mechanizmy naprawy DSB. Są nimi rekombinacja homologiczna (ang. *homologous recombination*, HR) (Wright et al., 2018) oraz niehomologiczne łączenie końców (ang. *non-homologous end joining*, NHEJ) (Mahaney et al., 2009; Chang et al., 2017). HR to proces, w którym cząsteczki DNA o podobnych lub identycznych sekwencjach wymieniają między sobą informacje genetyczne. Jest to niezbędny mechanizm naprawy DNA, różnorodności genetycznej i dokładnej segregacji chromosomów podczas mejozy. Uszkodzona cząsteczka DNA szuka homologicznej sekwencji na siostrzanej chromatydzie lub homologicznym chromosomie. Natomiast NHEJ to szlak zaangażowany w naprawę DSB, który w przeciwieństwie do HR, nie wymaga homologicznej matrycy do naprawy i może występować w całym cyklu komórkowym. NHEJ jest uważany za mechanizm naprawczy, który jest podatny na błędy, ponieważ może prowadzić do utraty (delecje) lub dodania (insercje) nukleotydów w miejscu pęknięcia. Ten szlak naprawczy jest szczególnie aktywny w komórkach dzielących się lub podczas fazy G1 cyklu komórkowego, kiedy HR nie jest łatwo dostępna.

Na Rysunku 2.14 został przedstawiony schemat, który opisuje wybór ścieżki naprawy DSB, jej szybkość (określana jako *fast* lub *slow*) oraz dokładność w zależności od złożoności DSB (określana jako *error free* lub *error prone*) oraz fazy cyklu komórkowego. SSB, które mają komplementarne nici (Lieber, 2010), są natychmiastowo naprawiane poprzez szybką i standardową ścieżkę NHEJ (ang. *classical NHEJ*, c-NHEJ) (Löbrich and Jeggo, 2017). Proces ten polega na zespoleniu pasujących końców przecięcia w kilka minut, skutkując naprawą ponad 80% takich uszkodzeń wywołanych promieniowaniem o niskim LET w czasie 2-4 godzin. Ponieważ końce tych uszkodzeń często ulegają modyfikacjom chemicznym, mechanizm ten obejmuje enzymatyczną odbudowę końców DNA 5' i 3' przy pomocy kinazy/fosfatazy polinukleotydowej, enzymu kodowanego u ludzi przez gen PNKP (ang. *polynucleotide kinase 3'-phosphatase*) (Jilani et al., 1999). Szlak c-NHEJ jest dostępny przez cały cykl komórkowy i nie obejmuje przywracania sekwencji, w przeciwieństwie do procesu HR. Informacje podstawowe utracone na końcach uszkodzeń mogą nie zostać w pełni przywrócone, prowadząc do krótkich delecji części informacji genetycznej (Daley and Wilson, 2005). Jednakże naprawa najprostszych uszkodzeń tego typu przebiega bezbłędnie, a te, które nie zostaną dokładnie naprawione, skutkują jedynie niewielkimi delecjami. Z kolei większe delecje i rearanżacje w DNA są typowe po procesie c-NHEJ w przypadku złożonych uszkodzeń materiału genetycznego.



Rysunek 2.14: Mechanizm naprawy DSB w zależności od złożoności DSB oraz fazy cyklu komórkowego. Przedstawione zostały cztery ścieżki naprawy DBS, oznaczone (i-iv), ich dostępność w cyklu komórkowym i kluczowe białka naprawcze. Na tym schemacie nie pokazano głównych białek sygnalizacyjnych (ATM, ATR i H2AX), wspólnych dla wszystkich czterech szlaków. Po lewej: proste DSB są przetwarzane przez c-NHEJ. PNKP enzymatycznie odtwarza chemicznie modyfikowane końce 5' i 3'. Końce DSB są następnie ponownie łączone w procesie zależnym od kompleksu Ku70/Ku80-DNA PKCs. Po prawej: złożone DSB są naprawiane ze znacznie wolniejszą kinetyką poprzez zależną od resekcji c-NHEJ, (niezbyt często) alternatywną ścieżkę NHEJ (alt-NHEJ) lub HR. Obydwa wolne szlaki NHEJ są stosowane poza fazą G2, c-NHEJ podczas G1 i alt-NHEJ podczas pozostałych faz. W G2 złożone DSB są kierowane na ścieżkę HR, jeśli jest ona dostępna (Rucinski et al., 2021).

Uszkodzenia podwójnoniciowe, które częściej występują w wyniku działania promieniowania jonizującego o wysokim LET, podlegają naprawie za pośrednictwem jednej z dwóch ścieżek: HR, która jest dostępna jedynie w późnych fazach S (faza, podczas której dochodzi do replikacji DNA) i G2 (faza, podczas której następuje synteza białek wrzecion podziałowego), lub poprzez wolniejszą ścieżkę NHEJ zależną od procesu resekcji (Ensminger and Löbrich, 2020). W przypadku złożonego DSB proces c-NHEJ wymaga początkowo resekcji DNA, czyli przekształcenia uszkodzenia w jednoniciowe DNA (ang. *single stranded DNA*, ssDNA) i enzymatycznego usunięcia niewielkiego odcinka z uszkodzonych końców DNA w celu utworzenia długich odcinków odsłoniętego ssDNA. To odsłonięte ssDNA służy jako platforma do inicjacji szlaku i ułatwia późniejsze zespolenie końców uszkodzenia przy udziale kompleksu XRCC4-Ligaza IV (Riballo et al., 2004).

Inny wariant powolnego łączenia końców, znany jako alternatywny NHEJ (ang. *alternative NHEJ*, alt-NHEJ), to mniej efektywny i rzadko występujący mechanizm naprawy

DSB, który jest wykorzystywany gdy standardowy szlak c-NHEJ nie jest dostępny. W ramach alt-NHEJ wykorzystywane są różne zestawy białek NHEJ, w tym poli-ADP-rybozo 1 (PARP 1) (Löbrich and Jeggo, 2017). W przeciwieństwie do szlaku c-NHEJ, który jest ograniczony do fazy G1, alt-NHEJ pozostaje aktywny w innych fazach cyklu komórkowego. Warto zaznaczyć, że jedynie mechanizm HR umożliwia naprawę bez błędów, podczas gdy powolne mechanizmy c-NHEJ i alt-NHEJ często prowadzą do delecji i translokacji fragmentów chromosomów. Charakter tych procesów naprawczych, które przebiegają wolniej i są podatne na błędy poza fazą, może tłumaczyć zwiększoną mutagenność promieniowania o wysokim LET, dla którego częściej obserwowane są nienaprawione uszkodzenia DSB (Asaithamby et al., 2011; Falk et al., 2010).

Oprócz fazy cyklu komórkowego struktura chromatyny istotnie wpływa na reakcję na uszkodzenia DNA, zwłaszcza procesy naprawy uszkodzeń DNA (Cann and Deltre, 2011). Przeprowadzone badania potwierdzają tezę, że heterochromatyna i euchromatyna różnią się w kontekście indukcji uszkodzeń DNA oraz preferowanej ścieżki naprawy DNA (Goodarzi et al., 2008, 2010; Falk et al., 2010; Lorat et al., 2016). Struktura heterochromatyny pełni rolę ochronną przed atakiem wolnych rodników, charakterystycznego dla promieniowania o niskim LET, jednak nie chroni przed skupiskami bezpośredniej jonizacji, które prowadzą do złożonych uszkodzeń DNA (Falk et al., 2010). W związku z tym, w heterochromatynie częściej pojawiają się złożone DSB. Naprawa uszkodzeń DNA w heterochromatynie wymaga pierwotnej dekondensacji heterochromatyny, po której następuje wolniejsza naprawa przy wykorzystaniu szlaku c-NHEJ (w fazie G1) lub HR (w fazach S/G2) (Geuting et al., 2013).

2.7.2 Białko NBS1

DSB indukowane przez promieniowanie jonizujące aktywują kompleks Mre11-Rad50-NBS1 (MRN), gdzie rolą białka Nijmegen Breakage Syndrome 1 (NBS1) jest wykrywanie DSB, aktywacja kinazy białkowej ataxia telangiectasia mutated (ATM) oraz zapewnienie stabilności kompleksu przy uszkodzeniu DNA (Williams et al., 2007; Stracker and Petrini, 2011; Falk et al., 2012; Liu et al., 2017; Molinaro et al., 2021). Białka odgrywają ważną rolę w naprawie DNA, zarówno w procesie alt-NHEJ, jak i w HR. Po związaniu się z DSB, białka ATM, DNA-PKcs lub ATR fosforylują histon H2AX na serynie 139 jego C-końca, co powoduje powstanie γ -H2AX (Rogakou et al., 1998, 1999). To z kolei inicjuje rekrutację adapterów/mediatorów takich jak białko p53 (53BP1) lub BRCA1, w zależności od wyboru ścieżki naprawczej, niezbędnej do przekształcenia sygnału DDR oraz stanowiącą platformę rekrutacyjną dla innych czynników naprawczych (Zhang et al., 2006; Blackford and Jackson, 2017). Aktywowane białka odpowiedzi na uszkodzenie DNA gromadzą się w obszarach uszkodzenia, tworząc mikroskopijnie widoczne ogniska w obrębie jądra komórkowego (Rogakou et al., 1999). Częstotliwość tych ognisk jest związana z nasileniem uszkodzeń (Rothkamm et al., 2015), ale jest także regulowana przez czynniki modyfikujące sygnalizację odpowiedzi na uszkodzenie DNA (Jackson and Bartek, 2009; Ciccia and Elledge, 2010; Płodowska et al., 2022). W kontekście alt-NHEJ NBS1 i kompleks MRN (MRE11-RAD50-NBS1) odgrywają znaczącą rolę w naprawie DNA.

Rozdział 3

Badania radiobiologiczne

Badania radiobiologiczne obejmują badanie wpływu promieniowania jonizującego na organizmy żywe, w tym na człowieka. Mają one na celu zrozumienie mechanizmów indukcji uszkodzeń wywołanych promieniowaniem, ocenę ryzyka związanego z ekspozycją na promieniowanie oraz opracowanie strategii ochrony przed promieniowaniem. Eksperymenty są prowadzone na różnych poziomach organizacji DNA, aby uzyskać kompleksowe zrozumienie skutków promieniowania. Oprócz podejścia doświadczalnego ważną rolę w radiobiologii odgrywają symulacje przy użyciu modelowania metodami Monte Carlo. Są one doskonałą metodą oceny właściwości fizycznych, które są niemożliwe lub trudne do zmierzenia.

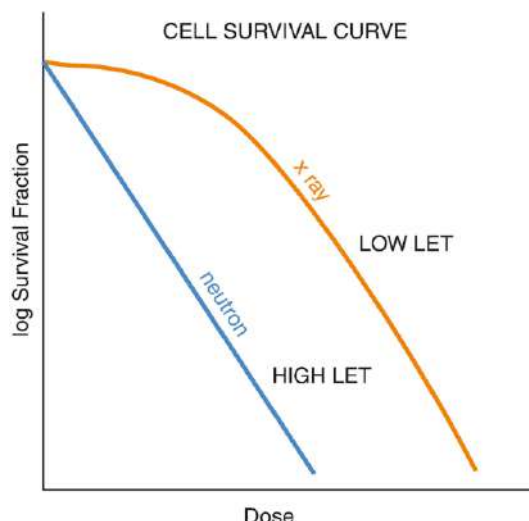
Do opisu rodzaju prowadzonych eksperymentów lub badań używane są łacińskie terminy *in vitro*, *in vivo* i *in silico*. Termin *in vitro* odnosi się do eksperymentów lub procesów przeprowadzanych w kontrolowanych warunkach poza organizmem żywym. Zwykle obejmuje to użycie izolowanych komórek, tkanek lub cząsteczek biologicznych w probówce. Badaniu procesów biologicznych *in vivo* są prowadzone w organizmach żywych, takich jak zwierzęta lub ludzie. Termin *in silico* obejmuje wykorzystanie technik komputerowych, algorytmów i danych do symulacji procesów biologicznych lub innych zjawisk.

3.1 Badania *in vitro*

3.1.1 Przeżywalność komórkowa

Test klonogeny, zwany również testem tworzenia kolonii, jest podstawową techniką stosowaną w radiobiologii do oceny zdolności komórek do proliferacji po ich ekspozycji na promieniowanie jonizujące. Jest uważany za złoty standard w ocenie odpowiedzi komórkowej na promieniowanie i jest szeroko stosowany w badaniach dla zrozumienia mechanizmów śmierci komórek wywołanej promieniowaniem. W przeprowadzonym teście mierzona jest zdolność poszczególnych komórek do tworzenia kolonii, czyli skupisk przynajmniej 50 komórek pochodzących z pojedynczej komórki, która przeżyła. Możliwość tworzenia identycznej kopii komórki, która jest genetycznie identyczna z pierwowzorem, nazywana jest zdolnością klonowania.

Test dostarcza informacji na temat frakcji komórek, które przeżyły po ekspozycji na promieniowanie. Frakcję komórek, które przeżyły (ang. *surviving fraction*, SF), oblicza



Rysunek 3.1: Krzywa dawka-efekt, która została otrzymana w teście klonogennym dla komórek poddanych działaniu promieniowania X (krzywa pomarańczowa) oraz neutronów (krzywa niebieska) (Giridhar and Rath, 2020).

się normalizując liczbę kolonii do liczby wysianych komórek w próbkach napromienianych i dzieląc ją przez znormalizowaną liczbę kolonii w próbkach kontrolnych, które nie zostały napromienione. Krzywa przeżycia, która przedstawia tak obliczoną frakcję przeżywającą w funkcji dawki promieniowania, jest często analizowana w celu określenia parametrów, takich jak wrażliwość na promieniowanie, zależności dawka — odpowiedź oraz dawka wymagana do zabicia określonej części komórek danej linii komórkowej. Przykładowa krzywa, która została wyznaczona z danych otrzymanych w teście klonogennym dla komórek poddanych działaniu promieniowania X i neutronów, została przedstawiona na Rysunku 3.1.

Krzywą przeżycia komórek można opisać za pomocą modelu liniowo-kwadratowego, który jest opisany wzorem:

$$SF(D) = \exp(-\alpha D - \beta D^2), \quad (3.1)$$

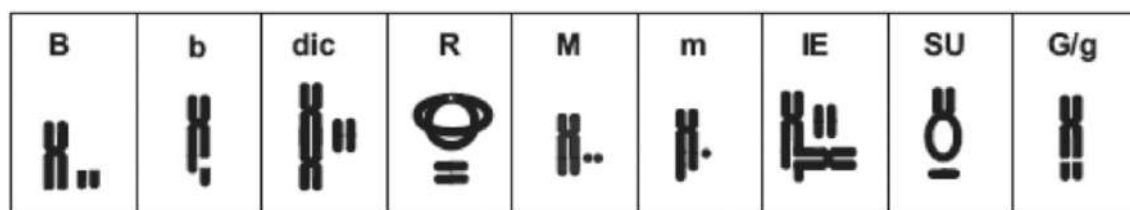
gdzie D określa wykorzystaną dawkę promieniowania (Begg and Steel, 2002; K. Sachs and DJ Brenner, 1997; Brenner et al., 1998). Współczynnikiem opisującym kształt krzywej jest stosunek α/β , który określa wrażliwość tkanki na frakcjonowane napromienianie, a przy pomocy parametrów α i β możliwe jest wyznaczenie odpowiednio letalnych i subletalnych uszkodzeń.

3.1.2 Aberracje chromosomowe i mikrojądra

Aby zbadać odpowiedź komórkową na poziomie DNA, wykorzystuje się testy radiobiologiczne z użyciem chromosomów, czyli test aberracji chromosomowych oraz mikrojąder.

Test aberracji chromosomowych jest badaniem cytogenetycznym stosowanym do wykrywania i analizowania zmian strukturalnych w chromosomach wywołanych różnymi czynnikami, w tym ekspozycją na promieniowanie jonizujące. Aberracje chromosomowe to zmiany w strukturze lub liczbie chromosomów (Kellerer and Rossi, 1974). Rodzaje

aberracji chromosomowych zostały przedstawione na Rysunku 3.2.

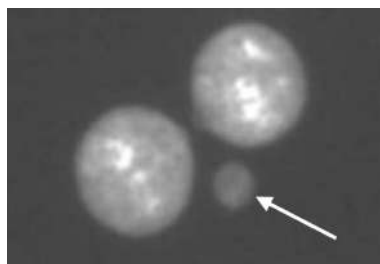


Rysunek 3.2: Rodzaje aberracji chromosomowych (B: pęknięcie chromosomu; b: pęknięcie chromatydy; dic: chromosom dicentryczny; R: pierścień; M: oderwanie małej części chromosomu; m: oderwanie małej części chromatydy; IE: wymiana międzychromosomalna; SU: połączenie siostrzane; G/g: chromosom/przerwa chromatydowa) (Gałęcki et al., 2019).

Specyficznym typem aberracji chromosomowych, który jest powszechnie stosowany jako biodozymetr w radiobiologii i dozymetrii promieniowania, jest chromosom dicentryczny (dicentryk). Jest to aberracja strukturalna, która pojawia się, gdy dwa fragmenty chromosomów z zachowanymi centromerami łączą się ze sobą, w wyniku czego powstaje pojedynczy chromosom z dwoma centromerami. Dicentryki powstają w wyniku uszkodzeń DNA wywołanych promieniowaniem jonizującym, w szczególności pęknięć dwuniciowych (Staaf et al., 2013). Analiza dicentryków zapewnia ilościową miarę narażenia na promieniowanie i jest przydatna w przypadkach, gdy wymagane jest oszacowanie dawki przypadkowego lub zawodowego narażenia na promieniowanie. Ma zastosowanie w biodozymetrii radiacyjnej, reagowaniu na zdarzenia radiacyjne i dozymetrii retrospektywnej, przyczyniając się do oceny zagrożeń zdrowotnych związanych z promieniowaniem (Tucker et al., 1993).

Natomiast test mikrojądrowy jest jedną z najpopularniejszych metod oceny genotoksyczności różnych czynników chemicznych i fizycznych, w tym uszkodzeń DNA wywołanych promieniowaniem jonizującym (Sommer et al., 2020). Mikrojądrem nazywane jest małe jądro komórkowe widoczne w cytoplazmie komórki, które tworzy się, gdy chromosom lub fragment chromosomu nie jest włączony do jednego z jąder potomnych podczas podziału komórki. Obraz mikrojądra został przedstawiony na Rysunku 3.3. Analiza w teście mikrojąder polega na określeniu liczby mikrojąder obecnych w badanych próbkach. Na podstawie liczby mikrojąder można ocenić, czy i jak bardzo promieniowanie jonizujące uszkadza DNA. Większa liczba mikrojąder może wskazywać na większy stopień uszkodzenia genetycznego.

Testy mikrojąder i aberracji chromosomowych są potencjalnie użytecznymi narzędziami w przypadku awaryjnej sytuacji radiologicznej, gdzie konieczna jest szybka ocena ekspozycji na promieniowanie i skutków dla zdrowia osób, które w takim wypadku uczestniczyły. Wyniki analizy zdjęć mikroskopowych próbek krwi pobranych od poszkodowanych, zależą od doświadczenia osoby, która liczy mikrojądra lub klasyfikuje aberracje chromosomowe. Według przeprowadzonych badań oba testy dają możliwość oceny odpowiedzi na dawkę nawet przez osoby bez doświadczenia. Badania sugerują, że test mikrojądrowy wydaje się być bardziej przystępny w nauce i analizie, co prowadzi do trafnej oceny reakcji komórkowych na napromieniowanie (Gałęcki et al., 2019). Niemniej jednak, za-



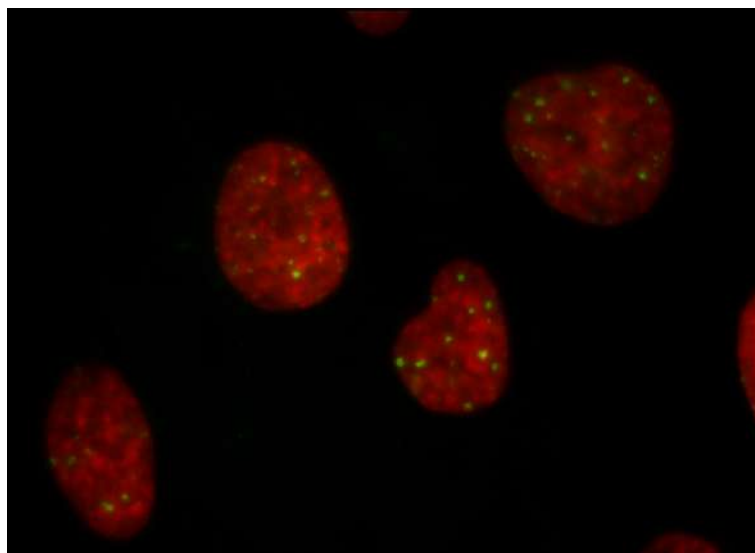
Rysunek 3.3: Obraz mikroskopowy dwujądrazastej komórki limfocyty ludzkiego z widocznym w cytoplazmie mikrojądrem (zaznaczonym strzałką) (Sommer et al., 2020).

równy test dicentryków, jak i test mikrojąder są rekomendowanymi przez Europejską Sieć Biodozymetrii RENEb narzędziami biodozymetrycznymi (Wojcik et al., 2017).

3.1.3 Ogniska naprawcze i ich mobilność

Ogniska naprawcze są to obszary w jądrze komórkowym, w których gromadzą się białka naprawy DNA w odpowiedzi na uszkodzenie. Wybór białek naprawczych zależy od konkretnych aspektów naprawy DNA lub stabilności genomu, które są podstawą badania. W odpowiedzi na DSB biorą udział białka indukujące różne ścieżki naprawy, a wybór właściwych pozwala skoncentrować się na określonych mechanizmach lub odpowiedziach komórkowych. Obserwacja ognisk powstających w komórkach poddanych działaniu promieniowania jonizującego (ang. *radiation-induced foci*, RIF) jest powszechną techniką stosowaną w radiobiologii do badania powstawania i naprawy pęknięć dwuniciowych DNA (Belyaev, 2010). Tworzenie ognisk jest częścią odpowiedzi komórkowej na stres genotoksyczny i służy jako mechanizm rekrutacji innych białek naprawczych i aktywacji szlaków naprawy DNA. Dzięki obserwacji i analizie liczby, wielkości i intensywności świecenia ognisk można uzyskać wgląd w odpowiedź komórkową na uszkodzenia DNA wywołane promieniowaniem (Takahashi and Ohnishi, 2005; Kuo and Yang, 2008). Przykładowy obraz ognisk naprawczych z mikroskopu fluorescencyjnego, które powstały w jądrach komórkowych napromienionych dawką 1 Gy promieniowania γ został przedstawiony na Rysunku 3.4.

Procesy komórkowe można badać poprzez obrazowanie preparatów utrwalonych komórek lub poprzez bezpośrednie rejestrowanie żywych komórek w czasie rzeczywistym. Obrazowanie żywych komórek jest szeroko stosowaną techniką mikroskopową do badania zachowania i funkcji na nieutrwalonym preparacie komórkowym (Sollazzo et al., 2018). Przewagą tej techniki jest możliwość obserwacji dynamiki procesów komórkowych, takich jak rekrutacja białek. Istnieje kilka metod obrazowania powszechnie stosowanych w obrazowaniu żywych komórek. Jedną z nich jest mikroskopia fluorescencyjna, która wykorzystuje barwniki lub genetycznie kodowane białka fluorescencyjne do znakowania określonych składników komórkowych albo cząsteczek będących przedmiotem zainteresowania (Jakl et al., 2020). Znakując białko markerami fluorescencyjnymi, np. białkiem zielonej fluorescencji (ang. *green fluorescent protein*, GFP), możliwe jest obserwowanie jego lokalizacji w jądrze komórkowym i zmiany jego położenia lub ruchu w odpowiedzi na



Rysunek 3.4: Przykładowy obraz jąder komórkowych wybarwionych na kolor czerwony wraz z ogniskami naprawczymi (fluorescencyjnie świecącymi w kolorze zielonym) w środku. Obiekty były obserwowane w 100-krotnym powiększeniu.

uszkodzenie DNA (Remington, 2011; Jakob and Durante, 2012).

Ogniska zawierające białko naprawcze poruszają się wewnątrz komórek. Badanie ruchliwości RIF pozwala zrozumieć dynamikę procesów naprawy DNA oraz reakcję komórek na działanie promieniowania jonizującego (Ariumi et al., 2018; Aten et al., 2004; Dion et al., 2013; Lottersberger et al., 2015; Mok et al., 2014; Smith et al., 2019; Soutoglou and Misteli, 2007). Analizując poruszanie się ognisk naprawczych, można zauważyć takie ogniska naprawy DNA, które pozostają stosunkowo statyczne lub nieruchome w jądrze. Może to sugerować, że mechanizm naprawczy jest stabilnie zlokalizowany w miejscu uszkodzenia DNA, co pozwala na skuteczną naprawę. W innych sytuacjach ogniska wykazują zachowanie dynamiczne, poruszają się w obrębie jądra komórkowego. Tę dynamiczną mobilność można przypisać różnym czynnikom, w tym poszukiwaniu homologicznych sekwencji DNA (w przypadku naprawy HR) lub skanowaniu DNA pod kątem uszkodzeń (Bordelet and Dubrana, 2019). Czynnikiem, który wpływa na mobilność, jest między innymi wybranie konkretnej ścieżki naprawy. W przypadku HR procesy poszukiwania homologa są dynamiczne, co prowadzi do bardziej dynamicznych ognisk. W przeciwieństwie do tego naprawa NHEJ może wykazywać bardziej stabilne ogniska. Ruchliwość RIF może zmieniać się również w trakcie naprawy DNA. Podczas wstępnego wykrywania i sygnalizowania uszkodzeń DNA ogniska mogą być bardziej dynamiczne. Po zakończeniu rekrutacji mechanizmów naprawczych mogą one stać się bardziej statyczne. Ważnym czynnikiem wpływającym na mobilność ognisk jest również struktura chromatyny (Jakob et al., 2009). Heterochromatyna jest zwykle bardziej zwarta i może ograniczać mobilność, podczas gdy euchromatyna pozwala na większą mobilność ognisk.

Istnieje szereg problemów w eksperymentach, w których wykorzystywane są żywe komórki. Po pierwsze, komórki muszą przetrwać w czasie wykonywania obrazowania. Oznacza to, że warunki środowiskowe, takie jak temperatura, wilgotność powietrza oraz stężenie

składników odżywczych i tlenu, muszą być ściśle kontrolowane w eksperymentach trwających dłużej niż kilka godzin. Innym problemem jest fototoksyczność i fotowysbielenie (Ishikawa-Ankerhold et al., 2012; Icha et al., 2017). Oświetlenie, zwłaszcza jeśli obrazowanie wymaga światła o dużym natężeniu, może uszkodzić komórki, a także może wywoływać *photobleaching*. Jest to proces, w którym fluorofor (barwnik fluorescencyjny) traci zdolności fluorescencyjne po ekspozycji na światło będące czynnikiem uszkadzającym jego strukturę chemiczną. Co więcej, migrujące komórki i przesuwanie się ognisk stanowią duże wyzwanie podczas długotrwałego obrazowania. Ponadto pojedyncze ognisko w jądrze komórkowym często odnosi się do skupiska lub nagromadzenia wielu pęknięć, a nie tylko do pojedynczego DSB. Aby móc zbadać pojedyncze DSB, należy użyć technik genomowych zaprojektowanych do identyfikacji i analizy poszczególnych DSB.

3.1.4 i-BLESS

i-BLESS (in situ Breaks Labeling, Enrichment on Streptavidin and Next-generation Sequencing) to technika biologii molekularnej stosowana do mapowania pęknięć podwójnoniciowych DNA w wysokiej rozdzielczości w całym genomie. Łączy wzbogacenie fragmentów DNA zawierających DSB z sekwencjonowaniem nowej generacji w celu zidentyfikowania i scharakteryzowania regionów genomu, w których występują pęknięcia. Metoda pozwala na kompleksową analizę uszkodzeń i dynamiki naprawy DNA w skali całego genomu (Biernacka et al., 2018). Zastosowanie techniki i-BLESS umożliwia identyfikację określonych miejsc, które są podatne na uszkodzenia DNA, potencjalnie łącząc te miejsca z procesami biologicznymi, takimi jak stres replikacyjny, konformacja chromatyny lub niestabilność genomu (Biernacka et al., 2021).

Metoda i-BLESS może stanowić doskonałe uzupełnienie do metody analizy ognisk naprawczych, ze względu na zapewnienie różnej perspektywy na procesy uszkodzeń i naprawy DNA. Za pomocą metody i-BLESS możliwe jest otrzymanie informacji o liczbie powstających DSB w całym genomie, podczas gdy analiza ognisk dostarcza informacji na temat dynamiki białek naprawczych na poziomie subkomórkowym.

