Rozprawa doktorska

Konstrukcja i wykorzystanie mikrowiązki promieniowania X do badań radiobiologicznych na poziomie komórkowym

Sebastian Bożek

Rozprawa doktorska została wykonana w Instytucie Fizyki Jądrowej im. Henryka Niewodniczańskiego Polskiej Akademii Nauk, w Zakładzie Spektroskopii Stosowanej (NZ52) pod kierownictwem prof. dr hab. Wojciecha M. Kwiatka

Praca finansowana ze środków MNiSW, grant nr NN 518 295 540

Kraków 2012

Składam serdeczne podziękowania mojemu Promotorowi Panu prof. dr hab. Wojciechowi Kwiatkowi za cenne wskazówki oraz pomoc w trakcie realizacji niniejszej pracy. Pragnę również podziękować Kierownik Oddziału Zastosowań Fizyki i Badań Interdyscyplinarnych IFJ PAN Pani prof. dr hab. Urszuli Woźnickiej, Kierownik Zakładu Farmakokinetyki i Farmacji Fizycznej CM UJ Pani prof. dr hab. Joannie Szymurze-Oleksiak oraz Dziekanowi Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej CM UJ Panu prof. dr hab. Janowi Krzekowi za cenne wsparcie organizacyjne.

Bardzo dziękuję dr Jakubowi Bieleckiemu, z którym przez kilka lat miałem przyjemność pracować przy budowie układu mikrowiązki rentgenowskiej, za dużą pomoc w realizacji technicznej części mojej pracy, a przede wszystkim za uczynność, poczucie humoru i podnoszący na duchu optymizm.

Dziękuję dr Annie Wiecheć za wprowadzenie mnie w tajniki pracowni biologicznej, cenne wskazówki oraz pomoc w trakcie wykonywania eksperymentów. Dziękuję także dr Zbigniewowi Stachurze oraz dr inż. Januszowi Lekkiemu za pomoc oraz cenne uwagi.

Składam serdeczne podziękowania Panu dr Wojciechowi Jawieniowi, który skierował mnie w odpowiednie miejsce, i na którego pomoc i wsparcie zawsze mogłem liczyć. Dziękuję także mgr Katarzynie Pogodzie, mgr inż. Ewelinie Lipiec, Panom Zbigniewowi Szklarzowi oraz Tomaszowi Pieprzycy, mgr Erazmowi Dutkiewiczowi, inż. Romanowi Hajdukowi, mgr inż. Henrykowi Doruchowi, mgr inż. Konradowi Tkoczowi, mgr inż. Michałowi Sienkiewiczowi oraz mgr inż. Jackowi Świerblewskiemu za pomoc w trakcie realizacji niniejszej pracy.

Dziękuję Wszystkim Pracownikom i Doktorantom Zakładu Spektroskopii Stosowanej IFJ PAN oraz Zakładu Farmakokinetyki i Farmacji Fizycznej CM UJ za bardzo miłą atmosferę pracy.

> Dziękuję całej mojej Rodzinie, w szczególności Aleksandrze oraz moim Rodzicom, nieustannie wpierającym mnie w dążeniu do celu.

Spis treści

Spis treści			3	
Spis ilustracji				5
Spis	tabel	l		9
Wyl	kaz sk	rótóv	w	. 10
Wst	ęp	•••••		. 11
1.	Pron	nieni	owanie jonizujące (PJ) - ogólna charaktetrystyka	. 12
2.	Odd	ziały	wanie PJ na poziomie atomu	. 14
2	.1.	Foto	ny	. 14
	2.1.1	l .	Zjawisko fotoelektryczne	. 14
	2.1.2	2.	Zjawisko Rayleigha	. 16
	2.1.3	3.	Zjawisko Comptona	. 16
	2.1.4	I .	Zjawisko Augera	. 17
	2.1.5	5.	Zjawisko tworzenia par	. 18
	2.1.6	5.	Reakcje fotojądrowe	. 20
2	.2.	Prot	ony i ciężkie jony	. 20
2	.3.	Neu	trony	. 22
2	.4.	Elek	trony	. 23
3.	Odd	ziały	wanie PJ na poziomie molekularnym	. 27
4.	Odd	ziały	wanie PJ na poziomie komórkowym	. 28
4	.1.	Аро	ptoza i nekroza	. 31
4	.2.	Mut	acje i nowotwory	. 32
5.	Skut	ki od	ldziaływania PJ na poziomie całego organizmu	. 34
5	.1.	Skut	tki deterministyczne	. 35
	5.1.1	l .	Zespół jelitowy	. 35
	5.1.2	2.	Zespół szpiku kostnego	. 36
5	.2.	Skut	tki stochastyczne - białaczka	. 37
6.	Radi	ofob	ia i radioentuzjazm - hipoteza liniowa i hormeza radiacyjna	. 39
7.	Bada	ania z	z dziedziny mikrodozymetrii	. 43
8.	Opis	linii	eksperymentalnej	. 45
8	.1.	Lam	ıpa rentgenowska	. 46
8	.2.	Ukła	ad ogniskujący	. 47

8.3.	Pon	niary zogniskowanej wiązki	
8	.3.1.	Przekrój poprzeczny - średnica oraz profil wiązki	
8	.3.2.	Widmo promieniowania oraz intensywność wiązki	53
8.4.	Ukł	ad pozycjonowania i podglądu próbki	
9. H	Iodowla	a komórkowa i procedury biologiczne	
9.1.	Sto	sowane odczynniki	60
9	.1.1.	DAPI	61
9	.1.2.	Jodek propidyny	61
9	.1.3.	Przeciwciała Anti-phospho-Histone γ-H2AX oraz Alexa Fluor 488	
9.2.	Me	tody analiz biochemicznych	63
9	.2.1.	Badanie przeżywalności komórek	63
9	.2.2.	Obserwacja mikrojąder	63
9	.2.3.	Obserwacja uszkodzeń DNA	65
10.	Oszac	owanie dawki	67
11.	Wynil	xi eksperymentów	78
11.1	1. E	adanie przeżywalności komórek po napromienieniu	78
11.2	2. Т	est mikrojądrowy	
11.3	3. 0	Obserwacja uszkodzeń DNA	
12.	Wnios		
Podsu	mowan	ie	94
DODA	ATEK A	A) Liniowy przekaz energii LET	96
DODA	ATEK E	 B) Prawo osłabienia wiązki (Lamberta-Beera) 	97
DODATEK C) Dawka promieniowania			
DODATEK D) Budowa komórki eukariotycznej 104			
DODATEK E) Cykl komórkowy108			
DODI			

Spis ilustracji

Rys.	1 Schemat zjawiska fotoelektrycznego
Rys.	2 Schemat powstawania promieniowania charakterystycznego15
Rys.	3 Schemat zjawiska Rayleigha16
Rys.	4 Schemat zjawiska Comptona17
Rys.	5 Schemat zjawiska Augera
Rys.	6 Schemat zjawiska tworzenia par
Rys.	7 Obszary, w których dominują poszczególne efekty oddziaływania fotonów z
	materiałem. Współczynniki σ_f , σ_c , σ_p określają odpowiednio prawdopodobieństwa na
	zajście efektów fotoelektrycznego, Comptona oraz zjawiska tworzenia się par [1, 2, 34]
Rys.	8 Schemat reakcji fotojądrowej
Rys.	9 a) Schemat jonizacji za pośrednictwem oddziaływań kulombowskich dokonywanych
	przez proton, b) penumbra
Rys.	10 Krzywa wartości LET w funkcji drogi jonu w materiale absorbenta. W pobliżu końca
	drogi jonu występuje pik Bragga. Jego położenie zależy od rodzaju cząstki oraz jej
	energii początkowej
Rys.	11 Schemat reakcji jądrowych typu "knock-out" oraz "pick-up"
Rys.	12 Widmo lampy rentgenowskiej oraz schemat powstawania promieniowania
	charakterystycznego (linie α i β serii K) [14]. Linie te wyróżniają się z tła ciągłego,
	ponieważ jednorodny materiał anody jest w zasadzie "przezroczysty" dla własnego
	promieniowania charakterystycznego. Foton charakterystyczny pochłonięty przez atom
	może zostać po chwili ponownie reemitowany
Rys.	13 Schemat jonizacji dokonywanej przez fotoelektrony oraz elektrony delta
Rys.	14 Symulacja przejścia w wodzie początkowo równoległej wiązki 25 elektronów o
•	energii 1 keV przeprowadzona przy użyciu programu Casino [16]
Rys.	15 Schemat pojedynczo i podwójnoniciowych uszkodzeń DNA powodowanych przez
2	promieniowanie jonizujące
Rys.	16 Możliwe konsekwencje nienaprawionych uszkodzeń DNA [8]
- Rys.	17 Schemat przedstawiający gruczoły oraz kosmki jelitowe [12]
Rys.	18 Hipoteza liniowa [5]
Rys.	19 Hipoteza liniowa i hormeza radiacyjna [5]
-	

- Rys. 24 Rozproszenie promieniowania rentgenowskiego na płaszczyznach krystalograficznych. Różnica dróg optycznych dla sąsiednich promieni wynosi AB + BC. AB=BC=d*sinθ, zatem 2d*sinθ = nλ, gdzie λ jest długością fali, a n liczbą naturalną. Promieniowanie rozproszone pod kątem θ jest monochromatyczne [14]......49
- Rys. 25 a) Zasada ogniskowania przy użyciu wielowarstwy opiera się na wykorzystaniu konstruktywnej interferencji promieniowania zgodnie z regułą Bragga [53, 17] b) układ zwierciadeł ogniskujących Rigaku po modyfikacjach technicznych. Widoczna przesłona zatrzymująca wiązkę bezpośrednią z Rys. 23b oraz przesłona dozująca odcinająca promieniowanie w ściśle określonym czasie [17]. Szczegóły techniczne dotyczące działania i modyfikacji układu zostały opisane w raporcie instytutowym [17].......................49

Rys.	27 a) Obraz wiązki na ekranie scyntylatora (szczegóły pomiaru w dalszej części pracy)
	oraz profil wiązki uzyskany na podstawie obrazu b) dwuwymiarowy model rozkładu
	intensywności wiązki
Rys.	. 28 a) Zmierzona intensywność wiązki w funkcji położenia krawędzi b) parametry
	aproksymacji
Rys.	29 Parametr P3 w funkcji odległości od powierzchni zwierciadeł. Wykres ilustruje profil
	wiązki
Rys.	30 a) pomiar widma przy użyciu detektora Amptek b) widmo wiązki bezpośredniej c)
	widmo zogniskowanej monochromatycznej o energii 4,5 keV [17]54
Rys.	31 a) Mikroskop z poprzecznym wewnętrznym oświetleniem. Światło doprowadzane
	jest ze źródła (firma SCHOTT) światłowodem. Widoczny joystick do automatycznej
	regulacji ostrości oraz powiększenia b) fragment wzorca do pomiaru rozdzielczości
	obserwowany w mikroskopie do pozycjonowania próbki c) elementy patternu
	obserwowane w mikrokoskopie w pracowni biologicznej55
Rys.	. 32 a) Zdjęcie nieprzesłoniętej wiązki wykonane aparatem fotograficznym umieszczonym
	we wnęce pomiarowej (ISO 100, czas ekspozycji 30 sekund). Obraz został znacznie
	rozjaśniony, gdyż w czasie pomiaru panuje całkowita ciemność. Po lewej stronie u góry
	zdjęcia scyntylatora [17] b) zdjęcie wiązki zogniskowaniej widzianej przez mikroskop
	na ekranie scyntylatora
Rys.	. 33 a) Optymalizacja układu w osi wiązki b) Profil wiązki uzyskany w trakcie
	optymalizacji
Rys.	. 34 Po optymalizacji położenia mikroskopu jego płaszczyzna ogniskowania oraz
	płaszczyzna, na której znajduje się ognisko wiązki pokrywają się [17] 57
Rys.	. 35 Ilustracja metody napromieniania pojedynczych komórek
Rys.	. 36 Szalka Petriego z wykonanym w podstawie otworem o średnicy 10 mm wypełnionym
	przez medium hodowlane
Rys.	37 Komórki wybarwione znacznikiem DAPI w eksperymencie prowadzonym w ramach
	niniejszej pracy
Rys.	38 Komórki linii MG63 wybarwione jodkiem propidyny (fot.: dr Anna Wiecheć). Jodek
	propidyny oprócz jąder komórkowych wybarwia również cytoplazmę, co umożliwia
	wizualizację całych komórek. Wyniki analiz z jodkiem propidyny zostały także opisane
	w pracy [41]

Rys.	39 Wybarwianie Alexa Fluor 488 komórek napromienionych mikrowiązką
	promieniowania X w IFJ PAN. Jasne czerwone kropeczki lokalizują miejsca wystąpienia
	podwójnych uszkodzeń DNA63
Rys.	40 Test mikrojądrowy a) komórki nieuszkodzone b) komórki z mikrojądrami (fot.: dr
	Anna Wiecheć, mgr inż. Konrad Tkocz)64
Rys.	41 Nałożenie wybarwień komórek otrzymanych przy użyciu DAPI oraz Alexa Fluor 66
Rys.	42 Profil komórki uzyskany w programie WSxM w oparciu o obraz topografii komórek
	wykonany przy pomocy mikroskopu sił atomowych (fot.: mgr Katarzyna Pogoda) 67
Rys.	43 Statystyczny profil komórki PC3 "rozpłaszczonej" na szalce Petriego 68
Rys.	44 Paraboloida przybliżająca statystyczny kształt komórki PC3 "rozpłaszczonej" na folii
	mylarowej
Rys.	45 Rura zawarta o promieniu x, długości h(x) i grubości ścianek dx, zawartą w
	paraboloidzie H(x,y)
Rys.	46 a) przekrój przez otrzymaną funkcję rozkładu intensywności wiązki71
Rys.	47 Metoda napromieniania tzw. rastrem. Okręgi symbolizują napromieniane obszary 71
Rys.	48 a) Rozkład natężenia wiązki w kolejnych krokach b) Funkcja $\Phi(x)$ - suma
	rozkładów wzdłuż kierunku ruchu wiązki c) $\Phi(x)$ w okolicy x=0
Rys.	49 Metoda jednorodnego rastra. Przy kroku wiązki równym 0.7 FWHM (rys a) uzyskuje
	się stały rozkład sumarycznej intensywności w pewnym przedziale wzdłuż kierunku
	przemieszczania wiązki73
Rys.	50 Matematyczne modele "rozpłaszczonych" komórek PC3: największej, średniej oraz
	najmniejszej75
Rys.	51 Symulacja początkowo równoległej wiązki 25 elektronów o energii 4.5 keV w
	wodzie wykonana w programie Casino [16]76
Rys.	52 Przekrój poprzeczny strefy U77
Rys.	53 Wynik testu mikrojądrowego. Ze względu na brak powtórzeń, dla szalek 1-2 przyjęto
	błąd pomiarowy uzyskany dla szalek 3-5
Rys.	54 Wzrost częstości występowania mikrojąder w napromienianym obszarze (fot.:dr
	Anna Wiecheć,
Rys.	55 Analiza wybarwionych komórek w programie Image-Pro
Rys.	56 Komórki PC3 napromieniane metodą rastra w kwadratowym obszarze [53]. Dawka
	pochłonięta wynosiła 32 Gy. Komórki zostały utrwalone 30 minut po napromienieniu. 84
Rys.	57 Zależność "dawka-efekt". Pierwszy punkt jest średnią z 14 wyników, drugi z 8, a
	trzeci z 10. Szalki inkubowane były po czasie 30 minut od napromienienia

Rys.	58 Kinetyka naprawy uszkodzeń DNA. Komórki napromienianie były dawką 32 Gy.
	Pierwszy punkt jest średnią z 6 wyników, drugi z 19, trzeci z 12, czwarty z 685
Rys.	. 59 Komórki PC3 napromieniane metodą rastra (dawka 32 Gy) utrwalone 7 godzin po
	napromienieniu. W tym czasie niektóre z komórek naprawiły już powstałe uszkodzenia
	DNA
Rys.	. 60 Ilustracja efektu przesunięcia obrazu wskutek załamania światła na granicy powietrza
	i medium hodowlanego a) obraz z bardzo cienką warstwą medium b) obraz z warstwą
	medium o grubości ok. 2 mm c) nałożenie obrazów a i b, d) wykorzystana siatka
	mikroskopowa o średnicy 3 mm
Rys.	. 61 Otwór w szalce Petriego o średnicy D i napromieniany kwadratowy obszar o boku a.
Rys.	62 Przykładowe zdjęcie komórek wykonane w mikroskopie do podglądu próbki91
Rys.	. 63 Przedruk rysunku Rys. 49
Rys.	. 64 Osłabienie wiązki w trakcie przejścia przez materiał [14]98
Rys.	. 65 Ubytek natężenia monochromatycznej wiązki o początkowym natężeniu I_0 w funkcji
	drogi przebytej w materiale [14]
Rys.	. 66 Stosunek dawki efektywnej do kermy w powietrzu [54]
Rys.	. 67 Schemat komórki zwierzęcej
Rys.	. 68 Schemat helisy DNA [6]
Rys.	. 69 Schemat budowy wewnętrznej chromosomu [6] 107
Rys.	. 70 Cykl komórkowy [6] 109

Spis tabel

Tabela 1 Wynik testu mikrojądrowego	
Tabela 2 Współczynniki wagowe promieniowania w _R [2]	
Tabela 3 Współczynniki wagowe tkanek w _T [2]	

Wykaz skrótów

IFJ PAN - Instytut Fizyki Jądrowej Polskiej Akademii Nauk

- CM UJ Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego
- DNA deoxyribonucleic acid kwas deoksyrybonukleinowy
- PJ promieniowanie jonizujące

LET - Linear Energy Transfer - liniowy przekaz energii

NK - komórki natural killers (linia limfocytów)

ARS - Acute Radiation Syndrome - choroba popromienna

- **PBS** Phosphate Buffered Saline sól fizjologiczna (odczynnik)
- PC3 Prostate Cancer [Cells] linia komórek raka prostaty
- DAPI 4', 6-diamidino-2-phenylindole barwnik fluorescencyjny
- **PFA** paraformaldehyd (odczynnik)
- TBP TATA [Box] Binding Protein
- SSB Single Strand Break pojedynczoniciowe uszkodzenie DNA
- DSB Double Strand Break podwójnoniciowe uszkodzenie DNA
- KERMA Kinetic Energy Released per Unit Mass
- MKN-7 linia komórkowa nowotworu żołądka
- AP anterio-posterior płaszczyzna czołowa ciała człowieka z przodu
- PA posterio-anterior płaszczyzna czołowa ciała człowieka z przodu
- LLAT left lateral płaszczyzna strzałkowa ciała człowieka od lewej strony
- RLAT right lateral płaszczyzna strzałkowa ciała człowieka od prawej strony
- ROT geometria napromieniania wzdłuż osi ciała człowieka
- ISO izotropowa geometria napromieniania
- **RBE** Relative Biological Effectiveness

Wstęp

Celem prezentowanej pracy doktorskiej była konstrukcja układu mikrowiązki rentgenowskiej do napromieniania *in vitro* pojedynczych żywych komórek. Niniejsza rozprawa, oprócz opisu budowy układu oraz przeprowadzonych eksperymentów, zawiera również analityczne oszacowanie dawki oraz teorię metody, która może być kompromisem pomiędzy mało dokładną metodą napromieniania całej próbki szeroką wiązką, a trudnym w praktycznej realizacji układem napromieniającym pojedyncze komórki. Tekst pracy powstawał także z myślą o naukowcach planujących w przyszłości konstrukcję podobnych stanowisk badawczych. Wydaje się zasadne, aby w pracach projektowych dotyczących budowy stanowiska mikrowiązki do badań radiobiologicznych uczestniczyli zarówno fizycy, jak i biolodzy oraz inżynierowie, dlatego zamierzeniem autora niniejszej pracy było napisanie tekstu czytelnego i zrozumiałego dla wszystkich członków przyszłych zespołów badawczych. Pierwsza część pracy, będąca teoretycznym wprowadzeniem w oparciu o literaturę z fizyki, biologii oraz medycyny, opisuje kolejno oddziaływanie promieniowania jonizującego na poziomie atomu, cząsteczki, pojedynczej komórki oraz całego organizmu. Prowadzenie badań

z dziedziny radiobiologii wymaga dogłębnego zrozumienia natury oddziaływania różnych rodzajów promieniowania jonizującego na organizm począwszy od skali atomowej. Możliwe skutki napromienienia organizmu są powszechnie znane, jednak ich mechanizm, czyli bliska sercu fizyka odpowiedź na pytanie "dlaczego tak się właśnie dzieje" już nie zawsze.

Pierwsze eksperymenty radiobiologiczne przeprowadzone na skonstruowanym układzie potwierdzają dotychczasowe wyniki podobnych badań, m.in. liniową zależność pomiędzy dawką a liczbą podwójnych uszkodzeń DNA w napromienianych komórkach jak również kilkugodzinny czas potrzebny na ich naprawę. W rozdziałach opisujących wyniki oraz wnioski zostały przedstawione możliwości dalszej optymalizacji układu oraz prowadzonych na nim eksperymentów.

CZĘŚĆ 1 - PODSTAWY TEORETYCZNE

1. Promieniowanie jonizujące (PJ) - ogólna charaktetrystyka

Promieniowanie jonizujące (PJ) to fotony lub cząstki naładowane zdolne do jonizowania atomów, czyli wybijania elektronów z powłok atomowych. W rezultacie tego procesu powstają swobodne elektrony oraz jony - atomy pozbawione jednego lub więcej elektronów. Aby elektron mógł zostać wyrzucony poza atom, musi mu zostać dostarczona energia przekraczająca pewną wartość progową, zwana energią wiązania. Zasadniczo im większa jest liczba atomowa pierwiastka, tym większa jest energia wiązania elektronu na danej powłoce. Spośród wszystkich pierwiastków najmniejszą energią wiązania cechuje się jedyny elektron w atomie wodoru. Jonizacja wodoru wymaga dostarczenia energii 13,6 eV. Wartość ta została przyjęta jako wartrość progowa. Fotony promieniowania elektromagnetycznego, jak również rozpędzone cząstki naładowane, których energia kinetyczna przekracza próg 13,6 eV są określane jako promieniowanie jonizujące [1].