3.2 Badania *in silico*

Modelowanie skutków oddziaływania promieniowania z materiałem biologicznym metodą Monte Carlo jest cennym podejściem w badaniach radiobiologicznych. Metoda MC pozwala na symulację oddziaływań promieniowania na poziomie nanoskopowym, dostarczając wglądu w depozycję energii i wynikające z niej skutki biologiczne. Istnieje wiele narzędzi do modelowania metodami Monte Carlo, które są stosowane w badaniach skutków promieniowania w materiale biologicznym. Lista narzędzi została przedstawiona w publikacji (Kyriakou et al., 2021). Pierwszy kod symulujący strukturę toru został opracowany dla elektronów w parze wodnej przez fizyków zajmujących się promieniowaniem w Gesellschaft für Strahlenforschung (GSF, Niemcy) (Booz et al., 1974). Kod ten był dalej udoskonalany, co później doprowadziło do powstania serii kodów MOCA (Modular Object-Centric Approach) (Wilson and Paretzke, 1981). Pod koniec lat 90. ich wspólna praca stała się podstawą kodu symulacyjnego umożliwiającego modelowanie struktury to-

ru dla przekrojów czynnych wody ciekłej PARTRAC (Particle Tracking Code) (Friedland et al., 2011, 2017), który zawiera szczegółowy geometryczny model chromatyny-DNA (Friedland et al., 1998). Przegląd innych kodów symulacji biofizycznej struktury torów można znaleźć na przykład w pracach (Nikjoo et al., 2006; Dingfelder, 2012).

PARTRAC to zbiór kodów używany do symulacji metodami Monte Carlo transportu i zachowania cząstek w różnych ośrodkach, w szczególności do badania *in silico* skutków promieniowania w materiałach i systemach biologicznych. Stosowany jest przede wszystkim w dziedzinie radiobiologii i ochrony przed promieniowaniem. PARTRAC umożliwia modelowanie transportu różnych typów cząstek, takich jak elektrony, protony, cząstki α i ciężkie jony, przez różne materiały. Uwzględnia interakcje fizyczne i biologiczne, takie jak rozpraszanie, utrata energii oraz uszkodzenia spowodowane promieniowaniem i ich naprawa. Ma na celu dostarczenie szczegółowych informacji na temat przestrzennego rozkładu depozycji energii promieniowania i wynikających z tego uszkodzeń DNA na poziomie mikroskopowym (Friedland et al., 2011). Oddziaływania fizyczne charakteryzują się funkcjami gęstości prawdopodobieństwa, które są powiązane z przekrojami czynnymi. Do symulacji wymagane są przekroje, które służą do określenia średniej swobodnej drogi cząstki i wyboru konkretnego typu interakcji. W PARTRACu przekroje czynne dla oddziaływań fotonów pobierane są z biblioteki EPDL97 (Cullen et al., 1997). Baza ta została szczegółowo porównana z danymi eksperymentalnymi. Są w niej zawarte przekroje czynne na rozpraszanie elastyczne, efekt fotoelektryczny, rozpraszanie Comptona, wytwarzanie par i procesy relaksacyjne poprzez emisję fotonów fluorescencyjnych lub elektronów Augera. Przekroje czynne dla badanego materiału obliczane są z przekrojów czynnych przy użyciu praw addytywności i skalowania gęstości (Brahme, 2014).

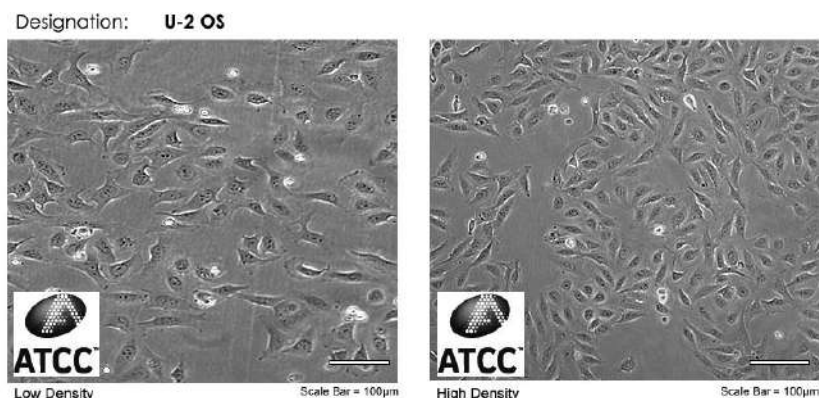
W 2001 r. został zainicjowany projekt Geant4-DNA jako rozszerzenie ogólnego zestawu narzędzi Geant4 (Agostinelli et al., 2003; Allison et al., 2016). Projekt Geant4-DNA został zrealizowany i opracowany specjalnie w celu modelowania i przewidywania biologicznych uszkodzeń DNA w wyniku promieniowania (Chauvie et al., 2006; Incerti et al., 2010). Rozszerzenie Geant4-DNA jest w pełni zawarte w zestawie narzędzi Geant4 o otwartym kodzie źródłowym. Geant4-DNA umożliwia modelowanie bardziej złożonej (w porównaniu do kodów PARTRAC) konfiguracji eksperymentalnej. Ponadto pozwala na wyznaczenie dawek pochłoniętych przez obiekty komórkowe, takie jak cytoplazma czy jądro komórkowe (Incerti et al., 2006). W Geant4-DNA dostępne są trzy modele fizyczne nazwane opt2, opt4 i opt6. Opt2 opiera się na modelach jonizacji i wzbudzenia Borna oraz modelu rozpraszania elastycznego Championa. Opt4 obejmuje modele jonizacji i wzbudzenia Emfietzoglou oraz model rozpraszania Rutherforda. Opt6 obejmuje modele CP100 dla jonizacji, wzbudzenia i rozpraszania elastycznego (Incerti et al., 2018).

Rozdział 4

Materialy i metody

4.1 Materiał komórkowy

Badania zostały przeprowadzone z wykorzystaniem komórek mięsaka kościopochodnego, który jest najczęstszym nowotworem złośliwym kości u dzieci (Niforou et al., 2008). Linia U2OS to komórki, które zostały pobrane od piętnastoletniej kobiety. W celu oznaczenia białka naprawczego NBS1 linia komórkowa U2OS została trwale transfekowana plazmidem kodującym GFP. Procedura transfekcji została dokładnie opisana i scharakteryzowana w pracy (Lukas et al., 2011). Komórki, na których przeprowadzono badania, zostały udostępnione przez dr Claudię Lukas z Danish Cancer Society w Kopenhadze. Obraz komórek U2OS pod mikroskopem został przedstawiony na Rysunku 4.1.



Rysunek 4.1: Wygląd komórek linii U2OS pod mikroskopem. Zdjęcie pochodzi z bazy American Type Culture Collection (ATCC): <https://www.atcc.org/products/htb-96>. Na lewym panelu zostały przedstawione komórki o mniejszej konfluencji, a na prawym panelu — o większej.

Komórki były przechowywane w inkubatorze do hodowli komórkowych *in vitro* w temperaturze 37°C z 5% CO₂ oraz wilgotnością powietrza na poziomie 95%. Pasażowanie komórek zostało opisane w Dodatku A: Protokół laboratoryjny hodowli komórek U2OS. Hodowla komórkowa była prowadzona w zmodyfikowanej pożywce Dulbecco Modified Eagles (Sigma-Aldrich, D6046, Sztokholm, Szwecja) uzupełnionej płodową surowicą bydlęcą (Thermo Scientific, nr kat. SH30072.3, Sztokholm, Szwecja) zawierającą niezbęd-

ne składniki do wzrostu i proliferacji komórek oraz antybiotykiem (roztwór penicyliny-streptomycyny) zapobiegającym kontaminacji bakteryjnej. Dwa dni przed napromienianiem 10^5 komórek wysiewano na okrągłe szklane szkiełka nakrywkowe o średnicy 25 mm. Długość cyklu komórkowego komórek z linii U2OS wynosi około 18–20 godzin, zatem można oczekiwać, że 48-godzinny odstęp pomiędzy wysiewaniem a napromienianiem będzie obejmował około 2,5 cykli komórkowych (Grant et al., 2013). W dniu napromieniania szkiełko nakrywkowe z komórkami było umieszczane na poliamidowej płytce i przykrywane folią Mylar, co zostało przedstawione na Rysunku 4.2. Następnie płytka była umieszczana w urządzeniach do napromieniania materiału biologicznego.



Rysunek 4.2: Poliamidowa płytka ze szkiełkami nakrywkowymi, na których są wysiane komórki. Szkiełka są przykryte cienką folią Mylar w celu odseparowania komórek od środowiska zewnętrznego.

4.2 Układ eksperymentalny

W niniejszej pracy zostały wykonane badania eksperymentalne z użyciem dwóch rodzajów promieniowania jonizującego — cząstek α oraz promieniowania γ . Wybór tych rodzajów promieniowania był podyktowany różnicą w ich sposobie oddziaływania z materią, co w konsekwencji oznacza różny sposób indukcji uszkodzeń materiału genetycznego zawartego w komórkach. Oba rodzaje promieniowania powstają w wyniku przemian jądrowych izotopów promieniotwórczych, co zostało omówione w Rozdziale 2. W eksperymentach z komórkami linii U2OS został wykorzystany izotop ^{241}Am jako emiter cząstek α oraz ^{137}Cs jako źródło promieniowania γ . Oba źródła są dostępne w laboratorium Zakładu Biologii Molekularnej Uniwersytetu w Sztokholmie.

4.2.1 Promieniowanie α

Na Rysunku 4.3 przedstawione zostało urządzenie AIF 08 (zbudowane w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie), które służy do napromieniania komórek z wykorzystaniem promieniowania α . Emiterem cząstek α jest izotop ^{241}Am (AP1 s/n 101; Eckert and Ziegler, Berlin, Niemcy) o aktywności wynoszącej 5 MBq, który dostarcza cząstki α z fluencją (23800 ± 4600) cząstek na sekundę. Moc dawki w czasie wykonywania eksperymentów wynosiła $0,223 \text{ Gy/min}$. LET cząstek α wynosił $(91 \pm 9) \text{ keV } \mu\text{m}^{-1}$. Szczegóły dotyczące weryfikacji dozymetrycznej źródła zostały opisane w (Staaf et al., 2012c).

Istotnym elementem urządzenia jest mechanizm automatycznie przesuwiający napromienianą próbkę w kierunku źródła promieniotwórczego i odsuwający ją po zakończonym napromienieniu. Dzięki temu zapewniona jest precyzyjna kontrola czasu napromieniania próbki.



Rysunek 4.3: Urządzenie AIF 08, w którym znajduje się źródło ameryku. Zdjęcie urządzenia, w którym materiał biologiczny jest umieszczany na ruchomym stoliku automatycznie przysuwającym się do źródła. Dzięki temu odległość pomiędzy powierzchnią źródła a napromienianym materiałem jest niewielka i odtwarzana w każdym pomiarze.

Źródło cząstek α (znajdujące się w AIF 08) jest częścią urządzenia MAX, które jest wykorzystywane do jednoczesnego napromienienia cząstkami α i promieniowaniem X. Źródłem promieniowania X jest lampa rentgenowska o napięciu 190 kV, umieszczona pod inkubatorem. Ze względu na niską moc dawki promieniowania fotonowego nie zostało ono wykorzystane w badaniu prezentowanym w niniejszej pracy. Wykorzystanie źródła promieniowania γ , którym zostało zastąpione źródło X, umożliwiło otrzymanie porównywalnych czasów napromieniania dwoma rodzajami promieniowania (7 min 32 s dla źródła promieniowania α , a 5 min 37 s dla źródła promieniowania γ).

4.2.2 Promieniowanie γ

Promieniowanie γ było dostarczane za pomocą aparatu Scanditronix IC900 (Scanditronix AB, Uppsala, Szwecja). Jest to urządzenie do ekspozycji komórek w zamkniętej komorze, w której znajdują się dwa źródła ^{137}Cs o aktywności 16,65 TBq emitujące promieniowanie γ o energii 662 keV. LET promieniowania γ został obliczony z wykorzystaniem symulacji za pomocą programu SRIM (Ziegler et al., 2010) i wynosił 1 keV/ μm . Źródła ^{137}Cs zostały skalibrowane za pomocą dozymetrii Fricke'a (Broszkiewicz, 1971) we współpracy ze Szwedzkim Narodowym Laboratorium Metrologii przy Szwedzkim Urzędzie ds. Bezpieczeństwa Promieniowania. Moc dawki w czasie wykonywania eksperymentów wynosiła 0,372 Gy/min.

Badana próbka z komórkami jest umieszczana na stoliku znajdującym się pomiędzy źródłami. Zdjęcie wsuwanego do urządzenia stolika wraz ze schematem ułożenia źródeł promieniotwórczych względem szalki z materiałem komórkowym został przedstawiony na Rysunku 4.4. W czasie ustawiania stolika, w pozycji umożliwiającej ułożenie napromienianego materiału, źródła pozostają zasłonięte. Po umieszczeniu stolika w środku komory, źródła promieniotwórcze są wysuwane, a czas napromienienia jest odliczany od momentu ich całkowitego odsłonięcia.



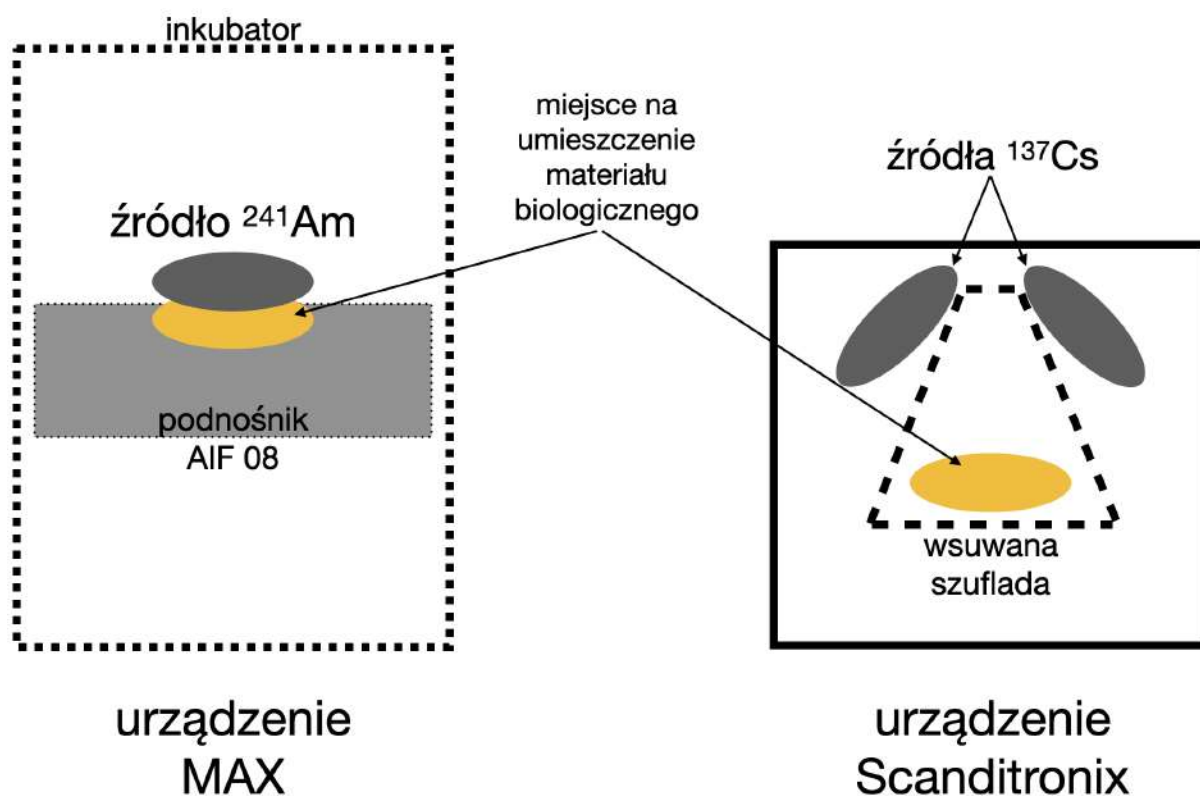
Rysunek 4.4: Komora aparatu Scanditronix, w której próbki są napromieniane promieniowaniem fotonowym. Zdjęcie wysuwanej szuflady, na której umieszczany jest materiał biologiczny do napromieniania. Próbkę jest umieszczana pomiędzy znacznikami, co zapewnia równomierny rozkład dawki. Następnie szuflada jest wsuwana do urządzenia i rozpoczyna się odsłanianie źródeł, a następnie napromienianie.

4.3 Procedury eksperymentalne

4.3.1 Napromienianie sekwencyjnymi wiązkami mieszanymi

Komórki były napromieniane według czterech scenariuszy: (I) napromieniane cząstkami α w urządzeniu MAX, (II) napromieniane promieniowaniem γ w komorze Scanditronix, (III i IV) napromienianie wiązkami mieszanymi: γ po α i α po γ z uwzględnieniem przenoszenia materiału biologicznego z jednego urządzenia do drugiego. Schematy wykorzystanych do napromieniania urządzeń zostały przedstawione na Rysunku 4.5.

Dawki, które zostały użyte do napromieniania to odpowiednio 1,7 Gy, 2 Gy oraz 1,85 Gy. W celu napromieniania komórek, szkiełko nakrywkowe z komórkami było pokrywane 250 μ l pożywki do hodowli komórkowej i następnie przykrywane 2,5 μ m folią Mylar. Przygotowana próbka była umieszczana w komorze Scanditronix i napromieniana z wykorzystaniem promieniowania γ . Czas napromieniania kontrolowano zgodnie z wynikami przeprowadzonej dozymetrii. W przypadku napromienienia cząstkami α szkiełko nakrywkowe z komórkami i folią Mylar umieszczono na poruszanej silnikiem półce, która przesuwiała komórki w kierunku źródła. Napromienianie rozpoczynało się w momencie

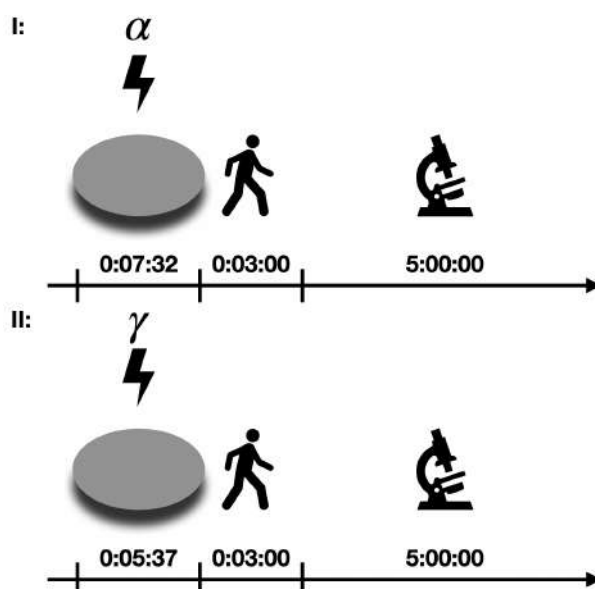


Rysunek 4.5: Dwa urządzenia wykorzystane do napromienienia komórek. Po lewej zostało przedstawione urządzenie MAX z wbudowanym źródłem ^{241}Am , a po prawej urządzenie Scanditronix z dwoma źródłami ^{137}Cs . Na obu schematach zostało zaznaczone miejsce, w którym umieszczana jest płytka z materiałem komórkowym (żółty element) przedstawiona na Rysunku 4.2.

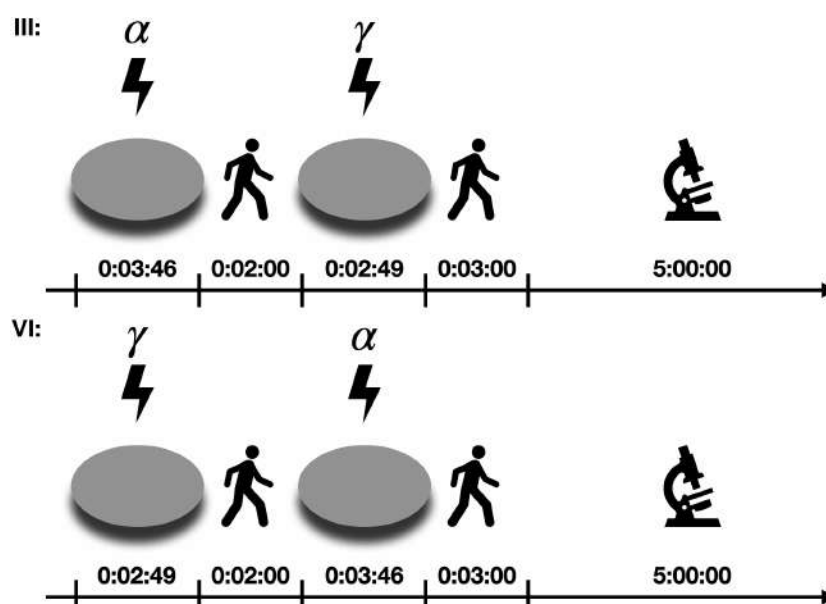
zetknięcia szkiełka nakrywkowego ze źródłem i było zatrzymywane przez opuszczenie półki. Oba napromieniania miały miejsce w temperaturze pokojowej. Czas napromieniania potrzebny do dostarczenia 1,7 Gy promieniowania α wynosił 7 min 32 s. Dostarczenie 2 Gy promieniowania γ zajęło 5 min 37 s. Rozbieżności między dawkami promieniowania α i γ wynikają z niedokładności w obliczeniach dotyczących mocy dawki promieniowania α , które zostały dostrzeżone po zakończeniu eksperymentu. Schematy napromieniania komórek dwoma rodzajami promieniowania jonizującego zostały przedstawione na Rysunku 4.6. Czas, który był potrzebny na przeniesienie próbki z układu do napromieniania do układu do obserwacji pod mikroskopem, wynosił 3 min. Komórki były obserwowane pod mikroskopem przez 5 godzin.

Czas ekspozycji na dawkę 1,85 Gy pochodzącą od wiązek mieszanych wynosił 6 min 33 s (co odpowiada połowie zsumowanych czasów ekspozycji komórek na cząstki α i promieniowanie γ osobno). Przeniesienie próbki komórek z jednego źródła do drugiego zajmowało około 2 min. Całkowity czas ekspozycji na wiązki mieszane wynosił więc około 8 min 33 s (w przybliżeniu 9 min). Komórki zostały napromienione kombinacją 45% promieniowania α i 55% promieniowania γ . Sekwencyjna ekspozycja na wiązki mieszane promieniowania jonizującego została przeprowadzona na dwa sposoby. W pierwszym scenariuszu (III) materiał biologiczny najpierw napromieniano cząstkami α (w urządzeniu

MAX), a następnie, po około 2 minutach potrzebnych na przeniesienie szalki z jednego źródła do drugiego, komórki napromieniano promieniowaniem γ (w urządzeniu Scanditronix). W drugim scenariuszu (IV) została zastosowana odwrotna kolejność. Schemat napromieniania sekwencyjnymi wiązkami mieszanymi dla oby scenariuszy (III i IV) został przedstawiony na Rysunku 4.7.



Rysunek 4.6: Schematy napromieniania komórek linii U2OS dwoma rodzajami promieniowania jonizującego: (I) cząstkami α i (II) promieniowaniem γ .



Rysunek 4.7: Schematy dwóch scenariuszy napromieniania komórek linii U2OS sekwencyjnymi wiązkami mieszanymi: (III) napromienienie cząstkami α , a następnie promieniowaniem γ , (IV) odwrotna kolejność zastosowania promieniowania α i γ .

4.3.2 Mikroskopia fluorescencyjna żywych komórek

Natychmiast po napromienieniu szkiełka nakrywkowe z komórkami były umieszczane w ogrzanej do 37°C komorze ze stali nierdzewnej. Komora wielkości standardowego szkiełka mikroskopowego ma studzienkę bez dna, w której umieszczane jest okrągłe szkiełko nakrywkowe i uszczelniane pierścieniem O-ring z plastikową nakrętką Sykes-Moore (Sollazzo et al., 2018; Scherthan and Adelfalk, 2011). Zdjęcie komory zostało umieszczone na Rysunku 4.8. Zagłębienie wypełniane było wstępnie ogrzaną pożywką wzrostową uzupełnioną pirogronianem sodu i 10 mM HEPES (Applied Chem GmbH, A3268, Hamburg, Niemcy) dla stabilności pH. Szkiełko nakrywkowe było umieszczane luźno na powierzchni wypełnionej studzienki, aby zapobiec parowaniu pożywki. Aby uniknąć pęcherzyków powietrza, zachowywana była ostrożność przy nakładaniu szkiełka. Metalowa komora z żywymi komórkami była składana zgodnie z krokami opisanymi powyżej natychmiast po napromienianiu, co trwało około 3 min. Następnie rozpoczynane było obrazowanie komórek pod mikroskopem. Badanie przeprowadzane było w temperaturze 37°C w samodzielnie skonstruowanej komorze środowiskowej z kontrolowaną temperaturą, która była zamontowana na odwróconym mikroskopie Carl Zeiss Axiovert 200 (Jena, Niemcy) (Illner and Scherthan, 2013). Jądra komórkowe obserwowane pod mikroskopem były wybierane losowo. Podczas jednego pomiaru rejestrowane były średnio dwa jądra komórkowe. Fluorescencja NBS1-GFP była wzbudzana przez 120 ms ekspozycję na światło o długości fali 488 nm z monochromatora Polychrome IV (TILL Photonics, Gräfelfing, Niemcy) i rejestrowana za pomocą kamery CCD (PCO Sensicam, Kelheim, Niemcy). Zdjęcia były wykonywane w odstępach 1-minutowych przez 300 minut. Obrazy zostały zarejestrowane przy użyciu oprogramowania TILL Photonics Imaging System (TILLvisION v3.3, TILL, Gräfelfing, Niemcy) zainstalowanego na podłączonym do mikroskopu komputerze.



Rysunek 4.8: Komora ze stali nierdzewnej do obrazowania komórek na żywo. Komora ma studzienkę bez dna, w której umieszczane jest okrągłe szkiełko nakrywkowe z komórkami. Następnie dno ze szkiełkiem było uszczelniane pierścieniem O-ring z plastikową nakrętką Sykes-Moore. Do studzienki wprowadzana jest pożywka hodowlana, która zapewnia odpowiednie warunki komórkom obrazowanym przez kilka godzin.

4.4 Analiza obrazów ognisk naprawczych i prezentacja wyników

Obrazy uzyskane z mikroskopu fluorescencyjnego zostały przeanalizowane przy użyciu oprogramowania Imaris Microscopy Image Analysis Software (wersje 9.9.0 i 9.1.2, Bitplane AG, Oxford Instruments plc). Każde jądro komórkowe było analizowane oddzielnie. Na początku wszystkie obrazy uzyskane z mikroskopu zostały przeskalowane. Przypisanie rzeczywistych jednostek długości do pikseli było możliwe dzięki wykonaniu pod mikroskopem obrazu referencyjnego, który zawierał podziałkę liniową. Po ustaleniu związku między pomiarami wyrażonymi w pikselach a rzeczywistymi odległościami, wyodrębniony został obszar, w którym znajdowało się jądro komórkowe. Następnie obliczone zostało położenie jego środka masy w danym punkcie czasowym. Średnia liczba ognisk naprawczych na jądro komórkowe została wyznaczona jako iloraz sumy wszystkich zarejestrowanych ognisk i liczby wszystkich zobrazowanych jąder dla danego scenariusza napromieniania i czasu analizy. To umożliwiło zbadanie kinetyki naprawy uszkodzeń w funkcji czasu. Niepewnością średniej liczby ognisk naprawczych w jądrze komórkowym jest odchylenie standardowe.

W przypadku wykresów przedstawiających średni rozmiar ognisk naprawczych, dla których dane są reprezentowane w kategoriach względnych, rozmiar został zdefiniowany jako stosunek danej wartości rozmiaru ogniska do maksymalnego zarejestrowanego rozmiaru. Rozmiar ognisk jest wyrażany w μm^2 . Do danych eksperymentalnych dopasowano krzywe rozkładu normalnego z charakterystycznymi parametrami (wartość średnia i odchylenie standardowe). Do danych reprezentujących zmianę wielkości ognisk w funkcji czasu dopasowano wielomiany ósmego rzędu. Niepewności dopasowania modelu prezentowane w Rozdziale 6.2 wynikają z określenia parametrów dopasowania krzywej (95% przedział ufności).