Promieniowanie jonizujące możemy podzielić na korpuskularne oraz elektromagnetyczne. Promieniowanie jonizujące korpuskularne to przede wszystkim rozpędzone cząstki posiadające ładunek elektryczny, takie jak elektrony, protony lub cząstki alfa. Cząstki naładowane oddziałują kulombowsko z elektronami materiału, przez który przechodzą [2]. Zasięg oddziaływań kulombowskich jest nieskończony, dlatego oddziaływanie cząstki naładowanej z elektronami materiału absorbenta ma charakter ciągły. Cząstki naładowane dokonują bezpośredniej jonizacji w materiale przez który przechodzą, stąd określane są jako promieniowanie jonizujące bezpośrednio. Do promieniowania jonizującego korpuskularnego możemy zaliczyć także neutrony. Nie posiadają one ładunku elektrycznego, zatem nie oddziałują bezpośrednio z elektronami, natomiast mogą oddziaływać z jądrami atomowymi prowadząc do reakcji jądrowych, których produktem są silnie jonizujące rozpędzone cząstki naładowane.

Promieniowanie jonizujące elektromagnetyczne to fotony X oraz gamma. Promieniowanie X powstaje w wyniku hamowania rozpędzonych swobodnych elektronów na atomach lub w wyniku przeskoków elektronów pomiędzy powłokami atomowymi. Natomiast promieniowanie gamma towarzyszy większości reakcji jądrowych i zazwyczaj cechuje się większą energią niż promieniowanie X. Fotony nie posiadają ładunku elektrycznego, zatem podobnie jak neutrony nie oddziaływują poprzez siłę kulombowską, są natomiast zdolne do wybijania pojedynczych elektronów z powłok atomowych. Z kolei w reakcjach fotojądrowych wysokoenergetyczne kwanty gamma mogą wybijać z jąder atomowych zarówno neutrony jak i protony. Tak więc w wyniku oddziaływania promieniowania X oraz gamma z materiałem powstają cząstki naładowane, dokonujące w kolejnym kroku intensywnej jonizacji, w porównaniu z którą jonizacja pierwotna dokonana bezpośrednio przez fotony jest znikoma. Dlatego promieniowanie fotonowe, podobnie jak neutrony, również klasyfikowane jest jako jonizujące pośrednio. W przypadku tego promieniowania najpierw musi zajść oddziaływanie, w którym całkowita lub częściowa energia zostaje przekazana wtórnej cząstce naładowanej, a następnie cząstka ta w kolejnych oddziaływaniach dokonuje "właściwej" bezpośredniej jonizacji. Jeżeli nie dojdzie do żadnego oddziaływania, to cząstka nieposiadająca ładunku elektrycznego może przeniknąć przez materiał praktycznie "niezauważona", nie przekazując materiałowi absorbenta żadanej energii.

Kiedy jednak rozważymy makroskopową wiązkę promieniowania jonizującego, pośrednio lub bezpośrednio, to zawsze pewna część energii unoszonej przez tę wiązkę zostanie zdeponowana w materiale absorbenta, przez który wiązka ta przenika. Może to prowadzić do wzbudzenia lub jonizacji atomów, czego skutkiem może być rozerwanie wiązań chemicznych, rozpad molekuł i powstanie silnie reaktywnych związków posiadających

13

niesparowany elektron, tzw. wolnych rodników [7]. W materii żywej zarówno promieniowanie jonizujące jak i produkty powstałe w wyniku jego działania mogą dokonywać uszkodzeń w komórkach. Powstałe uszkodzenia, głównie uszkodzenia helisy DNA, mogą prowadzić do śmierci komórki lub powstania mutacji, co może mieć negatywny wpływ na funkcjonowanie całego organizmu. Pierwsza część niniejszej rozprawy ilustruje skutki oddziaływania promieniowania na materię żywą na poziomie atomu, molekuł, pojedynczej komórki oraz całego organizmu.

2. Oddziaływanie PJ na poziomie atomu

2.1. Fotony

2.1.1. Zjawisko fotoelektryczne

Zjawiskiem, które w pewnym sensie definiuje pojęcie promieniowania jonizującego, jest zjawisko jonizacji, czyli utworzenia pary złożonej z jonu oraz swobodnego elektronu poprzez wybicie tego ostatniego z powłoki atomowej. W sytuacji, w której cząstką wybijającą jest foton, mówimy o zjawisku fotoelektrycznym. Aby doszło do tego zjawiska, energia padającego fotonu musi przekraczać energię wiązania elektronu na danej powłoce. Nadwyżkę energii wybity elektron zyskuje w formie energii kinetycznej, a padający foton ostatecznie znika.



Rys. 1 Schemat zjawiska fotoelektrycznego

Po wybiciu elektronu atom znajduje się w stanie wzbudzonym. Jak każdy układ w przyrodzie, "daży" on do stanu o możliwie jak najniższej energii. Prowadzi to do zajmowania przez elektrony wolnych miejsc na powłokach znajdujących się możliwie jak najbliżej jądra atomowego. Elektrony są jednak fermionami, co oznacza, że w danym stanie kwantowym w atomie może znaleźć się tylko jeden elektron. Liczba dopuszczalnych stanów na danej powłoce jest ograniczona, dlatego kiedy na bliższej jądru powłoce wszystkie dozwolone stany są już zajęte, elektrony sukcesywnie obsadzają stany kwantowe na dalszych powłokach. Dążenie atomu do minimum energii sprawia, że kiedy z wewnętrznej powłoki atomowej wybity zostaje elektron, to wolne miejsce po nim najczęściej zajmuje elektron z wyższej powłoki. Przejściu elektronu z powłoki wyżej na niższą towarzyszy emisja kwantu promieniowania o energii równej różnicy energii wiązania na powłokach, pomiędzy którymi nastąpiło przejście. W ten sposób, poprzez kaskadę przejść elektronowych, wzbudzony atom powraca do stanu podstawowego, reemitując energię wzbudzenia przekazaną mu przez padający foton poprzez kwanty promieniowania X. Kwanty te są charakterystyczne dla danego pierwiastka, ponieważ energie wiązania elektronów na powłokach dla danego pierwiastka są ściśle określone (Rys. 2).



Rys. 2 Schemat powstawania promieniowania charakterystycznego

Zjawisko fotoelektryczne stanowi największy odsetek oddziaływań fotonów o niskiej energii (Rys. 7 na stronie 20). Prawdopodobieństwo zajścia tego zjawiska silnie zależy od masy atomowej materiału, jak również od energii fotonu, proporcjonalnie do stosunku Z⁵/E³, gdzie Z jest liczbą atomową, a E energią padającego fotonu.

2.1.2. Zjawisko Rayleigha

Kiedy foton nie posiada wystarczającej energii do tego, aby wybić z atomu elektron, może się na nim rozproszyć zmieniając jedynie kierunek propagacji.



Rys. 3 Schemat zjawiska Rayleigha

Zmianę pędu fotonu przejmuje w tej sytuacji cały atom, którego masę przy tak niewielkiej energii fotonu można uznać za nieskończoną, dlatego rozproszenie to jest sprężyste i foton praktycznie nie traci w nim energii. Prawdopodobieństwo na zajście tego zjawiska, zwanego efektem Rayleiga, rośnie proporcjonalnie do kwadratu liczby atomowej materiału [2].

2.1.3. Zjawisko Comptona

Wysokoenergetyczny foton może ulec również niesprężystemu rozproszeniu na elektronie, przekazując mu znaczną część swojej energii. Elektron przejmując część pędu fotonu zostaje

odrzucony, najczęściej pod pewnym kątem w stosunku do pierwotnego kierunku ruchu fotonu, a foton zmienia kierunek propagacji.



Rys. 4 Schemat zjawiska Comptona

W wyniku utraty części energii długość fali fotonu wzrasta. Przyrost długości fali związany jest z kątem rozproszenia fotonu, co opisuje zależność

$$\Delta \lambda = \frac{h}{m_{\rho} \cdot c} (1 - \cos \theta) \tag{1}$$

- h stała Plancka
- me masa elektronu
- c prędkość światła w próżni
- θ kąt rozproszenia fotonu

Zjawisko Comptona jest zazwyczaj kojarzone z tzw. *quasi-swobodnymi* elektronami znajdującymi się w pasmie przewodzenia metali. Jednak przy dużej energii fotonu zjawisko Comptona może także zachodzić na lekkich atomach i wydaje się, że może ono stanowić istotny przyczynek do oddziaływania wysokoenergetycznego promieniowania fotonowego z materią żywą [3].

2.1.4. Zjawisko Augera

Dla żywych ogranizmów zbudowanych z lekkich atomów zjawisko Augera jest głównym szlakiem deekscytacji atomów [3]. W wyniku wzbudzenia atomu, np. w efekcie oddziaływania kwantu promieniowania, elektron znajdujący się na jednej z wewnętrznych

połok zostaje wyrzucony poza atom. Jego miejsce zajmuje elektron z wyższej powłoki, jednak zamiast emisji kwantu promieniowania charakterystycznego z atomu zostaje wyrzucony kolejny elektron, tym razem z jednej z połok zewnętrznych (Rys. 5) Elektron ten nazywany jest elektronem Augera. Jest on wybijany z atomu przez powstający kwant promieniowania charakterystycznego. Można powiedzieć, że zjawisko Augera jest w pewnym sensie wtórnym efektem fotoelektrycznym, w którym powstały foton promieniowania charakterystycznego wybija elektron z powłoki zewnętrznej.





Szczególnym przypadkiem zjawiska Augera jest przejście Costera-Kroniga. W przejściu tym wolne miejsce po pierwotnie wybitym elektronie zajmowane jest przez elektron z tej samej powłoki, znajdujący się na energetycznie wyższej podpowłoce. Jeżeli elektron Augera został wybity również z tej samej powłoki, to zjawisko to nosi nazwę superefektu Costera-Kroniga.

2.1.5. Zjawisko tworzenia par

Wzór E=mc² (2) mówi o równoważności masy i energii. Jedna wielkość może przekształcać się w drugą. Wzór ten zazwyczaj kojarzony jest ze zjawiskiem rozszczepienia ciężkich jąder atmowych, gdzie ubytkowi masy towarzyszy wydzielenie się ogromnej energii. Zjawiskiem w pewnym sensie symetrycznym do zamiany masy na energię jest efekt tworzenia par, w

którym energia zostaje przekształcona w masę. Wysokoenergetyczny foton w polu jądra atomowego może zostać "zamieniony" na dwa elektrony - negaton (który zwykle mamy na myśli mówiąc o elektronie) oraz jego dodatnio naładowaną antycząstkę - pozyton.



Rys. 6 Schemat zjawiska tworzenia par

Obecność jądra atomowego jest konieczna, ponieważ musi być spełniona zasada zachowania pędu. W tej sytuacji jądro przejmuje pęd fotonu. Sumaryczny ładunek elektryczny powstałych cząstek jest równy zeru, jak ma to miejsce w przypadku fotonu, ponieważ musi być również spełniona zasada zachowania ładunku elektrycznego. Jednak aby zjawisko to mogło zajść, energia padającego fotonu musi być większa od 1,02 MeV. Wartość ta odpowiada sumie mas spoczynkowych elektronu i pozytonu, co w przeliczeniu na energię zgodnie ze wzorem 2 wynosi 2 * 511 keV = 1,022 MeV.

Dla fotonów o wysokiej energii, rzędu megaelektronowoltów, zjawisko "przemiany" fotonu na cząstki może również zajść w polu elektronu. Zjawisko to nazywane jest produkcją trypletów, ponieważ elektron przejmujący pęd fotonu zostaje wyrzucony poza atom. Aby spełniona była zasada zachowania pędu, energia padającego fotonu musi przewyższać próg 2,04 MeV. Stosunek częstości występowania zjawiska tworzenia trypletu do częstości produkcji par rośnie wraz z liczba atomową materiału. [2,3].



Rys. 7 Obszary, w których dominują poszczególne efekty oddziaływania fotonów z materiałem. Współczynniki σ_f , σ_c , σ_p określają odpowiednio prawdopodobieństwa na zajście efektów fotoelektrycznego, Comptona oraz zjawiska tworzenia się par [1, 2, 34]

2.1.6. Reakcje fotojądrowe

Fotony o bardzo dużych energiach, rzędu megaelektronowoltów, mogą wybijać nukleony z jąder atomowych. Zjawisko to jest analogiczne do zjawiska fotoelektrycznego, z tym że zachodzi ono na poziomie jądrowym. W zjawisku tym foton znika, a z jądra wybijany jest proton lub neutron (Rys. 8).



2.2. Protony i ciężkie jony

Cząstki posiadające ładunek elektryczny, takie jak protony lub cząstki alfa, przechodząc przez materię oddziaływują z atomami kulombowsko, przez co mogą dokonywać w materiale absorbenta intensywnej jonizacji. Wzdłuż toru ciężkiej cząstki naładowanej przechodzącej przez materiał występuje duże stężenie wzbudzonych atomów oraz par składających się ze swobodnego elektronu i dodatniego jonu absorbenta, z którego wybity został elektron. Jonizacja ta jest intensywna i silnie skupiona wokół toru cząstki. Jej przestrzenny rozkład tworzy walcowatą strukturę zwaną penumbrą.



Rys. 9 a) Schemat jonizacji za pośrednictwem oddziaływań kulombowskich dokonywanych przez proton, b) penumbra

Protony oraz ciężkie jony posiadają dużą masę w stosunku do elektronów, z którymi oddziaływują, dlatego w kolejnych oddziaływaniach w bardzo niewielkim stopniu zmieniają kierunek przemieszczania się. Te niewielkie zmiany kierunku pędu kompensują się wzajemnie, co sprawia, że ciężka cząstka naładowana ostatecznie porusza się po linii prostej wyznaczonej przez pęd początkowy. Jednak w każdym oddziaływaniu cząstka ta traci pewną część swojej energii kinetycznej, ulegając przez to spowolnieniu aż do całkowitego zatrzymania się. To powoduje, że ciężkie cząstki naładowane charakteryzuje pewien zasięg w materiale absorbującym. Zasięg ten zależy od energii początkowej cząstki oraz właściwości tego materiału. Przez zasięg cząstek rozumiemy graniczną odległość, poza którą cząstki nie mogą penetrować dalszych warstw materiału [2]. Im wolniej cząstka naładowana porusza się w materiale, tym dłużej przebywa ona w sąsiedztwie danej grupy atomów, deponując coraz większą ilość energii na danym odcinku toru. Ilość energii deponowanej przez cząstęk na

jednostkę drogi przebytej w materiale nazywa się liniowym przekazem energii LET - Linear Energy Transfer [Dodatek A - liniowy przekaz energii]. Pod koniec drogi LET cząstki naładowanej wzrasta gwałtownie. W tej okolicy następuje rekombinacja, co w przypadku dodatnio naładowanego jonu oznacza przyłączenie elektronów i utworzenie obojętnego atomu, a w przypadku elektronu przyłączenie się do jednego z jonów dodatnich [2]. W tym miejscu, po osiągnięciu wartości maksymalnej, LET maleje gwałtownie do zera. Na wykresie wartości LET cząstki w funkcji jej drogi przebytej w materiale zjawiska towarzyszące zatrzymywaniu się cząstki ujawniają się w formie charakterystycznego kształtu zwanego pikiem Bragga.



2.3. Neutrony

Specyficznym rodzajem cząstek promieniowania są swobodne neutrony. Swobodny neutron jest cząstką niestabilną - rozpada się na proton, elektron oraz antyneutrino z czasem połowicznego rozpadu 15 minut $(n \rightarrow p + e^- + \tilde{v})$ [40]. Neutron nie posiada ładunku elektrycznego, nie oddziaływuje zatem za pośrednictwem siły kulombowskiej. Może on

¹ Zjawisko to wykorzystywane jest w hadronoterapii. Odpowiedni dobór energii początkowej wiązki jonów umożliwia depozycję ich energii na okreslonej głębokości. Można zatem niszczyć komórki nowotworowe, znajdujące się na pewnej głębokości w tkance, bez znaczących uszkodzeń zdrowych komórek znajdujących się na drodze jonów od źródła do nowotworu. W IFJ PAN funkcjonuje obecnie stanowisko do protonowej terapii nowotworów oka [15].

natomiast oddziaływać z jądrami atomowymi, co w rezultacie może prowadzić do wyswobodzenia z atomu cząstek naładowanych. W reakcji typu "knock-out"² rozpędzony neutron może "wpaść" do jądra atomowego wybijając z niego proton, który uzyskując znaczną energię kinetyczną dokonuje w kolejnym kroku intensywnej jonizacji. W innej reakcji typu "pick-up", dzięki oddziaływaniom silnym występującym pomiędzy nukleonami neutron przelatując w bliskim sąsiedztwie jądra może "porwać" ze sobą proton, tworząc z nim deuteron - cząstkę naładowaną [4].



Zatem rozpędzone swobodne neutrony również wliczane są w poczet promieniowania jonizującego, z tym że tak jak już wspomnianio, dokonują one jonizacji w sposób pośredni.

2.4. Elektrony

Swobodny elektron oddziaływuje z materiałem absorbenta głównie poprzez siły kulombowskie. Rozpędzone elektrony mogą m.in. rozpraszać się na atomach niesprężyście. Energia kinetyczna elektronu tracona w czasie tych rozproszeń zostaje wyemitowana w formie promieniowania. Promieniowanie to, nazywane promieniowaniem hamowania³, stanowi zasadniczą część widma lampy rentgenowskiej. Wysokoenergetyczny elektron,

² W tego typu reakcji w górnych warstwach atmosfery powstaje promieniotwórczy izotop węgla ¹⁴C ($\mathbf{n} + \frac{^{14}}{^{7}}\mathbf{N} \rightarrow \frac{^{16}}{^{6}}\mathbf{C} + \mathbf{p}$)

³ W literaturze dość często spotyka się niemiecki odpowiednik - bremsstrahlung.

poprzez oddziaływania kulombowskie, może również przekazać znaczną część swojej energii innemu elektronowi. Może to spowodować przeniesienie elektronu związanego w atomie na wyższy stan energetyczny lub wyrzucenie go poza atom. Analogicznie do opisanego wcześniej efektu fotoelektrycznego, prowadzi to do kaskady przejść elektronowych w atomie i związanej z tym emisji kwantów promieniowania charakterystycznego. W widmie lampy



rentgenowskiej ujawnia się to w postaci wąskich pików odpowiadających liniom emisyjnym.

Rys. 12 Widmo lampy rentgenowskiej oraz schemat powstawania promieniowania charakterystycznego (linie α i β serii K) [14]. Linie te wyróżniają się z tła ciągłego, ponieważ jednorodny materiał anody jest w zasadzie "przezroczysty" dla własnego promieniowania charakterystycznego. Foton charakterystyczny pochłonięty przez atom może zostać po chwili ponownie reemitowany.

Głównym tematem niniejszej pracy jest oddziaływanie promieniowania fotonowego na żywy organizm. Jednak energia fotonu przekazywana jest absorbentowi najcześciej nie w formie pojedynczego oddziaływania, lecz poprzez kaskadę oddziaływań, w której główną rolę odgrywają wysokoenergetyczne elektrony. W zjawisku fotoelektrycznym padający foton wybija z atomu elektron, który ze względu na sposób wyswobodzenia nazwany jest fotoelektronem. Fotoelektron przejmuje energię kinetyczną fotonu pomniejszoną o pracę wyjścia, odpowiadającą energii jego wiązania na powłoce, z której został wybity. Fotoelektron poprzez oddziaływanie kulombowskie z elektronem związanym na powłoce atomowej może przenieść go na wyższy poziom energetyczny, a przy dostatecznie dużej energii przekazanej mu w tym oddziaływaniu także całkowicie wyrzucić go poza atom. Swobodne elektrony powstałe w ten sposób nazywane są elektronami delta. W opisanym oddziaływaniu elektron delta może uzyskać tak dużą energię, że również jest on zdolny do uwalniania kolejnych elektronów z powłok atomowych. To właśnie elektrony delta przekazują materiałowi absorbenta zdecydowaną większość energii deponowanej przez



wysokoenergetyczny foton.

Rys. 13 Schemat jonizacji dokonywanej przez fotoelektrony oraz elektrony delta

Elektron poruszający się w absorbującym medium ma taką samą masę spoczynkową jak elektrony związane na powłokach atomów, przez co oddziaływując z jednym z nich może utracić znaczną część swojej energii [2]. Również oddziaływanie z jądrami atomowymi może

spowodować gwałtowną zmianę kierunku ruchu elektronu. W odróżnieniu od protonów i ciężkich jonów, utrata energii elektronu następuje skokowo, jednak z mniejszą częstością, a kierunek ruchu elektronu może ulegać wielokrotnym zmianom. Pojedyncze oddziaływanie rozpędzonego elektronu zwykle nie powoduje jeszcze dużej zmiany jego kierunku ruchu, jednak w perspektywie bardzo wielu oddziaływań pęd elektronu może ulec znacznej zmianie [3]. W odróżnieniu od jonizacji wywołanej przez proton lub ciężki jon, silnie skupionej wokół toru jego przejścia, przestrzenny rozkład jonizacji wywołanych przez elektrony przyjmuje stożkowy kształt, co związane jest zarówno ze zmianą pędu fotoelektronów jak i wytworzonych "kolejnych pokoleń" elektronów delta. Uwolnione elektrony poprzez kolejne oddziaływania z elektronami związanymi w atomach stopniowo tracą swoją energię kinetyczną aż do całkowitego zatrzymania się, kiedy to zostają one przyłączone do znajdujących się w pobliżu jonów dodatnich. Dlatego natężenie przechodzącej wiązki elektronów zmniejsza się stopniowo w całym zakresie grubości absorbenta i maleje do zera dla dużych grubości warstw materiału [2].



Rys. 14 Symulacja przejścia w wodzie początkowo równoległej wiązki 25 elektronów o energii 1 keV przeprowadzona przy użyciu programu Casino [16].

3. Oddziaływanie PJ na poziomie molekularnym

trwa ok. 10⁻¹⁶ s i można go odpowiednio zapisać w postaci

Wybicie elektronu z powłoki atomowej lub z powłoki wiążącej ze sobą atomy w cząsteczce może prowadzić do rozpadu tej cząsteczki. Rozpad niektórych cząsteczek chemicznych może zapoczątkować proces, w wyniku którego powstają wolne rodniki, posiadające niesparowane elektrony [7]. Niesparowanie oznacza tu nierówną liczbę elektronów o spinie dodatnim i ujemnym na danej powłoce. Sytuacja ta dotyczy najczęściej zewnętrznych powłok atomowych, dlatego też wolne rodniki charakteryzuje duża reaktywność chemiczna. Dążąc do sparowania elektronów, poprzez pozbycie się nadmiarowego elektronu lub przyłączenie elektronu od innej cząsteczki, zwykle szybko wchodzą w reakcje z innymi cząsteczkami [7]. Najważniejszym składnikiem żywych organizmów jest woda, która stanowi 60-70% masy komórek. Uważa się, że życie na Ziemi rozpoczęło się w oceanie i dlatego warunki panujące w tym pradawnym środowisku wywarły trwały wpływ na chemię istot żywych⁴ [6]. Dlatego w rozważaniach dotyczących przekazu energii przez promieniowanie woda jest najlepszym przybliżeniem ośrodka żywej komórki. Promieniowanie jonizujące pochłonięte przez cząsteczkę wody może spowodować jej wzbudzenie lub rozpad, zwany radiolizą [7]. Etap ten

 $\begin{array}{c} H_2 O \xrightarrow{h\nu} H_2 O * \\ H_2 O \xrightarrow{h\nu} H_2 O^+ + e^- \end{array}$

W czasie 10^{-14} - 10^{-13} sekundy wzbudzone cząsteczki wody H₂O* rozpadają się na atomy wodoru i rodniki hydroksylowe •OH, a jony H₂O⁺ w kolejnych reakcjach z cząsteczkami wody tworzą jony H₃O⁺ jak również rodniki hydroksylowe [7], co odpowiednio zapisujemy jako:

⁴ Naukowcy poszukujący innych form życia poza naszą planetą są zgodni co do tego, że warunkiem istnienia życia na danej planecie jest obecność tam wody w stanie płynnym, ewentualnie innej cieczy umożliwiającej łatwą dyfuzję pierwiastków i łączenie się ich w proste związki, a następnie w bardziej zorganizowane struktury.

$$H_2O^* \rightarrow H^{\bullet} + {}^{\bullet}OH$$

 $H_2O^+ + H_2O \rightarrow H_3O^+ + {}^{\bullet}OH$

Po czasie 10^{-12} s swobodne elektrony uzyskują otoczkę cząsteczek wody (dipoli elektrycznych) tworząc tzw. elektrony uwodnione e_{aq}^{-} [7]. W kolejnych etapach, w wyniku oddziaływań pomiędzy pierwotnymi produktami radiolizy (H[•], e_{aq}^{-} , •OH), tworzą się m.in. cząsteczki wodoru H₂ i nadtlenku wodoru H₂O₂ [7]. Rodnik hydroksylowy •OH jest bardzo reaktywny chemicznie. Jego reakcje z kwasami nukleinowymi mogą prowadzić do uszkodzenia zasad nukleinowych oraz przerwań nici DNA [7].

4. Oddziaływanie PJ na poziomie komórkowym

Efekty działania promieniowania jonizującego na poziomie atomowym oraz molekularnym mogą prowadzić do uszkodzeń w komórkach. Przenikając przez komórkę PJ może powodować uszkodzenia we wszystkich jej organellach, jednak najbardziej newralgicznym "celem" w komórce jest DNA [9] - dwuniciowa cząsteczka, w której zakodowana została cała informacja dotycząca budowy oraz funkcjonowania komórki [Dodatek D - Budowa komórki eukariotycznej]. Pozostałe makrocząsteczki, takie jak białka i lipidy, występują w komórce w wielu kopiach, natomiast DNA tylko w dwóch, z których jedna jest często nieaktywna [9]. Promieniowanie jonizujące może uszkadzać DNA bezpośrednio lub pośrednio, w tym drugim przypadku poprzez elektrony delta oraz powstałe reaktywne wolne rodniki. Uszkodzenia DNA to najczęściej pojedncze lub podwójne przerwania helisy (SSB - Single Strand Break, DSB - Double Strand Break) [8].



Rys. 15 Schemat pojedynczo i podwójnoniciowych uszkodzeń DNA powodowanych przez promieniowanie jonizujące

Powyższy rysunek jest dość schematyczną ilustracją, zwłaszcza w przypadku uszkodzeń pojedynczoniciowych. Dla promieniowania fotonowego 70% - 90% uszkodzeń DNA następuje wskutek działania pośredniego, poprzez oddziaływanie elektronów delta oraz wolnych rodników. Natomiast w przypadku protonów, neutronów oraz ciężkich jonów 90% uszkodzeń DNA ma charakter bezpośredni [2].

Komórka przy pomocy szeregu mechanizmów dąży do naprawy uszkodzonej nici. Naprawa DNA to procesy komórkowe łączone z odbudową jego struktury oraz funkcji. Czas wymagany do przeprowadzenia skutecznej naprawy DNA zależy od rodzaju uszkodzenia i metabolizmu komórki. Naprawa może trwać sekundy lub wiele dni czy tygodni [8]. Zdolność komórki do naprawy uszkodzeń DNA zależy od fazy cyklu życiowego [Dodatek E - cykl komórkowy]. W trakcie transkrypcji DNA uszkodzenia są naprawiane najskuteczniej, ponieważ występuje wtedy największa ilość enzymów zaangażowanych w replikację DNA, naprawiających powstające błedy [8]. Pojedynczoniciowe uszkodzenia DNA są stosunkowo łatwo naprawiane przez komórkę, co wynika z wzajemnej komplementarności obydwu nici.

Połowiczny czas naprawy, w którym liczba uszkodzeń redukowana jest do połowy, dla pojedynczoniciowych uszkodzeń wynosi 2-10 minut [8]. Natomiast podwójnoniciowe uszkodzenia, o ile w ogóle mogą zostać naprawione, wymagają znacznie dłuższego czasu naprawy, rzędu godzin lub dni [10]. Wynika stąd, iż promieniowanie charakteryzujące się dużą gęstością jonizacji jest znacznie bardziej niebezpieczne dla komórki niż promieniowanie o małej wartości współczynnika LET. Gęstość jonizacji wytwarzana w komórce wydaje się być jednym z najistotniejszych czynników fizycznych [8]. Jonizacja wywołana przez promieniowanie o niskim LET (np. X lub gamma) ma formę pojedynczych rozproszonych zdarzeń. Promieniowanie to jest mało skuteczne w uszkadzaniu DNA, ponieważ do poważniejszych uszkodzeń zwykle potrzeba więcej niż jednej jonizacji [8].

Czasem zdarza się, że mechanizmy naprawcze nie są w stanie naprawić powstałych uszkodzeń DNA. Nienaprawione uszkodzenia DNA mogą być przyczyną śmierci komórki lub powstania mutacji w kolejnych jej pokoleniach. Istnieją dwa rodzaje śmierci komórki: śmierć interfazalna oraz śmierć mitotyczna [9]. Śmierć interfazalna jest następstwem uszkodzenia metabolizmu komórki. Następuje ona w dowolnej części cyklu komórkowego, zazwyczaj od kilku do kilkudziesięciu godzin po napromienieniu. Śmierć mitotyczną zwykle poprzedzają jeszcze 1,2 lub 3 następne cykle komórkowe zakończone podziałami [2]. Po tym czasie komórki przestają się dzielić i często dochodzi również do ich obumierania. Przy mniejszych dawkach promieniowania [Dodatek C - Dawka promieniowania] może wystąpić czasowe zatrzymanie podziału komórek. Poniższy schemat przedstawia ciąg zdarzeń mogących nastąpić na skutek braku naprawy uszkodzeń DNA w komórce.



Rys. 16 Możliwe konsekwencje nienaprawionych uszkodzeń DNA [8]

4.1. Apoptoza i nekroza

Wyróżniamy dwa rodzaje śmierci interfazalnej: apoptozę oraz nekrozę. Apoptozę można określić jako celowe i na swój sposób "świadome" samounicestwienie się komórki. Apoptotyczna komórka syntetyzuje szereg białek, które ją w charakterystyczny sposób zabijają [2,6]. Apoptoza jest normalnym procesem występującym w organizmach wielokomórkowych. Organizmy jednokomórkowe, takie jak bakterie czy drożdże, dzielą się tak szybko jak to jest możliwe, a szybkość ich proliferacji [Dodatek E] zależy głównie od dostępności substancji odżywczych w środowisku [6]. Natomiast komórki organizmu wielokomórkowego są członkami zorganizowanej społeczności, a ich proliferacja musi być kontrolowana. Można powiedzieć, że w procesie apoptozy komórka poświęca swoje życie dla dobra całego organizmu. W dojrzałych tkankach apoptoza równoważy proliferację, by zapobiec rośnięciu narządów [6]. Wszystkie komórki zwierząt posiadające jądro komórkowe dysponują zawiązkiem własnego rozpadu. Apoptoza jest prowadzona przez rodzinę enzymów rozcinających białka, zwanych kaspazami [6]. Prekursorami kaspaz są prokaspazy, pozostające "w uśpieniu" aż do momentu otrzymania odpowiedniego sygnału do aktywacji i zniszczenia komórki [6]. Aktywacja kaspaz jest ściśle regulowana w komórce, by trzymać

program śmierci w pogotowiu do chwili koniecznego uruchomienia [6]. Komórka ulegająca apoptozie kurczy się - jej cytoszkielet się zapada, rozpada się otoczka jądrowa a DNA jest cięty na fragmenty [6]. Na powierzchni komórki pojawiają się ciałka apoptotyczne, będące sygnałem dla sąsiednich komórek oraz makrofagów do przeprowadzenia fagocytozy, czyli całkowitego wchłonięcia pozostałości po apoptotycznej komórce. Pozwala to na ponowne wykorzystanie składników organicznych apoptotycznej komórki przez komórki fagocytujące. W apoptozie nie następuje uwolnienie zawartości komórki do otoczenia, dzięki czemu nie występuje stan zapalny [6].

Apoptoza najczęściej występuje w wyniku działania niskich dawek promieniowania. Z kolei nekroza, zwana również martwicą, może pojawić się w wyniku znacznego napromienienia komórki. W odróżnieniu od apoptozy, śmierć nekrotyczna jest nagłym i niekontrolowanym "zabójstwem" komórki. W wyniku znacznych uszkodzeń błony komórka traci zdolność do zachowania równowagi wodno-elektrolitowej. Woda i jony, których nadmiar w normalnych warunkach usuwany jest na zewnątrz, wnikają do wnętrza komórki [2]. W odróżnieniu od kurczącej się komórki apoptotycznej, komórka nekrotyczna zwiększa swój rozmiar w wyniku spęcznienia, co powoduje, że błona komórkowa pęka, a zawartość komórki wylewa się na zewnątrz. W wyniku tego w tkance pojawia się stan zapalny [6]. Podsumowując, apoptoza określana jest jako programowana śmierć komórki i jest aktywnym rodzajem śmierci, natomiast nekroza to bierny proces degeneracyjny [8].

4.2. Mutacje i nowotwory

Ciało dorosłego człowieka zbudowane jest z ok. 10¹⁵ komórek. Wiele z nich musi się dzielić i różnicować, aby zastąpić "zużyte" komórki. Szacuje się, że każdego dnia w ciele dorosłego człowieka następuje ok. 10¹² podziałów komórkowych [11]. Równocześnie ciało to jest w stanie utrzymywać stałą masę przez dekady. Dzieje się tak za sprawą mechanizmów zarządzających proliferacją, a także śmiercią komórek [11]. W organizmie

wielokomórkowym poszczególne komórki muszą dostosowywać swe zachowanie do potrzeb organizmu jako całości. Muszą dzielić się wtedy, kiedy nowe komórki tego typu są potrzebne, oraz zatrzymać podziały, kiedy takiej potrzeby nie ma. Powinny także zabijać się same, kiedy jest to konieczne. Musza zachowywać swój odpowiedni, wyspecjalizowany charakter i właściwe miejsce w organizmie [6]. Mutacje, czyli zmiany genetyczne powstałe w wyniku braku lub nieprawidłowej naprawy uszkodzeń DNA, pozwalające komórce na przeżycie i podziały, kiedy robić tego nie powinna, mogą mieć dla organizmu groźne konsekwencje. Bezustanna ekspansja klonu zmutowanej genetycznie komórki to nowotwór [6]. Komórki nowotworowe namnażają się bez ograniczenia oraz, w przypadku nowotworów złośliwych, przedostają się krwiobiegu i kolonizują miejsca zarezerwowane dla innych komórek, tworząc tzw. przerzuty. Są również mniej skłonne do zabicia się w drodze apoptozy. Mutacje prowadzące do powstania nowotworów nie uszkadzają komórek. Wręcz przeciwnie, selekcja naturalna daje im przewagę nad pozostałymi komórkami poprzez nieograniczone możliwości rozmnażania się⁵ [6]. Zatem z ewolucyjnego punktu widzenia komórki nowotworowe w pewnym sensie odnoszą sukces. Jest on jednak krótkotrwały, ponieważ doprowadzając ostatecznie do śmierci swojego żywiciela same również ulegają unicestwieniu⁶ [11].

Na szczęście potrzeba więcej niż jednej mutacji, aby zmienić prawidłową komórkę w nowotworową. Szacuje się, że do transformacji nowotworowej komórki potrzeba co najmniej 5 zmutowanych genów [11]. Prawdopodobieństwo pięciokrotnego uszkodzenia tej samej komórki jest bardzo znikome, jednak pojedyncza mutacja jest wielokrotnie (nawet miliony razy) powielana w kolejnych podziałach potomstwa zmutowanej komórki, tworząc klon

⁵ Mutacje najczęściej powstają wskutek błędnego przepisania kodu DNA w czasie podziału komórki. Czasem jednak takie zmiany w DNA sprawiają, że komórki stają się lepiej przystosowane do warunków panujących w środowisku zewnętrznym. Zjawisko to jest podstawą ewolucji. W ten sposób bakterie mogą uodpornić się na działanie antybiotyków [6].

⁶ Niektórym komórkom nowotworowym udało się uniknąć samozagłady. Komórki HeLa, które zabiły swoją żywicielkę Henriettę Lacks w roku 1951 (szczegóły w dalszej części pracy), można znaleźć obecnie w tysiącach laboratoriów na całym świecie. Z ewolucyjnego punktu widzenia komórki te osiągnęły zatem niebywały sukces [11].

zmutowanych komórek. Dalsze uszkodzenia tych komórek oraz podziały komórek wtórnie uszkodzonych powodują kumulowanie się mutacji. Mutacje zazwyczaj pojawiają się jedna po drugiej w okresie wielu lat, dlatego nowotwory są zasadniczo chorobą wieku starczego [6]. Uszkodzenie DNA samo w sobie nie jest jeszcze źródłem kancerogenezy. Dopiero proces replikacji może przekształcić chemiczne uszkodzenia DNA w mutacje [11]. Stąd czynniki rakotwórcze są najbardziej niebezpieczne dla tkanek, w których komórki ulegają częstym podziałom⁷.

Kiedy dochodzi już do transformacji nowotworowej, los organizmu spoczywa w rękach układu odpornościowego. W szpiku kostnym z macierzystych komórek krwiotwórczych powstają obrońcy naszego organizmu - krwinki białe, czyli leukocyty. Wśród nich są granulocyty obojętnochłonne (60-70% leukocytów) stanowiące pierwszą linię obrony, granulocyty kwasochłonne (1-4%) odgrywające główną rolę w reakcjach alergicznych i w zwalczaniu pasożytów oraz limfocyty (30-40%) zaangażowane głównie w odporność komórkową [12]. Jednym z rodzajów limfocytów są limfocyty NK (natural killers), które podobnie jak granulocyty kwasochłonne wykazują naturalną cytotoksyczność, niszcząc komórki zakażone wirusem oraz transformowane nowotworowo [12].

5. Skutki oddziaływania PJ na poziomie całego organizmu

Skutki działania promieniowania na organizm możemy podzielić na deterministyczne oraz stochastyczne [9]. Po napromienieniu organizmu bardzo dużą dawką PJ pojawienie się pewnych charkterystycznych objawów jest niemal pewne. Duże dawki PJ determinują pojawienie się typowych symptomów w stosunkowo krótkim czasie od napromienienia, dlatego skutki te określane są jako deterministyczne [2]. Napromienienie mniejszymi dawkami zwykle nie powoduje takich objawów, może być natomiast przyczyną rozwoju

⁷ Stąd szczególny nacisk na ochronę radiologiczną kobiet w ciąży. Wada komórki zarodkowej przekazana zostanie wszystkim komórkom organizmu, tworząc wadę genetyczną.

choroby nowotworowej, wystąpienia mutacji genetycznych lub innych dysfunkcji organizmu. Skutki te mogą pojawić się po wielu latach, jak ma to miejsce w przypadku nowotworów, a w przypadku mutacji nawet w kolejnych pokoleniach. Mogą się pojawić, ale nie muszą. Mówimy o pewnym prawdopodobieństwie ich wystapienia, stąd skutki te określa się mianem stochastycznych.

5.1. Skutki deterministyczne

Skutki deterministyczne możemy podzielić na wczesne oraz późne. Wczesne skutki deterministyczne są wynikiem napromienienia komórek intensywnie proliferujących, takich jak komórki nabłonka jelitowego lub krwiotwórcze komórki macierzyste szpiku kostnego [dodatek E], natomiast późne skutki są efektem uszkodzenia komórek dzielących się rzadko lub nie dzielących się [2]. Wczesne skutki deterministyczne, będące wynikiem napromienienia całego ciała, określane są jako choroba popromienna (ang. ARS - Acute Radiation Syndrome [9]). Wynikają one z licznych uszkodzeń bardzo wielu komórek macierzystych, powodując ich śmierć najczęściej w drodze apoptozy. Najdotkliwsze objawy są wynikiem zaburzeń definiowanych jako zespół jelitowy oraz zespół szpiku kostnego.

5.1.1. Zespół jelitowy

Jelito cienkie to najdłuższy odcinek przewodu pokarmowego człowieka mierzący ok. 6 metrów długości [12]. Zasadniczą funkcją jelita cienkiego jest dokończenie trawienia pokarmu oraz jego wchłanianie, jak również udział w regulacji gospodarki jonowej. Obok układu oddechowego przewód pokarmowy jest najczęstszą drogą wnikania do organizmu różnych patogenów, dlatego też układ pokarmowy poprzez odpowiedni nabłonek przystosowany jest do ich blokowania oraz niszczenia [12]. Stąd też jelito cienkie stanowi ważne wsparcie dla układu odpornościowego. Błona śluzowa nabłonka tworzy palczaste wypustki zwane kosmkami jelitowymi [12].



Rys. 17 Schemat przedstawiający gruczoły oraz kosmki jelitowe [12]

Nabłonek pokrywający kosmki zawiera komórki jelitowe - enterocyty, których główną funkcją jest wchłanianie pokarmu. Nabłonek gruczołów jelitowych (tzw. krypta) przechodzi w nabłonek kosmków, który zawiera komórki macierzyste, będące źródłem odnowy komórkowej zarówno gruczołu jak i kosmka [2,12]. Proces odnowy enterocytów jest bardzo intensywny, ponieważ na szczycie kosmka następuje ich stałe złuszczanie. Czas życia enterocytów na szczycie kosmka wynosi tylko kilka dni [9]. Napromienienie powoduje, że macierzyste komórki krypt przestają się dzielić, a część z nich ginie na skutek apoptozy [9]. Nie następuje zatem odnowienie nabłonka wyściełającego jelito. W ciągu kilku dni po napromienieniu, kiedy pozostałe enterocyty na szczycie kosmka ulegną złuszczeniu, następuje brak łaknienia, wymioty, biegunka, utrata wody i elektrolitów, pojawiają się także zakażenia bakteryjne [2].

5.1.2. Zespół szpiku kostnego

Szpik kostny jest głównym podłożem tkankowym dla tworzenia i rozwoju komórek krwi [12]. Jego otoczenie ochronne stanowi tkanka kostna. W szpiku kostnym wyróżnia się dwa przedziały - śródnaczyniowy i zewnątrznaczyniowy [12]. Głównym składnikiem przedziału śródnaczyniowego są naczynia zatokowe szpiku. Krew z zatok szpikowych zbierana jest przez zatokę centralną, która przechodzi w żyłę odprowadzającą [12]. Przedział
zewnątrznaczyniowy wypełnia zrąb szpiku oraz krew szpikowa. Zrąb szpiku to rusztowanie zbudowane z komórek i substancji międzykomórkowej. Spełnia on rolę strukturalną, odżywczą i regulacyjną dla krwiotwórczych komórek macierzystych, z których wywodzą się wszystkie rodzaje komórek krwi [9,12]. Krążące we krwi obwodowej komórki mają różny czas życia. Przykładowo średni czas życia erytrocyta wynosi 60 dni, a połowiczny czas życia granulocyta wynosi 6 godzin [2]. Wszystkie komórki krwi po pewnym czasie ulegają wymianie na nowe, pochodzące z dzielących i różnicujących się komórek macierzystych zawartych w szpiku kostnym. Podobnie jak ma to miejsce w przypadku zepołu jelitowego, po napromienieniu komórki macierzyste przestają się dzielić, a część z nich ginie, przez co komórki krwi obwodowej nie są odnawiane. Najpierw spada liczba zwalczających infekcje limfocytów i granulocytów, a następnie trombocytów odpowiedzialnych za krzepnięcie krwi. W rezultacie pojawiają się infekcje, krwotoki i anemia [2,9].