Średnią względną intensywność ognisk naprawczych określono za pomocą następującego wzoru:

$$I = \frac{I_{focus}}{I_{nucleus} - I_{focus}} \quad (4.1)$$

gdzie I_{focus} jest całkowitą intensywnością w obszarze ogniska, a $I_{nucleus}$ jest intensywnością w całym obszarze jądra komórkowego. Niepewność względnej intensywności u_I została obliczona na podstawie prawa propagacji małych błędów (Taylor, 2011) i jest wyrażona wzorem:

$$u_I = \sqrt{\left(\frac{I_{nucleus}}{(I_{nucleus} - I_{focus})^2} u_{I_{focus}}\right)^2 + \left(-\frac{I_{focus}}{(I_{nucleus} - I_{focus})^2} u_{I_{nucleus}}\right)^2}, \quad (4.2)$$

gdzie $u_{I_{focus}}$ to niepewność intensywności ogniska naprawczego, a $u_{I_{nucleus}}$ to niepewność intensywności jądra komórkowego.

Zmiana położenia ogniska naprawczego była wyznaczana poprzez śledzenie jego współrzędnych i wyznaczenie średniego przemieszczenia kwadratowego (ang. *mean square displacement*, MSD) (Frenkel and Smit, 2002), które jest kwadratem długości toru ruchu.

MSD obliczono dla pozycji w pierwszej minucie obserwacji jądra komórkowego $d(t_0)$ względem pozycji odniesienia w czasie $d(t_0 + \Delta t)$:

$$\text{MSD} = ([d(t_0 + \Delta t) - d(t_0)])^2. \quad (4.3)$$

Do danych dopasowano funkcję modelu subdyfuzji, dla której wyznaczono parametry promienia dyfuzji (r_c) oraz współczynnika dyfuzji (D_c). D_c jest miarą ruchliwości ogniska, r_c to promień, w którym to ognisko się porusza, a n to wymiar analizowanej przestrzeni (w tym przypadku równy 2) (Jegou et al., 2009). Model ten jest określony przez następujący wzór:

$$\text{MSD}(\Delta t) = r_c^2 \left\{ 1 - \exp\left(-\frac{2nD_c\Delta t}{r_c^2}\right) \right\}. \quad (4.4)$$

Dla każdego scenariusza napromieniania nagrano około 30 filmów, a średnia liczba jąder komórkowych obrazowanych w jednym filmie to dwa. Informacje dotyczące miejsca przechowywania danych eksperymentalnych i dostępu do nich zostały umieszczone w Dodatku B: Dostęp do danych eksperymentalnych. Ze względu na jakość otrzymanych obrazów, do analizy kwalifikowano różną liczbę jąder komórkowych:

- cząstki α : 18 jąder komórkowych,
- promieniowanie γ : 28 jąder komórkowych,
- wiązki mieszane z cząstkami α zastosowanymi jako pierwsze: 25 jąder komórkowych,
- wiązki mieszane z promieniowaniem γ zastosowanym jako pierwsze: 16 jąder komórkowych,
- komórki kontrolne: 22 jądra komórkowe.

Ekspozycja na promieniowanie γ i α jest oznaczana odpowiednio symbolami γ i α i oznacza, że podczas napromieniania został wykorzystany tylko jeden rodzaj promieniowania. Sekwencyjna ekspozycja komórek na oba rodzaje promieniowania jest oznaczana na wykresach jako $\gamma \rightarrow \alpha$ lub $\alpha \rightarrow \gamma$ odzwierciedlające kolejność napromienienia.

4.5 Analiza statystyczna

W przypadku danych uzyskanych z pomiarów dozymetrycznych niepewności otrzymanych wartości zostały wyznaczone metodą propagacji. Dawki oszacowane za pomocą dozymetru krzemowego i filmów radiochromowych zostały porównane dwustronnym, testem t-Studenta. Dla danych otrzymanych w oparciu o metody MC sprawdzona została normalność testem Shapiro-Wilka. Do otrzymanych histogramów dopasowana została funkcja Gaussa, z której wyznaczona została wartość średnia wraz z odchyleniem standardowym (ang. *standard deviation*, SD). Dla danych otrzymanych w pomiarach przestrzennego rozkładu dawki w komorze Scanditronix wyznaczony został współczynnik zmienności (ang. *coefficient of variation*, CV), który jest miarą zróżnicowania rozkładu cechy i jest obliczany jako iloraz odchylenia standardowego i wartości średniej.

Wszystkie testy statystyczne danych uzyskanych ze wszystkich pomiarów zostały wykonane z wykorzystaniem samodzielnie napisanych skryptów w języku Python 3 (wersja

Python 3.7.9, Python Software Foundation) z wykorzystaniem dodatkowych bibliotek, takich jak SciPy i Matplotlib. W celu oceny statystycznej dane zostały porównane za pomocą testu ANOVA z użyciem testu post hoc Tukeya (rozmiar ogniska i intensywności) oraz testu t dla średnich dwóch niezależnych próbek wyników (rozmiar ogniska w dwóch przedziałach czasowych). Różnice dla wartości p mniejszych niż 0,05 były uznawane za istotne statystycznie. Dane zostały przedstawione jako średnie wartości z niepewnością standardową średniej (ang. *standard error of the mean*, SEM). W przypadku danych, do których dopasowane były funkcje liniowe (intensywność ognisk), do porównania dwóch współczynników nachylenia wynikających z dopasowania równania $y = at + b$, zastosowano test t.

Rozdział 5

Dozymetria

5.1 Narzędzia

Pomiar dawki promieniowania jonizującego jest ważny dla dokładnego określenia efektu biologicznego, jaki może wywołać. Wskutek różnic w sposobie oddziaływania promieniowania α i γ z materiałem biologicznym, konieczne jest zastosowanie różnych technik pomiarowych. Do opisu oddziaływania promieniowania α z materiałem biologicznym wykonane zostały symulacje z wykorzystaniem metod MC. W celu sprawdzenia jednorodności promieniowania γ w komorze Scanditronix przeprowadzona została dozymetria z wykorzystaniem metod fizycznych, dozymetrów przeznaczonych do pomiarów promieniowania fotonowego.

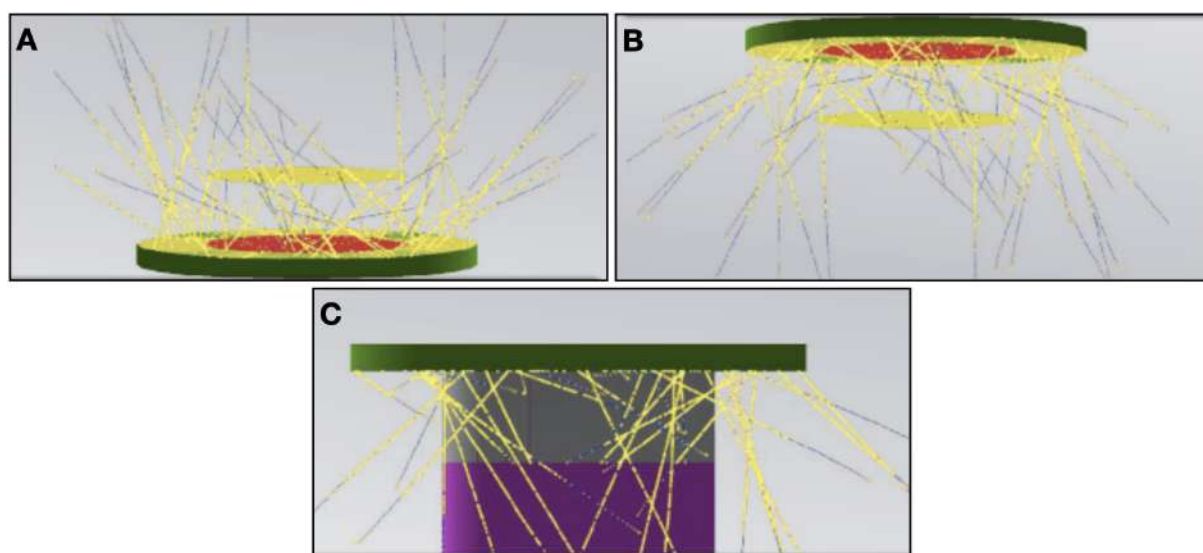
5.1.1 Teoretyczna weryfikacja dozymetryczna

Ze względu na brak możliwości wymontowania opisanego wcześniej źródła promieniowania α z urządzenia MAX, do symulacji w oparciu o metody MC zostało wykorzystane analogiczne źródło ^{241}Am wyprodukowane przez firmę Eckert and Ziegler (Brunsztwik, Niemcy), o niższej aktywności równej 1,96 MBq. Źródło to jest dostępne w Środowiskowym Laboratorium Ciężkich Jonów (ŚLCJ). Zostało ono użyte do charakterystyki widma promieniowania α i zbadania jednorodności jego aktywności powierzchniowej za pomocą detektora Si (ORTEC, USA) i oprogramowania SRIM. Wyniki zostały opisane w (Szepliński et al., 2020). Parametry źródła użyte do symulacji obejmują aktywną warstwę o grubości 0,4 μm , która została pokryta warstwą złota o grubości 1 μm . Dodatkowo, w symulacji zostały uwzględnione energie emitowanych cząstek α wynoszących 5,48 MeV (84,5%), 5,44 MeV (13,1%) i 5,39 MeV (1,6%), przy średniej ważonej energii 5,46 MeV.

Kod PARTRAC (Friedland et al., 2011) został wykorzystany do wykonania uproszczonej symulacji napromieniania jądra komórkowego limfocytu. Wyniki symulacji zostały użyte do oszacowania energii zdeponowanej i liczby cząstek α , które oddziaływały z atomami w objętości jądra komórkowego. Symulacje zostały przeprowadzone dla objętości, w której umieszczone zostało jądro komórkowe i która była prostopadłościanem wypełnionym wodą. Wymiary (x, y, z) tego prostopadłościanu to $(40 \times 21 \times 37)$ μm . Jądro komórkowe zostało przedstawione jako kula o promieniu 5 μm (Sharma et al., 2008), która znajduje się w centrum prostopadłościanu. Skład pierwiastkowy jądra komórkowego

zawierał 10,6% wodoru, 9% węgla, 3,2% azotu, 74,2% tlenu, 2,6% fosforu i 0,4% siarki, a gęstość była równa gęstości wody. Cząstki α zostały wygenerowane losowo z dna cytoplazmy (około 10 μm od jądra komórkowego). Symulacje dostarczenia dwóch różnych dawek (1,22 Gy i 2,33 Gy) zostały przeprowadzone dla 1000 jąder w celu uzyskania rozkładów energii zdeponowanej i odpowiadającej jej liczby cząstek α . Dawki z zakresu 1-3 Gy zostały wybrane ze względu na częste zastosowanie w eksperymentach komórkowych w celu wywołania wyraźnie mierzalnych efektów biologicznych (Edwards et al., 1980; Staaf et al., 2012c). Dodatkowo wyniki symulacji przy użyciu kodów PARTRAC były wykorzystane do sprawdzenia poprawności zastosowania bardziej skomplikowanej geometrii w symulacjach z użyciem programu Geant4.

Środowisko Geant4 (Agostinelli et al., 2003) umożliwia obliczanie dawek pochłoniętych dla typowych geometrii komórkowych, takich jak cytoplazma i jądro komórkowe (Incerti et al., 2006). Posłużył on do oszacowania poziomu niejednorodności dawki i niepewności w różnych układach eksperymentalnych z wykorzystaniem promieniowania α . Obliczenia zostały wykonane dla czterech schematów napromieniania komórek cząstkami α , przedstawionych na Rysunku 5.1.



Rysunek 5.1: Trzy geometrie układów napromieniania monowarstwy komórek z użyciem źródła ^{241}Am . Przedstawione zostało napromienianie materiału biologicznego znajdującego się na leżącym bezpośrednio na źródle szkiełka (A), napromienianie komórek od góry (B) oraz napromienianie od góry wraz ze wstawionym pomiędzy źródłem a materiałem biologicznym nieruchomym lub obrotowym kolimatorem (C).

Pierwszym z badanych scenariuszy było napromienianie monowarstwy komórek wysianych na szkiełku o grubości 150 μm , które było umieszczane bezpośrednio na źródle powierzchniowym (Rysunek 5.1A). W drugim schemacie komórki były napromieniane od góry (Rysunek 5.1B). Cząstki α przechodziły przez ochronną warstwę folii Mylar o grubości 3 μm , a następnie przez warstwę pożywki (6 μm). W ostatnim schemacie, pomiędzy folię Mylar a źródło, dodany został kolimator o grubości 5 mm (Rysunek 5.1C). Dla czwartego schematu napromieniania kolejność materiałów, przez które przechodziło pro-

mieniowanie α nie zmieniała się (taka sama jak na Rysunku 5.1C). Dodano jednak ruch kolimatora, który obracał się w każdym ruchu o kąt 5° . Na podstawie symulacji struktury torów wykonanych przez Geant4 zostały obliczone długości drogi jonizacji, co pozwoliło na oszacowanie wartości LET z zastosowaniem wzoru 2.4.

5.1.2 Doświadczalna weryfikacja dozymetryczna

Dla źródła fotonowego ^{137}Cs , jednorodność dawki w komorze do napromieniania została sprawdzona z wykorzystaniem komory jonizacyjnej oraz samowywołujących się filmów radiochromowych. Dodatkowo przeprowadzone zostały pomiary z wykorzystaniem dozymetru krzemowego.

Filmy radiochromowe

Dozymetria źródła ^{137}Cs została wykonana za pomocą dozymetru pasywnego, którym są filmy radiochromowe EBT3 Gafchromic (Ashland Inc., Bridgewater, NJ). Jest to dozymetr, który ma właściwości modyfikowania właściwości strukturalnych czułego elementu krystalicznego pod wpływem promieniowania jonizującego. Oddziaływanie promieniowania jonizującego z folią powoduje proces polimeryzacji monomerów substancji czulej (Williams and Metcalfe, 2011). To mikroskopijne zjawisko znajduje odzwierciedlenie w zmianie koloru na poziomie makroskopowym, a kolor filmu można powiązać z dawką promieniowania (Lewis and Devic, 2015). Napromienione filmy radiochromowe z wykorzystaniem dawek z zakresu 0-2 Gy promieniowania fotonowego zostały przedstawione na Rysunku 5.2.



Rysunek 5.2: Skany filmów radiochromowych, które zostały napromienione czterema różnymi dawkami promieniowania fotonowego. Pierwszy film (najjaśniejszy) jest to film nie-napromieniony (próba kontrolna), natomiast pozostałe cztery zostały napromienione dawkami odpowiednio 0,25; 0,5; 1 i 2 Gy.

Ze względu na brak informacji o bezwzględnej wartości dawki ważne jest, aby film został wcześniej skalibrowany. Kalibracja polega na napromienieniu filmu certyfikowanym źródłem o znanej mocy dawki lub źródłem, które zostało wcześniej skalibrowane za pomocą certyfikowanego dozymetru. Z uwagi na dostępność certyfikowanej cylindrycznej komory jonizacyjnej (Unidos E wyposażonej w komorę jonizacyjną TM30010, PTW, Freiburg, Niemcy) najpierw wykonana została kalibracja źródła promieniowania rentgenowskiego. Źródło to zostało wybrane ze względu na możliwość poprowadzenia przewodów łączących dozymetr aktywny z aparaturą zasilającą i umożliwiającą odczyt wyniku pomiaru (Boag,

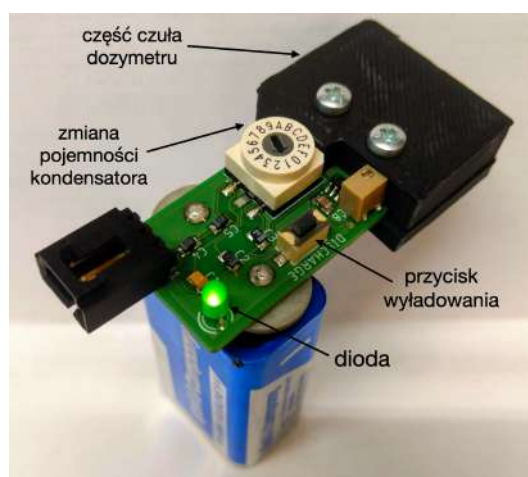
1987). W przypadku źródeł ^{137}Cs napromienianie odbywa się w zamkniętej komorze, do której nie ma dostępu i możliwe jest jedynie umieszczenie w jej środku kompaktowego urządzenia bez okablowania lub zewnętrznego źródła zasilania.

Komora jonizacyjna została umieszczona w urządzeniu MAX, w miejscu do napromieniania promieniowaniem X, a następnie odczytana została moc dawki. Kolejnym krokiem było napromienienie filmów radiochromowych w tym samym urządzeniu i odczytanie wartości poziomu zaczernienia dozymetru po 24 h od zakończenia napromieniania. Do odczytu filmów wykorzystano skaner płaski Epson Expression 12000XL (Epson Seiko Epson Corp., Nagano, Japonia) (Ferreira et al., 2009; Cho et al., 2020). Obrazy RGB zapisane w formacie TIF zostały przeanalizowane przy użyciu oprogramowania ImageJ (wersja 1.53i, Java 1.8.0, Wayen Rasband, National Institutes of Health, USA; strona internetowa: <http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>). Obliczenia intensywności pikseli zostały wykonane na podstawie kanału czerwonego, o którym wiadomo, że ma najwyższą czułość na dawkę (Stevens et al., 1996; Ohuchi, 2007). Po uzyskaniu krzywej odpowiedzi poziomu zaczernienia (intensywności koloru) filmu radiochromowego w funkcji dawki promieniowania jonizującego, zostały wykonane pomiary z użyciem urządzenia Scanditronix. Cztery wycięte kawałki filmów radiochromowych o wymiarach $2,5 \times 2$ cm zostały napromienione dawkami 0,25 Gy; 0,5 Gy; 1 Gy i 2 Gy. Piąty kawałek został nienapromieniony, była to próba kontrolna. Pomiary zostały powtórzone dla takiego samego zestawu filmów i dawek dwukrotnie. Uśrednione wartości intensywności koloru dla danego fragmentu filmu zostały porównane z krzywą kalibracyjną uzyskaną dla promieniowania rentgenowskiego.

Dozymetr krzemowy

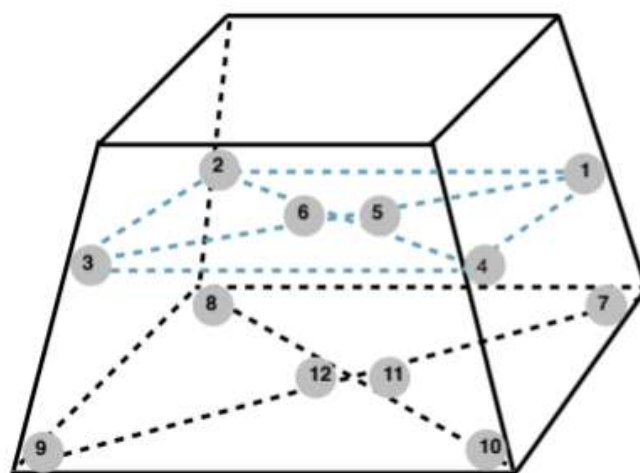
Drugim detektorem wykorzystanym w badaniach był krzemowy dozymetr aktywny, który powstał w ramach współpracy z Wydziałem Fizyki Uniwersytetu w Sztokholmie. Konstrukcja dozymetru, który został przedstawiony na Rysunku 5.3, oparta jest na czułych fotodiodach krzemowych (Vishay Intertechnology, Inc., model VBPW34FAS) wykorzystywanych do detekcji promieniowania jonizującego. Kiedy promieniowanie oddziałuje w diodzie, może jonizować atomy krzemu, uwalniając elektrony. Przy braku jonizacji przez diodę spolaryzowaną w kierunku zaporowym prąd nie płynie. Jednak, gdy promieniowanie wywoła jonizację, wytworzony ładunek spowoduje przepływ prądu. Ten ładunek, który może być przechowywany w kondensatorze, jest proporcjonalny do energii zdeponowanej przez promieniowanie. Kiedy uwolniony ładunek gromadzi się w kondensatorze, wywołuje to różnicę potencjałów. Dlatego pomiar różnicy potencjałów na kondensatorze pozwala określić całkowity uwolniony ładunek, który jest proporcjonalny do pochłoniętej dawki. W dozymetrze znajdują się cztery kondensatory o różnych pojemnościach. Wybór konkretnego kondensatora lub kombinacji kondensatorów wpływa na pojemność i umożliwia pomiar dawki promieniowania w różnych zakresach z dobrą dokładnością.

Dla źródeł ^{137}Cs znajdujących się w komorze urządzenia Scanditronix zostały wykonane cztery pomiary dla różnych czasów napromieniania: 42 s, 84 s, 169 s i 337 s, co odpowiadało dawkom 0,25 Gy; 0,5 Gy; 1 Gy i 2 Gy. Wykonanie pomiarów dla tak szerokiego zakresu dawek wymagało wybrania odpowiedniej pozycji przełącznika obrotowego, który umożliwiał zmianę kondensatora o pojemności odpowiedniej do przewidywanej



Rysunek 5.3: Zdjęcie dozymetru krzemowego. Część czuła dozymetru, w której znajdują się cztery fotodiody, jest osłonięta czarną nakładką wydrukowaną techniką 3D z tworzywa, którego gęstość jest zbliżona do gęstości wody ($1,0\text{--}1,05\text{ g/cm}^3$). Na panelu znajduje się przełącznik obrotowy podłączony do kondensatorów, dzięki któremu możliwe jest ustawienie wzmocnienia wzmacniacza na odpowiednią wartość dla oczekiwanego zakresu dawek. Przycisk wyładowania, który należy nacisnąć przed każdym pomiarem, znajduje się pod przełącznikiem obrotowym. Dioda LED w lewym dolnym rogu wskazuje, że dozymetr jest włączony.

wartości dawki. Dawki promieniowania, które zostały zarejestrowane przez dozymetr były odczytane bezpośrednio po zakończeniu napromieniania. Otrzymane wartości dawek zostały porównane z tymi, które zostały wyznaczone z krzywej kalibracyjnej dla filmów radiochromowych.



Rysunek 5.4: Pozycje w komorze Scanditronix, w których zostały wykonane pomiary detektorem krzemowym.

Oprócz pomiarów wartości dawek dziesięć identycznych dozymetrów zostało użytych

do wykonania pomiarów przestrzennego rozkładu dawki w komorze urządzenia Scanditronix. Jak pokazano na Rysunku 5.4, dozymetry zostały umieszczone w 6 pozycjach na dnie i w środku komory do napromieniania, co dało 12 pomiarów dawek. Obliczona została wartość średnia i wariancja dawek na dwóch wysokościach komory. Dawka referencyjna wynosiła 2 Gy.

5.2 Wyniki

5.2.1 Symulacje MC dla źródła cząstek α

Dla źródła ^{241}Am została wykonana dozymetria *in silico*. Celem wykonania obliczeń z wykorzystaniem metod MC było określenie rozkładu energii zdeponowanej przez cząstki α oraz wyznaczenie rozkładu wartości LET dla czterech układów do napromieniania materiału biologicznego. Wielkością dozymetryczną modelowaną dla źródła ^{241}Am był rozkład dawki i jego jednorodność dla wymienionych wcześniej konfiguracji źródła.

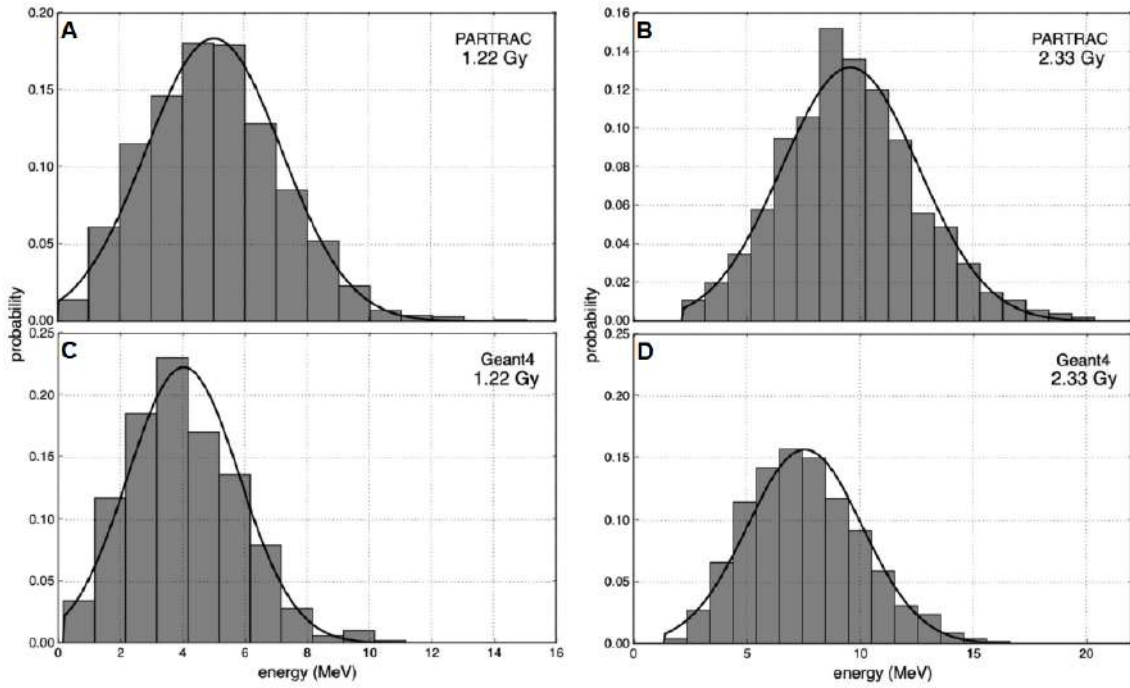
Rozkłady energii, liczby torów cząstek α i LET

Energia zdeponowana przez cząstki α z ^{241}Am została obliczona z wykorzystaniem narzędzi do symulacji PARTRAC i Geant4. Rozkłady energii zdeponowanej powstały na podstawie symulacji wykonanych dla 1000 jąder komórkowych, dla dwóch różnych wartości dawek ($D_1 = 1,22$ Gy i $D_2 = 2,33$ Gy). Wyniki zostały przedstawione na Rysunku 5.5. Otrzymane wartości zostały zestawione w Tabeli 5.1.

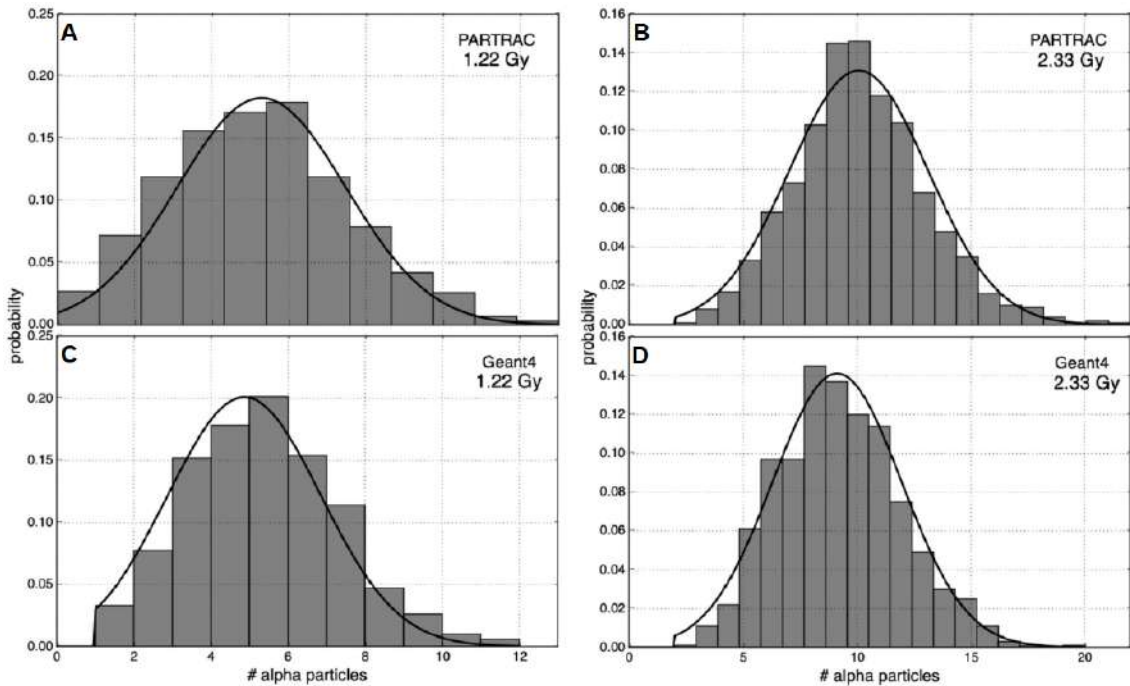
Energia przedstawiona na histogramach została zdeponowana przez cząstki emitowane w punktowego źródła. Dodatkowym testem było porównanie liczby cząstek α przechodzących przez jądro komórkowe limfocyту odpowiedzialnych za depozycję energii. Rozkłady liczby cząstek dla 1000 jąder komórkowych zostały przedstawione na Rysunku 5.6. Nie zaobserwowano istotnej statystycznie różnicy w średniej liczbie cząstek α przechodzących przez jedno jądro komórkowe. Wartości otrzymane z symulacji zostały przedstawione w Tabeli 5.1. Biorąc pod uwagę zgodność otrzymanych wyników uzyskanych dla obu narzędzi, Geant4 został wybrany do dalszych obliczeń LET i rozkładu dawki w jądrach komórkowych ułożonych w monowarstwie, ze względu na możliwość napromieniania materiału biologicznego w różnych konfiguracjach dla bardziej skomplikowanego układu eksperymentalnego.

Tabela 5.1: Parametry dopasowania funkcji Gaussa do rozkładów energii zdeponowanej w jądrze komórkowym limfocyту i liczby cząstek α .

	D_1		D_2	
	PARTRAC	Geant4	PARTRAC	Geant4
Liczba torów cząstek α (średnia $\pm$ SD)	$5,3 \pm 2,2$	$4,9 \pm 2,0$	$10,1 \pm 3,0$	$9,1 \pm 2,8$
Energia [MeV] (średnia $\pm$ SD)	$5,0 \pm 2,2$	$4,0 \pm 1,8$	$9,6 \pm 3,0$	$7,6 \pm 2,5$



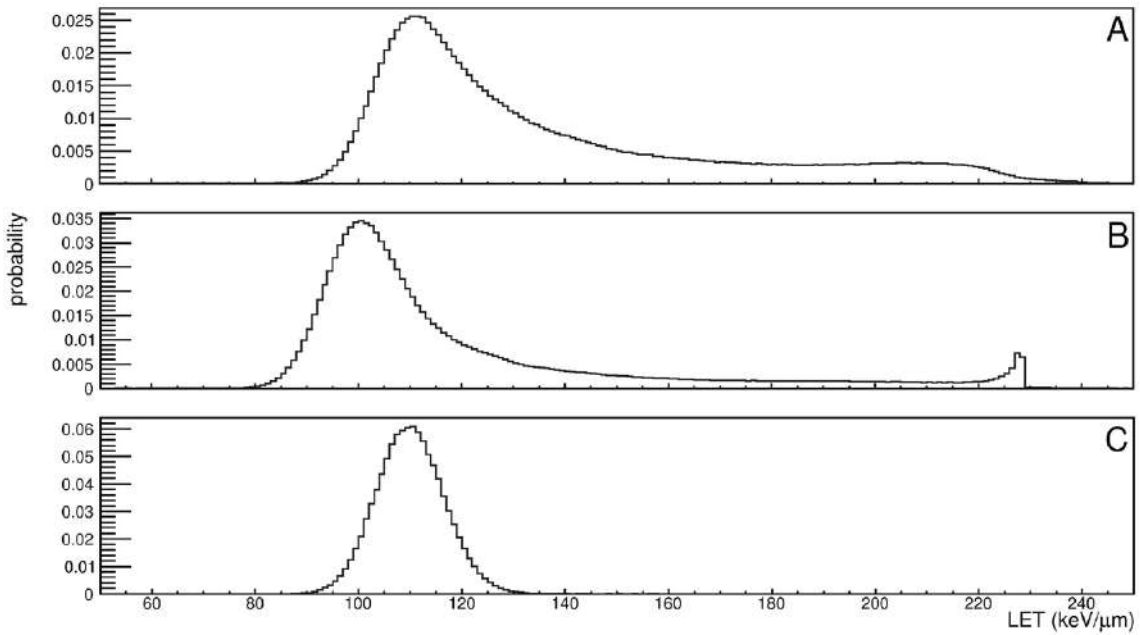
Rysunek 5.5: Rozkłady energii zdeponowanej obliczone z wykorzystaniem kodów PARTRAC (A i B) oraz środowiska Geant4 (C i D) dla wartości dwóch dawek (1,22 Gy dla A i C oraz 2,33 Gy dla C i D) (Tartas et al., 2023a). Do każdego histogramu został dopasowany rozkład Gaussa.



Rysunek 5.6: Rozkłady liczby cząstek α symulowane przez PARTRAC i Geant4 w jądrach komórkowych dla wartości dwóch dawek: 1,22 Gy (A i C) i 2,33 Gy (B i D) (Tartas et al., 2023a). Linie reprezentują dopasowania funkcji Gaussa.

Rozkłady wartości LET w monowarstwie komórek zostały wyznaczone za pomocą narzędzia Geant4 dla czterech konfiguracji ekspozycji na promieniowanie α . Wyniki zostały przedstawione na Rysunku 5.7 jako rozkłady wartości LET. W przypadku konfiguracji A i B, dla których nie zastosowano kolimatora, można zaobserwować szeroki zakres wartości LET, który jest spowodowany obecnością cząstek wchodzących w warstwę komórek pod różnymi kątami. Te rozkłady charakteryzowały się różnymi wartościami średnich i median wartości LET przedstawionych w Tabeli 5.2.

Rezultatem zastosowania kolimatora (niezależnie od tego, czy był nieruchomy, czy obrotowy) był węższy rozkład wartości LET, który został przedstawiony na Rysunku 5.7(C). Wyznaczając średnią oraz medianę wartości LET otrzymano ten sam wynik dla obu statystyk — 110 keV/ μm .



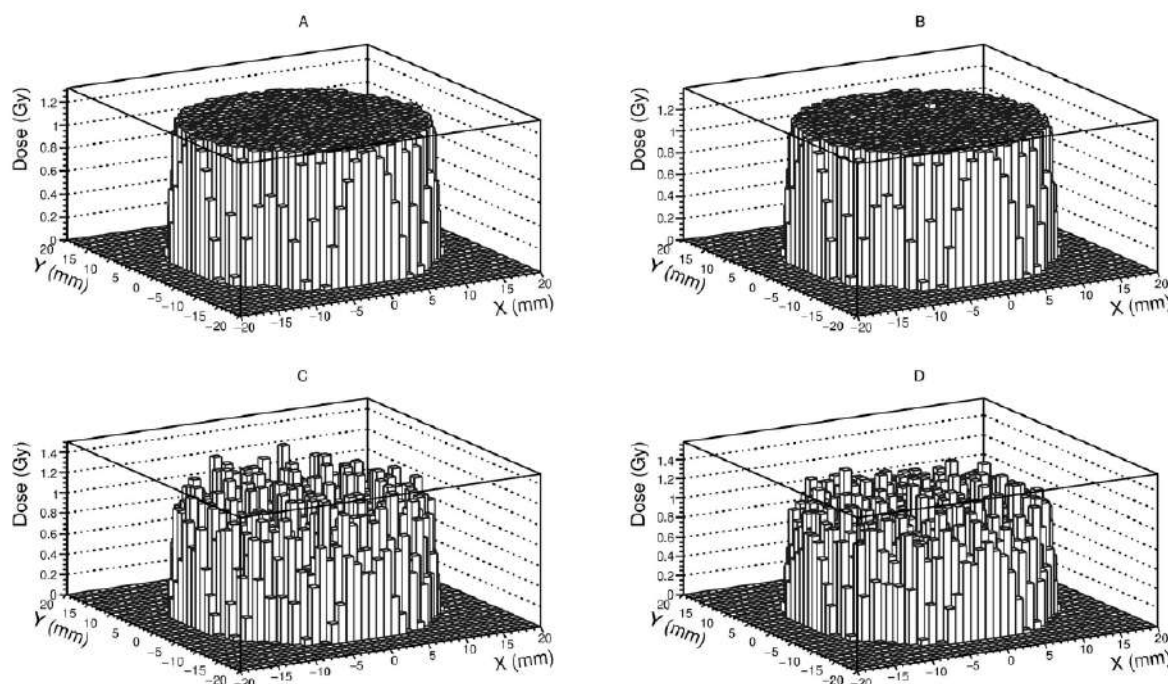
Rysunek 5.7: Rozkłady LET w jądrach komórkowych napromienianych cząstkami α : komórki napromieniane z góry (A), komórki napromieniane od dołu bez kolimatora (B) oraz komórki napromieniane od dołu przez kolimator nieruchomy lub obrotowy (C) (Tartas et al., 2023a).

Tabela 5.2: Charakterystyka wartości LET uzyskanych dla czterech konfiguracji napromieniania.

Konfiguracja ekspozycji	Średnia wartość LET $\pm$ SD [keV/ μm]	Mediana LET [keV/ μm]
A	135 ± 35	123
B	120 ± 34	107
C	110 ± 9	110

Jednorodność dawki w monowarstwie komórek

Rozkłady dawek zaabsorbowanych przez jądra komórkowe znajdujące się na szalce, dla czterech konfiguracji napromienienia, zostały przedstawione na Rysunku 5.8. Wartość dawki, dla której wykonane zostały obliczenia, była równa 1,22 Gy. Dla każdej konfiguracji zostało obliczone odchylenie standardowe. Wyniki zostały przedstawione w Tabeli 5.3.



Rysunek 5.8: Rozkłady dawki w monowarstwie komórek poddanych działaniu promieniowania α (Tartas et al., 2023a): dla komórek napromienianych przez szkiełko (A), dla komórek napromienionych od góry (B), dla komórek napromienionych od góry ze wstawionym kolimatorem (C), dla komórek napromienionych od góry przez obrotowy kolimator (D).

Tabela 5.3: Wartości odchylenia standardowego uzyskanych w obliczeniach jednorodności rozkładu dawek w jądrach komórkowych poddanych działaniu promieniowania α .

Konfiguracja ekspozycji	Dawka [Gy]	Odchylenie standardowe [Gy]
A	1,22	0,04
B		0,04
C		0,20
D		0,14

Jednorodność dawki jest największa w jądrach komórkowych, które były napromienione w układach bez zastosowania kolimatora. Odchylenie standardowe wyniosło 41 mGy dla konfiguracji z napromienieniem przez szkiełko oraz 42 mGy dla konfiguracji z napromienieniem od góry, przez folię Mylar. Wstawienie kolimatora pomiędzy źródło a materiał

biologiczny spowodowało pogorszenie jednorodności dawki. Wartość odchylenia standardowego wzrosła 5-krotnie przyjmując wartość 200 mGy. Zastosowanie obrotowego kolimatora polepszyło jednorodność w układach z zastosowaniem kolimatorów i zredukowało odchylenie standardowe o 30%.

Analizując wykresy przedstawione na Rysunku 5.8 można zauważyć skoki wartości dawki na krawędziach szalki. Jest to niedoskonałość metody obliczeniowej, w której na okrągłą szalkę została nałożona siatka z kwadratowymi pikselami. W rezultacie piksele na krawędziach są tylko w części "wypełnione" materiałem biologicznym, w którym deponowana jest energia.

5.2.2 Weryfikacja pomiarów dla źródła fotonowego

Dla źródła ^{137}Cs wykonane zostały pomiary dawki z wykorzystaniem dozymetru krzemowego oraz filmów radiochromowych. Pierwszym krokiem była walidacja danych uzyskanych z pomiarów z wykorzystaniem dozymetru krzemowego za pomocą filmów radiochromowych. Następnie, sprawdzony został przestrzenny rozkład dawki promieniowania γ w komorze do napromieniania Scanditronix, w której ustawiono 6 różnych dozymetrów krzemowych na dwóch różnych wysokościach.

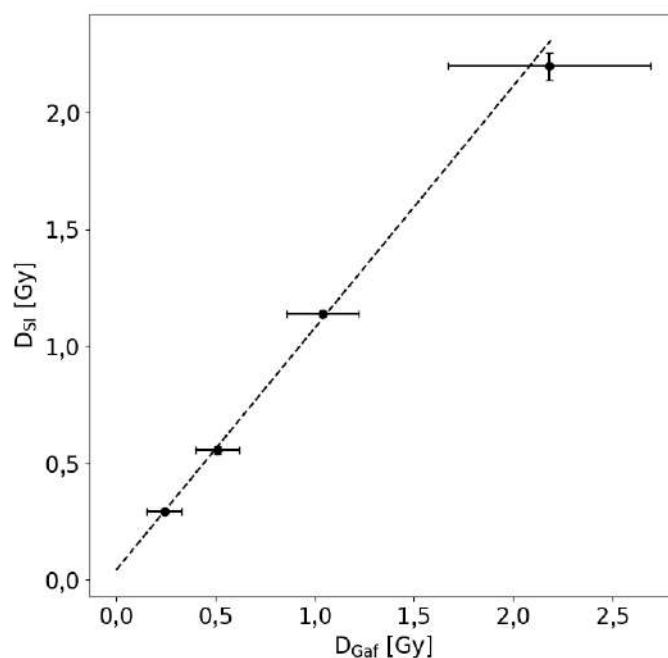
Walidacja pomiarów z dozymetru krzemowego za pomocą filmów radiochromowych

Wartości dawek promieniowania γ , które zostały zmierzone za pomocą dozymetru krzemowego (D_{SI}) zostały porównane z dawkami otrzymanymi za pomocą filmów radiochromowych (D_{gaf}). Wyniki zostały przedstawione w Tabeli 5.4. Dozymetr systematycznie przeszacowywał dawkę o $(10,1 \pm 8,5)\%$. W żadnym punkcie dawki różnica nie była znacząca statystycznie (wszystkie wartości $p > 0,05$).

Tabela 5.4: Pomiary dawek promieniowania γ wykonane filmami radiochromowymi (D_{gaf}) i dozymetrami krzemowymi (D_{SI}) dla zadanego czasu napromieniania. Wartości $p > 0,05$ wskazują na brak różnicy istotnej statystycznie między dawkami oszacowanymi obiema metodami. Znak przed odchyleniem procentowym wskazuje na kierunek odchylenia.

Czas napromieniania [s]	D_{gaf} [Gy]	D_{SI} [Gy]	Odchylenie procentowe	Wartość p
42	$0,241 \pm 0,089$	$0,2925 \pm 0,0079$	-8	0,7
84	$0,51 \pm 0,11$	$0,555 \pm 0,015$	-9	0,6
169	$1,04 \pm 0,18$	$1,140 \pm 0,015$	-9	0,7
337	$2,18 \pm 0,51$	$2,197 \pm 0,059$	-1	0,5

Odpowiedź detektora krzemowego na promieniowanie γ emitowane ze źródła ^{137}Cs została przedstawiona w funkcji dawki na Rysunku 5.9. Analizując parametry dopasowanej funkcji liniowej, które wynosiły odpowiednio $a = 1,035 \pm 0,031$ i $b = (0,043 \pm 0,018)$ Gy, można zauważyć, że wartość współczynnika nachylenia prostej jest bliska wartości 1, a wartość wyrazu wolnego bliska 0. Wartości parametrów oraz wyniki przeprowadzonych testów statystycznych sugerują zgodność otrzymanych wartości dawek.



Rysunek 5.9: Pomiary dawek, które zostały wykonane dozymetrem krzemowym (D_{SI}) w funkcji dawki referencyjnej z użyciem filmów radiochromowych (D_{gaf}) (Blomgren et al., 2023).

Przestrzenny rozkład dawki w komorze do napromieniania

Obliczenia średniej dawki i jej zmienności mierzonej w dolnej, środkowej i obu częściach komory (zgodnie z Rysunkiem 5.4) do napromieniania Scanditronix zostały przedstawione w Tabeli 5.5. Współczynnik zmienności dawki mierzonej dozymetrami wynosił poniżej 5%, co jest zadowalające w eksperymentach radiobiologicznych.

Tabela 5.5: Obliczenia średniej dawki i błędu standardowego na podstawie pomiarów w różnych częściach komory do napromieniowania promieniowaniem γ .

Pozycje	Dawka średnia [Gy]	Odchylenie standardowe [Gy]	Współczynnik zmienności [%]
1-6	2,16	0,10	4,8
7-12	2,122	0,056	2,6
1-12	2,141	0,082	3,8

Przeprowadzona analiza, do której zostały wykorzystane filmy radiochromowe oraz dozymetr krzemowy, potwierdziła poprawność wartości mocy dawki źródeł znajdujących się w urządzeniu Scanditronix wyznaczonej przez Laboratorium Metrologii przy Szwedzkim Urzędzie ds. Bezpieczeństwa Promieniowania. W czasie wykonywania eksperymentów, moc dawki promieniowania fotonowego emitowanego ze źródeł ^{137}Cs wynosiła 0,372 Gy/min.

5.3 Dyskusja i wnioski

Głównym problemem związanym z konfiguracjami układu eksperymentalnego do napromieniania materiału biologicznego cząstkami α jest niejednorodność dawki wewnątrz napromienionych jąder komórkowych. Ponieważ dawka pochodząca od cząstek α jest zależna od LET, zmiany wartości LET mają na nią silny wpływ. Co więcej, cząstki α o różnych energiach, które docierają do warstwy komórek pod różnymi kątami, powodują trudną do oszacowania niejednorodność dawki. Analiza przeprowadzona w oparciu o metody MC z wykorzystaniem kodów PARTRAC i Geant4 miała na celu zbadanie interakcji cząstek α z materiałem komórkowym. Analiza składała się z dwóch głównych części.

W pierwszej części porównane zostały narzędzia PARTRAC i Geant4 pod względem zdeponowanej energii oraz liczby cząstek α przemieszczających się przez kuliste jądro limfocytu. Uzasadnieniem przeprowadzenia tej analizy było porównanie skuteczności obu narzędzi, które są powszechnie stosowane w badaniach radiobiologicznych (Agostinelli et al., 2003; Friedland et al., 2011; Friedland and Kundrat, 2014; Allison et al., 2016). Rozkłady o mniejszej wariancji uzyskano za pomocą narzędzia Geant4, zarówno w przypadku rozkładów energii, jak i liczby cząstek dostarczonych do jądra komórkowego. Uwzględniając odchylenie standardowe wyznaczonych parametrów, można jednak stwierdzić, że wartości średnie obu charakterystyk były zgodne. Przesunięcia w rozkładach zdeponowanej energii mogły wynikać z zastosowania różnych modeli fizycznych.

W drugiej części dozymetrii *in silico* zostało użyte tylko narzędzie Geant4. Posłużyło ono do oszacowania rozkładów LET i jednorodności dawki w komórkach hodowanych jako monowarstwa i napromienionych w trzech konfiguracjach ekspozycji: dla cząstek α przechodzących przez szkiełko nakrywkowe, dla źródła, które było umieszczone nad komórkami i konfiguracji, w której umieszczony został dodatkowo kolimator. Trzecia konfiguracja była wykorzystana do obliczeń dla nieruchomego i obrotowego kolimatora. Uzasadnieniem przeprowadzenia analizy były wyniki pomiarów, dla których wykorzystano różne układy eksperymentalne do napromieniania komórek, ale nigdy nie została przeprowadzona systematyczna charakterystyka parametrów wiązki ze źródła α (Edwards et al., 1980; Roos and Kellerer, 1989; Goodhead et al., 1991; Neti et al., 2004; Esposito et al., 2009; Staf et al., 2012a; Szeffiński et al., 2020; Płodowska et al., 2021). Wartości LET i RBE w eksperymentach z wykorzystaniem promieniowania α zależą od charakterystyki źródła, konfiguracji napromieniowania, układu biologicznego i punktu końcowego opisującego jego reakcję, dlatego kluczowe dla interpretacji wyników eksperymentów radiobiologicznych jest określenie parametrów ekspozycji źródła.

Dla źródła ^{137}Cs została wykonana dozymetria doświadczalna. Sprawdzona została jednorodność dawki promieniowania γ w komorze Scanditronix. Oprócz zastosowania certyfikowanych dozymetrów wykorzystany został dozymetr krzemowy. Wyniki, które zostały otrzymane dla pomiarów dawek dozymetrem krzemowym zostały zwalidowane przy użyciu filmów radiochromowych. Dzięki analizie wyników pomiarów dla różnych wartości dawek stosowanych w badaniach radiobiologicznych sprawdzona została poprawność działania dozymetru krzemowego, a także potwierdzona została wartość mocy dawki, którą można uzyskać ze źródła ^{137}Cs . Otrzymana wartość jednorodności dawki w komorze została uznana za zadowalającą.

Dozymetria jest ważnym elementem każdego eksperymentu radiobiologicznego. Pomaga zaprojektować i przetestować różne ustawienia ekspozycji materiału biologicznego na promieniowanie jonizujące. Odpowiedź komórkowa, która jest obserwowana po dostarczeniu do materiału biologicznego promieniowania jonizującego, jest odpowiedzią średnią dla wielu komórek. Dlatego istotne jest dostarczenie takiej samej dawki do każdej komórki. Dla promieniowania γ jednorodność dawki w każdej komórce jest łatwiejsza do uzyskania z uwagi na sposób oddziaływania z materią. W przypadku promieniowania α , które ma wysoką wartość LET oraz dużą liczbę jonizacji zlokalizowanych w małej objętości przy niewielkim zasięgu, efekty biologiczne w pojedynczych komórkach mogą się bardzo różnić w różnych schematach napromieniania. Dlatego ważna jest znajomość parametrów wiązki promieniowania. Pomimo możliwości otrzymania podobnej wartości dawki zdeponowanej w napromienianym materiale, efekt biologiczny może być inny.

Eksperymentalna i teoretyczna weryfikacja dozymetryczna odgrywają istotną rolę w dozymetrii, która zajmuje się pomiarami i oceną dawek promieniowania. Obliczenia z zastosowaniem metod MC powinny poprzedzać faktyczne pomiary, które są kosztowne i czasochłonne. Metody MC są pomocne nie tylko w charakteryzowaniu konfiguracji ekspozycji, ale także w określaniu czynników wpływających na charakterystykę wiązki, dzięki czemu można uniknąć błędów w prawidłowym dostarczaniu dawki do obiektu badawczego. Modele teoretyczne mogą uwzględniać różne czynniki, takie jak rodzaj promieniowania, materiały absorbujące, geometrię układu czy warunki eksperymentalne. Teoretyczna weryfikacja dostarcza ważnych informacji na temat rozkładu dawek promieniowania, efektywności ochrony przed promieniowaniem i optymalizacji procedur dozymetrycznych. Eksperymentalna weryfikacja dozymetryczna opiera się na przeprowadzaniu pomiarów dawek promieniowania przy użyciu odpowiednich instrumentów i detektorów. W ramach eksperymentów stosuje się różne metody i techniki, takie jak detektory promieniowania jonizującego (np. licznik Geigera-Müllera, komora jonizacyjna, licznik scyntylicyjny), dozymetry termoluminescencyjne, dozymetry optyczne czy spektrometria promieniowania. Eksperymenty te pozwalają na bezpośrednią ocenę dawek promieniowania na podstawie zmierzonych energii i fluencji cząstek lub bezpośredniego pomiaru dawki czy kermy.

Eksperymentalna i teoretyczna weryfikacja dozymetryczna są ze sobą ściśle powiązane i wzajemnie się uzupełniają (Czub et al., 2020). Eksperymentalne wyniki pomiarów służą do weryfikacji i kalibracji modeli teoretycznych, podczas gdy modele teoretyczne umożliwiają prognozowanie i optymalizację dawek promieniowania w oparciu o dostępne dane eksperymentalne. W połączeniu te dwa podejścia przyczyniają się do doskonalenia metod dozymetrycznych, poprawy bezpieczeństwa radiologicznego i ochrony przed promieniowaniem.

Rozdział 6

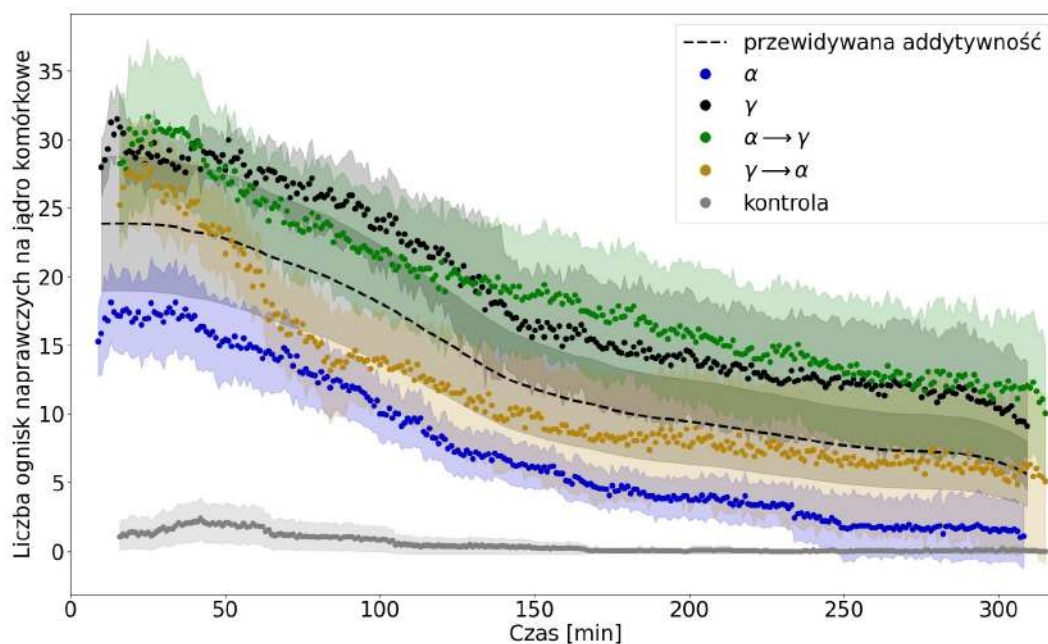
Charakterystyka ognisk naprawczych

Zaprezentowane w tym rozdziale badania miały na celu sprawdzenie odpowiedzi komórek z linii U2OS na działanie promieniowania γ i α oraz na kombinację obu typów promieniowania w proporcji 46% do 54%. Do analizy został wykorzystany mikroskop służący do obrazowania w czasie rzeczywistym żywych komórek, w których tworzą się i zanikają ogniska NBS1. Białko NBS1 łączy się z konkretnymi obszarami chromatyny w miejscach wystąpienia uszkodzeń DSB i pozostaje tam w trakcie procesu naprawy. To pozwala na monitorowanie obszarów, w których powstały DSB w miarę upływu czasu przy użyciu ognisk będących połączeniem NBS1 i GFP, tak jak zostało opisane w podrozdziałach 3.1.3 i 4.1 (Lukas et al., 2003). Ze względu na ograniczoną ilość informacji dotyczących wpływu napromieniania wiązkami mieszanymi oraz wpływu na DDR, wykonane zostały nagrania filmów poklatkowych, na których rejestrowane były komórki U2OS poddawane tylko promieniowaniu α , tylko promieniowaniu γ oraz sekwencyjnym ekspozycjom na oba te rodzaje promieniowania w naprzemiennej kolejności. Z powodu czasochłonnego procesu przygotowywania próbek komórek do obrazowania w czasie rzeczywistym, rejestracja obrazów rozpoczęła się około 3 minut po zakończeniu napromieniania i trwała przez około 300 minut. W celu uzyskania zarówno danych ilościowych, jak i jakościowych dotyczących ognisk zawierających białko NBS1, wykonana została analiza obrazów z uwzględnieniem pomiaru liczby ognisk (podrozdział 6.1), ich rozmiaru (podrozdział 6.2) oraz intensywności (podrozdział 6.3).

6.1 Kinetyka powstawania i zanikania ognisk naprawczych

Kinetyka powstawania ognisk naprawczych NBS1 oraz ich zanik zostały przedstawione na Rysunku 6.1, a parametry ilościowe zostały zestawione w Tabeli 6.1. Proces tworzenia ognisk naprawczych w wyniku uszkodzenia DNA może rozpocząć się już podczas ekspozycji na promieniowanie, której czas wynosił 7 minut i 32 sekundy dla promieniowania γ , 5 minut i 37 sekund dla promieniowania α oraz 10 minut i 33 sekundy dla sekwencyjnych wiązek mieszanych. Dodatkowo, przed rozpoczęciem rejestrowania obrazu mikroskopowego potrzebne było przygotowanie napromienionych komórek, które trwało średnio około 3 minut. Za każdym razem mierzony i zapisywany był czas pomiędzy za-

kończeniem napromieniania a rozpoczęciem rejestrowania zdjęć pod mikroskopem. Aby dokładnie porównać kinetykę powstawania i zanikania ognisk dla wszystkich scenariuszy napromieniania, punkt czasowy 0 jest ustalony jako początek napromieniania komórek, a dane doświadczalne pojawiają się odpowiednio później w zależności od czasu napromieniania oraz przygotowania próbki. Czas rozpoczęcia rejestracji obrazu (pierwszy punkt, który pojawia się na Rysunku 6.1) był mierzony niezależnie dla każdego napromieniania i każdej szalki z komórkami. Punkt czasowy, w którym uzyskano ostatni obraz, ma wartość większą niż 300 minut, ze względu na przesunięcie danych o czas napromieniania oraz przygotowania komórek do procesu akwizycji obrazów.