Zarówno skutki zespołu jelitowego, jak i skutki zespołu szpiku kostnego, mogą doprowadzić do śmierci niezależnie od siebie [13]. Przy dużym napromienieniu całego organizmu zespoły te pojawiają się równocześnie, przez co choroba popromienna jest w zasadzie nieuleczalna. Po kilku dniach objawy mogą ustąpić przechodząc w fazę utajoną, jednak po krótkim czasie wracają powodując wyniszczenie organizmu i ostatecznie śmierć [13]. Z kolei późne skutki deterministyczne są efektem uszkodzenia komórek dzielących się rzadko lub nie dzielących się. Mogą wystąpić przy napromienieniu mniejszymi dawkami lub przy napromienieniu punktowym. Wśród nich wyróżnia się przyspieszenie zmętnienia soczewki oka, zmiany skórne, zwłóknienia tkanki łącznej oraz bezpłodność [2].

5.2. Skutki stochastyczne - białaczka

Powstanie opisanego powyżej zespołu szpiku kostnego jest wynikiem śmierci lub zatrzymania podziałów znacznej liczby komórek krwiotwórczych. Jak wspomniano wcześniej, oprócz apoptozy i nekrozy w komóce na skutek działania promieniowania jonizującego może dojść do pojawienia się mutacji, których kumulacja może prowadzić do transformacji nowotworowej. W wyniku tzw. transformacji białaczkowej z komórek macierzystych szpiku kostnego powstają zmienione leukocyty. Są one niedojrzałe, przez co nie mogą pełnić właściwych dla siebie funkcji w organizmie. Posiadają natomiast cechę charakterystyczną dla komórek nowotworowych - namnażają się bez ograniczeń i nie są skłonne do zabicia się w drodze apoptozy. Szybko mnożące się nowotworowe leukocyty całkowicie zapełniają jamy szpikowe, nie pozostawiając miejsca dla rozwoju prawidłowych komórek krwi [45]. Wskutek tego szpik kostny przepełnia się zmienionymi nowotworowo, upośledzonymi leukocytami (tzw. blastami), natomiast inne składniki krwi, takie jak krwinki czerwone i płytki krwi, są wytwarzane w niewystarczających ilościach [45]. Podobnie jak w przypadku popromiennego zespołu szpiku kostnego, prowadzi to do znacznego obniżenia krzepliwości krwi oraz odporności organizmu. Wadliwe leukocyty przedostają się do krwi, a następnie osiadają w narządach całego organizmu (tj. wątroba, śledziona, węzły chłonne) powodując ich powiększanie, a następnie powolne uszkadzanie [46]. Bardzo duża ilość zmienionych nowotworowo białych krwinek sprawia, że pobrana krew ma białawy kolor, stąd choroba ta nazywana jest białaczką. Używana na świecie nazwa tej choroby - leukemia - jest zaczerpnięta z języka greckiego ("leukos" - biały oraz "haima" - krew) [47].

Białaczka jest jednym ze stochastycznych skutków ekspozycji całego ciała na promieniowanie jonizujące. Nie jest ono jednak jedynym czynnikem mogącym wywołać tę chorobę. Podobnie jak inne choroby nowotworowe, białaczkę mogą wywołać pewne rodzaje wirusów oraz czynniki chemiczne lub genetyczne. Stąd dane osób napromienionych większymi dawkami poddaje się statystycznej analizie jedynie pod względem wzrostu częstości występowania tej choroby. Prawdopodobieństwo występowania negatywnych skutków napromienienia w zależności od dawki jest tematem kolejnego rozdziału.

38

6. Radiofobia i radioentuzjazm - hipoteza liniowa i hormeza radiacyjna

Na podstawie dotychczasowych rozważań można wnioskować, że z działania promieniowania jonizującego na żywy organizm nic dobrego nie może wyniknąć. Negatywny wpływ promieniowania na ludzki organizm ujawnił się szczególne dobitnie po pierwszym, i jak do tej pory jedynym w historii ludzkości ataku nuklearnym, jaki został przeprowadzony przez amerykańskie lotnictwo w Japonii w roku 1945. Badania kliniczne ofiar wybuchów jądrowych z Hiroszimy i Nagasaki ujawniły liniową zależność pomiędzy częstością występowania negatywnych skutków zdrowotnych (takich jak np. białaczki) a otrzymaną dawką promieniowania. Na wykresie zależności skutków od dawki obszar ten określany jest



Rys. 18 Hipoteza liniowa [5]

Obszar definiowany jako "znane" odnosi się do rejonu bardzo dużych dawek. Natomiast wyznaczenie zależności skutek-dawka w rejonie małych dawek jest w zasadzie niemożliwe na podstawie obserwacji klinicznych. Napromienienie dużymi dawkami w krótkim czasie prowadzi do pojawienia się omówionych wcześniej, charakterystycznych i stosunkowo łatwych do zdiagnozowania skutków deterministycznych. Natomiast w rejonie niskich dawek mamy do czynienia ze skutkami stochastycznymi, które mogą, ale nie muszą wystąpić. Skutki te moga ujawnić się po wielu latach, dodatkowo moga być one wynikiem działania wielu

innych czynników uszkadzających DNA, tak jak ma to miejsce w przypadku nowotworów, będących najbardziej spodziewanym skutkiem napromienienia w perspektywie wielu lat. Dlatego też, w związku z niewyznaczalnością zależności skutek-dawka w obszarze niskich dawek, aproksymowano do tego obszaru liniowa zależność uzyskana na podstawie danych z Hiroszimy i Nagasaki. Tak powstała hipoteza liniowa. Według tej hipotezy prawdopodobieństwo wystąpienia negatywnych skutków zdrowotnych rośnie liniowo z dawka począwszy od najmniejszych dawek, i nie istnieje żaden próg dawki, poniżej którego nie ma żadnego ryzyka zachorowania. Istotnie, każda cząstka promieniowania trafiając do tkanki może doprowadzić do uszkodzeń DNA, które jeśli nie zostaną naprawione to niosą ze sobą ryzyko powstania nowotworu. Im większe jest natężenie takich cząstek padających na tkankę, tym większą deponują one w niej energię, i tym większe wydaje się być prawdopodobieństwo pojawienia się mutacji, które mogą doprowadzić do kancerogenezy. Zgodnie z hipotezą liniową każda dawka promieniowania jonizującego jest szkodliwa, a przynajmniej niepożądana.

Istnieje również odmienna hipoteza dotycząca oddziaływania niskich dawek promieniowania na organizm. Jest to hipoteza hormezy radiacyjnej, według której niskie dawki promieniowania nie tylko nie szkodzą, ale wpływają na organizm korzystnie [5,59,61]. Zjawisko hormezy polega na korzystnym, stymulującym działaniu niewielkich dawek substancji, które w większej ilości są toksyczne. Termin hormeza pochodzi od greckiego słowa hormao - pobudzam [8]. Paracelsus⁸ - średniowieczny lekarz i przyrodnik uważany za ojca medycyny nowożytnej - głosił, że "wszystko jest trucizną i nic nie jest trucizną. Tylko dawka czyni, że dana substancja nie jest trucizną" [5,40]. Istotnie stubstancje, które w niewielkich ilościach działają korzystnie, w dużych dawkach mogą być bardzo szkodliwe. Wydaje się, że szkodliwy może być nawet nadmiar higieny. Dzieci wychowywane w

⁸ Phillippus Aureolus Theophrastus Bombastus von Hohenheim (1493 - 1531) [40]

przesadnie higienicznych warunkach są zwykle mniej odporne na infekcje. Udział "żołnierzy" układu odpornościowego w "misjach pokojowych" o niewielkim stopniu zagrożenia w dalszej perspektywie wydaje się być korzystny dla organizmu. Podobne stymulujące działanie mogą mieć również niewielkie dawki promieniowania jonizującego, pobudzając w organizmie mechanizmy odpowiedzialne za naprawę uszkodzeń DNA oraz eliminację komórek ulegających niebezpiecznym transformacjom. Hipoteza hormezy radiacyjnej znajduje oparcie m.in. w korzystnym działaniu tzw. kapieli radonowych. Orędownicy radonowej wody przekonują, że powoduje ona m.in zwiększenie wydzielania kwasów żołądkowych oraz pobudzenie perystaltyki przewodu pokarmowego, co wydaje się dość dobrze pasować do kluczowego słowa teorii hormezy - "pobudzam". Oczywiście podstawowym założeniem hormezy jest pojęcie "niewielkiej dawki". Hipoteza hormezy radiacyjnej przewiduje istnienie pewnego progu dawki promieniowania, poniżej którego nie jest ono szkodliwe, a w pewnym zakresie niskich dawek nawet działa na organizm korzystnie. Oczywiście hormetyczna zależność dawka-skutek musi dostosować się do potwierdzonego przez dane kliniczne "znanego" obszaru. Poniższy rysunek przedstawia krzywą hormetyczną na tle zależności liniowej.



Rys. 19 Hipoteza liniowa i hormeza radiacyjna [5]

Interesujący jest fragment w pobliżu zerowej dawki. Sugeruje on, że niekorzystny dla organizmu może być również "niedobór" promieniowania jonizującego. Zjawisko to można przybliżyć pewną analogią; krzywą hormetyczną przedstawioną na rysunku Rys. 19 skojarzmy na chwilę z innym rodzajem promieniowania elektromagnetycznego, jakim jest światło słoneczne. Zażywanie wielogodzinnych "kąpieli słonecznych" na plaży w upalny dzień może być przyczyną poważnych oparzeń, a nawet raka skóry, jednak całkowity brak dostępu do światła słonecznego w dłuższej perspektywie również nie jest niekorzystny dla zdrowia.

Wpływ niskich dawek promieniowania jonizującego jest tematem dyskusji, dlatego jest również tematem badań naukowych [56,59-61]. Międzynarodowa Komisja Ochrony Radiologicznej (ICRP) definiuje jako małe dawki te, które powodują jonizację we wrażliwych częściach komórki w średnich odstępach czasu dłuższych od czasu potrzebnego na zadziałanie mechanizmu naprawczego [55]. Podążając za tą definicją, zachodzi potrzeba prowadzenia badań m.in. z dziedziny kinetyki naprawy DNA. Badania takie prowadzone są głównie na hodowlach komórkowych, co opisane zostało w dalszej części. Napromienianie pojedynczych komórek ściśle określoną dawką promieniowania możliwe jest dzięki układom mikrowiązkowym. Schemat takiego układu, wykorzystującego zogniskowaną wiązkę promieniowania rentgenowskiego, przedstawiony został w kolejnym rozdziale. Układ ten został skonstruowany w ramach prezentowanej pracy doktorskiej.

CZĘŚĆ 2 - MATERIAŁY I METODY

7. Badania z dziedziny mikrodozymetrii

Badania z dziedziny mikrodozymetrii są obecnie coraz bardziej popularne [19]. W badaniach tych często wykorzystuje się klasyczne, szerokowiązkowe źródła promieniowania, napromieniające całą próbkę w jednym kroku. Badania takie są jednak obciążone dużą niepewnością statystyczną w kwestii oceny dawki promieniowania deponowanej w pojedycznej komórce. Znacznie bardziej dokładne są układy mikrowiązkowe, w których użyta wiązka promieniowania ma średnicę porównywalną z rozmiarami pojedynczej komórki [17]. Dzięki precyzyjnym układom pozycjonowania i podglądu próbki możliwe jest napromienianie pojedynczych komórek. Poniższy rysunek ilustruje metodę napromieniania przy użyciu szerokiej wiązki oraz przy użyciu układu mikrowiązkowego.



Rys. 20 Napromienianie komórek przy użyciu a) klasycznego źródła b) układu mikrowiązki [17, 33]. Układ mikrowiązki umożliwia precyzyjne napromienianie pojedynczych komórek.

mikrowiązkowe charakteryzują możliwością ogniskowania Układy się wiązki promieniowania do rozmiarów rzędu pojedynczych mikrometrów. Układy te, skrótowo zwane mikrowiązkami, mogą wykorzystywać różne rodzaje promieniowania jonizującego. Stosowane są mikrowiązki jonowe, wykorzystujące protony, cząstki alfa, oraz ciężkie jony, jak również mikrowiązki elektronowe oraz rentgenowskie [17,18,19]. Układy mikrowiązkowe umożliwiają m.in. sporządzanie bardzo dokładnych map rozkładów pierwiastków na powierzchni próbek metodą fluorescencji rentgenowskiej [20]. Układy mikrowiązek rentgenowskich stanowią również podstawę dla mikrotomografii komputerowej - metody umożliwiającej wizualizację przestrzennego rozkładu gęstości próbki na poziomie mikrometrów i tym samym dokładną analizę struktury badanego materiału [21, 22,23]. Mikrowiązki dedykowane do badań radiobiologicznych umożliwiają badanie tzw. efektu widza. Efekt ten polega na występowaniu charakterystycznej odpowiedzi na napromienienie u komórek, które nie zostały napromienione, natomiast znajdowały się w otoczeniu komórek napromienianych⁹ [24,25]. O wywołanie odpowiedzi popromiennej u sąsiednich komórek można by podejrzewać elektrony delta, jednak napromienienie samego medium hodowlanego także wywołuje odpowiedź radiacyjną u nienapromienionych komórek zanurzonych w tym medium [26].

Najbardziej rozpowszechnionymi układami mikrowiązkowymi są mikrowiązki jonowe [19]. Jeden z takich układów, wykorzystujący protony oraz cząstki alfa, funkcjonuje w Instytucie Fizyki Jądrowej PAN od 2004 roku [27 - 34]. Źródłem jonów o energii 2 MeV jest akcelerator liniowy typu Van de Graaffa. Wiązka jonów rozpędzonych w akceleratorze transportowana jest do komory pomiarowej metalowymi jonowodami, z których odpompowywane jest powietrze, co zapewnia jonom swobodny lot wzdłuż jonowodu. Wiązka jest kierowana na odpowiedni tor oraz ogniskowana poprzez system przesłon oraz pól magnetycznych odpowiednio zakrzywiających kierunek ruchu cząstek.

Mikrowiązki rentgenowskie często konstruowane są na liniach synchrotronowych. Istnieją również laboratoryjne układy tego typu wykorzystujące lampy rentgenowskie. Taki właśnie układ, wykorzystujący lampę rentgenowską z mikroogniskowaniem, został skonstruowany w IFJ PAN. Jedną z dwóch działających obecnie linii eksperymentalnych jest skonstruowana w

⁹ Efekt widza jest pojęciem zaczerpniętym z socjologii. Polega on na tym, że im więcej osób jest świadkami zdarzenia wymagającego interwencji, tym mniejsze jest prawdopodobieństwo, że ktoś z nich zareaguje [40]. Efekt ten definiowany jest również przy użyciu dość fizycznej terminologii jako rozproszenie lub dyfuzja odpowiedzialności. Prawdopodobnie stąd wspomniane w tekście zjawisko określane jest jako efekt widza, pomimo iż radiobiologiczny efekt widza wydaje się być czymś zupełnie przeciwnym.

ramach prezentowanej pracy doktorskiej linia do napromieniania pojedynczych żywych komórek ściśle określoną dawką promieniowania X. Opis techniczny układu został przedstawiony w raporcie dostępnym na stronie internetowej Instytutu [17], dlatego w niniejszej pracy techniczne detale zostały ograniczone do rozmiarów niezbędnych dla zrozumienia fizycznej zasady działania układu. Dodane natomiast zostały fragmenty wyjaśniające zjawiska fizyczne leżące u podstaw działania danego elementu. W ostatnim rozdziale pracy przedstawione zostały także rozważania dotyczące części technicznej, bazujące na konstrukcyjnych doświadczeniach autora niniejszej pracy. Mogą one być przydatne dla osób planujących budowę podobych stanowisk eksperymentalnych.

8. Opis linii eksperymentalnej

Linia eksperymentalna do naświetlań pojedynczych żywych komórek promieniowaniem rentgenowskim w IFJ PAN składa się z lampy rentgenowskiej z mikroogniskowaniem, układu ogniskującego promieniowanie X, układu pozycjonowania próbki oraz układu mikroskopu optycznego z kamerą i własnym układem pozycjonowania [17] (Rys. 21). Lampa rentgenowska jest unieruchomiona, natomiast wszystkie pozostałe elementy mogą być zdalnie pozycjonowane w trzech kierunkach przestrzeni.



Rys. 21 Schemat oraz fotografia układu mikrowiązki rentgenowskiej do badań radiobiologicznych [17]

8.1. Lampa rentgenowska

Źródłem promieniowania X jest lampa rentgenowska L9191 (firma Hamamatsu) typu otwartego (Rys. 22). Ten rodzaj lamp charakteryzuje się możliwością wymiany anod, co umożliwia dostosowanie energii wykorzystywanego promieniowania charakterystycznego do rozmiarów oraz budowy wewnętrznej napromienianego obiektu. W opisywanym eksperymencie mikrodozymetrycznym wykorzystywana jest anoda tytanowa emitująca promieniowanie o energii linii K_α równej 4,5 keV [17]. Dzięki mikroogniskowaniu powierzchnia, z której emitowana jest wiązka promieniowania X, ma średnicę ok. 2 mikrometrów. Wiązka promieniowania ma kształt stożka o kącie rozwarcia równym 120°. W lampie L9191 zastosowana została anoda transmisyjna, dlatego emitowana wiązka promieniowania X jest niejako przedłużeniem wiązki elektronów ogniskowanych w lampie na wewnętrznej powierzchni anody (Rys. 22c). Formowanie wiązki elektronów odbywa się przy

użyciu pól magnetycznych, jednak szczegóły techniczne związane z tym zagadnieniem są tajemnicą handlową producenta.



Rys. 22 Lampa Hamamatsu L9191 a) w całości przed umieszczeniem w układzie b) od frontu po zdemontowaniu anody [17] c) zasada działania [22]. Na rysunku b w centralnej części widoczny mimośrodowy otwór, przez który padają na anodę emitowane z katody elektrony, powodując emisję promieniowania X. Rotacja anody powoduje zmianę miejsca padania elektronów, kiedy jej powierzchnia napromieniana w danym położeniu jest już "wypalona".

Nominalnie parametry pracy lampy zawierają się w zakresie napięć od 0 do 160 kV oraz prądów od 20 do 200 μ A. W rzeczywistości prąd elektronów padających na anodę (tzw. prąd targetu) nie przekracza 30 μ A. W eksperymencie radiobiologicznym praca lampy odbywa się przy napięciu 40 kV, ponieważ wtedy stosunek intensywności piku linii K_a do intensywności maksimum widma ciągłego jest największy.

8.2. Układ ogniskujący

Napromienianie komórek wymaga zogniskowana emitowanej z anody rozbieżnej wiązki promieniowania X. W tym celu zastosowany został układ ogniskujący firmy Rigaku. Elementem czynnym układu są dwa płasko-eliptyczne zwierciadła wielowarstwowe ustawione wzajemnie prostopadle (tzw. geometria Montela Rys. 23a). Każde ze zwierciadeł ogniskuje wiązkę w jednej płaszczyźnie, a promienie odbite kolejno od obydwu zwierciadeł są ogniskowane przestrzennie [17].



Rys. 23 a) Zasada działania zwierciadeł ogniskujących firmy Rigaku b) obraz promieniowania przechodzącego przez układ obserwowany przy użyciu czułej na promieniowanie kamery CCD Photonic Science [18]. Duży romb z lewej strony rysunku b pochodzi od bezpośredniej wiązki promieniowania X. Dwie ukośne linie są wynikiem pojedynczych odbić od każdego ze zwierciadeł. Najmniejsza plamka z prawej strony obrazu przedstawia zogniskowaną wiązkę po kaskadowym odbiciu od obu zwierciadeł, co schematycznie ilustruje rysunek a. Wiązka bezpośrednia oraz pojedyncze odbicia po zogniskowaniu są przesłaniane przy pomocy odpowiednich przesłon [17]

Efekt ogniskowania polega na wykorzystaniu konstruktywnej interferencji promieniowania rozproszonego na wielowarstwach zgodnie z regułą Bragga. Reguła ta leży u podstaw krystalografii rentgenowskiej [14]. Promieniowanie rentgenowskie dzięki swojej przenikliwości może rozpraszać się na wewnętrznych strukturach w sieci kryształu. Odległość pomiędzy sąsiednimi płaszczyznami sieciowymi w kryształach jest porównywalna z długością fali tego promieniowania, co sprawia, że zachodzą zjawiska charakterystyczne dla optyki falowej. Kiedy różnica dróg optycznych promieni odbitych¹⁰ od poszczególnych płaszczyzn jest równa całkowitej wielokrotności długości fali, nastepuje ich interferencyjne wzmocnienie (Rys. 24).

¹⁰ Promieniowanie rozprasza się na atomach we wszystkich kierunkach (zjawisko Rayleiga 2.1.2), jednak tylko dla ściśle określonych kierunków obserwuje się konstruktywną interferencję



Rys. 24 Rozproszenie promieniowania rentgenowskiego na plaszczyznach krystalograficznych. Różnica dróg optycznych dla sąsiednich promieni wynosi AB + BC. AB=BC= $d^*\sin\theta$, zatem $2d^*\sin\theta = n\lambda$, gdzie λ jest długością fali, a *n* liczbą naturalną. Promieniowanie rozproszone pod kątem θ jest monochromatyczne [14].