Rysunek 6.1: Kinetyka częstotliwości powstawania ognisk naprawczych NBS1 w komórkach kontrolnych i napromienionych. Kropki reprezentują punkty danych eksperymentalnych (ze zdjęć robionych co minutę), a zacięte korytarze reprezentują standardowe niepewności wartości średnich (SEM). Oczekiwane częstotliwości obliczone na podstawie założenia addytywności są widoczne jako czarna linia przerywana. Statystycznie istotną różnicę uzyskano dla par, z wyjątkiem ognisk powstałych po napromienianiu promieniowaniem γ oraz dla $\alpha \rightarrow \gamma$ (jednokierunkowa ANOVA) (Tartas et al., 2023b).

Średnia liczba ognisk na komórkę, które powstały w komórkach kontrolnych w ciągu 300 minut wynosiła ($1,0 \pm 1,8$). Ekspozycja na promieniowanie γ , α oraz kombinację obu znacząco zwiększała liczbę RIF, w porównaniu do komórek kontrolnych. Dane dotyczące liczby ognisk zostały zestawione w Tabeli 6.1. Częstość występowania ognisk stopniowo spadała w miarę upływu czasu naprawy. Największa średnia liczba RIF była obserwowana w komórkach poddanych działaniu promieniowania γ i osiągnęła maksimum (wartość $31,7 \pm 5,6$ ognisk na komórkę) w 14. minucie od momentu rozpoczęcia napromieniania. Komórki napromienione cząstkami α charakteryzowały się najniższą liczbą ognisk, z maksymalną

Tabela 6.1: Częstość występowania ognisk NBS1 w komórkach kontrolnych, komórkach narażonych na samo promieniowanie α i γ , na sekwencyjne wiązki mieszane $\alpha \rightarrow \gamma$ i $\gamma \rightarrow \alpha$, a także wartości przewidywane w oparciu o założenie addytywności. Początkowa liczba ognisk na jądro komórkowe podawana jest jako średnia liczba ognisk zarejestrowanych w 16. minucie po rozpoczęciu napromieniania (16. minuta to pierwsza minuta serii obrazów zarejestrowanej dla sekwencyjnych wiązek mieszanych). Końcowa liczba ognisk na jądro oznacza średnią liczbę ognisk zarejestrowanych w 310 minucie, czyli ostatniej minucie uzyskania obrazu komórek poddawanych działaniu promieniowania γ .

Rodzaj promieniowania	Początkowa średnia liczba ognisk na komórkę	Najwyższa średnia liczba ognisk na komórkę (punkt czasowy)	Końcowa średnia liczba ognisk na komórkę
kontrola	$1,1 \pm 2,1$	$2,4 \pm 3,1$ (36 min)	0,0
α	$17,1 \pm 2,7$	$18,1 \pm 2,9$ (13 min)	$1,1 \pm 2,3$
γ	$30,9 \pm 2,3$	$31,5 \pm 2,5$ (14 min)	$9,1 \pm 4,7$
$\alpha \rightarrow \gamma$	$28,3 \pm 5,0$	$31,7 \pm 5,6$ (25 min)	$11,9 \pm 5,1$
$\gamma \rightarrow \alpha$	$25,2 \pm 3,3$	$28,2 \pm 3,5$ (24 min)	$6,4 \pm 5,7$
przewidywane $\alpha + \gamma$	$23,9 \pm 4,8$	$23,9 \pm 4,8$ (20 min)	$6,5 \pm 2,6$

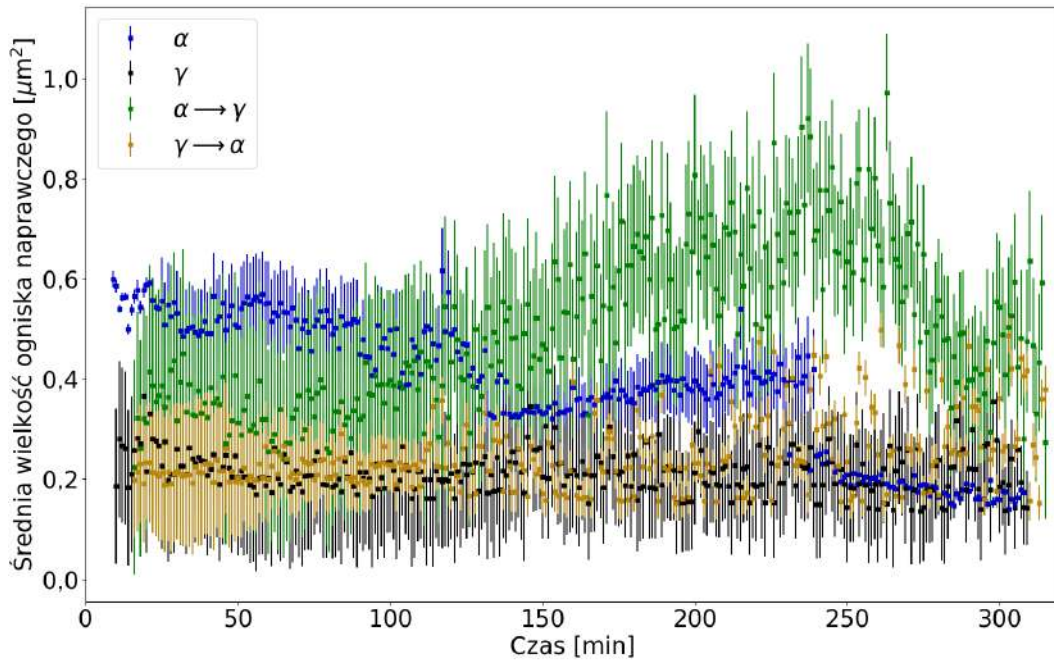
wartością wynoszącą $(18,1 \pm 2,9)$ ognisk na komórkę 13 minut po rozpoczęciu napromieniania. W przypadku ekspozycji na mieszane promieniowanie, średnia liczba ognisk była zbliżona do tego, co zostało zaobserwowane, gdy do napromieniania zostało wykorzystane tylko promieniowanie γ . Dla kombinacji $\alpha \rightarrow \gamma$ maksymalna liczba RIF wynosząca $(31,7 \pm 5,6)$, została zarejestrowana w 25. minucie. Dla $\gamma \rightarrow \alpha$ czas potrzebny do indukcji maksymalnej liczby ognisk naprawczych był podobny (24 minuty), ale zaobserwowana wartość wynosząca $(28,2 \pm 3,5)$ ognisk była mniejsza nieistotnie statystycznie.

Na wykresie przedstawiona została również linia przewidywanej addytywności, która była obliczona na podstawie danych liczby ognisk naprawczych dla promieniowania α i γ . Dla każdego punktu czasowego liczba ognisk w przewidywanej addytywności była sumą liczby ognisk indukowanych przez promieniowanie α i γ podzieloną przez 2.

6.2 Zmiana rozmiaru ognisk naprawczych

Oprócz częstości występowania ognisk naprawczych, przeanalizowana została wielkość ognisk, którą jest powierzchnia ogniska wyrażana w μm^2 . Uzasadnieniem tej analizy jest założenie, że wielkość RIF jest wprost proporcjonalna do złożoności uszkodzeń DNA i jest większa w jądrach komórkowych poddanych działaniu promieniowania α w porównaniu z promieniowaniem γ . Dane doświadczalne zostały przedstawione na Rysunku 6.2. Ze względu na duże niepewności, do danych eksperymentalnych zmiany średniego rozmiaru RIF w czasie, została dopasowana funkcja wielomianowa ósmego stopnia, co zostało przedstawione na Rysunku 6.3. Parametry dopasowania zostały przedstawione w Tabeli C.4 w Dodatku C. Największe ogniska były obserwowane zaraz po ekspozycji na cząstki α , a ich wielkość zmniejszała się w miarę upływu czasu. Promieniowanie γ oraz kombi-

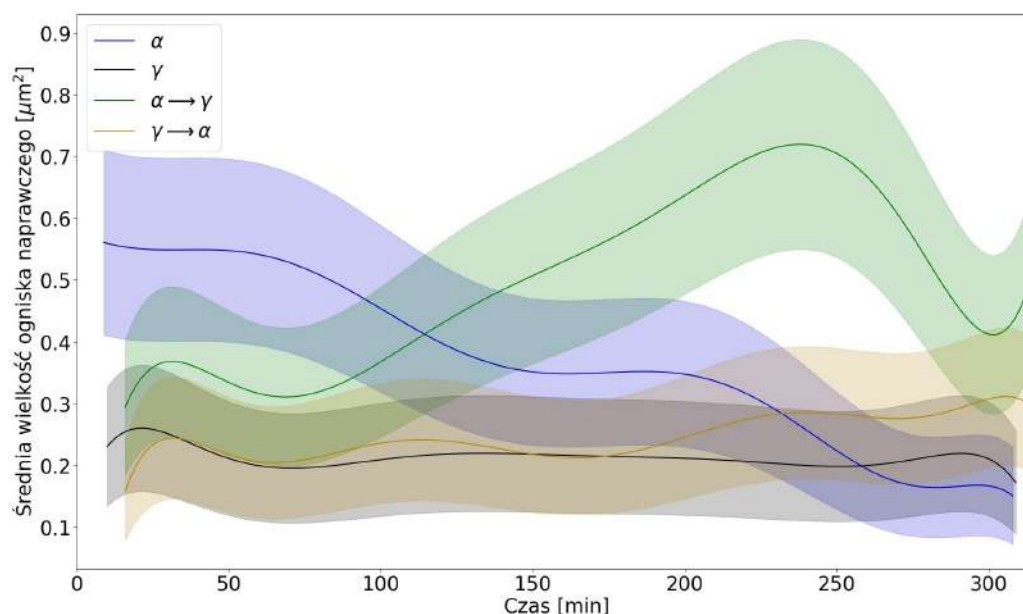
nacja $\gamma \rightarrow \alpha$ indukowały na początku małe ogniska, których wielkość nie zmieniała się znacząco przez pierwsze 180 minut obserwacji. Po tym czasie został zanotowany lekki wzrost wielkości ognisk w przypadku kombinacji $\gamma \rightarrow \alpha$, co można wytłumaczyć pojawieniem się kilku dużych ognisk, w których znajdowały się złożone uszkodzenia. Niemniej jednak ich wielkość pozostawała wyraźnie mniejsza od RIF wywołanych przez sekwencyjne napromienianie $\alpha \rightarrow \gamma$. Ogniska, które powstały w wyniku ekspozycji komórek na kombinację $\alpha \rightarrow \gamma$ były na początku mniejsze niż te, które powstały po ekspozycji tylko na cząstki α . Jednak od 150. minuty po ekspozycji na $\alpha \rightarrow \gamma$, średnia wielkość ognisk zaczęła stopniowo wzrastać, osiągając maksimum po 270 minutach od czasu rozpoczęcie napromieniania i była największa spośród wszystkich przeprowadzonych eksperymentów.



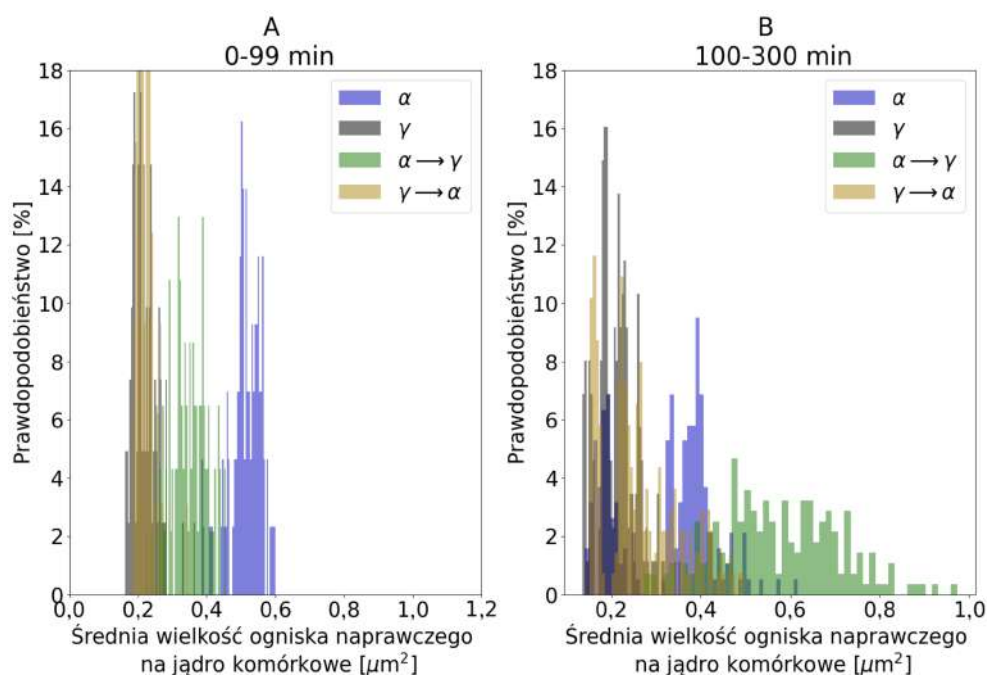
Rysunek 6.2: Średnia powierzchnia ognisk naprawczych w napromienionych komórkach w funkcji czasu. Słupki błędów reprezentują niepewności standardowe średniej.

Rozkłady wielkości ognisk, obserwowane w dwóch przedziałach czasowych (0-99 min oraz 100-300 min) zostały przedstawione na Rysunku 6.4. Do danych doświadczalnych została dopasowana funkcja Gaussa, co zostało przedstawione na Rysunku 6.5. Parametry dopasowania funkcji rozkładu normalnego znajdują się w Tabeli C.1 w Dodatku C. W ciągu pierwszych 99 minut, zarówno RIF wywołane przez promieniowanie γ , jak i kombinacją $\gamma \rightarrow \alpha$, charakteryzowały się najmniejszą średnią powierzchnią, wynoszącą około $0,2 \mu\text{m}^2$. Największe obszary RIF były obserwowane po ekspozycji na cząstki α : $(0,513 \pm 0,045) \mu\text{m}^2$, podczas gdy ogniska wywołane przez $\alpha \rightarrow \gamma$ miały średnią wielkość równą $(0,348 \pm 0,052) \mu\text{m}^2$. Około 90 minut po ekspozycji średnia powierzchnia RIF wywołanych przez cząstki α zaczęła się zmniejszać, natomiast rozmiar ognisk wywołanych przez γ pozostał na stałym poziomie i przez większość czasu obserwacji był najmniejszy. Co interesujące, powierzchnia ognisk wywołanych zarówno przez $\gamma \rightarrow \alpha$, jak i $\alpha \rightarrow \gamma$, wzrastała w miarę upływu czasu, co wskazuje na gromadzenie się złożonych uszkodzeń DNA w tych ogniskach. Dla obu kombinacji $\alpha \rightarrow \gamma$ i $\gamma \rightarrow \alpha$, średnia powierzchnia była istotnie

większa w przedziale od 100 do 300 minut w porównaniu do przedziału od 0 do 99 minut (odpowiednio $(0,348 \pm 0,052) \mu\text{m}^2$ i $(0,60 \pm 0,14) \mu\text{m}^2$ oraz $(0,220 \pm 0,025) \mu\text{m}^2$ i $(0,262 \pm 0,086) \mu\text{m}^2$).



Rysunek 6.3: Średnia wielkość ognisk naprawczych w funkcji czasu dla napromienionych komórek, opisana za pomocą dopasowania funkcji wielomianowej. Korytarze reprezentują 95% przedziały ufności (Tartas et al., 2023b).

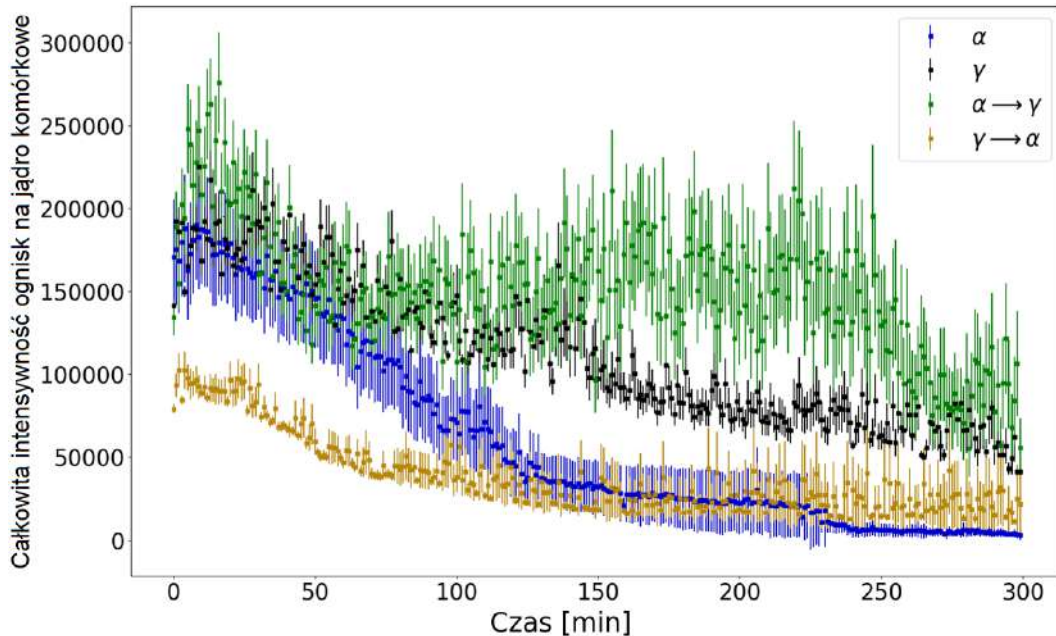


Rysunek 6.4: Histogramy powierzchni ognisk NBS1, które zostały przeanalizowane dla dwóch przedziałów czasowych: pierwsze 0-99 min (A) i następne 100-300 min (B).

Rysunek 6.5: Rozkłady powierzchni ognisk NBS1, które zostały przeanalizowane dla dwóch przedziałów czasowych: pierwsze 0-99 min (A) i następne 100-300 min (B) (Tartas et al., 2023b).

6.3 Intensywność ognisk naprawczych

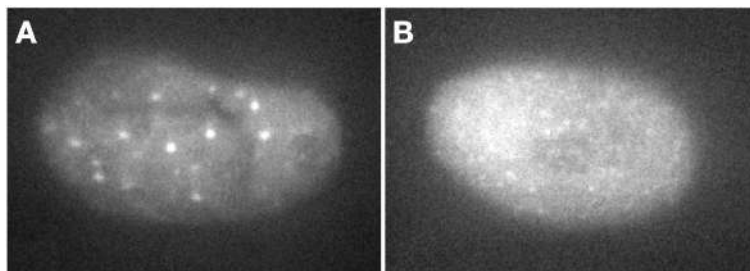
Kolejną charakterystyką ognisk naprawczych, która została poddana analizie była średnia intensywność fluorescencji NBS1-GFP w całym jądrze komórkowym, jako miara całkowitej ilości białka naprawczego (oznaczana jako całkowita intensywność RIF). Została ona obliczona jako suma wartości szarości w pikselach, które znajdowały się w obszarze ognisk. Dane doświadczalne intensywności zostały przedstawione na Rysunku 6.6. Kształt funkcji jest podobny do tego pokazanego na Rysunku 6.2, ponieważ intensywność ognisk jest skorelowana z liczbą pikseli, a co za tym idzie, z obszarem ogniska. Największa całkowita intensywność ognisk została zaobserwowana w komórkach poddanych działaniu kombinacji $\alpha \rightarrow \gamma$. Podobnie jak w przypadku wielkości ogniska, drugie maksimum intensywności zostało zarejestrowane około 200 minut po punkcie 0, co sugeruje transport białka NBS1 do dużych ognisk w tym późnym punkcie czasowym. Najniższe wartości całkowitej intensywności RIF zostały zaobserwowane dla kombinacji $\gamma \rightarrow \alpha$. Najbardziej wyraźny spadek całkowitej intensywności RIF wystąpił dla komórek napromienionych cząstkami α .



Rysunek 6.6: Suma intensywności pikseli znajdujących się w obszarze ognisk naprawczych na jądro komórkowe.

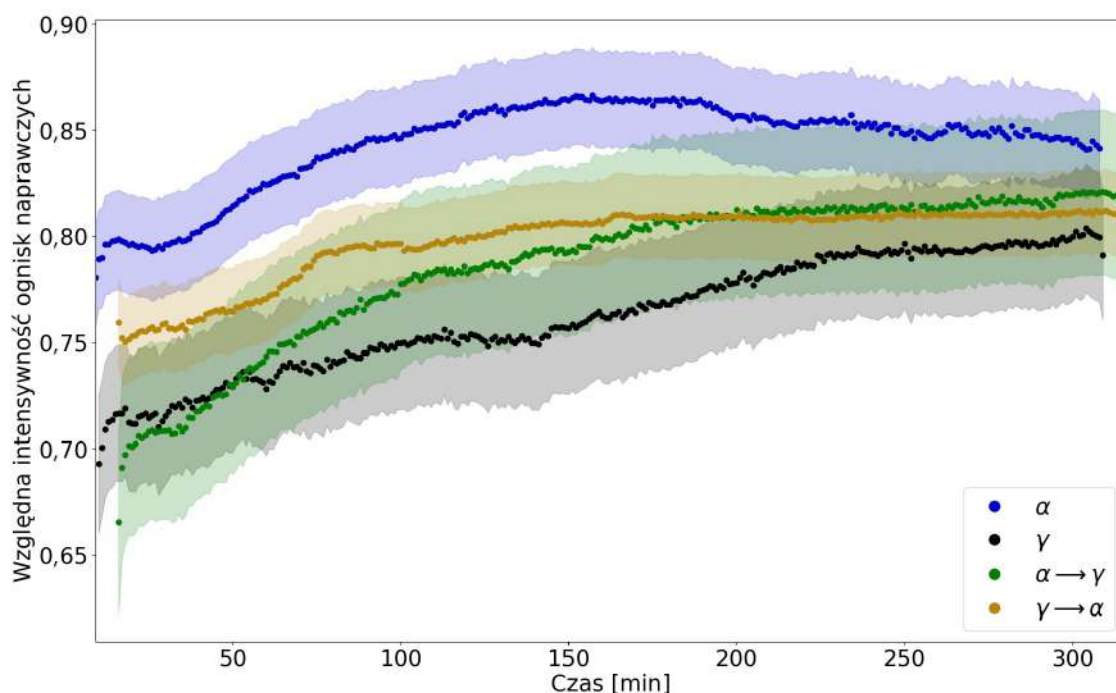
W celu przeanalizowania dynamiki intensywności ognisk w odniesieniu do tła jądra komórkowego wartość średnia intensywności RIF została podzielona przez intensywność

tła jądra komórkowego poza ogniskiem (zgodnie ze wzorem 4.1). Uzasadnieniem takiego sposobu obliczania intensywności jest duża intensywność tła (związana z dużą liczbą ognisk naprawczych) w jądrach komórkowych napromienionych promieniowaniem γ , co zostało pokazane na Rysunku 6.7. Otrzymane wartości względnej intensywności zostały przedstawione na Rysunku 6.8. Najwyższą względną intensywność RIF charakteryzują ogniska naprawcze indukowane przez cząstki α . To może być wyjaśnione poprzez fakt, że cząstki α indukują złożone uszkodzenia, a jednocześnie wykazuje niską intensywność tła wokół RIF. W rezultacie białka NBS1-GFP były skumulowane w uszkodzonym DNA i obszarach chromatyny, co skutkowało mniejszą ilością białek poza RIF. Ogniska indukowane kombinacją $\alpha \rightarrow \gamma$ i promieniowaniem γ wykazywały podobnie niskie względne intensywności do 60. minuty. Następnie względna średnia intensywność ognisk powstających pod wpływem promieniowania γ pozostawała najniższa, podczas gdy intensywność ognisk powstających w wyniku zastosowania kombinacji $\alpha \rightarrow \gamma$ wzrastała, nieznacznie przekraczając wartość intensywności ognisk powstałych w wyniku ekspozycji na $\gamma \rightarrow \alpha$ po około 130. minucie. Wartości względnej intensywności ognisk dla sekwencyjnych wiązek mieszanych $\gamma \rightarrow \alpha$ i $\alpha \rightarrow \gamma$ były pośrednie w porównaniu do promieniowania γ i cząstek α . Dla wszystkich rodzajów promieniowania intensywność ognisk stopniowo wzrastała przez około 120–180 minut, a następnie osiągnęła plateau.

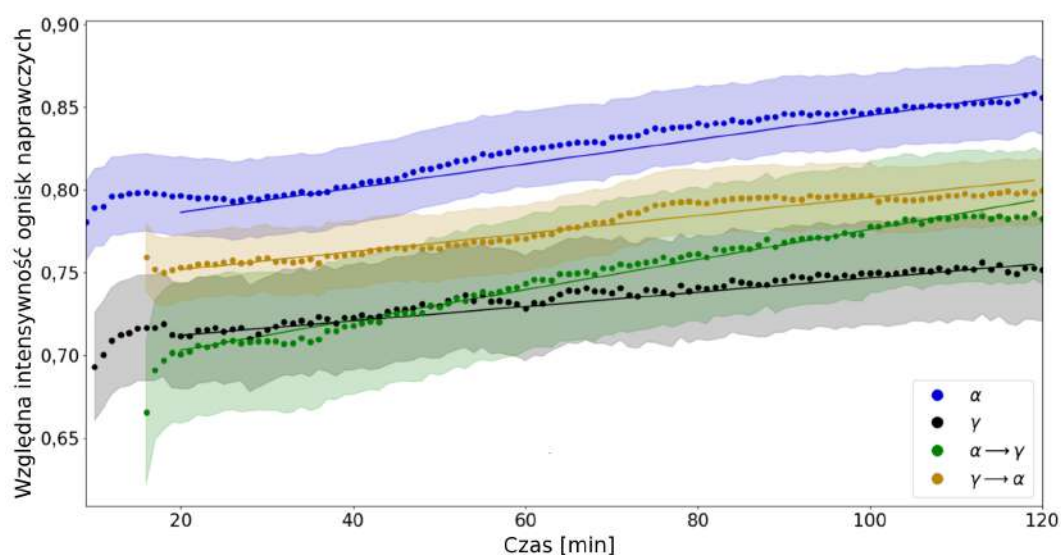


Rysunek 6.7: Zdjęcie mikroskopowe jąder komórkowych napromienionych cząstkami α (A) oraz promieniowaniem γ (B) z ogniskami naprawczymi o różnej intensywności.

Analiza dynamiki względnej intensywności RIF do 120 minut po czasie 0 opierała się na dopasowaniu funkcji liniowej do danych eksperymentalnych. Wykresy z dopasowaniem zostały przedstawione na Rysunku 6.9. Parametry nachylenia prostych oraz wartości p zostały zestawione w Tabelach C.2 i C.3 w Dodatku C. Największy wzrost względnej intensywności był obserwowany w ogniskach indukowanych przez $\alpha \rightarrow \gamma$ ($a = (9 \pm 12 \cdot 10^{-4}) \text{ min}^{-1}$), a najmniejszy przez γ ($a = (4,3 \pm 8,4 \cdot 10^{-4}) \text{ min}^{-1}$). Różnica ta była istotna statystycznie. Podczas pierwszych 120 minut, względna wartość intensywności ognisk powstających po zastosowaniu kombinacji $\alpha \rightarrow \gamma$ była istotnie mniejsza niż $\gamma \rightarrow \alpha$. Następnie różnica ta zniknęła. Współczynniki nachylenia linii dopasowania do danych różniły się istotnie dla par: γ i α , γ i $\alpha \rightarrow \gamma$, oraz $\gamma \rightarrow \alpha$ i $\alpha \rightarrow \gamma$.



Rysunek 6.8: Względna intensywność ognisk naprawczych na jądro komórkowe w ciągu 300 minut od napromieniania. Względne wartości uzyskano, dzieląc całkowite intensywności ognisk przez średnią intensywność tła (średnia intensywność obszaru jądrowego bez ognisk, z której średnia całkowita intensywność ogniska została odjęta). Korytarze niepewności reprezentują błędy standardowe średniej (Tartas et al., 2023b).



Rysunek 6.9: Względna intensywność ognisk naprawczych z dopasowanymi funkcjami liniowymi dla pierwszych 120 minut (Tartas et al., 2023b).

6.4 Dyskusja i wnioski

W wyniku przedstawionej analizy stwierdzono, że promieniowanie o wysokim LET wywołuje mniejszą liczbę ognisk NBS1 przypadającą na pojedynczą komórkę, chociaż dawka promieniowania była podobna do tej stosowanej w przypadku promieniowania o niskim LET. Ten efekt jest zgodny z oczekiwaniami, gdyż promieniowanie o wysokim LET, takie jak promieniowanie α , charakteryzuje się dużą gęstością jonizacji w DNA. Te wyniki potwierdzają wcześniejsze obserwacje dotyczące ognisk γ -H2AX (Staaf et al., 2012a) oraz ognisk 53BP1 (Sollazzo et al., 2017), które były obserwowane w badaniach z wykorzystaniem tego samego źródła α . W przedstawionych wynikach jest to odzwierciedlone w obserwacji występowania ognisk o dużej powierzchni oraz wysoką całkowitą i względną intensywności sygnałów w tych ogniskach (Lorat et al., 2015; Hagiwara et al., 2017; Roobol et al., 2020; Reindl et al., 2015).

Zaobserwowane zostało, że obie sekwencje napromieniania dwoma rodzajami promieniowania wykazywały początkowo wysoką liczbę ognisk, zbliżoną do tych w przypadku komórek narażonych tylko na promieniowanie γ . Jednak w przypadku sekwencji $\gamma \rightarrow \alpha$, spadek liczby ognisk NBS1-GFP był wyraźniejszy niż w przypadku sekwencji $\alpha \rightarrow \gamma$. Początkowa liczba ognisk w obu sekwencjach związanych z napromienianiem wiązką mieszaną była wyższa, niż można było przewidywać, opierając się na sumowaniu efektów promieniowania γ i α . To zjawisko jest zgodne z wynikami wcześniejszych badań dotyczących markerów γ -H2AX (Staaf et al., 2012a) i 53BP1 (Sollazzo et al., 2017), które również były indukowane przez promieniowanie o wysokim i niskim LET jednocześnie. Wydaje się mało prawdopodobne, żeby sekwencja $\alpha \rightarrow \gamma$ czyniła DNA bardziej podatne na uszkodzenia wywołane promieniowaniem o niskim LET, ponieważ wtedy początkowa liczba ognisk byłaby wyższa w przypadku $\alpha \rightarrow \gamma$ niż $\gamma \rightarrow \alpha$. Warto zaznaczyć, że czas życia rodników generowanych przez promieniowanie w wodzie jest bardzo krótki, wynoszący mniej niż sekundę (Roots and Okada, 1975), dlatego synergizm na poziomie indukcji uszkodzeń DNA musiałby być widoczny w ogniskach utworzonych już podczas ekspozycji i bardzo krótko po niej. Ciekawy jest fakt, że w poprzednich badaniach, w których komórki były jednocześnie poddane działaniu promieniowania o niskim i wysokim LET, obserwowano podobny poziom początkowych ognisk 53BP1 wywołanych promieniowaniem wiązką mieszaną i o niskim LET tylko wtedy, gdy analizowano utrwalone komórki (Sollazzo et al., 2017) a nie żywe (Sollazzo et al., 2018). Tę różnicę przypisano przede wszystkim wyższej rozdzielczości mikroskopii związanej z utrwalaniem i procedurami immunofluorescencyjnymi, a także spłaszczeniu jąder komórkowych podczas tych procesów. Istnieje również możliwość, że ogniska NBS1-GFP, które są mniejsze niż ogniska 53BP1, stanowią bardziej czuły parametr dla monitorowania reakcji odpowiedzi komórkowej na uszkodzenia w dwuwymiarowej konfiguracji. Wyniki testu kometowego, przeprowadzonego na limfocytach krwi obwodowej, również potwierdziły synergiczny efekt w gromadzeniu początkowych uszkodzeń DNA w wyniku ekspozycji na wiązki mieszane promieniowania jonizującego (Cheng et al., 2018). Podobne wyniki uzyskano także podczas analizy ognisk γ -H2AX w utrwalonych ludzkich fibroblastach (Staaf et al., 2012a).

Synergia między promieniowaniem γ a promieniowaniem α pod względem opóźnionej naprawy wystąpiła jedynie w przypadku sekwencji $\alpha \rightarrow \gamma$. W przypadku sekwencji

$\gamma \rightarrow \alpha$ zaobserwowana została szybka naprawa, a liczba ognisk spadła poniżej oczekiwanej wartości, osiągając prawie poziom ognisk wywołanych przez cząstki α . Oznacza to, że po zastosowaniu kombinacji $\alpha \rightarrow \gamma$, proste pęknięcia dwuniciowego DNA wywołane promieniowaniem γ zostały szybko naprawione, pozostawiając jedynie złożone uszkodzenia na końcu 300-minutowej obserwacji. Ten szybki zanik ognisk w jądrze komórkowym w przedziale 50–100 minut naprawy sugeruje, że obecność uszkodzeń wywołanych promieniowaniem o niskim LET przed uszkodzeniem wywołanym wysokim LET przyspiesza aktywację mechanizmów naprawczych DNA. Wyniki mogą sugerować, że synergia pomiędzy tymi dwoma rodzajami promieniowania jest wynikiem ich interakcji, która wyraża się poprzez początkowe uszkodzenia DNA oraz opóźnioną naprawę. Wyniki te potwierdzają hipotezę, że złożone uszkodzenia wywołane wysokim LET angażują mechanizmy naprawcze DDR na tyle intensywnie, że uszkodzenia o niskim LET nie są efektywnie naprawiane lub naprawa tych uszkodzeń wykracza poza czas obserwacji ognisk objęty badaniem.

Aby bardziej szczegółowo zbadać mechanizmy odpowiedzi komórkowej na wiązki mieszane, obrazy zostały przeanalizowane w celu sprawdzenia wielkości obszarów, w których złożone uszkodzenia objawiają się dużymi ogniskami (Scherthan et al., 2019; Perez et al., 2016; Sisario et al., 2018). Zbadana została również całkowita intensywność ognisk, która mogła wskazywać na ilość białka NBS1 skoncentrowanego w określonym obszarze uszkodzenia DSB (Roobol et al., 2020). W obu przypadkach zauważalny wzrost wystąpił po 120 minutach obserwacji, szczególnie po ekspozycji na sekwencyjne wiązki mieszane, w których cząstki α zostały zastosowane jako pierwsze ($\alpha \rightarrow \gamma$). Zwiększenie wielkości ognisk może sugerować nagromadzenie uszkodzonych fragmentów DNA, które są trudne do naprawienia i przyciągają większą ilość białek zaangażowanych w naprawę DDR. Jest to proces, w którego trakcie te obszary wydają się łączyć, co może pomóc w skoordynowanej naprawie (Aten et al., 2004). Możliwe jest również, że pozostałe ogniska, które są naprawiane wolniej, mogą być związane z przetwarzaniem złożonych uszkodzeń lub lokalizować się w heterochromatynie, co może opóźniać proces naprawy. Promieniowanie o wysokim LET może indukować odpowiedź dwufazową w różnych typach komórek, gdzie drugie maksimum w liczbie ognisk pojawia się około 3-6 godzin po ekspozycji. Ten drugi wzrost jest często związany z przetwarzaniem uszkodzeń heterochromatycznych i związany z naprawą zależną od ATM-KAP1 (Goodarzi et al., 2009). Jednak w przypadku komórek U2OS nie została zaobserwowana wyraźna odpowiedź dwufazowa w liczbie ognisk NBS1 w badanym czasie, co jest zgodne z wynikami wcześniejszych badań nad 53BP1, gdzie również zaobserwowano niewielki wzrost liczby ognisk po około 4-5 godzinach (Sollazzo et al., 2017). Niemniej jednak jeśli chodzi o obszar ognisk, widoczne jest niewielkie spłaszczenie krzywej w przypadku promieniowania α po 200 minutach, a duży wzrost pojawił się w przypadku sekwencji $\alpha \rightarrow \gamma$ po około 240 minutach (co odpowiada 4 godzinom).

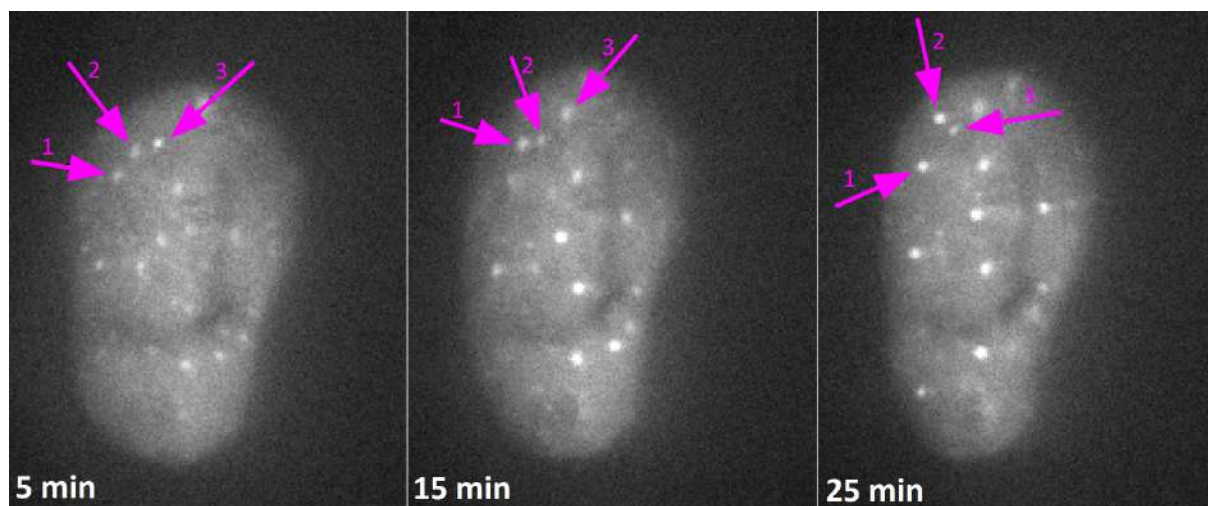
Przy obliczeniach względnej intensywności ognisk, ogniska, które powstały po ekspozycji na cząstki α wykazywały najwyższą wartość, podczas gdy te, które powstały pod wpływem promieniowania γ wykazywały najniższą. Te wyniki są zgodne z wcześniejszymi badaniami, w których zaobserwowano wysoką intensywność ognisk 53BP1 w przypadku uszkodzeń powstałych po zastosowaniu promieniowania o wysokim LET w porównaniu do tych o niskim LET. Interpretowano to jako efekt zwiększonego lokalnego stężenia białek naprawczych oraz obecność wielu pojedynczych zdarzeń resekcji. Te ostatnie były

określane na podstawie obserwacji wielokrotnych ognisk białka replikacyjnego A (RPA) w obszarach chromatyny 53BP1 (Roobol et al., 2020). Naprawa opierająca się na resekcji jest preferencyjnie aktywowana w przypadku złożonych pęknięć dwuniciowych (Averbeck et al., 2014). Warto zaznaczyć, że obliczenia względnej intensywności opierały się na różnicy między poziomami intensywności w obszarze ogniska a tła. Dlatego też nie jest zaskakujące, że ogniska powstające po zastosowaniu promieniowania o wysokim LET (cząstek α), wykazywały wyższą intensywność w porównaniu do wiązek mieszanych, zwłaszcza w kontekście poziomów tła. Ponadto, uszkodzenia wywołane przez promieniowanie o wysokim LET mogą prowadzić do związania większej ilości niektórych komponentów naprawy DDR (Greubel et al., 2008), co może wpłynąć na wyniki procesu naprawy.

Rozdział 7

Mobilność ognisk naprawczych

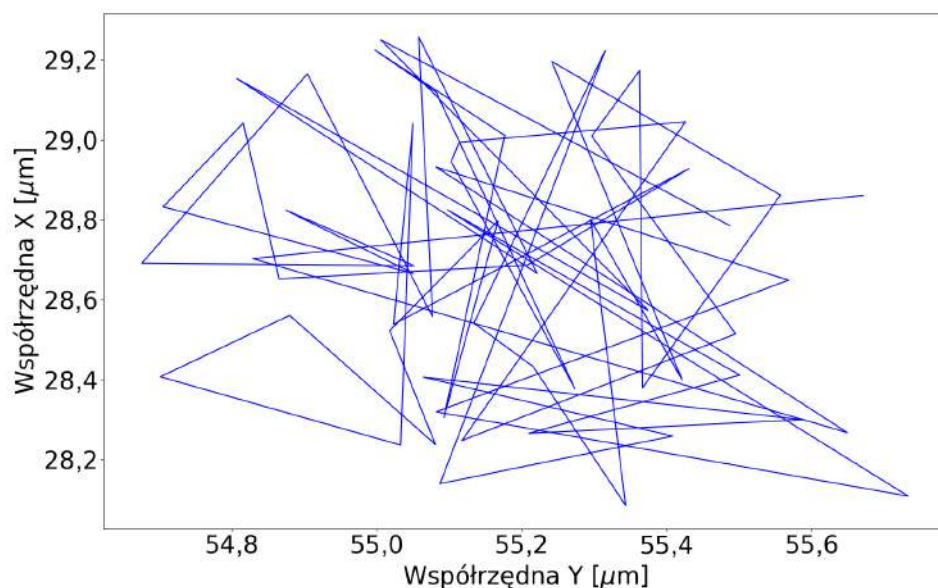
Ogniska naprawcze, które powstają w wyniku działania promieniowania jonizującego, poruszają się w obrębie jądra komórkowego, co zostało przedstawione za pomocą trzech klatek zarejestrowanego filmu na Rysunku 7.1.



Rysunek 7.1: Trzy zdjęcia jądra komórkowego zarejestrowanego w wybranych punktach czasowych z ogniskami NBS1 indukowanymi promieniowaniem α . Różowymi strzałkami zostały oznaczone trzy wybrane ogniska naprawcze i ich pozycje w 5, 15 i 25 minucie obserwacji pod mikroskopem fluorescencyjnym.

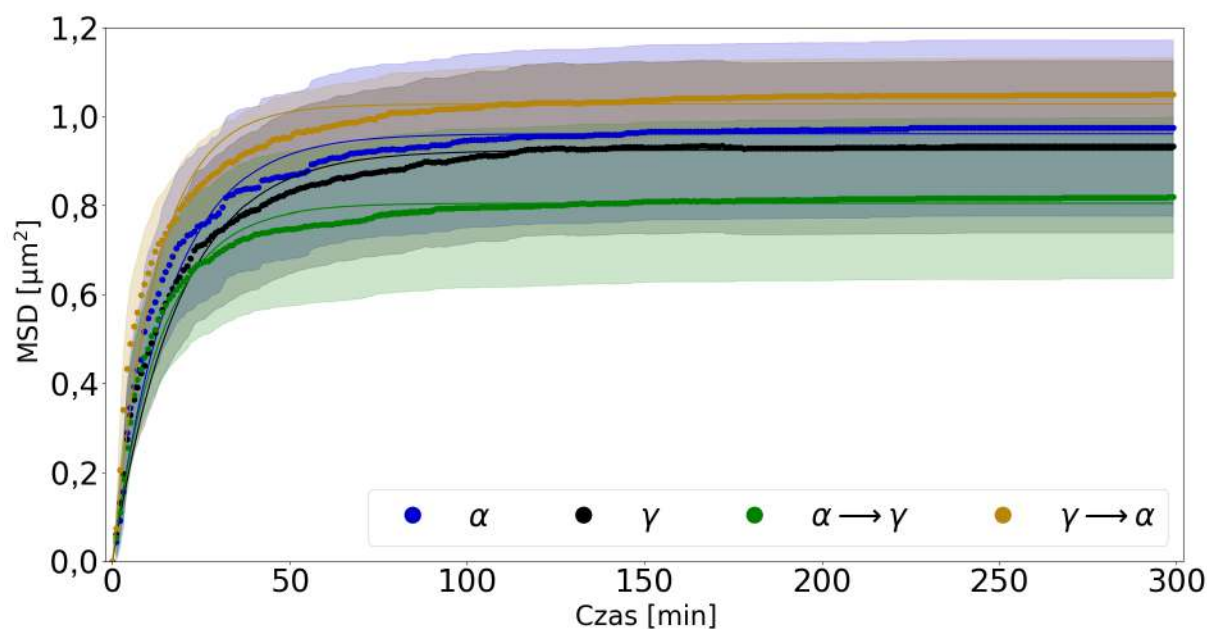
Ruch pojedynczego ogniska został zaprezentowany na Rysunku 7.2. Poruszanie się ogniska naprawczego w środowisku komórkowym wykazuje podobieństwa do ruchów Browna. Ruchy Browna to losowy ruch cząstek zawieszonych w płynie (cieczy lub gazie) powstały w wyniku ich zderzeń z poruszającymi się atomami lub cząsteczkami gazu/cieczy. Podobnie ruch ognisk naprawczych, które są dynamicznymi strukturami, wydaje się przebiegać według nieprzewidywalnego i stochastycznego wzorca w środowisku komórkowym (Chubb et al., 2002; Görisch et al., 2004; Mearini and Fackelmayer, 2006).

Dla każdego ogniska wyznaczone zostały współrzędne jego położenia na obrazie i obliczone zostało MSD będące miarą przemieszczenia ogniska z położenia odniesienia, w tym przypadku środka masy jądra komórkowego (Seeber et al., 2018). Określenie środka masy



Rysunek 7.2: Dwuwymiarowy (X, Y) ruch pojedynczego ogniska naprawczego w czasie z uwzględnieniem ruchu jądra komórkowego. Czas śledzenia ogniska został ograniczony do 60 min od rozpoczęcia nagrywania ze względu na czytelność wykresu.

jądra komórkowego w każdym punkcie czasowym umożliwiło eliminację wpływu ruchu jądra w komorze żywych komórek podczas rejestracji. Wyniki zostały przedstawione na Rysunku 7.3.



Rysunek 7.3: Średnie przemieszczenie kwadratowe ognisk naprawczych wywołane promieniowaniem α , promieniowaniem γ i wiązkami mieszanymi obu sekwencji. Linie ciągłe reprezentują dopasowania do punktów danych. Korytarze reprezentują odchylenie standardowe średniej.

Na podstawie danych eksperymentalnych, zgodnie z równaniem 4.4, obliczone zostały dwa parametry ruchliwości ognisk: współczynnik dyfuzji D_c , który opisuje ruchliwość ogniska i jest wyrażany w $\frac{\text{nm}^2}{\text{s}}$ oraz promień dyfuzji r_c (podawany w nm), który określa rzeczywisty obszar, w jakim przemieszcza się dane ognisko. Wartości współczynników dyfuzji D_c i promieni r_c zostały przedstawione w Tabeli 7.1, wraz z iloczynem obu tych parametrów. Iloczyn D_c i r_c umożliwia ocenę mobilności ognisk pod względem obu parametrów, które są ze sobą bezpośrednio powiązane. RIF indukowane przez kombinację $\gamma \rightarrow \alpha$ wykazywały najwyższą wartość, co sugeruje, że lokalne środowisko chromatyny jest silnie rozluźnione przez działanie sekwencyjnych wiązek mieszanych. Pozostałe rodzaje promieniowania charakteryzowały się podobnymi wartościami parametrów D_c i r_c , wyraźnie niższymi niż w przypadku $\gamma \rightarrow \alpha$.

Tabela 7.1: Analiza średniego kwadratu przemieszczenia z parametrami dopasowania funkcji modelu subdyfuzji. Rodzaje promieniowania są sklasyfikowane według iloczynu D_c i r_c (podzielonego przez 1000). Wszystkie parametry opisujące ruch ognisk dla $\gamma \rightarrow \alpha$ są znacząco wyższe niż dla pozostałych ($p < 0,0001$ w teście t jednostronnym).

Rodzaj promieniowania	Współczynnik dyfuzji ($D_c \pm \text{SEM}$) [$\frac{\text{nm}^2}{\text{s}}$]	Promień dyfuzji ($r_c \pm \text{SEM}$) [nm]	Iloczyn D_c i r_c (podzielony przez 1000)
α	$349,0 \pm 6,4$	1014 ± 10	354
γ	$242,1 \pm 3,4$	$980,5 \pm 6,7$	237
$\alpha \rightarrow \gamma$	$240,8 \pm 3,6$	$897,0 \pm 5,8$	216
$\gamma \rightarrow \alpha$	$206,0 \pm 2,5$	$961,4 \pm 6,0$	197

Ogniska, które zostały indukowane we wszystkich scenariuszach napromieniania, wykazywały szybką, lokalnie ograniczoną ruchliwość przez pierwsze 40-50 minut. Po około 1 godzinie od rozpoczęcia obserwacji wartość MSD osiągała plateau. To zachowanie sugeruje, że chromatyna porusza się w sposób subdyfuzyjny, lokalnie ograniczony, prawdopodobnie pod wpływem domen chromatyny otoczonych przez czynnik regulujący strukturę 3D chromatyny, który zawiera DSB (Natale et al., 2017).

7.1 Dyskusja i wnioski

Wyniki przeprowadzonych badań nad mobilnością ognisk naprawczych wykazały subdyfuzyjny ruch nośników uszkodzeń DSB w ograniczonej przestrzeni, które zostały oznaczone przy użyciu białka NBS1 (Seeber et al., 2018). Te wyniki są zgodne z danymi uzyskanymi przez jeden z zespołów, który zauważył, że mobilność ognisk naprawy DSB w chromatynie jest ograniczona i niezależna od wartości LET promieniowania, na jakie były narażone komórki (Jakob et al., 2009). Warto zauważyć, że podobne współczynniki dyfuzji obserwowano zarówno dla promieniowania α , jak i $\alpha \rightarrow \gamma$, co sugeruje, że środowisko chromatyny, na którą oddziałuje promieniowanie α , ma dominujący wpływ na proces naprawy DDR, nawet w obecności rozproszonych DSB wywołanych promieniowaniem γ . W przypadku schematu napromieniania wiązkami mieszanymi $\gamma \rightarrow \alpha$ została

zaobserwowana najwyższa wartość MSD i największy promień dyfuzji spośród testowanych schematów napromieniania.

Mała ruchliwość ognisk naprawczych po ekspozycji na kombinację dwóch rodzajów promieniowania z zastosowaniem cząstek α jako pierwszych ($\alpha \rightarrow \gamma$) w porównaniu do odwrotnej kolejności ($\gamma \rightarrow \alpha$) sugeruje, że chromatyna odgrywa kluczową rolę w tej odpowiedzi. Istnieje hipoteza, że otwieranie chromatyny w różnych miejscach jądra w odpowiedzi na promieniowanie o niskim LET, bezpośrednio przed ekspozycją na promieniowanie o wysokim LET, jest związane z szybkim wzrostem ruchu w ciągu pierwszych 40-50 minut. To zjawisko jest synchroniczne w czasie z szybką naprawą części złożonych uszkodzeń wywołanych promieniowaniem o wysokim LET. Istnieje prawdopodobieństwo, że to otwarcie chromatyny indukowane promieniowaniem o niskim LET prowadzi do powstania prostych pęknięć dwuniciowych, zwłaszcza w obszarach euchromatycznych, które są następnie naprawiane przez mechanizm NHEJ, niezależnie od stopnia upakowania heterochromatyny (Lorat et al., 2015; Goodarzi et al., 2010). Ten wniosek znajduje potwierdzenie we wcześniejszych badaniach nad komórkami nowotworu piersi, w których otwarcie chromatyny za pomocą inhibitora deacetylazy histonowej przyspieszało naprawę ognisk γ -H2AX po ekspozycji na promieniowanie α (Eriksson et al., 2018). To z kolei wpływało na ogólną ochronę przed promieniowaniem na przeżycie komórek (Svetličič et al., 2020). Inne badania sugerują, że w przypadku złożonych uszkodzeń zachodzących w heterochromatynie, DSB muszą przemieścić się w kierunku granicy heterochromatyna/euchromatyna, aby być naprawiane prawidłowo (Jakob et al., 2011). Promieniowanie o wysokim LET może zatem prowadzić do zróżnicowanego rozkładu uszkodzeń w zależności od środowiska chromatyny, zwłaszcza w pewnych obszarach jądrowych. Cząstki przechodzące przez jądro uderzają zarówno w euchromatynę, jak i heterochromatynę, co wpływa na różnice w naprawie DSB indukowanych w tych różnych środowiskach (Lorat et al., 2016; Goodarzi et al., 2009; Jakob et al., 2011). Istnieje również możliwość, że w przypadku promieniowania o wysokim LET, złożone DSB szybko przyciągają białka naprawcze, podczas gdy proste uszkodzenia, które pojawiają się później i są wywołane promieniowaniem o niskim LET, mogą zużywać dostępność białek, co z kolei może wpływać na wybór ścieżki naprawy (Greubel et al., 2008; Roobol et al., 2020). Warto również podkreślić, że ruchliwość chromatyny jest najwyższa w obszarach zawierających bardzo złożone uszkodzenia DNA. To może być wynikiem rozpuszczania architektury chromatyny wzdłuż ścieżek cząstek o wysokim LET, co zostało zaobserwowane w analizie z użyciem transmisyjnego mikroskopu elektronowego (ang. *transmission electron microscope*, TEM) (Timm et al., 2018).

Ze względu na to, że aktualna analiza skupiała się wyłącznie na ogniskach NBS1, niemożliwe jest dokładne przewidzenie, jak obserwowane różnice w kinetyce ognisk naprawczych mogą wpływać na indukowaną promieniowaniem śmierć komórek. Niemniej jednak wiele wcześniejszych badań nad przeżyciem komórek klonogennych narażonych na promieniowanie o wysokim i niskim LET w naprzemiennych sekwencjach, wykazało synergiczny efekt pomiędzy dwoma rodzajami promieniowania tylko wtedy, gdy ekspozycja na promieniowanie o wysokim LET poprzedzała ekspozycję na promieniowanie o niskim LET (Zhou et al., 2006; Demizu et al., 2004; Durand and Olive, 1976; Higgins et al., 1983, 1984; McNally et al., 1984; Ngo et al., 1981). W przeciwnym przypadku, czyli gdy kolejność ekspozycji była odwrotna, synergizm nie był obserwowany, z wyjątkiem tylko

dwóch badań (Railton et al., 1975; Suzuki, 1993). W związku z tym większość dostępnych danych dotyczących przeżycia komórek klonogennych potwierdza wyniki prezentowane w niniejszej pracy.

Rozdział 8

Podsumowanie i perspektywy

Ważnym aspektem badań radiobiologicznych jest dozymetria źródeł promieniowania, mająca na celu dokładne określenie dawki, jaką otrzymuje materiał biologiczny. Znajomość tej dawki ma kluczowe znaczenie dla wyciągania wniosków z eksperymentów i porównywania danych pomiędzy różnymi laboratoriami. Istotne jest, aby układ eksperymentalny był dobrze zdefiniowany, ponieważ biologiczny efekt (a także RBE), który zależy od parametru LET promieniowania, jest ściśle związany ze sposobem dostarczenia promieniowania do komórek (Dos Santos et al., 2018). Pomiar dawki może być przeprowadzany przy użyciu aktywnych dozymetrów, umożliwiających monitorowanie w czasie rzeczywistym, oraz pasywnych, dostarczających informacje po zakończeniu ekspozycji. W przypadku źródeł znajdujących się w zamkniętych komorach skuteczne mogą być dozymetry krzemowe wykorzystywane do szybkich pomiarów dawki. Oprócz dozymetrii eksperymentalnej również ważną rolę odgrywa dozymetria teoretyczna, wykorzystująca metody MC. Umożliwia ona projektowanie układów eksperymentalnych. Analiza uzyskanych wyników z pomiarów dozymetrycznych potwierdziła wartości mocy dawek i jednorodności promieniowania α i γ .

Reakcja na uszkodzenia DNA wywołane promieniowaniem jonizującym zależy od charakterystyki zastosowanego promieniowania opisaną m.in. parametrem LET. Promieniowanie o wysokim LET powoduje bardziej złożone uszkodzenia w DNA niż promieniowanie o niskim LET, utrudniając komórce naprawę (Lorat et al., 2015; Roobol et al., 2020; Nikitaki et al., 2022). Co więcej, w miarę wzrostu złożoności uszkodzeń DNA, naprawa DSB staje się zależna od procesu resekcji DSB (Averbeck et al., 2014).