Ekwiwalentem płaszczyzn krystalograficznych mogą być cienkie warstwy materiału, o grubości porównywalnej z długością fali promieniowania rentgenowskiego. Na tej zasadzie działa układ zwierciadeł ogniskujących Rigaku. Każde ze zwierciadeł pokryte jest powłoką złożoną ok. 80 dwuwarstw chromu i węgla o grubości zmieniającej się w taki sposób, by dla promieni wychodzących ze źródła kąt padania/odbicia był równocześnie kątem Bragga dla promieniowania o energii 4,5 keV (Rys. 25a) [17].



Rys. 25 a) Zasada ogniskowania przy użyciu wielowarstwy opiera się na wykorzystaniu konstruktywnej interferencji promieniowania zgodnie z regułą Bragga [53, 17] b) układ zwierciadeł ogniskujących Rigaku po modyfikacjach technicznych. Widoczna przesłona zatrzymująca wiązkę bezpośrednią z Rys. 23b oraz przesłona dozująca odcinająca promieniowanie w ściśle określonym czasie [17]. Szczegóły techniczne dotyczące działania i modyfikacji układu zostały opisane w raporcie instytutowym [17].

W centralnej części zwierciadeł grubość pojedynczej dwuwarstwy Cr/C wynosi 3,1 nm [17]. Z relacji Bragga wynika istotny fakt, że układ ogniskujący jest równocześnie monochromatyzatorem wiązki, co ma znaczenie dla oszacowania dawki promieniowania deponowanego w komórkach.

W czasie ogniskowania obraz wiązki obserwowany jest przy użyciu czułej na promieniowanie rentgenowskie kamery CCD firmy Photonic Science (Rys. 26a). Celem ogniskowania jest uzyskanie najintensywniejszej wiązki zogniskowanej. Obraz z kamery analizowany jest w programie Image-Pro, umożliwiającym precyzyjną analizę zdjęć. Optymalizacja odbywa się w oparciu o przebieg sum intensywności pikseli w kolejnych pionowych odcinkach prostopadłych do poziomych linii definiujących analizowany obszar (Rys. 26b)



Rys. 26 a) obserwacja ogniska przy użyciu kamery CCD Photonic Science b) odczyt intensywności pikseli [17]. Po lewej stronie piku zogniskowanej wiązki widoczne jest tło pochodzące od wiązki bezpośredniej, niewidoczne na ekranie monitora "gołym okiem". Optymalizacja polega na uzyskaniu intensywnego, wąskiego piku z równoczesnym przesłonięciem pozostałych elementów, w szczególności tła widma ciągłego.

8.3. Pomiary zogniskowanej wiązki

8.3.1. Przekrój poprzeczny - średnica oraz profil wiązki

Wiązka fotonów kierowana w określony punkt praktycznie zawsze ulega geometrycznemu poszerzeniu. Rozmycie wiązki jest wynikiem wielu niezależnych od siebie czynników. Rozkład zmiennej losowej zależnej od wielu różnych czynników przyjmuje zazwyczaj postać

rozkładu normalnego, dlatego intensywność wiązki fotonowej w przekroju poprzecznym najczęściej ma postać dwuwymiarowej krzywej Gaussa z maksimum leżącym w osi wiązki (Rys. 27)





Rys. 27 a) Obraz wiązki na ekranie scyntylatora (szczegóły pomiaru w dalszej części pracy) oraz profil wiązki uzyskany na podstawie obrazu b) dwuwymiarowy model rozkładu intensywności wiązki

Średnica wiązki jest jednym z kluczowych parametrów charakteryzujących układ mikrowiązkowy. W przypadku wiązki "gausopodobnej" należy wybrać miejsce na osi intensywności, gdzie definiowana będzie średnica wiązki. Najczęściej przyjmuje się tu połowę maksymalnej intensywności piku FWHM (Full Width at Half Maximum) lub współrzędną, dla której intensywność wynosi $1/e^2$ intensywności maksymalnej. Szerokość połówkową piku oraz odchylenie standardowe rozkładu normalnego σ łączy zależność [49]

$$FWHM = 2\sqrt{2\ln 2}\,\sigma \approx 2,35482\,\,\sigma \tag{3}$$

Najbardziej znaną metodą pomiaru przekroju poprzecznego wiązki jest tzw. metoda noża (ang. knife edge, gaussian edge). W metodzie tej wiązka jest stopniowo przesłaniana przez

ostrą krawędź. Po każdym przesunięciu krawędzi rejestrowana jest intensywność wiązki, która w funkcji położenia ostrza przyjmuje kształt dystrybuanty rozkładu normalnego. Otrzymaną krzywą można aproksymować funkcją postaci [50]

$$y = \frac{P_1}{2} \left(1 \pm erf\left(\frac{\sqrt{2}(x - P_2)}{P_3}\right) \right) + P_4$$
(4)

gdzie P_1 odpowiada całkowitej intensywności wiązki, P_2 położeniu maksimum piku, P_4 linii zerowej, a P_3 to promień wiązki dla 1/e² intensywności maksymalnej (Rys. 28).



a)

Rys. 28 a) Zmierzona intensywność wiązki w funkcji położenia krawędzi b) parametry aproksymacji

Funkcję błędu przyjmuje się ze znakiem ujemnym, kiedy ostrze zasłania wiązkę, lub ze znakiem dodatnim, kiedy wiązka jest odsłaniana (tj. na rysunku Rys. 28). Szerokość połówkową piku oblicza się z zależności

$$FWHM = 0.18 * P_3$$
 (5)

Pomiar metodą noża powtarzany jest dla kolejnych odległości od powierzchni zwierciadeł. W ten sposób otrzymuje się profil wiązki oraz optymalną odległość, gdzie szrokość połówkowa piku jest najmniejsza (Rys. 29)



Rys. 29 Parametr P3 w funkcji odleglości od powierzchni zwierciadeł. Wykres ilustruje profil wiązki.

8.3.2. Widmo promieniowania oraz intensywność wiązki

Widmo promieniowania wiązki jest wynaczane przy użyciu detektora Amptek XR-100 [52] (Rys. 30a), który jest elementem traktu pomiarowego i służy do wyznaczenie strumienia fotonów. Ognisko znajduje się w odległości zaledwie kilku milimetrów od powierzchni elementu ogniskującego, dlatego detektor musi być pozycjonowany bardzo dokładnie, także ze względu na bardzo niewielkie rozmiary wiązki. Detektor Amptek XR-100 jest chłodzony termoelektrycznie, dzięki czemu jest on lekki i może być łatwo pozycjonowany. Powierzchnia czynna detektora to 6mm², a jego zdolność rozdzielcza przy energii 5,9 keV wynosi 145 eV (FWHM). W czasie pomiaru powierzchnia czynna detektora pozycjonowana jest do ogniska wiązki. Zmierzona intensywność wiązki w ognisku przy napięciu anodowym lampy 40 kV i prądzie targetu 30 μA wynosi ok. 1,75 · 10⁵ fotonów na sekundę.



a)

Rys. 30 a) pomiar widma przy użyciu detektora Amptek b) widmo wiązki bezpośredniej c) widmo zogniskowanej monochromatycznej o energii 4,5 keV [17]



8.4. Układ pozycjonowania i podglądu próbki

Kolejnym krokiem po zogniskowaniu i wyznaczeniu parametrów wiązki jest pozycjonowanie układu optycznego do podglądu próbki. Komórki obserwowane są przy użyciu kamery cyfrowej zamocowanym poziomo mikroskopem optycznym (Rys. 21 na stronie 46). Oświetlenie mikroskopu doprowadzane jest z zewnętrznego urządzenia zamocowanym poprzecznie światłowodem i trafia na próbkę poprzez okular (Rys. 31a) Zdolność rozdzielcza mikroskopu (1,5 µm) oraz wzpółczynnik kalibracji odległości na obrazie w pikselach do rzeczywistego przemieszczenia pozycjonerów w mikrometrach (0,3 µm/piksel) wyznaczone zostały w oparciu o specjalny wzorzec (Rys. 31b,c). Jest to litograficzny obraz prostokątów oraz zawartych w nich kropek i równoległych linii wykonanych z wolframu, umieszczonych na krzemowym podłożu [44]. Wzorzec umożliwia także określenie dokładności pozycjonerów próbki (0,75 µm). Powyższe procedury zostały szczegółowo opisane w raporcie technicznym [17], a pliki z obliczeniami zostały załączone na płycie CD.



Rvs. 31 a) Mikroskop Z poprzecznym wewnętrznym oświetleniem. Światło doprowadzane jest ze źródła (firma SCHOTT) światłowodem. Widoczny joystick do automatycznej regulacji ostrości oraz powiększenia b) fragment wzorca do pomiaru rozdzielczości obserwowany w mikroskopie do pozycjonowania próbki c) elementy patternu obserwowane w mikrokoskopie w pracowni biologicznej



Napromienianie pojedynczych komórek wymaga zlokalizowania wiązki mikroskopem optycznym, pracującym przy takich samych ustawieniach jak w trakcie przebiegu eksperymentu (maksymalne powiększenie). Przetworzenie promieniowania rentgenowskiego na światło widzialne odbywa się w cienkiej warstwie umieszczonego w ognisku ekranu scyntylatora P43 (Gd₂O₂S:Tb). Kryształy scyntylatora wykazują własności luminescencyjne, co związane jest z istnieniem przerwy energetycznej pomiędzy pasmem walencyjnym a pasmem przewodzenia [14]. Energia uwolniona w wyniku przejścia elektronu z poziomu donorowego (domieszka Tb) do pasma walencyjnego odpowiada promieniowaniu o długości fali równej 545 nm (barwa zielona - Rys. 32) [35].



Rys. 32 a) Zdjęcie nieprzesłoniętej wiązki wykonane aparatem fotograficznym umieszczonym we wnęce pomiarowej (ISO 100, czas ekspozycji 30 sekund). Obraz został znacznie rozjaśniony, gdyż w czasie pomiaru panuje całkowita ciemność. Po lewej stronie u góry zdjęcia scyntylatora [17] b) zdjęcie wiązki zogniskowaniej widzianej przez mikroskop na ekranie scyntylatora.

Oprócz pozycjonowania w płaszczyźnie prostopadłej do osi wiązki mikroskop musi zostać również wypozycjonowany w samej osi wiązki. Kiedy mikroskop pracuje przy maksymalnym powiększeniu, scyntylator ustawiany jest w takiej pozycji, aby jego ziarna były w mikroskopie wyraźnie widoczne (ostre). W tej konfiguracji mikroskop i scyntylator, zachowując stałą odległość A od siebie, poruszają się w osi wiązki zmieniając odległość B w zakresie kilku milimetrów aż do uzyskania najmniejszej i najintensywniejszej plamki obserwowanej na ekranie scyntylatora (Rys. 33) [17]. Zoptymalizowana odległość B wynosi ok. 95 mm.



Rys. 33 a) Optymalizacja układu w osi wiązki b) Profil wiązki uzyskany w trakcie optymalizacji

Po optymalizacji mikroskopu jego położenie jest ustalone i nie zmienia się w czasie eksperymentów. Po umieszczeniu szalki z komórkami na wysięgniku należy przemieścić ją w osi wiązki w miejsce, w którym przy maksymalnym powiększeniu mikroskopu komórki są widocze ostro. Wtedy znajdują się one w płaszczyźnie ogniska wiązki (Rys. 34).



Rys. 34 Po optymalizacji położenia mikroskopu jego płaszczyzna ogniskowania oraz płaszczyzna, na której znajduje się ognisko wiązki pokrywają się [17].

Po wypozycjonowaniu układu, na podstawie współczynnika kalibracji mikrometr/piksel, jak również na podstawie obrazu komórek i położenia wiązki obserwowanych w mikroskopie, możliwe jest napromienianie wybranych pojedynczych komórek (Rys. 35). Wszystkie powyższe procedury zostały opisane w raporcie technicznym [17]. Na płycie CD dostępny jest krótki film przedstawiający napromienianie pojedynczych komórek.



Rys. 35 Ilustracja metody napromieniania pojedynczych komórek.

Na obrazie komórek wczytywany jest punkt P1, oznaczony jako środek wiązki na analizowanym wcześniej zdjęciu ogniska. Na zdjęciu komórek manualnie oznaczane są komórki przeznaczone do napromienienia. Na podstawie współczynnika kalibracji mikrometr/piksel pozycjonery przesuwają szalkę tak, aby wybrane komórki znajdowały się kolejno w ognisku wiązki. Animacja jest dostępna na płycie CD.

9. Hodowla komórkowa i procedury biologiczne

Napromieniane w ramach prezentowanej pracy komórki pochodzą z hodowli komórkowej prowadzonej w IFJ PAN przy współpracy z Katedrą Biochemii Lekarskiej CM UJ. Hodowla komórkowa umożliwia utrzymywanie poza organizmem żywych komórek przez okres ponad 24 godzin. W badaniach hodowle komórkowe zapewniają kontrolę środowiska oraz powtarzalność wyników badań [37]. Hodowle komórek dostępne są w formie tzw. linii komórkowych. Są to populacje komórek otrzymywane z hodowli pierwotnej po pierwszym pasażu, czyli przeniesieniu komórek z dotychczasowego naczynia do nowego [37]. Hodowle pierwotną otrzymuje się z komórek pobranych bezpośrednio z żywego organizmu. Komórki muszą być pasażowane co pewien czas aby zapobiec sytuacji, w której w wyniku wielu kolejnych podziałów pokrywają one gęsto całą powierzchnię, na której rosną (zjawisko tzw. konfulencji), co może doprowadzić do "zniszczenia" hodowli [37]. Podczas pasażowania komórki "rozcieńcza" się w odpowiednim stosunku i przenosi do nowych naczyń, namnażając w ten sposób ich populacje i zapewniajac równocześnie ciagłość jednolitego materiału do badań [37]. Zazwyczaj po trzecim pasażu linia staje się stabilna, co oznacza, że komórki charakteryzują się ustalonym tempem podziałów. Linie komórkowe uzyskane ze zdrowych komórek posiadają ograniczoną liczbę pokoleń. Możliwa jest zatem tylko określona liczba pasaży, co jest odzwierciedleniem starzenia się populacji komórkowych w warunkach in vivo [37]. Natomiast komórki nowotworowe izolowane z guzów mają praktycznie nieograniczoną zdolność do proliferacji. Linie komórkowe uzyskane z tych komórek to linie ciągłe, które można pasażować nieskończoną ilość razy. Pierwszą hodowlę takich komórek (i w ogóle pierwszą hodowlę komórkową na świecie) stworzył amerykański naukowiec George Otto Gey [40]. Komórki nowotworu szyjki macicy zostały pobrane od Henrietty Lacks¹¹ - 31letniej pacjentki szpitala Johns Hopkins w Baltimore (USA), która w 1951 roku zmarła na skutek choroby [36]. Od pierwszych liter imienia i nazwiska Henrietty Lacks wywodzi się

¹¹ Dla zachowania anonimowości Henrietta Lacks przez długi czas znana była jako Helen Larson [36].

nazwa pierwszej linii komórkowej - HeLa. Obecnie na świecie istnieją komercyjne banki hodowli komórkowych, gdzie dostępne są tysiące różnych rodzajów komórek. Każda linia posiada swój unikalny identyfikator, składający się zazwyczaj z pierwszych liter charakteryzujących dany rodzaj komórek (np. linia CHO - Chinese Hamster Ovary [cells] -Komórki jajnika chomika chińskiego).

W Instytucie Fizyki Jądrowej PAN prowadzone są hodowle kilku linii komórkowych. W niniejszej pracy wykorzystane zostały komórki nowotworowe linii PC3. Linia ta wywodzi się z przerzutu komórek nowotworu prostaty do kości [38]. Komórki te przechowywane są w specjalnych sterylnych butelkach hodowlanych, gdzie przylegają do ścianki poziomo ułożonej butelki. Komórki zanurzone są w medium hodowlanym - substancji dostarczającej im składników odżywczych niezbędnych do ich przeżycia, wzrostu oraz różnicowania, jak również stanowiącej odpowiednie środowisko zewnętrzne. Butelki hodowlane z komórkami znajdują się w inkubatorze zapewniającym odpowiednią temperaturę (37°C) oraz wilgotność powietrza. Natomiast w celu napromienienia w przeddzień eksperymentu komórki przenoszone są na cienkią folię mylarową zakrywającą otwór w dnie szalki Petriego (Rys. 36). Dzięki swojej niewielkiej grubości (1,5 μm) folia mylarowa w niewielkim stopniu rozprasza wiązkę promieniowania nie powodując jej znacznego poszerzenia.



Rys. 36 Szalka Petriego z wykonanym w podstawie otworem o średnicy 10 mm wypełnionym przez medium hodowlane

Procedura przenoszenia komórek na folię mylarową, potocznie nazywana "wysiewaniem komórek", została opisana w pracy [39]. W ciągu kilkunastu godzin po przeniesieniu, dzięki czynnikom adhezyjnym komórki przyklejają się do folii oraz ulegają dalszej proliferacji. Przed napromienieniem medium musi zostać odciągnięte, celem uniknięcia przesunięcia obrazu związanego z załamaniem światła na granicy ośrodków (rozdział 12 - wnioski). Przykrywka szalki zastępowana jest cienką folią spożywczą, izolującą komórki od czynników zewnętrznych i umożliwiającą równocześnie podgląd mikroskopowy. Po napromienieniu uzupełniane jest medium hodowlane, a szalka umieszczana jest z powrotem w inkubatorze. W czasie napromieniania komórki są w fazie G1 cyklu komórkowego [dodatek E]. Dalszy schemat postępowania po napromienieniu zależy od rodzaju prowadzonego eksperymentu. W ramach niniejszej pracy prowadzono cztery rodzaje analiz: badanie przeżywalności komórek, obserwację mikrojąder, obserwację uszkodzeń DNA w zależności od dawki oraz badanie kinetyki naprawy DNA. Kolejne podrozdziały przedstawiające przebieg poszczególnych eksperymentów poprzedzone zostały charakterystyką znaczników fluorescencyjnych łączących się z DNA, wykorzystywanych w opisanych dalej analizach.

9.1. Stosowane odczynniki

Poniższe analizy bazują na wykorzystaniu związków chemicznych będących znacznikami fluorescencyjnymi. Po wzbudzeniu ich światłem o określonej długości fali w mikroskopie fluorescencyjnym można obserwować ich świecenie. Jednak najistotniejszą cechą tych związków jest to, że łączą się one z DNA. Odbywa się to na zasadzie interkalacji, czyli przyłączania się niewielkich cząsteczek do związków wielocząsteczkowych, których cząsteczki związane są ze sobą wiązaniami wodorowymi lub siłami van der Waalsa [40]. Taką cząsteczką jest właśnie DNA, gdzie pary zasad nukleinowych połączone są ze sobą wiązaniami wodorowymi. Wykorzystywane znaczniki wnikają do wnętrza helisy umożliwiając lokalizację samego DNA, lub charakterystycznych związków pojawiających się w miejscu, gdzie nastąpiło jego uszkodzenie. W przeprowadzonych badaniach wykorzystano znacznik DAPI, jodek propidyny oraz antyciało histonowe gamma-H2AX z barwnikiem Alexa Fluor 488.

9.1.1. DAPI

DAPI to barwnik fluorescencyjny silnie wiążący się z DNA. Skrót prawdopodobnie zawdzięcza swojej nazwie systematycznej w języku angielskim (4', 6-diamidino-2phenylindole). DAPI przenika zarówno przez uszkodzone jak i nienaruszone błony komórkowe, dzięki czemu jest używany do wybarwiania wszystkich komórek, zarówno żywych jak i utrwalonych [40]. DAPI wzbudzany jest światłem ultrafioletowym. Kiedy jest związany w DNA, maksimum absorpcji odpowiada długości fali równej 358 nm, a maksimum emisji 461 nm, przez co w mikroskopie fluorescencyjnym komórki wybarwione tym znacznikiem mają niebiesko-fioletowy kolor (Rys. 37).



Rys. 37 Komórki wybarwione znacznikiem DAPI w eksperymencie prowadzonym w ramach niniejszej pracy

9.1.2. Jodek propidyny

Jodek propidyny (ang. PI - propidium iodide) - podobnie jak DAPI, łączy się z DNA, jednak może on wniknąć do komórek tylko poprzez uszkodzone błony komórkowe, dlatego stosowany jest do oznaczenia martwych komórek. Po wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali 488 nm jodek propidyny emituje czerwone światło (Rys. 38).



Rys. 38 Komórki linii MG63 wybarwione jodkiem propidyny (*fot.: dr Anna Wiecheć*). Jodek propidyny oprócz jąder komórkowych wybarwia również cytoplazmę, co umożliwia wizualizację całych komórek. Wyniki analiz z jodkiem propidyny zostały także opisane w pracy [41].

9.1.3. Przeciwciała Anti-phospho-Histone γ-H2AX oraz Alexa Fluor 488

Przeciwciało Anti-phospho-Histone γ-H2AX wraz ze znacznikiem fluorescencyjnym Alexa Fluor 488 stosowane jest do lokalizacji podwójnych uszkodzeń DNA na zasadzie immunofluorescencji - techniki pozwalającej śledzić obecność (ekspresję) oraz lokalizacje docelowego białka w komórce [42]. Podstawową jednostką chromatyny jest nukleosom [Dodatek E - Rys. 69 str 107), składający się z DNA oraz formujących go białek, zwanych histonami. Wyróżniamy cztery rodzaje histonów: H2A, H2B, H3 oraz H4. W komórkach ssaków, w odpowiedzi na powstanie podwójnego uszkodzenia DNA dochodzi do charakterystycznej zmiany jednego z podtypów histonu H2A, oznaczanego jako H2AX [42]. Zmiana ta polega na przyłączeniu do białka reszty fosforanowej, stąd nazywana jest fosforylacją. Powstaje wówczas fosforylowana postać H2AX, oznaczana jako γ-H2AX. γ-H2AX akumuluje się w miejscach uszkodzenia DNA, gdzie uruchamia kaskadę czynników naprawczych, aktywując białka biorące udział w naprawie DNA [42]. Przeciwciało Antiphospho-Histone łączy się z γ-H2AX w miejscach, gdzie nastąpiły podwójne uszkodzenia DNA. Z kolei Alexa Fluor 488 jest markerem fluorescencyjnym, wzbudzanym światłem o długości fali 488 nm, i równocześnie antyciałem skierowanym przeciw Anti-phospho-Histone (tzw. przeciwciało drugorzędowe). Przyłączanie się markerów Alexa Fluor do Anti-phospho-Histone umożliwia zatem wizualizację oraz lokalizację podwójnych uszkodzeń DNA.