We wcześniej przeprowadzonych badaniach zostało wielokrotnie potwierdzone, że jednoczesna ekspozycja komórek na promieniowanie o wysokim i niskim LET prowadzi do powstawania złożonych uszkodzeń, które są trudne do naprawienia. To skutkuje wyższym poziomem uszkodzeń DNA i aktywacją DDR na wyższym poziomie, niż można by przewidzieć, bazując na prostej addytywności tych dwóch rodzajów promieniowania (Cheng et al., 2018, 2019; Sollazzo et al., 2017; Staaf et al., 2012a, 2013; Sollazzo et al., 2018). Jedną z hipotez zakłada, że mechanizm tej interakcji może być związany z rozluźnieniem struktury chromatyny spowodowanym uszkodzeniami wywołanymi promieniowaniem o wysokim LET. W wyniku tego procesu DNA staje się bardziej podatne na uszkodzenia spowodowane promieniowaniem o niskim LET (Sollazzo et al., 2016). Alternatywną hipotezą jest nadmierna aktywacja systemu naprawy DNA, która może występować w przypadku naprawy uszkodzeń o wysokim LET, co z kolei utrudnia skuteczną naprawę

uszkodzeń o niskim LET. Jednym z podejść do weryfikacji tych hipotez jest napromienianie komórek najpierw promieniowaniem o niskim LET, a następnie promieniowaniem o wysokim LET, w naprzemiennym trybie.

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy doktorskiej skupiają się na sprawdzeniu efektu działania dwóch rodzajów promieniowania jonizującego, różniącego się między sobą wartością LET, które są podawane sekwencyjnie — jedno po drugim. Dodatkowo wyniki badań wskazują, że w przypadku sekwencyjnego narażenia na mieszane wiązki o niskim i wysokim LET, kolejność napromieniania w różny sposób wpływa na odpowiedź komórkową i mechanizmy naprawy. Wydaje się, że po ekspozycji komórek na promieniowanie o niskim, a później wysokim LET, komórki angażują się w naprawę złożonych uszkodzeń wywołanych promieniowaniem o wysokim LET w takim stopniu, że uszkodzenia wywołane promieniowaniem o niskim LET są naprawiane z opóźnieniem. Wynik ten daje wgląd w czasoprzestrzenną organizację procesów naprawy DNA, która może być modulowana przez obecność uszkodzeń o różnej złożoności w jądrze komórkowym. Mimo przeprowadzonych badań z wykorzystaniem sekwencyjnych wiązek mieszanych nie udało się jednoznacznie stwierdzić, która z wcześniej przedstawionych hipotez wyjaśniających uzyskane efekty biologiczne jest prawdziwa. Obie hipotezy wydają się równie prawdopodobne. Wyniki badań potwierdzają zgodność z hipotezami w kontekście ognisk naprawczych, ale nie przynoszą jednoznacznej odpowiedzi, która z nich jest bardziej prawdopodobna.

Dokładny mechanizm tej reakcji nie jest jeszcze w pełni zrozumiany. Może to być związane z aktywacją kinaz odpowiedzialnych za odpowiedź na uszkodzenia DNA przez początkowe uszkodzenia promieniowaniem o niskim LET lub rozluźnieniem struktury chromatyny po kilku minutach od ekspozycji na promieniowanie γ . To rozluźnienie może wpłynąć na przyspieszenie naprawy uszkodzeń wywołanych przez promieniowanie α , podobnie jak było to obserwowane w przypadku hamowania deacetylazy histonowej (Svetlichik et al., 2020) biorącej udział w mechanizmie kontroli ekspresji genów. W przypadku sekwencji $\alpha \rightarrow \gamma$ naprawa była znacznie wolniejsza niż w przypadku wykorzystania samego promieniowania γ , a przebieg tej opóźnionej naprawy bardziej przypominał wyniki z wcześniejszych badań, w których komórki były narażone jednocześnie na promieniowanie o wysokim i niskim LET (Staaf et al., 2012b,c; Cheng et al., 2019; Sollazzo et al., 2017; Staaf et al., 2012a, 2013; Sollazzo et al., 2018). W tych eksperymentach napromieniania cząstkami α i promieniowaniem rentgenowskim rozpoczynało się w tym samym czasie, ale ze względu na wyższą dawkę promieniowania α w porównaniu z promieniowaniem rentgenowskim, działanie promieniowania rentgenowskiego trwało dłużej.

Warto zaznaczyć, że przedstawione badania były skoncentrowane na analizie ognisk NBS1 w czasie 5 godzin po napromienianiu. Interesującym kierunkiem dalszych badań byłoby kontynuowanie monitorowania zachowania ognisk w dłuższym czasie. Niestety, w obecnym układzie eksperymentalnym nie było to możliwe ze względu na efekty wysycania sygnału fluorescencji oraz na ruch komórek, który nasilił się pod koniec czasu obserwacji. Te ograniczenia prawdopodobnie wynikały z ostatecznych efektów fototoksycznych związanych z parametrami wykorzystanej techniki, takimi jak czas wykonywania pojedynczego zdjęcia i warunki hodowli w komorze obrazowania na żywo.

Dodatkowym, interesującym podejściem do dalszych badań mogłoby być śledzenie tworzenia się ognisk w trzech wymiarach za pomocą mikroskopii konfokalnej. Ze względu

na ortogonalną konfigurację zastosowanego układu ekspozycji na cząstki α , jedno ognisko indukowane przez cząstki α może reprezentować jedno przejście cząstki, które prawdopodobnie wywołałoby kilka ognisk na swojej drodze, jak to zostało pokazane w innym badaniu (Leatherbarrow et al., 2006). Analiza trójwymiarowa umożliwiłaby zbadanie w trzecim wymiarze ognisk, których nie udało się wykryć ze względu na ich nakładanie się.

Bibliografia

- Abbasi, S. et al. (2019). Martian residents: mass media and Ramsar high background radiation areas. *Journal of Biomedical Physics & Engineering*, 9(4):483.
- Agostinelli, S., Allison, J., Amako, K. a., Apostolakis, J., Araujo, H., Arce, P., Asai, M., Axen, D., Banerjee, S., Barrand, G., et al. (2003). Geant4—a simulation toolkit. *Nuclear instruments and methods in physics research section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 506(3):250–303.
- Allison, J., Amako, K., Apostolakis, J., Arce, P., Asai, M., Aso, T., Bagli, E., Bagulya, A., Banerjee, S., Barrand, G., et al. (2016). Recent developments in Geant4. *Nuclear instruments and methods in physics research section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 835:186–225.
- Allshire, R. C. and Madhani, H. D. (2018). Ten principles of heterochromatin formation and function. *Nature reviews Molecular cell biology*, 19(4):229–244.
- Ariumi, Y., Kawano, K., Yasuda-Inoue, M., Kuroki, M., Fukuda, H., Siddiqui, R., Turelli, P., and Tateishi, S. (2018). DNA repair protein Rad18 restricts LINE-1 mobility. *Scientific Reports*, 8(1):15894.
- Asaithamby, A., Hu, B., and Chen, D. J. (2011). Unrepaired clustered DNA lesions induce chromosome breakage in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(20):8293–8298.
- Aten, J. A., Stap, J., Krawczyk, P. M., van Oven, C. H., Hoebe, R. A., Essers, J., and Kanaar, R. (2004). Dynamics of DNA double-strand breaks revealed by clustering of damaged chromosome domains. *Science*, 303(5654):92–95.
- Aurenche, P., Gelis, F., and Zaraket, H. (2000). Landau-Pomeranchuk-Migdal effect in thermal field theory. *Physical Review D*, 62(9):096012.
- Averbeck, N. B., Ringel, O., Herrlitz, M., Jakob, B., Durante, M., and Taucher-Scholz, G. (2014). DNA end resection is needed for the repair of complex lesions in G1-phase human cells. *Cell Cycle*, 13(16):2509–2516.
- Barendsen, G., Koot, C., Van Kersen, G., Bewley, D., Field, S., and Parnell, C. (1966). The effect of oxygen on impairment of the proliferative capacity of human cells in culture by ionizing radiations of different let. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, 10(4):317–327.

- Begg, A. and Steel, G. G. (2002). Cell proliferation and growth rate of tumours. In *Basic clinical radiobiology*, pages 11–12. Arnold, London.
- Belyaev, I. Y. (2010). Radiation-induced DNA repair foci: spatio-temporal aspects of formation, application for assessment of radiosensitivity and biological dosimetry. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 704(1-3):132–141.
- Berg, JM, T. J. and Stryer, L. (2002). DNA replication, recombination and repair: Biochemistry.
- Bertolet, A., Baratto-Roldán, A., Barbieri, S., Baiocco, G., Carabe, A., and Cortés-Giraldo, M. (2019). Dose-averaged LET calculation for proton track segments using microdosimetric Monte Carlo simulations. *Medical physics*, 46(9):4184–4192.
- Biernacka, A., Skrzypczak, M., Zhu, Y., Pasero, P., Rowicka, M., and Ginalski, K. (2021). High-resolution, ultrasensitive and quantitative DNA double-strand break labeling in eukaryotic cells using i-bless. *Nature protocols*, 16(2):1034–1061.
- Biernacka, A., Zhu, Y., Skrzypczak, M., Forey, R., Pardo, B., Grzelak, M., Nde, J., Mitra, A., Kudlicki, A., Crosetto, N., et al. (2018). i-BLESS is an ultra-sensitive method for detection of DNA double-strand breaks. *Communications biology*, 1(1):181.
- Blackford, A. N. and Jackson, S. P. (2017). ATM, ATR, and DNA-PK: The trinity at the heart of the DNA damage response. *Molecular cell*, 66(6):801–817.
- Blomgren, A., Tartas, A., Meher, P. K., Silverstein, S., Wojcik, A., and Brzozowska, B. (2023). Home-made low-cost dosimeter for photon dose measurements in radiobiological experiments and for education in the field of radiation sciences. *wysłany manuskrypt*.
- Boag, J. (1987). Ionization chambers. *The dosimetry of ionizing radiation*, 2:169–243.
- Booz, J., Ebert, H., Eickel, R., and Waker, A. (1974). Fourth symposium on microdosimetry, Verbania Pallanza, Italy, 24–28 september 1973. Technical report, Commission of the European Communities, Luxembourg.
- Bordelet, H. and Dubrana, K. (2019). Keep moving and stay in a good shape to find your homologous recombination partner. *Current genetics*, 65(1):29–39.
- Brahme, A. (2014). *Comprehensive biomedical physics*. Newnes.
- Brenner, D. J., Hlatky, L., Hahnfeldt, P., Huang, Y., and Sachs, R. (1998). The linear-quadratic model and most other common radiobiological models result in similar predictions of time-dose relationships. *Radiation research*, 150(1):83–91.
- Broszkiewicz, R. (1971). *Chemiczne metody dozymetrii promieniowania jonizujacego*.
- Brzozowska, B., Tartas, A., and Wojcik, A. (2020). Monte Carlo modeling of DNA lesions and chromosomal aberrations induced by mixed beams of alpha particles and X-rays. *Frontiers in Physics*, 8:567864.

- Bushberg, J., Seibert, J., Boone, J., and Leidholdt, E. (2012). *The Essential Physics of Medical Imaging*.
- Cann, K. L. and Dellaire, G. (2011). Heterochromatin and the DNA damage response: the need to relax. *Biochemistry and cell biology*, 89(1):45–60.
- Chang, H. H., Pannunzio, N. R., Adachi, N., and Lieber, M. R. (2017). Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nature reviews Molecular cell biology*, 18(8):495–506.
- Chatzipapas, K. P., Papadimitroulas, P., Emfietzoglou, D., Kalospyros, S. A., Hada, M., Georgakilas, A. G., and Kagadis, G. C. (2020). Ionizing radiation and complex DNA damage: quantifying the radiobiological damage using Monte Carlo simulations. *Cancers*, 12(4):799.
- Chauvie, S., Francis, Z., Guatelli, S., Incerti, S., Mascialino, B., Montarou, G., Moretto, P., Nieminen, P., and Pia, M. G. (2006). Monte Carlo simulation of interactions of radiation with biological systems at the cellular and DNA levels: the Geant4-DNA project. In *Radiation Research*, volume 166, pages 676–677.
- Chelkowski, S., Bandrauk, A. D., and Corkum, P. B. (2014). Photon momentum sharing between an electron and an ion in photoionization: From one-photon (photoelectric effect) to multiphoton absorption. *Physical Review Letters*, 113(26):263005.
- Cheng, L., Brzozowska, B., Sollazzo, A., Lundholm, L., Lisowska, H., Haghdoost, S., and Wojcik, A. (2018). Simultaneous induction of dispersed and clustered DNA lesions compromises DNA damage response in human peripheral blood lymphocytes. *PLoS One*, 13(10):e0204068.
- Cheng, L., Brzozowska-Wardecka, B., Lisowska, H., Wojcik, A., and Lundholm, L. (2019). Impact of atm and DNA-pk inhibition on gene expression and individual response of human lymphocytes to mixed beams of alpha particles and X-rays. *Cancers*, 11(12):2013.
- Cho, G., Hwang, H., Sarstedt, M., and Ringle, C. M. (2020). Cutoff criteria for overall model fit indexes in generalized structured component analysis. *Journal of marketing analytics*, 8(4):189–202.
- Chubb, J. R., Boyle, S., Perry, P., and Bickmore, W. A. (2002). Chromatin motion is constrained by association with nuclear compartments in human cells. *Current Biology*, 12(6):439–445.
- Ciccia, A. and Elledge, S. J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Molecular cell*, 40(2):179–204.
- Cullen, D. et al. (1997). Epd197 the evaluated data library, '97 version.
- Czub, J., Braziewicz, J., Wasilewski, A., Wysocka-Rabin, A., Wołowicz, P., and Wójcik, A. (2020). Monte carlo dosimetry using fluka code and experimental dosimetry with gafchromic ebt2 and xr-rv3 of self-built experimental setup for radiobiological studies with low-energy x-rays. *International Journal of Radiation Biology*, 96(6):718–733.

- Daley, J. M. and Wilson, T. E. (2005). Rejoining of DNA double-strand breaks as a function of overhang length. *Molecular and cellular biology*, 25(3):896–906.
- Demizu, Y., Kagawa, K., Ejima, Y., Nishimura, H., Sasaki, R., Soejima, T., Yanou, T., Shimizu, M., Furusawa, Y., Hishikawa, Y., et al. (2004). Cell biological basis for combination radiotherapy using heavy-ion beams and high-energy X-rays. *Radiotherapy and oncology*, 71(2):207–211.
- Denekamp, J., Fowler, J. F., and Dische, S. (1977). The proportion of hypoxic cells in a human tumor. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 2(11-12):1227–1228.
- Dertinger, H. and Jung, H. (1970). Direct and indirect action of radiation. *Molecular Radiation Biology: The Action of Ionizing Radiation on Elementary Biological Objects*, pages 70–90.
- Di Trollo, R., Di Lorenzo, G., Fumo, B., and Ascierio, P. A. (2015). Cosmic radiation and cancer: is there a link? *Future Oncology*, 11(7):1123–1135.
- Dingfelder, M. (2012). Track-structure simulations for charged particles. *Health physics*, 103(5).
- Dion, V., Kalck, V., Seeber, A., Schleker, T., and Gasser, S. M. (2013). Cohesin and the nucleolus constrain the mobility of spontaneous repair foci. *EMBO reports*, 14(11):984–991.
- Dos Santos, M., Paget, V., Ben Kacem, M., Trompier, F., Benadjaoud, M. A., François, A., Guipaud, O., Benderitter, M., and Milliat, F. (2018). Importance of dosimetry protocol for cell irradiation on a low X-rays facility and consequences for the biological response. *International journal of radiation biology*, 94(6):597–606.
- Durand, R. and Olive, P. (1976). Irradiation of multi-cell spheroids with fast neutrons versus X-rays: A qualitative difference in sub-lethal damage repair capacity or kinetics. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, 30(6):589–592.
- Edwards, A., Purrott, R., Prosser, J., and Lloyd, D. (1980). The induction of chromosome aberrations in human lymphocytes by alpha-radiation. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, 38(1):83–91.
- Ensminger, M. and Löbrich, M. (2020). One end to rule them all: Non-homologous end-joining and homologous recombination at DNA double-strand breaks. *The British journal of radiology*, 93(1115):20191054.
- Eriksson, M., Hååg, P., Brzozowska, B., Lipka, M., Lisowska, H., Lewensohn, R., Wojcik, A., Viktorsson, K., and Lundholm, L. (2018). Analysis of chromatin opening in heterochromatic non-small cell lung cancer tumor-initiating cells in relation to DNA-damaging antitumor treatment. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, 100(1):174–187.

- Esplen, N., Mendonca, M. S., and Bazalova-Carter, M. (2020). Physics and biology of ultrahigh dose-rate (flash) radiotherapy: a topical review. *Physics in Medicine & Biology*, 65(23):23TR03.
- Esposito, G., Antonelli, F., Belli, M., Campa, A., Simone, G., Sorrentino, E., and Tabocchini, M. A. (2009). An alpha-particle irradiator for radiobiological research and its implementation for bystander effect studies. *Radiation research*, 172(5):632–642.
- Falck, J., Forment, J. V., Coates, J., Mistrik, M., Lukas, J., Bartek, J., and Jackson, S. P. (2012). Cdk targeting of NBS1 promotes DNA-end resection, replication restart and homologous recombination. *EMBO reports*, 13(6):561–568.
- Falk, M., Lukasova, E., and Kozubek, S. (2010). Higher-order chromatin structure in DSB induction, repair and misrepair. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 704(1-3):88–100.
- Ferreira, B., Lopes, M., and Capela, M. (2009). Evaluation of an Epson flatbed scanner to read gafchromic EBT films for radiation dosimetry. *Physics in Medicine & Biology*, 54(4):1073.
- Francis, N. J., Kingston, R. E., and Woodcock, C. L. (2004). Chromatin compaction by a polycomb group protein complex. *Science*, 306(5701):1574–1577.
- Frenkel, D. and Smit, B. (2002). *Understanding molecular simulation: from algorithms to applications*. Academic Press San Diego.
- Friedland, W., Dingfelder, M., Kunderát, P., and Jacob, P. (2011). Track structures, DNA targets and radiation effects in the biophysical Monte Carlo simulation code partrac. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 711(1-2):28–40.
- Friedland, W., Jacob, P., Paretzke, H. G., and Stork, T. (1998). Monte Carlo simulation of the production of short DNA fragments by low-linear energy transfer radiation using higher-order DNA models. *Radiation research*, 150(2):170–182.
- Friedland, W. and Kunderat, P. (2014). The partrac code: Status and recent developments. *40th COSPAR Scientific Assembly*, 40:F2–2.
- Friedland, W., Schmitt, E., Kunderát, P., Dingfelder, M., Baiocco, G., Barbieri, S., and Ottolenghi, A. (2017). Comprehensive track-structure based evaluation of DNA damage by light ions from radiotherapy-relevant energies down to stopping. *Scientific reports*, 7(1):45161.
- Gałecki, M., Tartas, A., Szymanek, A., Sims, E., Lundholm, L., Sollazzo, A., Cheng, L., Fujishima, Y., Yoshida, M. A., Żygierewicz, J., et al. (2019). Precision of scoring radiation-induced chromosomal aberrations and micronuclei by unexperienced scorers. *International Journal of Radiation Biology*, 95(9):1251–1258.

- Garbacz, M., Cordoni, F. G., Durante, M., Gajewski, J., Kisielwicz, K., Krah, N., Kopeć, R., Olko, P., Patera, V., Rinaldi, I., et al. (2021). Study of relationship between dose, let and the risk of brain necrosis after proton therapy for skull base tumors. *Radiotherapy and Oncology*, 163:143–149.
- Geuting, V., Reul, C., and Löbrich, M. (2013). ATM release at resected double-strand breaks provides heterochromatin reconstitution to facilitate homologous recombination. *PLoS genetics*, 9(8):e1003667.
- Giridhar, P. and Rath, G. K. (2020). Clinical significance of cell survival curves. *Practical Radiation Oncology*, pages 171–175.
- Goodarzi, A. A., Jeggo, P., and Lobrich, M. (2010). The influence of heterochromatin on DNA double strand break repair: Getting the strong, silent type to relax. *DNA repair*, 9(12):1273–1282.
- Goodarzi, A. A. and Jeggo, P. A. (2013). The repair and signaling responses to DNA double-strand breaks. *Advances in genetics*, 82:1–45.
- Goodarzi, A. A., Noon, A. T., Deckbar, D., Ziv, Y., Shiloh, Y., Löbrich, M., and Jeggo, P. A. (2008). ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. *Molecular cell*, 31(2):167–177.
- Goodarzi, A. A., Noon, A. T., and Jeggo, P. A. (2009). The impact of heterochromatin on DSB repair.
- Goodhead, D., Bance, D., Stretch, A., and Wilkinson, R. (1991). A versatile plutonium-238 irradiator for radiobiological studies with α -particles. *International Journal of Radiation Biology*, 59(1):195–210.
- Goodhead, D. T. (1994). Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *International journal of radiation biology*, 65(1):7–17.
- Goodhead, D. T. (1999). Mechanisms for the biological effectiveness of high-let radiations. *Journal of radiation research*, 40(SUPPL):S1–S13.
- Görisch, S. M., Wachsmuth, M., Ittrich, C., Bacher, C. P., Rippe, K., and Lichter, P. (2004). Nuclear body movement is determined by chromatin accessibility and dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(36):13221–13226.
- Grant, G. D., Brooks 3rd, L., Zhang, X., Mahoney, J. M., Martyanov, V., Wood, T. A., Sherlock, G., Cheng, C., and Whitfield, M. L. (2013). Identification of cell cycle-regulated genes periodically expressed in U2OS cells and their regulation by FOXM1 and E2F transcription factors. *Molecular biology of the cell*, 24(23):3634–3650.
- Greubel, C., Hable, V., Drexler, G. A., Hauptner, A., Dietzel, S., Strickfaden, H., Baur, I., Krücken, R., Cremer, T., Dollinger, G., et al. (2008). Competition effect in DNA damage response. *Radiation and environmental biophysics*, 47:423–429.

- Grewal, S. I. and Jia, S. (2007). Heterochromatin revisited. *Nature Reviews Genetics*, 8(1):35–46.
- Hagiwara, Y., Niimi, A., Isono, M., Yamauchi, M., Yasuhara, T., Limsirichaikul, S., Oike, T., Sato, H., Held, K. D., Nakano, T., et al. (2017). 3D-structured illumination microscopy reveals clustered DNA double-strand break formation in widespread γ H2AX foci after high let heavy-ion particle radiation. *Oncotarget*, 8(65):109370.
- Hakem, R. (2008). DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. *The EMBO journal*, 27(4):589–605.
- Hall, E. and Giaccia, A. (2018). *Radiobiology for the Radiologist*. Wolters Kluwer.
- Higgins, P., DeLuca Jr, P., and Gould, M. (1984). Effect of pulsed dose in simultaneous and sequential irradiation of V-79 cells by 14.8-MeV neutrons and ^{60}Co photons. *Radiation research*, 99(3):591–595.
- Higgins, P., DeLuca Jr, P., Pearson, D., and Gould, M. (1983). V79 survival following simultaneous or sequential irradiation by 15-MeV neutrons and ^{60}Co photons. *Radiation research*, 95(1):45–56.
- Hotta, K. and Mizuno, H. (2023). Irradiation and therapy methods. In *Advances in Accelerators and Medical Physics*, pages 139–148. Elsevier.
- Hughes, J. R. and Parsons, J. L. (2020). FLASH radiotherapy: current knowledge and future insights using proton-beam therapy. *International journal of molecular sciences*, 21(18):6492.
- Hyun, J., Piot, P., and Sen, T. (2018). Optics and bremsstrahlung estimates for channeling radiation experiments at fast. *arXiv preprint arXiv:1802.06113*.
- IAEA, I. (2008). Relative biological effectiveness in ion beam therapy. *IAEA Tech Reports*, 461:1–165.
- Icha, J., Weber, M., Waters, J. C., and Norden, C. (2017). Phototoxicity in live fluorescence microscopy, and how to avoid it. *BioEssays*, 39(8):1700003.
- ICRP (2017). Occupational intakes of radionuclides: part 3. ICRP publication 137. *Ann. ICRP*, 46(3/4):1–486.
- ICRU (1970). Report 16: Linear energy transfer. 16.
- ICRU (2011). Report 85: Fundamental quantities and units for ionizing radiation.
- Illner, D. and Scherthan, H. (2013). Ionizing irradiation-induced radical stress stalls live meiotic chromosome movements by altering the actin cytoskeleton. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(40):16027–16032.

- Incerti, S., Gault, N., Habchi, C., Lefaix, J., Moretto, P., Poncy, J., Pouthier, T., and Seznec, H. (2006). A comparison of cellular irradiation techniques with alpha particles using the Geant4 Monte Carlo simulation toolkit. *Radiation Protection Dosimetry*, 122(1-4):327–329.
- Incerti, S., Ivanchenko, A., Karamitros, M., Mantero, A., Moretto, P., Tran, H., Mascialino, B., Champion, C., Ivanchenko, V., Bernal, M., et al. (2010). Comparison of Geant4 very low energy cross section models with experimental data in water. *Medical physics*, 37(9):4692–4708.
- Incerti, S., Kyriakou, I., Bernal, M., Bordage, M., Francis, Z., Guatelli, S., Ivanchenko, V., Karamitros, M., Lampe, N., Lee, S. B., et al. (2018). Geant4-dna example applications for track structure simulations in liquid water: a report from the geant4-dna project. *Medical physics*, 45(8):e722–e739.
- Ishikawa-Ankerhold, H. C., Ankerhold, R., and Drummen, G. P. (2012). Advanced fluorescence microscopy techniques—Frap, Flip, Flap, Fret and flim. *Molecules*, 17(4):4047–4132.
- Jackson, S. P. and Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461(7267):1071–1078.
- Jakl, L., Marková, E., Koláriková, L., and Belyaev, I. (2020). Biodosimetry of low dose ionizing radiation using DNA repair foci in human lymphocytes. *Genes*, 11(1):58.
- Jakob, B. and Durante, M. (2012). Radiation dose detection by imaging response in biological targets. *Radiation Research*, 177(4):524–532.
- Jakob, B., Splinter, J., Conrad, S., Voss, K.-O., Zink, D., Durante, M., Löbrich, M., and Taucher-Scholz, G. (2011). DNA double-strand breaks in heterochromatin elicit fast repair protein recruitment, histone H2AX phosphorylation and relocation to euchromatin. *Nucleic acids research*, 39(15):6489–6499.
- Jakob, B., Splinter, J., and Taucher-Scholz, G. (2009). Positional stability of damaged chromatin domains along radiation tracks in mammalian cells. *Radiation research*, 171(4):405–418.
- Janiak, M. K. and Wójcik, A. (2005). *Medycyna zagrożeń i urazów radiacyjnych*. Wydaw. Lekarskie PZWL.
- Jegou, T., Chung, I., Heuvelman, G., Wachsmuth, M., Görisch, S. M., Greulich-Bode, K. M., Boukamp, P., Lichter, P., and Rippe, K. (2009). Dynamics of telomeres and promyelocytic leukemia nuclear bodies in a telomerase-negative human cell line. *Molecular biology of the cell*, 20(7):2070–2082.
- Jilani, A., Ramotar, D., Slack, C., Ong, C., Yang, X. M., Scherer, S. W., and Lasko, D. D. (1999). Molecular cloning of the human gene, PNKP, encoding a polynucleotide kinase 3-phosphatase and evidence for its role in repair of DNA strand breaks caused by oxidative damage. *Journal of Biological Chemistry*, 274(34):24176–24186.

- K. Sachs, P. H. and DJ Brenner, R. (1997). Review the link between low-let dose-response relations and the underlying kinetics of damage production/repair/misrepair. *International journal of radiation biology*, 72(4):351–374.
- Kellerer, A. M. and Rossi, H. H. (1974). The theory of dual radiation action. *Current Topics in Radiation Research Quarterly*, pages 85–158.
- Krajewski, P. (2009). Biologiczne skutki promieniowania jonizującego.
- Kuo, L. J. and Yang, L.-X. (2008). γ -H2AX-a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In vivo*, 22(3):305–309.
- Kyriakou, I., Sakata, D., Tran, H. N., Perrot, Y., Shin, W.-G., Lampe, N., Zein, S., Bordage, M. C., Guatelli, S., Villagrasa, C., et al. (2021). Review of the Geant4-DNA simulation toolkit for radiobiological applications at the cellular and DNA level. *Cancers*, 14(1):35.
- Leatherbarrow, E. L., Harper, J. V., Cucinotta, F. A., and O’Neill, P. (2006). Induction and quantification of γ -H2AX foci following low and high let-irradiation. *International journal of radiation biology*, 82(2):111–118.
- Lewis, D. and Devic, S. (2015). Correcting scan-to-scan response variability for a radiochromic film-based reference dosimetry system. *Medical physics*, 42(10):5692–5701.
- Lieber, M. R. (2010). The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annual review of biochemistry*, 79:181–211.
- Little, J. B. (2000). Radiation carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 21(3):397–404.
- Liu, C., Vyas, A., Kassab, M. A., Singh, A. K., and Yu, X. (2017). The role of poly ADP-ribosylation in the first wave of DNA damage response. *Nucleic acids research*, 45(14):8129–8141.
- Löbrich, M. and Jeggo, P. (2017). A process of resection-dependent nonhomologous end joining involving the goddess artemis. *Trends in biochemical sciences*, 42(9):690–701.
- Lomax, M., Folkes, L., and O’neill, P. (2013). Biological consequences of radiation-induced DNA damage: relevance to radiotherapy. *Clinical oncology*, 25(10):578–585.
- Lorat, Y., Brunner, C. U., Schanz, S., Jakob, B., Taucher-Scholz, G., and Rübe, C. E. (2015). Nanoscale analysis of clustered DNA damage after high-LET irradiation by quantitative electron microscopy—the heavy burden to repair. *DNA repair*, 28:93–106.
- Lorat, Y., Timm, S., Jakob, B., Taucher-Scholz, G., and Rübe, C. E. (2016). Clustered double-strand breaks in heterochromatin perturb DNA repair after high linear energy transfer irradiation. *Radiotherapy and Oncology*, 121(1):154–161.
- Lottersberger, F., Karssemeijer, R. A., Dimitrova, N., and de Lange, T. (2015). 53BP1 and the LINC complex promote microtubule-dependent DSB mobility and DNA repair. *Cell*, 163(4):880–893.