Rys. 39 Wybarwianie Alexa Fluor 488 komórek napromienionych mikrowiązką promieniowania X w IFJ PAN. Jasne czerwone kropeczki lokalizują miejsca wystąpienia podwójnych uszkodzeń DNA.

9.2. Metody analiz biochemicznych

9.2.1. Badanie przeżywalności komórek

Po napromienianiu komórki inkubowane były przez okres 24, 48 oraz 72 godzin. Po tym czasie były wybarwiane odczynnikiem Hoechst33342 (substytut DAPI), a następnie jodkiem propidyny. W mikroskopie fluorescencyjnym obserwowano komórki oświetlane promieniowaniem UV wzbudzającym Hoechst, a następnie światłem wzbudzającym jodek propidyny. Nałożenie na siebie dwóch obrazów umożliwia obrazowanie apoptotycznych komórek na tle wszystkich pozostałych widocznych w obrazie mikroskopowym.

9.2.2. Obserwacja mikrojąder

Nieaprawione DNA może skutkować odłączeniem się jego fragmentów, które podczas podziału komórki nie zostają wcielone do żadnego z jąder komórkowych. Wokół odseparowanych fragmentów DNA tworzy się błona jądrowa. W ten sposób powstają małe jądra, zwane mikrojądrami. Mikrojądra mają kształt okrągły lub owlany i są dobrze oddzielone od reszty jądra. Rozmiar mikrojąder jest różny i zależy od długości odseparowanego fragmentu DNA. Mikrojądra indukowane promieniowaniem są małe i mają

zwykle średnicę 6-12 um. Większość (ok. 80%) mikrojąder ma rozmiary rzędu 6% głównego jądra i zawiera 6-20% jego zawartości [39]. Mikrojądra wybarwiają się w taki sam sposób jak jądro. W celu obserwacji mikrojąder po napromienianiu komórki były zalewane medium hodowlanym z dodatkiem cytochalazyny B [39]. Jest to substancja blokująca cytokinezę, czyli podział cytoplazmy towarzyszący podziałowi komórki. W rezultacie po niepełnym podziale komórki w obrębie jednej błony komórkowej widoczne są dwa jądra.

Po napromienieniu komórki są inkubowane przez okres 24, 48 i 72 godzin. W kolejnym kroku, po odciągnięciu medium hodowlanego, komórki są przemywane roztworem soli fizjologicznej PBS (ang. Phosphate Buffered Saline) a następnie utrwalane przygotowanym na świeżo roztworem metanolu i kwasu octowego (w proporcji 9:1). Po odciągnięciu utrwalacza i przepłukaniu w wodzie destylowanej komórki barwione są w roztworze jodku propidyny i fluoresceiny rozcieńczonych w PBS (odpowiednio 5 µg/ml i 10 µg/ml) lub w roztworze 10 ml błękitu metylenowego (barwnik Giemzy) w 40 ml wody destylowanej. Po wybarwieniu można obserwować dwujądrzaste komórki, a także obecne w nich mikrojądra. Przykładowe zdjęcie mikrojąder uzyskane po napromienieniu mikrowiązką X w IFJ PAN przedstawia rysunek Rys. 40.





Rys. 40 Test mikrojądrowy a) komórki nieuszkodzone b) komórki z mikrojądrami (*fot.: dr Anna Wiecheć, mgr inż. Konrad Tkocz*)

9.2.3. Obserwacja uszkodzeń DNA

Po napromienieniu komórki są inkubowane przez czas określony warunkami danego eksperymentu, a następnie po przepłukaniu w soli fizjologicznej PBS utwalane w roztworze 1.5 % paraformaldehydu (PFA) przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Po odciągnięciu utrwalacza PFA komórki zalewane są 70% roztworem etanolu i przechowywane w temperaturze -20°C przez okres od 24 godzin do 2 tygodni. Kolejnym etapem, przeprowadzanym w dniu analiz, jest permeabilizacja (uprzepuszczalnienie) błon komórkowych, dzięki czemu barwniki stosowane w analizach mogą łatwiej wniknąć do wnętrza komórki. Permeabilizacja przeprowadzana jest przy użyciu specjalistycznego detergentu - trytonu X. Po odsączeniu detergentu i przepułkaniu w PBS komórki inkubowane są przez 2 godziny w roztworze zawierającym antyciało Anti-phospho-Histone y-H2AX. Następnie po przepłukaniu buforem TBP (ang. TATA [Box] Binding Protein¹²) komórki są inkubowane przez godzinę w roztworze zawierającym przeciwciała drugorzędowe Alexa Fluor 488. Po odsączeniu roztworu i kolejnym przepłukaniu w TBP stosowany jest barwnik DAPI. Przy oświetleniu próbki światłem o długości fali 488 nm na ciemnym tle widoczne są czerwone plamki w miejscach powstania podwójnych uszkodzeń DNA (Rys. 39). Z kolei oświetlenie promieniowaniem UV wzbudza DAPI, obrazując komórki (Rys. 37). Z nałożenia na siebie tych dwóch obrazów otrzymuje się wizualizację podwójnych uszkodzeń DNA w komórkach (Rys. 41).

¹² Białko przyłączające się do sekwencji TATA w DNA - cherakterystycznego szeregu adenin i tymin



Rys. 41 Nałożenie wybarwień komórek otrzymanych przy użyciu DAPI oraz Alexa Fluor

Obserwacje uszkodzeń DNA prowadzone były w ramach dwóch eksperymentów: badania zależności dawka-efekt oraz kinetyki naprawy podwójnych uszkodzeń DNA. W badaniu zależności dawka-efekt wszystkie próbki utrwalane są po upływie tego samego czasu. W przeprowadzonych eksperymentach przyjęto czas 30 minut. Natomiast w badaniach kinetyki naprawy DSB próbki utrwalane są po różnych czasach. Komórki utrwalano po 30 minutach oraz 1,3,7 i 10 godzinach po napromienieniu.

CZĘŚĆ 3 - WYNIKI I WNIOSKI

10. Oszacowanie dawki

W celu wyznaczenia dawki należy oszacować masę pojedynczej komórki. W tym celu wykorzystano wyniki pomiarów topograficznych komórek PC3 wykonanych przy użyciu mikroskopu sił atomowych. W oparciu o topografie komórek wyznaczony został statystyczny profil komórki PC3. Do analizy topografii wykorzystano darmowy program WSxM dostępny w internecie [43]. Obliczenia zostały wykonane w programie *Mathematica* (licencja Wydziału



Matematyki Stosowanej AGH) i dołączone na płycie CD.

Rys. 42 Profil komórki uzyskany w programie WSxM w oparciu o obraz topografii komórek wykonany przy pomocy mikroskopu sił atomowych (*fot.: mgr Katarzyna Pogoda*).

Program WSxM umożliwia eksport profili do arkusza Excel, i tym samym ich dokładną analizę. Satatystyczny profil komórki PC3 został przybliżony wypukłą parabolą o miejscach zerowych znajdujących się w odległości odpowiadającej średniej szerokości komórki u

podstawy oraz maksimum odpowiadającym średniej wysokości komórki w najwyższym punkcie. Średni promień komórki u podstawy wynosi 15 μm, a średnia wysokość 3,5 μm.



Rys. 43 Statystyczny profil komórki PC3 "rozpłaszczonej" na szalce Petriego

Statystyczny profil komórki opisany jest równaniem paraboli

$$h(x) = -0.01556x^2 + 3.5 \tag{6}$$

Kształt komórki przybliżony został zatem paraboloidą o równaniu

 $H(x, y) = -0.01556(x^2 + y^2) + 3.5.$



Rys. 44 Paraboloida przybliżająca statystyczny kształt komórki PC3 "rozpłaszczonej" na folii mylarowej

Objętość komórki można wyznaczyć za pomocą całki obrotowej. Wyobraźmy sobie zawartą w paraboloidzie H(x,y) rurę o promieniu x, grubości ścianki dx i długości h(x) (Rys. 45). Objętość paraboloidy można przedstawić jako sumę objętości ścian wielu takich rur kaskadowo zawartych w sobie.



Rys. 45 Rura zawarta o promieniu x, długości h(x) i grubości ścianek dx, zawartą w paraboloidzie H(x,y).

Objętość ściany rury wynosi $V_r = 2\pi x h(x) dx$. Objętość paraboloidy otrzymamy całkując to wyrażenie od zera do miejsca przecięcia się profilu z płaszczyzną podstawy.

$$V_{K} = 2\pi \int_{0}^{R_{k}} x \cdot h(x) \, dx = 2\pi \int_{0}^{15} x \left(-0.01556 \, x^{2} + 3.5\right) dx = 1236 \, \mu m^{3}$$
(7)

Obliczona w ten sposób objętość przyczepionej do podłoża statystycznej komórki PC3 wynosi 1236 µm³. Gęstość materiału komórki przybliżamy gęstością wody, zatem masa komórki wyniesie

$$m_{K} = V_{K} \mu m^{3} \cdot 10^{-18} \frac{m^{3}}{\mu m^{3}} \cdot 10^{3} \frac{kg}{m^{3}} = 1,236 \cdot 10^{-12} kg$$
(8)

Profil wiązki w ognisku wyznaczony został na podstawie odczytu intensywności pikseli na obrazie wiązki ze scyntylatora (Rys. 27 na stronie 51). Wyznaczona w oparciu współczynnik kalibracji µm/px (rozdział 8.4) szerokość połówkowa piku FWHM to 20 µm, a odchylenie standardowe zgodnie ze wzorem 3 (strona 51) jest równe $\sigma = FWHM/2,35482 = 8,49322$. Funkcja przekroju wiązki z rysunku Rys. 27 na stronie 51 przyjmuje zatem postać

$$g(x) = \frac{M \cdot e^{-\frac{x^2}{2\sigma^2}}}{\sqrt{2\pi} \cdot \sigma} = M \cdot 0,0469719 \cdot \exp(-0,00693147x^2), \tag{9}$$

gdzie *M* jest pewną stałą kalibracyjną. Podobnie jak w przypadku objętości komórki, poprzez obrót całki z ramienia funkcji g(x) wokół osi *Oy* otrzymujemy "objętość" wiązki, odpowiadającą jej całkowitej intensywności. Przyjmując granice całkowania od 0 do 3σ należy pomnożyć wynik przez 1000/997, ponieważ w przedziale (- 3σ , 3σ) rozkładu normalnego mieści się 99,7% "populacji".

$$I_0 = 2\pi \int_0^{3\sigma} x \cdot g(x) \, dx \cdot \frac{1000}{997} \tag{10}$$

Otrzymujemy wynik $I_0 = 21,0528 M$. Ekstrapolacje pomiarów wykonanych detektorem Amptek dały wynik intensywności wiązki ok. 175000 fotonów na sekundę, zatem M = 175000/21,0528 = 8287,48. Ostatecznie funkcja przekroju wiązki przyjmuje postać



$$g(x) = 389,28 \cdot \exp(-0,00693147x^2) \tag{11}$$

Metoda celowania w pojedyncze komórki jest dość czasochłonna, a kiedy w celu uniknięcia błedu związanego z załamaniem światła na granicy ośrodków (opis w rozdziale 12) komórki pozbawione są medium hodowlanego bardzo istotne znaczenie ma możliwie krótki czas wykonania pomiaru. Dlatego w praktyce stosowana jest metoda tzw. rastra, czyli jednorodne napromienianie wybranego obszaru o kształcie prostokąta (Rys. 47).



Rys. 47 Metoda napromieniania tzw. rastrem. Okręgi symbolizują napromieniane obszary Próbki napromieniane były z krokiem K = FWHM. Rysunek Rys. 48 przedstawia położenia wiązki w kolejnych krokach oraz rozkład funkcji $\Phi(x)$ natężenia promieniowania zsumowanego wzdłuż kierunku ruchu wiązki. Dziedziną funkcji $\Phi(x)$ jest położenie w mikrometrach, a przeciwdziedziną natężenie promieniowania w fotonach/µm²/sek.





Rys. 48 a) Rozkład natężenia wiązki w kolejnych krokach b) Funkcja $\Phi(x)$ - suma rozkładów wzdłuż kierunku ruchu wiązki c) $\Phi(x)$ w okolicy x=0.

W przedziale, w którym $\Phi(x)$ jest funkcją okresową, jej wartość minimalna wynosi $\Phi_{c-min} = 390,8$ [fot/µm²/sek], a maksymalna $\Phi_{c-max} = 437,95$ [fot/µm²/sek]. Amplituda

oscylacji jest zatem równa

$$A_{\Phi c} = \frac{\Phi_{\max} - \Phi_{c-\min}}{2} = 23,57 \left[fot / \mu m^2 / s \right]$$
(12)

a średnie natężenie $I_0 = \Phi_{c-\min} + A_{\Phi c} = 414,37 \text{ fot } / \mu m^2 / s$. Przy odpowiednim kroku $K = 0,7 \cdot FWHM$ amplituda wahań jest zaniedbywalna, i tym samym rozkład natężenia
promieniowania jest stały (Rys. 49). Otrzymujemy padający na komórki równomierny "deszcz fotonów".



Rys. 49 Metoda jednorodnego rastra. Przy kroku wiązki równym 0.7 FWHM (rys a) uzyskuje się stały rozkład sumarycznej intensywności w pewnym przedziale wzdłuż kierunku przemieszczania wiązki.

Po zdefiniowaniu geometrii wiązki oraz komórki można oszacować natężenie promieniowania, które ulega rozproszeniu w komórce. Promieniowanie stanowia monochromatyczne fotony, zatem do określenia intensywności wiązki po przejściu przez warstwę materiału można zastosować eksponencjalne prawo osłabienia Lamberta-Beera [dodatek B]. Promieniowanie, zanim trafia na komórkę, przechodzi przez folię mylarową o grubości 1,5µm, na której znajdują się komórki. Folia mylarowa to kompozycja atomów wodoru, węgla oraz tlenu o masowych udziałach odpowiednio H - 4,2%, C - 62,5%, O -33,3%. Gęstość mylaru wynosi $\rho_{\rm M}=1,4$ g/cm³, a jego masowy współczynnik osłabienia wiązki dla energii 4,5 keV jest równy $\mu_{\rm M}$ =38,36 cm²/g [51]. Zatem liniowy współczynnik osłabienia wiązki fotonów 0 energii 4.5 keV folii mylarowej wynosi w $\sigma_M = \mu_M \cdot \rho_M = 53,704/cm = 0,0053704/\mu m$. Po przejściu przez folię mylarową natężenie wiązki maleje do wartości

$$I_{M} = I_{0} \cdot \exp(-\sigma_{M} \cdot 1.5 \,\mu m) = 411.05 \,[fot \,/\,\mu m^{2} \,/\,s]$$
(13)

Zatem na podstawę komórki pada strumień fotonów o natężeniu

$$I_{MK0} = I_M \cdot \pi R_k^2 = 290554 \, [fot \, / \, s]$$
(14)

Natężenie promieniowania przechodzącego przez komórkę można obliczyć podobnie jak jej objętość. We wzorze 7 w miejsce funkcji określającej wysokość h(x) komórki należy podstawić osłabienie wiązki promieniowania na odcinku równym h(x), czyli $I_M \cdot \exp(-\sigma_W \cdot h(x))$, gdzie σ_W jest liniowym współczynnikiem osłabienia wiązki o energii 4,5 keV w wodzie, równym 0,0058/µm. Zatem natężenie wiązki przechodzącej przez komórkę wynosi

$$I_{K} = 2\pi I_{M} \int_{0}^{R_{k}} x \cdot \exp(-\sigma_{W} \cdot h(x)) dx = 287626$$
(15)

Obliczone w ten sposób natężenie promieniowania przenikającego przez komórkę to I_K =287626 [fot/s]. Zatem w komórce zostaje rozproszonych $I_R = I_M - I_K = 2928$ fotonów w ciągu sekundy, co stanowi prawie dokładnie 1% wiązki padającej na komórkę. Przyjmując, że każdy z fotonów niesie energię 4,51 keV, otrzymujemy moc promieniowania rozproszonego w komórce

$$P_{K} = 2928 \cdot 4510 \, eV / s \cdot 1,602 \cdot 10^{-19} \, C = 2,1158 \cdot 10^{-12} \, J / s \tag{16}$$

oraz moc kermy

$$K^{\bullet} = \frac{P_K}{m_K} = 1,711 Gy/s \tag{17}$$

Dokładne parametry komórek otrzymane z 28 topografii dają średnicę u podstawy $30,75\pm7,75\mu m$ i wysokość $3,44\pm0,56\mu m$. Profile najmniejszej i największej komórki

 $PC3_{\min}(x) = -0,0217 x^2 + 2,87$ opisane odpowiednio równaniami są oraz $PC3_{max}(x) = -0,0108 x^2 + 4.$ Masy tych komórek wynoszą odpowiednio $m_{K-\min} = 0.596 \cdot 10^{-12} kg$ oraz $m_{K-\max} = 1.932 \cdot 10^{-12} kg$, a moc kermy $K_{\min}^{\bullet} = 1.713 Gy/s$ i $K_{\max}^{\bullet}=$ 1,709 Gy/s. Pomimo znacznej różnicy mas pomiędzy największą a najmniejszą komórką, przy równomiernym napromienieniu obszaru moc kermy w komórkach różni się bardzo nieznacznie.



Rys. 50 Matematyczne modele "rozpłaszczonych" komórek PC3: największej, średniej oraz najmniejszej

Kerma określa ilość energii wytworzonej przez promieniowanie w jednostce masy napromienianej substancji. Część tej energii może wydostać się poza napromieniany obiekt, unoszona przez elektrony delta, promieniowanie charakterystyczne lub promieniowanie hamowania, dlatego dawka pochłonięta będzie mniejsza [dodatek B]. Wybicie elektronu z powłoki K wodoru "kosztuje" foton 13 eV, co przy energii 4,5 keV nie ma większego znaczenia. Symulacja przejścia wiązki elektronów o energii 4,5 keV w wodzie (Rys. 51) obrazuje ich zasięg dochodzący do 0,8 µm, zatem niektóre z powstałych w komórce



fotoelektronów oraz elektronów delta wydostaną się poza jej objętość.

Rys. 51 Symulacja początkowo równoległej wiązki 25 elektronów o energii 4.5 keV w wodzie wykonana w programie Casino [16]

Oszacowanie dawki możliwe jest dzięki wykorzystaniu specjalistycznych pakietów obliczeniowych, symulujących oddziaływanie cząstek metodami Monte Carlo [dodatek B]. Wyniki symulacji dawki deponowanej w komórce przez wiązkę fotonów o energii 4,51 keV przedstawiono w pracy [53]. Kształt komórki został przybliżony elipsoidą obrotową o półosiach $a = 15\mu m$, $b = 20\mu m$, $c = 3,7\mu m$. Przy natężeniu padającej wiązki równym $175 \cdot 10^3$ fotonów na sekundę symulowana dawka wynosi 0,65 Gy/s, podczas gdy początkowa energia kinetyczna wszystkich uwolnionych przez promieniowanie elektronów, co w przybliżeniu odpowiada kermie, jest równa 1,04 Gy/s. Symulacje wykonano dla metody celowania w pojedyncze komórki. Dla opisanej powyżej metody rastra na podstawę komórki

pada promieniowanie o większym natężeniu. Inny jest również kształt komórki, jednak różnica ta nie wydaje się duża, stąd można przyjąć, że w obu przypadkach stosunek dawki pochłoniętej do kermy będzie w przybliżeniu taki sam. We wspomnianych symulacjach stosunek ten wynosi 0,65/1,04 = 0,625. W oparciu o przedstawione powyżej obliczenia otrzymujemy moc kermy w przybliżeniu równą 1,71 Gy/s. Przyjmując ten sam stosunek dawki pochłoniętej do kermy w metodzie rastra otrzymamy moc dawki pochłoniętej równą 1,71*Gy/s*.0,625 = 1,06Gy/s.

Stosunek dawki pochłoniętej do kermy można oszacować także w inny sposób. Promieniowanie wiązki pada na komórkę od strony jej podstawy, zatem przestrzenny rozkład torów powstałych fotoelektronów oraz elektronów delta będzie anizotropowy, skierowany w górę komórki, co wynika z zasady zachowania pędu (Rys. 51). Odległość 0,8 µm, którą można przyjąć jako zasięg elektronów o energii 4,5 keV w wodzie, posłuży do wyznaczenia objętości V_m strefy U komórki. Strefa U to objętość ograniczona paraboloidą H(x, y), definiującą kształt komórki (Rys. 44), paraboloidą F(x, y), otrzymaną poprzez translację paraboloidy H(x, y) o wartość -0,8 µm w kierunku wektora prostopadłego do płaszczyzny podłoża, oraz płaszczyzną podłoża. Rys. 52 przedstawia przekrój poprzeczny strefy U jako pole pomiędzy parabolami h(x) (krzywa czerwona) oraz f(x) (krzywa niebieska) ograniczone od dołu osią ox.



Rys. 52 Przekrój poprzeczny strefy U

Paraboloida F(x, y) ma postać $F(x, y) = -0,01556(x^2 + y^2) + 2,7$. Parabola $f(x) = -0,01556x^2 + 2,7$ będąca przekrojem poprzecznym paraboloidy F(x, y), ma miejsca zerowe w punktach $x_1 = -R_a$, $x_2 = R_a$, gdzie $R_a = 13.17 \,\mu m$. Objętość V_D paraboloidy F(x, y), obliczona analogicznie jak w równaniu 7, wynosi

$$V_D = 2\pi \int_0^{R_a} x \cdot f(x) \, dx = 2\pi \int_0^{13,17} x \left(-0.01556 \, x^2 + 2.7 \right) \, dx = 736 \, \mu m^3 \tag{18}$$

Objętość V_m strefy U wynosi $V_m = V_K - V_D = 500 \ \mu m^3$ i stanowi 40,5% całkowitej objętości komórki. Objętość V_D , z której wyswobodzone elektrony nie wydostaną się poza komórkę, stanowi zatem 59,5% całkowitej objętości komórki, co w przybliżeniu odpowiada otrzymanemu stosunkowi dawki pochłoniętej do kermy.

11. Wyniki eksperymentów

11.1. Badanie przeżywalności komórek po napromienieniu

Pierwszym prowadzonym eksperymentem była analiza przeżywalności komórek. Wywołanie apoptozy w komórkach miało być najprostszym eksperymentem sprawdzającym poprawne działanie układu, ostatecznie jednak okazało się niewykonalne. Wbrew wstępnym oczekiwaniom, komórki linii PC3 okazały się bardzo odporne na napromienianie fotonami o energii 4,5 keV. Nawet po 3-4 minutowym napromienianiu pojedynczej komórki, pomimo "astronomicznej" dawki sięgającej 200 Gy nie zaobserwowano efektu apoptozy. Podobny rezultat otrzymał Autor pierwszej pracy prowadzonej na układzie mikrowiązki protonowej w IFJ PAN [34]. W rozdziale 8.2.2 (praca [34]) opisany został wynik badania przeżywalności komórek po napromienieniu każdej z nich liczbą 3000 protonów o energii 2 MeV. Nie zaobserwowano podwyższonego efektu apoptozy. Na końcu rozdziału Autor powołuje się na wynik 10-20% komórek apoptotycznych dla dawki 10-15 Gy przy napromienianiu próbki

szeroką wiązką protonów, jednak brak dokładnych parametrów zastosowanej w tym przypadku wiązki oraz sposobu określenia dawki sprawiają, że trudno jest się odnieść do tego wyniku. Z kolei w pracy [33] w rozdziale 4.2.1 przedstawiono wynik napromieniania komórek linii MKN-7 (komórki nowotworu żołądka) przy mikrowiązce protonowej. Parametry wiązki były takie same jak w pracy [34] - 3000 protonów o energii 2 MeV. W tym eksperymencie zaobserowowano efekt apoptozy, zatem komórki linii MKN-7 okazały się znacznie bardziej wrażliwe na napromienianie. Autor pracy [33] podaje wartość dawki, jaką napromieniono komórki - 20,2 Gy. Jest ona dziesięciokrotnie mniejsza od dawki promieniowania X o energii 4,5 keV, deponowanej w komórkach przy mikrowiązce rentgenowskiej w czasie prób wywołania apoptozy. Duża gęstość jonizacji powodowanej przez protony prowadzi jednak do znacznie większej liczby podwójnych uszkodzeń DNA, niż ma to miejsce w przypadku promieniowania fotonowego (rozdział 2). Według danych z tabeli Tabela 2 na stronie 101 współczynnik wagowy protonów o energii 2 MeV jest dwudziestokrotnie większy od współczynnika wagowego dla promieniowania fotonowego. Przyjmując zatem to oszacowanie, dawka 20 Gy zdeponowana przez protony o energii 2 MeV odpowiadała by dawce 400 Gy promieniowania fotonowego. Wnioskując z pracy [34] oraz danych z tabeli Tabela 2 można podejrzewać, że komórki PC3 przeżyły by takie napromienienie. Podobne znaczne wielkości dawek deponowanych w komórkach można znaleźć w pracach [57] oraz [58]. W pracy [57] każda z izolowanych komórek drożdży (ang. yeast cells) napromieniana była polichromatyczną wiązką rentgenowską (anoda Rh) przez 20 minut, co odpowiadało dawce 60 Gy. 20 godzin po napromienieniu komórki nadal ulegały wzrostowi i proliferacji. Ciekawą ilustracją promienioodporności tych komórek są krzywe przeżywalności, przedstawione na rysunku 3 w pracy [58]. Widać, że komórki te są znacznie bardziej wrażliwe na promieniowanie niskoenergetyczne o energii 533-553 eV niż na wysokoenergetyczne promieniowanie izotopu kobaltu ⁶⁰Co. Jednak nawet w przypadku tak niskiej energii 90% komórek ginie dopiero przy dawce ok. 75 Gy.

W badaniach prowadzonych w ramach niniejszego projektu czas napromieniania próbki biologicznej był mocno ograniczony. Szalka Petriego z wyciętym otworem zaklejonym folia mylarową, na której znajdują się napromieniane komórki, ustawiona jest w pozycji pionowej. Powoduje to grawitacyjny odpływ cienkiej warstwy medium hodowlanego pokrywającego komórki lub jego parowanie pod wpływem czynników zewnętrzych, takich jak np. wzrost temperatury związany z oświetleniem próbki w celu jej obserwacji mikroskopowej. W czasie eksperymentu komórki praktycznie pozbawione są medium hodowlanego w celu uniknięcia błędu związanego z przesunięciem obrazu spowodowanym załamaniem światła na granicy ośrodków w czasie pozycjonowania komórek (rozdział 12). Ponieważ w czasie napromieniania komórki są praktycznie pozbawione substancji odżywczych zawartych w medium, dlatego nie moga być naświetlane przez długi czas. Przyjęto, że czas począwszy od momentu przygotowania próbki do naświetlań do momentu uzupełnienia medium po naświetlaniach nie powinien przekroczyć 20 minut. Czas ten obejmuje również ustawienie oraz pozycjonowanie próbki. Śmierć pojedynczych komórek na szalce może nastąpić niezależnie od napromieniania, dlatego miarodajny wynik wymaga odpowiedniej statystyki, a co za tym idzie odpowiedniej liczby napromienionych komórek, stąd ograniczenie związane z czasem napromieniania pojedynczej komórki. Napromienianie komórek w najdłuższym możliwym czasie rzędu 5 minut nie spowodowało apoptozy. Przeżyciowe badanie napromienianych próbek jodkiem propidyny zawsze dawało negatywny wynik - wszystkie komórki przeżywały napromienienie, lub liczba tych, które uległy apoptozie była porównywalna z poziomem tła spontanicznych aktów śmierci pojedynczych komórek. Po wielu eksperymentach dających negatywny wynik zrezygnowano z analiz przeżywalności.

11.2. Test mikrojądrowy

Test mikrojądrowy wykonano dla 5 szalek. Poniższa tebela oraz wykres ilustrują wyniki eksperymentu

sz	dawka / kom. [Gy]	liczba przeanalizowa- nych komórek	liczba komórek z jednym mikrojądrem	liczba komórek z dwoma mikrojądrami	średni odsetek mikrojąder [MN/kom] *100%
1	0 (kontrola)	63	3	0	4,8
2	31,8	105	7	0	6,7
3	42,4	45	2	0	8,9
4	42,4	45	2	2	13
5	42,4	200	19	0	9,5

Tabela 1 Wynik testu mikrojądrowego



Rys. 53 Wynik testu mikrojądrowego. Ze względu na brak powtórzeń, dla szalek 1-2 przyjęto błąd pomiarowy uzyskany dla szalek 3-5.



Rys. 54 Wzrost częstości występowania mikrojąder w napromienianym obszarze (*fot.:dr Anna Wiecheć, mgr inż Konrad Tkocz*)

Powyższe wyniki uzyskane zostały z pierwszego, jedynego jak do tej pory testu mikrojądrowego przeprowadzonego przy mikrowiązce rentgenowskiej. Spośród kilkunastu naświetlanych szalek miarodajny wynik udało się uzyskać jedynie dla pięciu z nich. Liczba punktów na wykresie jest w tym wypadku niewystarczająca do tego, aby na jej podstawie prowadzić spekulacje dotyczące charakteru zależności pomiędzy dawką a prawdopodobieństwem wystąpienia mikrojądra. Widać natomiast pewne podobieństwo pomiędzy wykresem na Rys. 53 a analogicznym wykresem przedstawionym w pracy [34] na rysunku 71 w rozdziale 8.4.

11.3. Obserwacja uszkodzeń DNA

Zdjęcia rozkładów barwników DAPI oraz AlexaFluor nakładane były na siebie jako warstwy obrazu w programie Adobe Photoshop Elements. Po zapisaniu w formacie JPG zawężany był zakres histogramu barw celem otrzymania właściwego kontrastu. Następnie w programie Image-Pro wyznaczane były odczyty średnich intensywności barw wzdłuż wyraźnie oddzielonych od siebie komórek (Rys. 55).



Rys. 55 Analiza wybarwionych komórek w programie Image-Pro

W pracy [39], gdzie komórki napromieniane były mikrowiązką protonową, wyznacznikiem intensywności uszkodzeń DNA była liczba pojedynczych intensywnych wybarwień (tzw. foci). Natomiast po napromienieniu wiązką fotonów wybarwienia są mniej intensywne, jednak mają charakter ciągły. Jest to konsekwencja różnej gęstości jonizacji w przypadku fotonów i cząstek naładowanych, co schematycznie zostało przedstawione na rysunkach Rys. 9 na stronie 21 oraz Rys. 13 na stronie 25 w rozdziale 2.



Rys. 56 Komórki PC3 napromieniane metodą rastra w kwadratowym obszarze [53]. Dawka pochłonięta wynosiła 32 Gy. Komórki zostały utrwalone 30 minut po napromienieniu.

W bezpośrednio napromienianych komórkach wybarwienia mają charakter ciągły. Natomiast w komórkach znajdujących się w bliskim otoczeniu napromienianych widać pojedyncze, dobrze odseparowane wybarwienia. Może to być przejaw efektu widza.

W niniejszej pracy dla każdej analizowanej komórki do arkusza Excel eksportowany był przebieg intensywności barw w formie trzech kolumn - intensywności barwy czerwonej, zielonej oraz niebieskiej (RGB). Ilościowym wyznacznikiem uszkodzeń DNA był stosunek intensywności barwy czerwonej (Red) do intensywności barwy niebieskiej (Blue) wzdłuż wybarwionej komórki (Rys. 55).

W sposób zilustrowany na przeanalizowano 114 komórek w 11 "udanych" szalkach. Zdjęcia komórek oraz pliki Excela z profilami barw RGB załączone zostały na płycie CD. W badniach zależności dawka-efekt udało się otrzymać wyniki dla trzech czasów napromieniania, a w eksperymencie badania kinetyki uszkodzeń dla czterech czasów inkubacji po napromienieniu. Ostateczne wyniki przedstawione zostały na poniższych wykresach.



Rys. 57 Zależność "dawka-efekt". Pierwszy punkt jest średnią z 14 wyników, drugi z 8, a trzeci z 10. Szalki inkubowane były po czasie 30 minut od napromienienia



Rys. 58 Kinetyka naprawy uszkodzeń DNA. Komórki napromienianie były dawką 32 Gy. Pierwszy punkt jest średnią z 6 wyników, drugi z 19, trzeci z 12, czwarty z 6.

Tak jak się spodziewano, wynik potwierdza liniową zależność pomiędzy dawką promieniowania a ilością podwójnych uszkodzeń DNA. Trzy punkty, w które wpasowuje się prosta regresji, są średnią z 32 pomiarów. Punkty te dość dokładnie wpisują się w liniową zależność. Dążenie prostej do wartości 1 dla punktu zerowego sugeruje niezależną od napromienienia progową wartość uszkodzeń DNA. Niezerowy próg liczby wybarwień komórek uzyskano również w pracy [39] dla komórek napromienianych protonami oraz

cząstkami alfa. Szczególnie dobrze widoczne jest to na Rys 24, przedstawiającym kinetykę naprawy DNA po napromienianiu komórek protonami o energii 2 MeV.

W niniejszej pracy, w eksperymencie analizy kinetyki uszkodzeń DNA uzyskano 4 punkty pomiarowe, będące średnią z 43 pomiarów. Najlepszą aproksymacją punktów pomiarowych jest wielomian trzeciego stopnia. Krzywa wskazuje maksimum intensywności uszkodzeń w okolicy 3 godzin inkubacji po napromienieniu. Opóźnienie to może być cechą charakteryzującą kinetykę reakcji antyciała skierowanego przeciwko histonom naprawczym. W pracy [39] zjawisko to można dostrzec na początku krzywych przedstawionych na rysunku 24. Wykres krzywej także sugeruje istnienie progowej intensywności podwójnych uszkodzeń DNA. Z wykresu wynika, że uszkodzenia DNA powstałe w wyniku napromienienia dawką 39 Gy promieniowania fotonowego o energii 4,51 keV komórki PC3 naprawiają całkowicie po średnim czasie ok. 13 godzin. Tego typu informacje mogą być przydatne przy planowaniu radioterapii frakcjonowanej, czyli wielokrotnym napromienianiu guza nowotworowego w określonych odstępach czasu. Z drugiej strony możliwe jest, iż w wyniku mechanizmów adaptacyjnych czas naprawy uszkodzeń po kolejnym napromienieniu tych samych komórek będzie krótszy, co było by dowodem na istnienie zjawiska hormezy radiacyjnej.



Rys. 59 Komórki PC3 napromieniane metodą rastra (dawka 32 Gy) utrwalone 7 godzin po napromienieniu. W tym czasie niektóre z komórek naprawiły już powstałe uszkodzenia DNA.

Podsumowując wykres 58 powróćmy na chwilę do punktu wyjściowego, znajdującego się na końcu części drugiej. Międzynarodowa Komisja Ochrony Radiologicznej definiuje jako małe dawki te, które powodują jonizację we wrażliwych częściach komórki w średnich odstępach czasu dłuższych od czasu potrzebnego na zadziałanie mechanizmu naprawczego. W ostatnich latach pojawiła się możliwość wykonywania cyfrowych zdjęć stomatologicznych. Aparatura przeznaczona do wykonywania takich zdjęć (w tym lampy rentenowskie) stanowi obecnie wyposażenie wielu gabinetów dentystycznych. Ze względu na łatwość, krótki czas wykonania i niskie koszty, zdjęcia takie powtarzane są czasem kilkakrotnie aż do uzyskania najlepszego obrazu (co jest typowe dla fotografii cyfrowej). Jednak w tej sytuacji napromienione komórki nabłonka jamy ustnej mogą nie mieć czasu na naprawę uszkodzeń - czasu, który miały, kiedy zlecone zdjęcie rentgenowskie zęba dentysta oglądał podczas kolejnej wizyty. Częste napromienianie w krótkich odstępach czasu może doprowadzić do transformacji nowotworowych, opisanych w rozdziale 4.2. Badania kinetyki naprawy radiacyjnych uszkodzeń komórek nabłonka jamy ustnej mogły by stanowić pewną sugestię dotyczącą częstości wykonywania zdjęć stomatologicznych.

12. Wnioski

Konstrukcja i wykorzystanie w badaniach radiobiologicznych układu mikrowiązkowego łączy ze sobą dwie dziedziny nauki - fizykę oraz biologię. Rozbudowana część techniczna, jak również obszerna teoria oddziaływań promieniowania z materią, stanowi niewątpliwą zachętę dla fizyków. Należy jednak pamiętać o tym, że eksperymenty prowadzone na skonstruowanym układzie to już *de facto* praca z dziedziny biologii. Zasadnym wydaje się zatem, aby tego typu układy powstawały przy działających już pracowniach biologicznych, a zespół biorących udział w projekcie biologów być przynajmniej tak liczny jak zespół fizyków. Jakość pracowni biologicznej ma kluczowe znaczenie, może nawet większe niż

uzyskane parametry układu fizycznego. Jeżeli wszystkie komórki na szalce giną w wyniku zakażeń, to rozmiar i intensywność wiązki nie mają większego znaczenia.

Napromienianie pojedynczych wybranych komórek jest możliwe, jednak metoda ta napotyka liczne trudności, o których należy pamiętać, szczególnie w czasie prac projektowych związanych z budową stanowiska. Czynniki zewnętrzne, które w skali makroskopowej są niezauważalne, w skali mikro mogą już mieć duże znaczenie. Obciążenie pionowych pozycjonerów przez znajdujące się na nich urządzenia powoduje ich niewielkie (w skali makro) przemieszczanie się w dół, co w mikroskali prowadzi do konieczności nieustannego korygowania ustawień elementów układu. Dlatego szczególnie pionowy pozycjoner układu ogniskującego musi cechować sie bardzo dobrą stabilnością. Również drgania zewnętrzne, będące wynikiem pracy innych urządzeń, nieuważnych trzaśnięć drzwiami lub nawet ruchu ciężkich pojazdów transportu drogowego mogą powodować rozogniskowanie wiązki. Pracownia mikrowiązki powinna zatem znajdować się z dala od miejsc ruchliwych lub podlegających drganiom sejsmicznym. Podstawa układu powinna także zawierać elementy tłumiące drgania. Warto zwrócić także uwagę na zakup odpowiedniej kamery naukowej oraz oprogramowania do akwizycji i analizy obrazu. Obraz mikrowiązki na ekranie scyntylatora cechuje się bardzo niską intensywnością. W przypadku omawianego układu czas akwizycji tego obrazu jest rzędu 1 minuty. W tej sytuacji dodawane do niektórych zestawów mikroskopowych tanie kamery przemysłowe nie będą w stanie sprostać wymaganiom eksperymentu. Dobrym rozwiązaniem zastosowanym w opisywanym układzie jest oprogramowanie Image-Pro, umożliwiające zarówno akwizycję jak i zaawansowaną analizę obrazu. Program umożliwia również sterowanie pozycjonerami próbki przy mikroskopie.

Kolejnym wyzwaniem dla konstruktorów układów przeznaczonych *stricte* do napromieniania pojedynczych komórek jest przesunięcie obrazu związane z załamaniem światła na granicy dwóch ośrodków. Komórki powinny być zanurzone w medium hodowlanym - cieczy dostarczającej im niezbędnych do życia substancji odżywczych. Przesunięcie obrazu zależeć

88

będzie od kształtu menisku oraz grubości kropli medium utrzymującej się w otworze z komórkami. W układzie pionowego ustawienia szalki oba parametry mogą zmieniać się w czasie, zatem bezbłędne celowanie w pojedyncze komórki wymaga utrzymywania ich na praktycznie suchym podłożu. Wiąże się to z pozbawieniem ich substancji odżywczych oraz pozostawieniem w nienaturalnych warunkach, przez co czas napromieniania jest bardzo ograniczony (maksymalnie 20 minut). Poniższy rysunek Rys. 60 ilustruje przesunięcie obrazu w wyniku załamania światła na granicy powietrze-medium hodowlane w układzie mikrowiązki rentgenowskiej w IFJ PAN. Wykorzystano cienką złotą folię do pomiaru zdolności rozdzielczej, przyklejoną po drugiej stronie folii mylarowej zakrywającej otwór w dnie szalki Petriego. Otwór został wypełniony kroplą medium o grubości ok. 2mm. Przesunięcie obrazu wynosi ok 60 mikrometrów, co w przybliżeniu odpowiada podwójnej średnicy statystycznej komórki PC3.



Rys. 60 Ilustracja efektu przesunięcia obrazu wskutek załamania światła na granicy powietrza i medium hodowlanego a) obraz z bardzo cienką warstwą medium b) obraz z warstwą medium o grubości ok. 2 mm c) nałożenie obrazów a i b, d) wykorzystana siatka mikroskopowa o średnicy 3 mm.

Trudna w realizacji metoda napromieniania pojedynczych komórek konieczna jest do prowadzenia badań efektu widza. Natomiast w badaniu zależności dawka-efekt oraz w badaniach kinetyki naprawy radiacyjnych uszkodzeń DNA bardziej efektywny wydaje się sposób opisany w rozdziale 10 - metoda jednorodnego rastra, którą ilustruje Rys. 49 na stronie 73. W metodzie tej obszar, na którym znajdują się komórki, napromieniany jest równomiernie stosunkowo szeroką wiązką. Do optymalnej szerokości wiązki doprowadzą nas poniższe rozważania.

Przy napromienianiu komórek mikrowiązką protonową w IFJ PAN wykonywany otwór w dnie szalki Petriego (Rys. 36 na stronie 59) miał średnicę 10 mm. W przezentowanej pracy średnica otworu D_{otw} została zredukowana do 6 mm, i wydaje się zasadne, aby była ona jeszcze mniejsza np. 4mm. Otwory mogą być wiercone, choć szybszym i wygodniejszym sposobem jest ich wtapianie przy pomocy gorącego ostrza.

W metodzie rastra równomiernie napromieniany jest obszar o kształcie prostokąta. Największy obszar komórek, jaki można w ten sposób naświetlić, stanowi kwadrat wpisany w okrąg o średnicy D_{otw} (Rys. 61).





Bok kwadratu ma długość $a_{otw} = D_{otw} / \sqrt{2}$, zatem dla otworu o średnicy 4mm $a_{otw} \approx 2,83$ mm. W okolicy wierzchołków kwadratu znajduje się granica obszaru, gdzie na komórki hipotetycznie mogą mieć wpływ pewne warunki brzegowe, dlatego napromieniany obszar zmiejszymy do kwadratu boku $a_w = 2,5$ mm, którego pole wynosi $P_w = 6,25$ mm².

Na przykładowym zdjęciu wykonanym przy użyciu mikroskopu do podglądu próbki w skonstruowanym układzie znajduje się ok. 100 komórek (Rys. 62).