- Lukas, C., Falck, J., Bartkova, J., Bartek, J., and Lukas, J. (2003). Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by DNA damage. *Nature cell biology*, 5(3):255–260.
- Lukas, J., Lukas, C., and Bartek, J. (2011). More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. *Nature cell biology*, 13(10):1161–1169.
- Mahaney, B. L., Meek, K., and Lees-Miller, S. P. (2009). Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochemical Journal*, 417(3):639–650.
- Malain, D. and Kanchana, P. (2019). Evaluation of radiation safety for ionization chamber smoke detectors containing Am-241. In *Journal of Physics: Conference Series*, volume 1285, page 012047. IOP Publishing.
- Malouff, T. D., Seneviratne, D. S., Ebner, D. K., Stross, W. C., Waddle, M. R., Trifiletti, D. M., and Krishnan, S. (2021). Boron neutron capture therapy: a review of clinical applications. *Frontiers in oncology*, 11:351.
- Mavragani, I. V., Nikitaki, Z., Souli, M. P., Aziz, A., Newsheen, S., Aziz, K., Rogakou, E., and Georgakilas, A. G. (2017). Complex DNA damage: a route to radiation-induced genomic instability and carcinogenesis. *Cancers*, 9(7):91.
- Maynard, S., Fang, E. F., Scheibye-Knudsen, M., Croteau, D. L., and Bohr, V. A. (2015). DNA damage, DNA repair, aging, and neurodegeneration. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 5(10).
- Mc Laughlin, J. (2015). Some characteristics and effects of natural radiation. *Radiation protection dosimetry*, 167(1-3):2–7.
- McNally, N. J., de Ronde, J., and Hinchliffe, M. (1984). The effect of sequential irradiation with X-rays and fast neutrons on the survival of V79 chinese hamster cells. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, 45(4):301–310.
- Mearini, G. and Fackelmayer, F. O. (2006). Local chromatin mobility is independent of transcriptional activity. *Cell Cycle*, 5(17):1989–1995.
- Melo, J. and Toczyski, D. (2002). A unified view of the DNA-damage checkpoint. *Current opinion in cell biology*, 14(2):237–245.
- Mendes, F., Barros, M., Vale, A., and Gonçalves, B. (2022). Radioactive hot-spot localisation and identification using deep learning. *Journal of Radiological Protection*, 42(1):011516.
- Mok, M. T., Cheng, A. S., and Henderson, B. R. (2014). The ubiquitin ligases RNF8 and RNF168 display rapid but distinct dynamics at DNA repair foci in living cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 57:27–34.

-
- Molinaro, C., Martoriati, A., and Cailliau, K. (2021). Proteins from the DNA damage response: Regulation, dysfunction, and anticancer strategies. *Cancers*, 13(15):3819.
- Motz, J., Olsen, H. A., and Koch, H. (1969). Pair production by photons. *Reviews of Modern Physics*, 41(4):581.
- Mozumder, A. and Hatano, Y. (2003). *Charged particle and photon interactions with matter: chemical, physicochemical, and biological consequences with applications*. CRC press.
- Natale, F., Rapp, A., Yu, W., Maiser, A., Harz, H., Scholl, A., Grulich, S., Anton, T., Hörl, D., Chen, W., et al. (2017). Identification of the elementary structural units of the DNA damage response. *Nature communications*, 8(1):15760.
- Neti, P. V. S. V., de Toledo, S. M., Perumal, V., Azzam, E. I., and Howell, R. W. (2004). A multi-port low-fluence alpha-particle irradiator: fabrication, testing and benchmark radiobiological studies. *Radiation research*, 161(6):732–738.
- Ngo, F. Q., Blakely, E. A., and Tobias, C. A. (1981). Sequential exposures of mammalian cells to low- and high-LET radiations: I. lethal effects following X-ray and neon-ion irradiation. *Radiation Research*, 87(1):59–78.
- Niforou, K. N., Anagnostopoulos, A. K., Vougas, K., Kittas, C., Gorgoulis, V. G., and Tsangaris, G. T. (2008). The proteome profile of the human osteosarcoma U2OS cell line. *Cancer genomics & proteomics*, 5(1):63–77.
- Nikitaki, Z., Velalopoulou, A., Zanni, V., Tremi, I., Havaki, S., Kokkoris, M., Gorgoulis, V. G., Koumenis, C., and Georgakilas, A. G. (2022). Key biological mechanisms involved in high-LET radiation therapies with a focus on DNA damage and repair. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 24:e15.
- Nikjoo, H. and Liamsuwan, T. (2014). Biophysical basis of ionizing radiation. *Comprehensive biomedical physics*, pages 65–104.
- Nikjoo, H., O’neill, P., Terrissol, M., and Goodhead, D. (1999). Quantitative modelling of DNA damage using Monte Carlo track structure method. *Radiation and environmental biophysics*, 38(1):31–38.
- Nikjoo, H., Taleei, R., Liamsuwan, T., Liljequist, D., and Emfietzoglou, D. (2016). Perspectives in radiation biophysics: from radiation track structure simulation to mechanistic models of DNA damage and repair. *Radiation Physics and Chemistry*, 128:3–10.
- Nikjoo, H., Uehara, S., Emfietzoglou, D., and Cucinotta, F. (2006). Track-structure codes in radiation research. *Radiation Measurements*, 41(9-10):1052–1074.
- Nilsson, B. and Brahme, A. (2014). Interaction of ionizing radiation with matter.

- Obe, G., Pfeiffer, P., Savage, J., Johannes, C., Goedecke, W., Jeppesen, P., Natarajan, A., Martinez-López, W., Folle, G., and Drets, M. (2002). Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 504(1-2):17–36.
- O’Driscoll, M. and Jeggo, P. A. (2006). The role of double-strand break repair—insights from human genetics. *Nature Reviews Genetics*, 7(1):45–54.
- Ohuchi, H. (2007). High sensitivity radiochromic film dosimetry using an optical common-mode rejection and a reflective-mode flatbed color scanner. *Medical Physics*, 34(11):4207–4212.
- Osborne, J. C., Miller, J. H., and Kempner, E. (2000). Molecular mass and volume in radiation target theory. *Biophysical Journal*, 78(4):1698–1702.
- PAA (2023). Raport roczny: Działalność Prezesa Państwowej Agencji Atomistyki oraz ocena stanu bezpieczeństwa jądrowego i ochrony radiologicznej w Polsce w 2022 roku.
- Paganetti, H. (2014). Relative biological effectiveness (RBE) values for proton beam therapy. variations as a function of biological endpoint, dose, and linear energy transfer. *Physics in Medicine & Biology*, 59(22):R419.
- Perez, R. L., Best, G., Nicolay, N. H., Greubel, C., Rossberger, S., Reindl, J., Dollinger, G., Weber, K.-J., Cremer, C., and Huber, P. E. (2016). Superresolution light microscopy shows nanostructure of carbon ion radiation-induced DNA double-strand break repair foci. *The FASEB Journal*, 30(8):2767–2776.
- Płodowska, M., Krakowiak, W., Węgierek-Ciuk, A., Lankoff, A., Szary, K., Lis, K., Wojcik, A., and Lisowska, H. (2022). Hypothermia differentially modulates the formation and decay of NBS1, γ H2AX and 53BP1 foci in U2OS cells exposed to gamma radiation. *Scientific Reports*, 12(1):5878.
- Płodowska, M., Lopez-Riego, M., Akuwudike, P., Sobota, D., Filipek, M., Kłosowski, M., Kaźmierczak, U., Brzozowska, B., Baliga, A., Lisowska, H., et al. (2021). Small is beautiful: low activity alpha and gamma sources for small-scale radiation protection research experiments. *International Journal of Radiation Biology*, 97(4):541–552.
- Podgoršak, E. B. et al. (2006). *Radiation physics for medical physicists*, volume 1. Springer.
- Railton, R., Lawson, R., and Porter, D. (1975). Interaction of γ -ray and neutron effects on the proliferative capacity of chinese hamster cells. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, 27(1):75–82.
- Reindl, J., Drexler, G. A., Girst, S., Greubel, C., Siebenwirth, C., Drexler, S. E., Dollinger, G., and Friedl, A. A. (2015). Nanoscopic exclusion between Rad51 and 53BP1 after ion irradiation in human HeLa cells. *Physical biology*, 12(6):066005.

-
- Remington, S. J. (2011). Green fluorescent protein: a perspective. *Protein Science*, 20(9):1509–1519.
- Riballo, E., Kühne, M., Rief, N., Doherty, A., Smith, G. C., Recio, M.-J., Reis, C., Dahm, K., Fricke, A., Krempler, A., et al. (2004). A pathway of double-strand break rejoining dependent upon atm, artemis, and proteins locating to γ -H2AX foci. *Molecular cell*, 16(5):715–724.
- Rogakou, E. P., Boon, C., Redon, C., and Bonner, W. M. (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *The Journal of cell biology*, 146(5):905–916.
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., and Bonner, W. M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *Journal of biological chemistry*, 273(10):5858–5868.
- Roobol, S. J., Van Den Bent, I., Van Cappellen, W. A., Abraham, T. E., Paul, M. W., Kanaar, R., Houtsmuller, A. B., van Gent, D. C., and Essers, J. (2020). Comparison of high- and low-LET radiation-induced DNA double-strand break processing in living cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18):6602.
- Roos, H. and Kellerer, A. M. (1989). Design criteria and performance parameters of an alpha irradiation device for cell studies. *Physics in Medicine & Biology*, 34(12):1823.
- Roots, R. and Okada, S. (1975). Estimation of life times and diffusion distances of radicals involved in X-ray-induced DNA strand breaks or killing of mammalian cells. *Radiation research*, 64(2):306–320.
- Rossi, H. H. (1960). Spatial distribution of energy deposition by ionizing radiation. *Radiation Research Supplement*, 2:290–299.
- Rothkamm, K., Barnard, S., Moquet, J., Ellender, M., Rana, Z., and Burdak-Rothkamm, S. (2015). DNA damage foci: Meaning and significance. *Environmental and molecular mutagenesis*, 56(6):491–504.
- Rucinski, A., Biernacka, A., and Schulte, R. (2021). Applications of nanodosimetry in particle therapy planning and beyond. *Physics in Medicine & Biology*, 66(24):24TR01.
- Sadasivan, S. and Mishra, U. (1986). Radioactive fallout swipe samples from Chernobyl. *Nature (London)*, 324(6092):23–24.
- Schafer, K. (1998). The cell cycle: a review. *Veterinary pathology*, 35(6):461–478.
- Scherthan, H. and Adelfalk, C. (2011). Live cell imaging of meiotic chromosome dynamics in yeast. *DNA Recombination: Methods and Protocols*, pages 537–548.
- Scherthan, H., Lee, J.-H., Maus, E., Schumann, S., Muhtadi, R., Chojowski, R., Port, M., Lassmann, M., Bestvater, F., and Hausmann, M. (2019). Nanostructure of clustered DNA damage in leukocytes after in-solution irradiation with the alpha emitter Ra-223. *Cancers*, 11(12):1877.

- Seeber, A., Hauer, M. H., and Gasser, S. M. (2018). Chromosome dynamics in response to DNA damage. *Annual review of genetics*, 52:295–319.
- Seltzer, S., Bartlett, D., Burns, D., Dietze, G., Menzel, H.-G., Paretzke, H., and Wambersie, A. (2011). Fundamental quantities and units for ionizing radiation. *ICRU Journal*, 11(1):1.
- Sharma, S., Cabana, R., Shariatmadar, S., and Krishan, A. (2008). Cellular volume and marker expression in human peripheral blood apheresis stem cells. *Cytometry Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 73(2):160–167.
- Sisario, D., Memmel, S., Doose, S., Neubauer, J., Zimmermann, H., Flentje, M., Djuzenova, C. S., Sauer, M., and Sukhorukov, V. L. (2018). Nanostructure of DNA repair foci revealed by superresolution microscopy. *The FASEB Journal*, 32(12):6469–6477.
- Skrzypczak, E. and Szepliński, Z. (2012). *Wstęp do fizyki jądra atomowego i cząstek elementarnych*. Wydanie II. Uniwersytet Warszawski. Wydział Fizyki.
- Smith, E. A., Winterhalter, C., Underwood, T. S., Aitkenhead, A. H., Richardson, J. C., Merchant, M. J., Kirkby, N. F., Kirby, K. J., and Mackay, R. I. (2021). A Monte Carlo study of different let definitions and calculation parameters for proton beam therapy. *Biomedical Physics & Engineering Express*, 8(1):015024.
- Smith, M. J., Bryant, E. E., Joseph, F. J., and Rothstein, R. (2019). DNA damage triggers increased mobility of chromosomes in G1-phase cells. *Molecular biology of the cell*, 30(21):2620–2625.
- Sollazzo, A., Brzozowska, B., Cheng, L., Lundholm, L., Haghdoost, S., Scherthan, H., and Wojcik, A. (2017). Alpha particles and X-rays interact in inducing DNA damage in U2OS cells. *Radiation Research*, 188(4):400–411.
- Sollazzo, A., Brzozowska, B., Cheng, L., Lundholm, L., Scherthan, H., and Wojcik, A. (2018). Live dynamics of 53BP1 foci following simultaneous induction of clustered and dispersed DNA damage in U2OS cells. *International journal of molecular sciences*, 19(2):519.
- Sollazzo, A., Shakeri-Manesh, S., Fotouhi, A., Czub, J., Haghdoost, S., and Wojcik, A. (2016). Interaction of low and high let radiation in tk6 cells—mechanistic aspects and significance for radiation protection. *Journal of Radiological Protection*, 36(4):721.
- Sommer, S., Buraczewska, I., and Kruszewski, M. (2020). Micronucleus assay: The state of art, and future directions. *International journal of molecular sciences*, 21(4):1534.
- Song, H., Senthamizhchelvan, S., Hobbs, R. F., and Sgouros, G. (2012). Alpha particle emitter radiolabeled antibody for metastatic cancer: what can we learn from heavy ion beam radiobiology? *Antibodies*, 1(2):124–148.
- Soutoglou, E. and Misteli, T. (2007). Mobility and immobility of chromatin in transcription and genome stability. *Current opinion in genetics & development*, 17(5):435–442.

- Staaf, E., Brehwens, K., Haghdoost, S., Czub, J., and Wojcik, A. (2012a). Gamma-H2AX foci in cells exposed to a mixed beam of X-rays and alpha particles. *Genome integrity*, 3(1):1–13.
- Staaf, E., Brehwens, K., Haghdoost, S., Nievaart, S., Pachnerova-Brabcova, K., Czub, J., Braziewicz, J., and Wojcik, A. (2012b). Micronuclei in human peripheral blood lymphocytes exposed to mixed beams of X-rays and alpha particles. *Radiation and environmental biophysics*, 51:283–293.
- Staaf, E., Brehwens, K., Haghdoost, S., Pachnerová-Brabcová, K., Czub, J., Braziewicz, J., Nievaart, S., and Wojcik, A. (2012c). Characterisation of a setup for mixed beam exposures of cells to 241Am alpha particles and X-rays. *Radiation protection dosimetry*, 151(3):570–579.
- Staaf, E., Deperas-Kaminska, M., Brehwens, K., Haghdoost, S., Czub, J., and Wojcik, A. (2013). Complex aberrations in lymphocytes exposed to mixed beams of 241Am alpha particles and X-rays. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 756(1-2):95–100.
- Stevens, M., Turner, J., Hugtenburg, R., and Butler, P. (1996). High-resolution dosimetry using radiochromic film and a document scanner. *Physics in Medicine & Biology*, 41(11):2357.
- Stracker, T. H. and Petrini, J. H. (2011). The MRE11 complex: starting from the ends. *Nature reviews Molecular cell biology*, 12(2):90–103.
- Streffer, C. and Müller, W.-U. (1987). Dose-effect relationships and general mechanisms of combined exposures. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, 51(6):961–969.
- Strzałkowski, A. (1979). *Wstęp do fizyki jądra atomowego*. Państwowe Wydaw. Naukowe.
- Suzuki, S. (1993). Survival of chinese hamster V79 cells after irradiation with a mixture of neutrons and 60Co γ rays: Experimental and theoretical analysis of mixed irradiation. *Radiation research*, 133(3):327–333.
- Svetličič, M., Bomhard, A., Sterr, C., Brückner, F., Płodowska, M., Lisowska, H., and Lundholm, L. (2020). Alpha radiation as a way to target heterochromatic and gamma radiation-exposed breast cancer cells. *Cells*, 9(5):1165.
- Szeffiński, Z., Filipek, M., Gotlib, J., and Kaźmierczak, U. (2020). Radiobiological research and dosimetry using a flat alpha source. In *RAP conference proceedings*, <https://doi.org/10.37392>, volume 37392.
- Takahashi, A. and Ohnishi, T. (2005). Does γ H2AX foci formation depend on the presence of DNA double strand breaks? *Cancer letters*, 229(2):171–179.

- Tartas, A., Filipek, M., Pietrzak, M., Wojcik, A., and Brzozowska, B. (2023a). Modeling of dose and linear energy transfer homogeneity in cell nuclei exposed to alpha particles under various setup conditions. *International Journal of Radiation Biology*, pages 1–9.
- Tartas, A., Lundholm, L., Scherthan, H., Wojcik, A., and Brzozowska, B. (2023b). The order of sequential exposure of U2OS cells to gamma and alpha radiation influences the formation and decay dynamics of NBS1 foci. *Plos one*, 18(6):e0286902.
- Taylor, J. R. (2011). Wstęp do analizy błęd pomiarowego.
- Timm, S., Lorat, Y., Jakob, B., Taucher-Scholz, G., and Rübe, C. E. (2018). Clustered DNA damage concentrated in particle trajectories causes persistent large-scale rearrangements in chromatin architecture. *Radiotherapy and Oncology*, 129(3):600–610.
- Tollefsen, T., Cinelli, G., Bossew, P., Gruber, V., and De Cort, M. (2014). From the european indoor radon map towards an atlas of natural radiation. *Radiation protection dosimetry*, 162(1-2):129–134.
- Toma-Dasu, I., Wojcik, A., and Lindblom, E. K. (2017). Risk of second cancer following radiotherapy. *Physica Medica*, 42:211–212.
- Toulany, M. (2019). Targeting DNA double-strand break repair pathways to improve radiotherapy response. *Genes*, 10(1):25.
- Tucker, J., Ramsey, M., Lee, D., and Minkler, J. (1993). Validation of chromosome painting as a biodosimeter in human peripheral lymphocytes following acute exposure to ionizing radiation in vitro. *International Journal of Radiation Biology*, 64(1):27–37.
- Venkatesh, S. and Workman, J. L. (2015). Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. *Nature reviews Molecular cell biology*, 16(3):178–189.
- Wade, D. M. and Drake, D. J. (2019). A brief review of modern uses of scattering techniques. *Georgia Journal of Science*, 77(2):7.
- Williams, M. and Metcalfe, P. (2011). Radiochromic film dosimetry and its applications in radiotherapy. In *AIP Conference Proceedings*, volume 1345, pages 75–99. American Institute of Physics.
- Williams, R. S., Williams, J. S., and Tainer, J. A. (2007). Mre11–Rad50–NBS1 is a keystone complex connecting DNA repair machinery, double-strand break signaling, and the chromatin template. *Biochemistry and cell biology*, 85(4):509–520.
- Wilson, W. and Paretzke, H. (1981). Calculation of distributions for energy imparted and ionization by fast protons in nanometer sites. *Radiation Research*, 87(3):521–537.
- Wojcik, A. and Harms-Ringdahl, M. (2019). Radiation protection biology then and now. *International journal of radiation biology*, 95(7):841–850.

-
- Wojcik, A., Oestreicher, U., Barrios, L., Vral, A., Terzoudi, G., Ainsbury, E., Rothkamm, K., Trompier, F., and Kulka, U. (2017). The RENEB operational basis: complement of established biodosimetric assays. *International journal of radiation biology*, 93(1):15–19.
- Workman, R., Burkert, V., Crede, V., Klempt, E., Thoma, U., Tiator, L., Agashe, K., Aielli, G., Allanach, B., et al. (2022). Review of particle physics. *Progress of theoretical and experimental physics*, 2022(8):083C01.
- Wright, W. D., Shah, S. S., and Heyer, W.-D. (2018). Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. *Journal of Biological Chemistry*, 293(27):10524–10535.
- Yao, W.-M. et al. (2006). Review of particle physics. *Journal of Physics G: Nuclear and Particle Physics*, 33(1):1.
- Zeman, E. M., Schreiber, E. C., and Tepper, J. E. (2020). Basics of radiation therapy. In *Abeloff’s Clinical Oncology*, pages 431–460. Elsevier.
- Zhang, Y., Zhou, J., and Lim, C. U. (2006). The role of NBS1 in DNA double-strand break repair, telomere stability, and cell cycle checkpoint control. *Cell research*, 16(1):45–54.
- Zhou, G., Bennett, P. V., Cutter, N. C., and Sutherland, B. M. (2006). Proton-HZE-particle sequential dual-beam exposures increase anchorage-independent growth frequencies in primary human fibroblasts. *Radiation research*, 166(3):488–494.
- Ziegler, J. F., Ziegler, M. D., and Biersack, J. P. (2010). Srim—the stopping and range of ions in matter (2010). *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 268(11-12):1818–1823.

Dodatek A

Protokół laboratoryjny hodowli komórek U2OS

Przygotowanie pożywki do hodowli

Pożywka do hodowli komórkowej stanowi podstawowe środowisko wzrostowe hodowanych komórek, które zastępuje im środowisko naturalnego występowania i rozwoju. Pożywka powinna być bogata w substancje odżywcze takie jak cukry, aminokwasy, witaminy i minerały. Skład pożywki powinien zachować odpowiednie pH i osmolalność. Każda linia komórkowa ma dobrane odpowiednie medium hodowlane.

W przypadku komórek U2OS pożywkę komórkową stanowi roztwór zmodyfikowanej pożywki DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Sigma-Aldrich, D6046, Sztokholm, Szwecja) suplementowany 10% płodowej surowicy bydlęcej (Thermo Scientific, nr kat. SH30072.3, Sztokholm, Szwecja) zapewniającej odpowiedni wzrost komórek oraz 1% antybiotyku (roztwór penicyliny-streptomycyny) warunkującego silniejszą ochronę komórek przed kontaminacją grzybową lub bakteryjną.

Pasażowanie komórek

Komórki U2OS były hodowane w butelce o pojemności 75 ml. Czynności związane z pasażowaniem komórek były wykonywane raz na dwa dni. Poszczególne kroki wykonywania pasażu komórek zostały przedstawione poniżej. Wszystkie czynności z wyjątkiem obserwowania komórek pod mikroskopem oraz inkubowania komórek muszą być wykonywane w środowisku czystym pod komorą laminarną.

1. Pierwszym krokiem jest usunięcie z butelki starej pożywki wzrostowej, a następnie przepłukanie dna butelki 10 ml soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (ang. Phosphate Buffered Saline, PBS). Po przepłukaniu należy wylać płyn z butelki.
2. Następnie należy dodać 1 ml trypsyny, która jest enzymem trawiennym umożliwiającym komórkom odklejenie się od dna butelki.
3. Komórki, do których została dodana trypsyna należy inkubować przez 10 min w temperaturze 37°C, aby mogły oderwać się od ściany butelki. Podczas ostatnich 2 min

inkubowania należy obserwować komórki pod mikroskopem, aby mieć pewność, że czas trypsynizacji oraz ilość trypsyny są dla nich odpowiednie.

4. Po oderwaniu komórek od ścianki należy zawiesić je w pożywce hodowlanej dodając 9 ml roztworu DMEM.
5. Aby móc policzyć komórki, które znajdują się w butelce należy pobrać próbkę zawieszonych komórek (0,5-1 ml) do probówki Eppendorfa i użyć automatycznego licznika komórkowego.
6. W zależności od otrzymanej liczby należy zachować 1-2 ml komórek w oryginalnej butelce hodowlanej (aby podzielić je w proporcji 1:10 lub 1:5). Na koniec należy dodać 8-9 ml pożywki, aby uzyskać całkowitą objętość 10 ml.

Dodatek B

Dostęp do danych eksperymentalnych

Dane eksperymentalne zostały umieszczone w bazie danych EMBL's European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) i są dostępne na stronie internetowej <https://www.ebi.ac.uk/biostudies/bioimages/studies/S-BIAD679>.

Przykładowy film demonstrujący kinetykę powstawania i zanikania ognisk naprawczych powstających po zastosowaniu sekwencyjnych wiązek mieszanych jest dostępny pod linkiem: <https://github.com/anna-irda/nbs1/wiki>.

Dodatek C

Materiały uzupełniające

Tabela C.1: Parametry dopasowania rozkładu Gaussa do histogramów rozmiaru ognisk naprawczych w dwóch przedziałach czasowych: 0-99 min i 100-300 min. Statystycznie istotne różnice oznaczono * przy wartości p .

Rodzaj promieniowania	0-99 min [μm^2]	100-300 min [μm^2]	Wartość p
α	$0,513 \pm 0,045$	$0,32 \pm 0,11$	$<0,0001^*$
γ	$0,219 \pm 0,035$	$0,210 \pm 0,043$	0,07
$\alpha \rightarrow \gamma$	$0,348 \pm 0,052$	$0,60 \pm 0,14$	$<0,0001^*$
$\gamma \rightarrow \alpha$	$0,220 \pm 0,025$	$0,262 \pm 0,086$	$<0,0001^*$

Tabela C.2: Wartości współczynników nachylenia prostych dopasowania funkcji liniowej do pierwszych 120 minut przebiegu intensywności ognisk naprawczych w czasie.

Rodzaj promieniowania	$a \pm u_a$ (10^{-4})
α	7 ± 10
γ	$4,3 \pm 8,4$
$\alpha \rightarrow \gamma$	9 ± 12
$\gamma \rightarrow \alpha$	5 ± 15

Tabela C.3: Wartości poziomu istotności (wartości p) różnicy między średnią intensywnością obserwowaną w dwóch próbkach napromienionych komórek. Oznaczenie * wskazuje na różnicę znaczącą statystycznie.

Rodzaj promieniowania	α	γ	$\alpha \rightarrow \gamma$	$\gamma \rightarrow \alpha$
α	—	0,0244*	0,1620	0,2255
γ	0,0244*	—	0,0005*	0,6560
$\alpha \rightarrow \gamma$	0,1620	0,0005*	—	0,0234*
$\gamma \rightarrow \alpha$	0,2255	0,6560	0,0234	—

Tabela C.4: Parametry dopasowania wielomianu do danych średniej wielkości ogniska naprawczego w czasie.

Rodzaj promienio- wania	a_0	a_1	a_2 (10^{-5})	a_3 (10^{-6})	a_4 (10^{-8})	a_5 (10^{-10})	a_6 (10^{-12})	a_7 (10^{-15})	a_8 (10^{-18})
α	-0,00426	5,46	2,5	8,162	8,449	-4,078	9,421	-8,42	
γ	0,2507	0,039	-168,6	32,1	-32,9	19,46	-6,671	12,31	-9,46
$\alpha \rightarrow \gamma$	-0,2449	0,09483	-314,5	48,59	-39,56	17,79	-4,245	4,53	-1,065
$\gamma \rightarrow \alpha$	-0,7916	0,1271	-464,1	83,49	-83,16	48,03	-15,98	28,41	-20,88