Rys. 62 Przykładowe zdjęcie komórek wykonane w mikroskopie do podglądu próbki

Oryginalny obraz ma rozdzielczość 1392 px * 1040 px, co po przeliczeniu (współczynnik kalibracji 0,3 µm/px w rozdziale 8.4) daje obszar o wymiarach 417,6 µm x 313 µm i polu równym $p_k = 0,4176 \ mm \cdot 0,313 \ mm = 0,13 \ mm^2$. Stosunek pola napromienianego kwadratu do pola tego obszaru wynosi $P_w / p_k = 48,08$. Pomnożenie tego stosunku przez liczbę komórek obserwowanych na pojedynczym zdjęciu daje szacunkową liczbę komórek w całym napromienianym obszarze. Z analizy 6 zdjęć średnia liczba komórek na pojedynczym zdjęciu wynosi 106 ± 11 , zatem całym napromienianym obszarze otrzymujemy W $48,08 \cdot (106 \pm 11) = 5048 \pm 529$ komórek. Taka liczba napromienionych komórek wydaje się wystarczająca dla uzyskania dość dobrej statystyki.

Dla wyznaczenia optymalnego rozmiaru wiązki przeanalizujmy jeszcze raz rysunek Rys. 49 ze strony 73.



Rys. 63 Przedruk rysunku Rys. 49

Długość odcinka plateau na wykresie b wynosi $L_{PLAT} = 60 \mu m$, a szerokość połówkowa piku $FWHM = 20 \mu m$. Stosunek $\alpha_p = \frac{L_{PLAT}}{FWHM} = 3$. Zatem przy założeniu, że obszar jest napromieniany z krokiem wiązki równym $0,7 \cdot FWHM$, współczynnik α_p musi być większy lub równy 3, czyli szerokość połówkowa wiązki musi być co najmniej 3 razy mniejsza od oczekiwanej długości plateau, równej długości mniejszego boku napromienianego prostokąta. Zatem dla rozpatrywanego powyżej kwadratu o boku $a_w = 2,5 \text{ mm}$ szerokość połówkowa wiązki nie może być większa niż 830 µm.

W przypadku monochromatycznego źródła promieniowania rentgenowskiego przeznaczonego do badań przeżywalności komórek po napromienieniu wydaje się wskazane, aby energia użytego promieniowania była możliwie jak najniższa. Poparciem tej tezy mogą byc wyniki badań przedstawione w pracy [58]. Dla lampy rentgenowskiej działającej w układzie skonstruowanym w ramach niniejszej pracy producent oferuje również anodę aluminiową o energii promieniowania charakterystycznej linii K_{α} równej 1,49 keV. O ile w przypadku promieniowania o energii 4,51 keV w komórce pochłaniane jest ok 1% wiązki, to w przypadku energii 1,49 keV w komórce rozproszone zostanie 20% padającego na nią promieniowania. Nawet przy uwzględnieniu mniejszej w tym wypadku intensywności promieniowania, wynikającej z jej zależności od masy atomowej materiału anody, jak również większej absorpcji promieniowania w folii mylarowej, przy niezmieniających się pozostałych warunkach napromienienia opisanych w rozdziale 10 moc kermy uwolnionej w statystycznej komórce wyniesie ok. 17 Gy/s (obliczenia na płycie CD), czyli prawie dziesięciokrotnie więcej niż w przypadku promieniowania o energii 4,5 keV.

W metodzie jednorodnego rastra nie celuje się w pojedyncze komórki. Nie ma zatem konieczności odsączania medium hodowlanego, przez co eksperyment może trwać znacznie dłużej. Jest to istotne w przypadku miękkiego promieniowania rentgenowskiego, które ze wszystkich rodzajów promieniowania jonizującego jest najmniej efektywne w uszkadzaniu komórek (stąd m.in. jego powszechne zastosowanie w diagnostyce medycznej). Mimo iż szalka znajduje się w pozycji pionowej, to niewielka kropla medium może utrzymywać się w otworze z komórkami przez długi czas dzięki sile napięcia powierzchniowego (zostało to sprawdzone w czasie wykonywania zdjęć z rysunku Rys. 60). Komórki różną się od siebie rozmiarami, jednak przy padającym na nie jednorodnym "deszczu promieniowania" ilość energii zdeponowanej w danej komórce jest tym większa, im większe jest pole zajmowanej przez nią powierzchni, a im większe jest pole zajmowanej przez komórkę powierzchni tym większa jest jej masa. Zatem dawka otrzymana przez poszczególne komórki będzie bardzo zbliżona, co wykazano na końcu rozdziału 10. W metodzie napromieniania pojedynczych komórek krótki dopuszczalny czas napromieniania wiąże się z niewielką liczbą komórek napromienionych, które przy nieznacznym napromienieniu bardzo trudno jest odnaleźć w niewyraźnym świetle barwników fluorescencyjnych, wśród spontanicznych wybarwień, na powierzchni zapełnionej ogromną ilością pozostałych komórek. W metodzie jednorodnego rastra nie ma tego problemu, a dodatkowymi zaletami są bardzo dobra statystyka oraz efektywne wykorzystanie drogich odczynników. Jako że w metodzie tej nie ma konieczności celowania w pojedyncze komórki, nie ma zatem konieczności obserwacji komórek w układzie przeznaczonym do ich napromieniania, co znacznie obniża wymagania dotyczące układu mikroskopu do podglądu próbki. Uzyskanie wiązki o rozmiarach rzędu milimetra możliwe jest przy zastosowaniu kolimatora lub systemu przesłon, co nieznacznie obniża intensywność wiązki, natomiast wyraźnie obniża koszty. W tej sytuacji uzyskuje się promieniowanie Zmieniajac energię użytego przy polichromatyczne. promieniowania pomocy monochromatora można poszukiwać wartości, dla której współczynnik kierunkowy prostej z rysunku Rys. 57 na stronie 85 osiągnie maksimum. Odkrycie takich zależności rezonansowych w przypadku komórek nowotworowych mogło by być bardzo użyteczne w radioterapii. Metoda jednorodnego rastra może być zatem efektywnym kompromisem pomiędzy dwiema metodami napromieniania komórek, przedstawionymi na Rys. 20 na stronie 43.

Podsumowanie

Wykorzystanie promieniowania jonizującego staje się coraz bardziej powszechne w diagnostyce medycznej i terapii. Najbliższym nam przykładem może być powstające na terenie Instytutu Fizyki Jądrowej PAN nowoczesne Centrum Hadronoterapii. Wydaje się uzasadnione. aby wraz z rozwojem ośrodków medycznych wykorzystujących promieniowanie jonizujące następował także rozwój stanowisk i metod badawczych, umożliwiających dogłębną analizę mechanizmów oddziaływania promieniowania na poziomie komórkowym, gdyż to właśnie na tym poziomie zachodzą zjawiska mogące zadecydować o losie całego organizmu. Taki właśnie układ badawczy został skonstruowany w ramach niniejszej pracy doktorskiej. W Polsce jest to pierwszy układ do napromieniania pojedynczych żywych komórek promieniowaniem rentgenowskim. Wiązka promieniowania X ma w ognisku średnicę ok. 20 mikrometrów, co jest porównywalne ze średnicą pojedynczej komórki. Opracowane zostały metody precyzyjnego pozycjonowania oraz podglądu próbki i ogniska wiązki, jak również metoda automatycznego napromieniania pojedynczych wybranych komórek. Przeprowadzone wstępne eksperymenty potwierdzają możliwości zastosowania układu w badaniach mikrodozymetrycznych, zatem cel pracy został zrealizowany.

Uzyskanie wiązki o rozmiarach rzędu pojedynczych mikrometrów konieczne jest do prowadzenia badań efektu widza. Natomiast do prowadzenia badań kinetyki naprawy radiacyjnych uszkodzeń DNA oraz zależności dawka-efekt można posłużyć się szerszą wiązką, której średnica dochodzi nawet do 1 mm, oraz zaprezentowanym w niniejszej pracy matematycznym algorytmem. Wydaje się, iż to właśnie kinetyka naprawy radiacyjnych uszkodzeń DNA może być kluczowym efektem determinującym skutki działania na organizm niskich dawek promieniowania jonizującego. Zaprezentowana w pracy metoda umożliwia znaczne obniżenie kosztów budowy układu przeznaczonego do badań radiacyjnych uszkodzeń DNA oraz zależności dawka-efekt w komórkach hodowlanych. Stwarza to szanse na większe upowszechnienie tych badań, co z czasem może zaowocować odkryciem nowych zależności pomiędzy parametrami napromieniania a biologicznym skutkiem.



DODATEK A) Liniowy przekaz energii LET

Im większy ładunek niesie cząstka, tym większa jest przestrzenna gęstość wywołanych przez nią jonizacji. Cząstka alfa ma podwójny ładunek dodatni, przez co siła oddziaływań kulombowskich jest duża, co prowadzi do większych strat energii na jednostkę drogi niż ma to miejsce np. w przypadku pojedyczo naładowanego protonu. Ilość energii traconej przez cząstkę na jednostkę drogi w materiale, i tym samym ilość energii przekazanej absorbentowi w jednostkowym odcinku drogi przebytej przez cząstke, określa liniowy przekaz energii LET (Linear Energy Tranfer). Wielkość ta zależy od gęstości materiału oraz energii kinetycznej przemieszczającej się w nim cząstki promieniowania, a w przypadku cząstek naładowanych przede wszystkim od ładunku elektrostatycznego cząstki. Dla promieniowania korpuskularnego LET zmienia się wzdłuż drogi przebytej w materiale absorbenta, można jednak porównać poszczególne cząstki lub ich wiązki pod kątem początkowej lub średniej wartości LET. W przypadku dwóch cząstek o tej samej początkowej energii kinetycznej, ta która ma większy LET będzie szybciej tracić energię w wyniku oddziaływań, przez co będzie mieć krótszy zasięg materiale absorbenta. Podwójny ładunek cząstki alfa, i tym samym intensywne oddziaływanie kulombowskie sprawia, że cząstka ta ma stosunkowo niewielki zasięg w organizmie człowieka, gdzie zatrzymywana jest przez skórę¹³. Najczęściej stosowaną jednostką współczynnika liniowego przekazu energii jest kiloelektronowolt na mikrometr [keV/µm].

¹³ Jednak na tym niewielkim odcinku drogi przebytej w skórze cząstka alfa deponuje znaczną energię, dlatego intensywna wiązka tych cząstek skierowana na skórę może wywołać w niej poważne uszkodzenia. Dosłownie na własnej skórze przekonał się o tym Pierre Curie, celowo przywiązując bandażem do własnego ramienia preparat radowy [5].

DODATEK B) Prawo osłabienia wiązki (Lamberta-Beera)

Spadek natężenia monochromatycznej wiązki na drodze jej przejścia przez jednorodny materiał określa prawo Lamberta-Beera, znane również jako prawo osłabienia wiązki [4]. Prawo to wyraża równanie różniczkowe

$$\mathbf{dI} = -\mathbf{\sigma} \, \mathbf{I} \, \mathbf{dx} \tag{19}$$

gdzie dI to zmiana natężenia równoległej monochromatycznej wiązki promieniowania o natężeniu I spowodowana przejściem tej wiązki przez cienką warstwę materiału o grubości dx posiadającego linowy współczynnik osłabienia wiązki σ . Minus bierze się stąd, że natężenie maleje wraz z drogą przebytą w materiale, czyli przyrost natężenia jest ujemny [14]. Rozwiązaniem równania (19) jest funkcja

$$\mathbf{I} = \mathbf{I}_0 \mathbf{e}^{-\sigma \mathbf{x}} \tag{20}$$

gdzie

- x grubość absorbentu przez który przechodzi promieniowanie
- Io natężenie wiązki padającej na absorbent
- I natężenie wiązki po przejściu przez absorbent
- σ liniowy współczynnik osłabienia wiązki o wymiarze [cm⁻¹]

Dla przykładu możemy rozważyć warstwę jednorodnego materiału o grubości d i liniowym współczynniku osłabienia wiązki σ , przez którą przechodzi emitowana ze źródła wiązka promieniowania o początkowym natężeniu I_0 (Rys. 64).



Rys. 64 Osłabienie wiązki w trakcie przejścia przez materiał [14]

Rejestrowane przez detektor natężenie przechodzącej wiązki Ir wynosi

$$\mathbf{I}_{\mathbf{r}} = \mathbf{I}_{\mathbf{0}} \, \mathbf{e}^{-\sigma \, \mathbf{d}} \tag{21}$$

Funkcja będąca rozwiązaniem równiania (19) jest tzw. zanikającą eksponentą (Rys. 65).



Rys. 65 Ubytek natężenia monochromatycznej wiązki o początkowym natężeniu I₀ w funkcji drogi przebytej w materiale [14]

Liniowy współczynnik osłabienia wiązki σ określa ubytek natężenia wiązki promieniowania na jednostkę odległości, którą wiązka ta przebywa w absorbencie. W praktyce posługujemy się również masowym współczynnikiem osłabienia wiązki μ , zdefiniowanym wzorem

$$\mu = \frac{\sigma}{\rho}$$

gdzie p jest gęstością materiału.

DODATEK C) Dawka promieniowania

Promieniowanie jonizujące, tak jak każdy inny rodzaj promieniowania, padając na dany obiekt przekazuje mu pewną energię. Energia ta deponowana jest w napromienianym obiekcie poprzez opisane w rozdziale 2 zjawiska oddziaływań. Ilość energii deponowanej przez promieniowanie w jednostce masy napromienianej substancji określana jest jako dawka pochłonięta [2].

$$\mathbf{D} = \mathbf{E} / \mathbf{m} \tag{22}$$

D - dawka, E - energia, m - masa

Podstawową jednostką definiującą dawkę promieniowania jonizującego jest grej [Gy].

$$[Gy] = [J] / [kg]$$

Innym sposobem określenia wielkości napromienienia obiektu jest dawka ekspozycyjna, zwana również ekspozycją. Określa ona całkowity ładunek jonów jednego znaku wytworzonych przez promieniowanie w jednostce masy napromienianej substancji.

$$\mathbf{X} = \mathbf{Q} / \mathbf{m} \tag{23}$$

gdzie X - ekspozycja, Q - całkowity ładunek, m - masa. Jednostką ekspozycji jest rentgen

$$[R] = [C] / [kg]$$

Powyższe wielkości opisują skutek zakończonych już oddziaływań promieniowania z materiałem. Wielkościami charakteryzującymi promieniowanie jako czynnik oddziaływujący na bieżąco są strumień oraz moc dawki pochłoniętej. Strumień promieniowania definiowany jest jako suma długości torów wszystkich cząstek penetrujących daną objętość

$$\Phi = \frac{dl}{dV} \tag{24}$$

Moc dawki pochłoniętej to stosunek dawki pochłoniętej do czasu, w którym promieniowanie zdeponowało swoją energię

$$\mathbf{D}^{\mathrm{t}} = \mathrm{d}\mathbf{D} / \mathrm{d}\mathbf{t} \tag{25}$$

Wielkość ta ma szczególne znaczenie w przypadku napromieniania żywych organizmów. Istotne jest, czy przykładową dawkę 100 mGy organizm otrzymał na przełomie wielu lat czy też w czasie kilku sekund. To właśnie moc dawki mierzą dozymetry.

Promieniowanie ulegające rozproszeniu w materiale nie zawsze deponuje w nim całą swoją energię. Energia rozproszonej wiązki zostaje przekazana naładowanym cząstkom wtórnym, dokonującym znaczącej jonizacji (rozdział 2.4). Cząstki te, jak również generowane przez nie fotony promieniowania charakterystycznego i promieniowanie hamowania, mogą wydostać się poza napromieniany obiekt pomniejszając tym samym wartość energii pochłoniętej. Sumaryczną energię kinetyczną wszystkich swobodnych cząstek naładowanych, uwolnionych przez promieniowanie na jednostkę masy, określa KERMA (Kinetic Energy Released per MAss Unit) [54]

$$K = E_{tr} / m \tag{26}$$

gdzie K - kerma, E_{tr} - energia uwolnionych cząstek naładowanych, m - masa. Jednostką kermy jest grej. W powietrzu kerma może być wyznaczona eksperymentalnie na podstawie obserwacji torów uwolnionych cząstek naładowanych w komorze jonizacyjnej.

W dozymetrii, dziedzinie zajmującej się oceną dawek promieniowania jonizującego, najczęściej stosuje się pojęcia dawek równoważnej oraz efektywnej. Dawka równoważna uwzględnia rodzaj cząstek promieniowania oraz ich energię. Ta sama dawka pochłonięta deponowana przez różne rodzaje cząstek o różnych energiach może wywołać różny skutek biologiczny, dlatego poszczególnym rodzajom promieniowania przyporządkowywane zostały bezwymiarowe współczynniki wagowe charakteryzujące względną "bioszkodliwość" danego rodzaju promieniowania (RBE - Relative Biological Effectiveness). Dawka równoważna definiowana jest jako

$$H_T = \sum_R w_R D_R$$

gdzie H_T - dawka równoważna D_R - pochłonięta dawka promieniowania typu R, w_R - współczynnik wagowy promieniowania typu R, uwzględniający rodzaj cząstek oraz ich energię. Jednostką dawki równoważnej jest siwert [Sv=J/kg].

Biologiczny efekt napromienienia zależy nie tylko od rodzaju promieniowania, ale także od rodzaju napromienianej tkanki. Różne rodzaje komórek może cechować różna promienioczułość. Rodzaj tkanki uwzględnia dawka efektywna, definiowana wzorem

$$H_F = \sum_T w_T H_T$$

gdzie H_F - dawka efektywna, H_T - dawka równoważna otrzymana przez tkankę T, w_T - współczynnik wagowy tkanki typu T. Poniższe tabele przedstawiają stosowane do niedawna wartości współczynników wagowych w_R oraz w_T , opublikowane w raporcie Międzynarodowej Komisji Ochrony Radiologicznej (ICRP - International Commision on Radiation Protection) [55].

Rodzaj i zakres energii promieniowania	W _R
Fotony wszystkich energii Elektrony i miony wszystkich energii Neutrony < 10 keV > 10 keV do 100 keV > 100 keV do 2 MeV > 2 MeV do 20 MeV > 20 MeV	1 5 10 20 10 5
Protony > 2 MeV Cząstki α , ciężkie jony	5 20

Tabela 2 Współczynniki wagowe promieniowania wR [2]

Tabela 3 Współczynniki wagowe tkanek wr [2]

Narząd lub tkanka	W _T
Gruczoły płciowe	0,2
Czerwony szpik kostny, jelito grube, płuca, żołądek	0,12
Pęcherz moczowy, gruczoły sutkowe, wątroba, przełyk, tarczyca	0,5
Skóra, powierzchnia kości	0,1
Pozostałe	0,5

Współczynniki przedstawione w tabelach Tabela 2 oraz Tabela 1 wzbudzały pewne kontrowersje. Skokowe i względnie duże zmiany współczynnika w_R dla neutronów przy pewnych "okrągłych" wartościach energii nie wyglądają zbyt przekonująco, podobnie jak definiowanie promienioczułości wszystkich tkanek człowieka przy pomocy czterech wartości współczynnika w_T. Jednak dokładne wyznaczenie dawki promieniowania deponowanej w materiale jest rzeczą dość skomplikowaną. Dla dokładnego określenia dawki w napromienianym obiekcie konieczne jest przeprowadzenie symulacji przejścia wiązki promieniowania przez materiał, z uwzględnieniem wszystkich procesów oddziaływań cząstek pierwotnych oraz wtórnych. Obecnie moce obliczeniowe komputerów umożliwiają prowadzenie takich zaawansowanych symulacji metodami Monte Carlo. W symulacjach tych można analizować przechodzenie przez materiał nawet milionów wirtualnych cząstek, obserwując ich trajektorie oraz losy generowanych przez nie cząstek wtórnych. Definiując materiał odpowiadający w przybliżeniu tkance można symulować oddziaływanie promieniowania na organizm. W 2010 roku komisja ICRP opracowała nowy raport [54], gdzie pochłonięte dawki różnych rodzajów promieniowania wyznaczone zostały w oparciu o symulacje przeprowadzone na wirtualnych fantomach ludzkiego ciała. Fantomy mężczyzny oraz kobiety opracowane zostały na bazie obrazów uzyskanych w trakcie badań tomograficznych pacjentów. Wyrożniono 6 geometrii napromieniania: w płaszczyźnie czołowej AP (anterio-posterior) i PA (posterio-anterior), strzałkowej LLAT (left lateral) i RLAT (right lateral), obrotową wzdłuż osi ciała (ROT - rotational) oraz izotropową (ISO -

isotropic) ze wszystkich kierunków. Raport zawiera 76 obszernych tabel, w których zawarte zostały wyniki symulacji deponowanych dawek oraz współczynników wagowych. Najczęściej stosowanymi jednostkami są stosunki dawki pochłoniętej do strumienia padających cząstek [pGy cm²], dawki efektywnej do strumienia [pSv cm²], a w przypadku fotonów również stosunek dawki efektywnej w geometrii ISO do kermy w powietrzu [Sv/Gy] (Rys. 66).



Rys. 66 Stosunek dawki efektywnej do kermy w powietrzu [54]

DODATEK D) Budowa komórki eukariotycznej

Komórki wszystkich organizmów żywych są potomkami jednej prakomórki, która pojawiła się na Ziemi miliardy lat temu [6]. Zawierała ona w sobie wszystkie podstawowe mechanizmy, jakimi dysponują dzisiejsze komórki. Wszystkie komórki żywe dzielimy na eukariota oraz prokariota. Komórki eukariota zawierają jądro komórkowe. W tej grupie wyróżniamy komórki roślinne oraz zwierzęce. Natomiast komórki prokariota, nie posiadające jądra, to bakterie i archeony¹⁴ [6]. Organizmy złożone, takie jak rośliny i zwierzęta, utworzone są z komórek eukariota. Wnętrze komórek wypełnia cytoplazma, gdzie zachodzi synteza białek oraz wiele reakcji chemicznych ważnych dla funkcjonowania komórki [6]. Rysunek Rys. 67 przedstawia schemat budowy typowej komórki zwierzęcej.



Rys. 67 Schemat komórki zwierzęcej

Komórki eukariotyczne oprócz jądra komórkowego zawierają w sobie także inne organelle, pełniące w komórce określone funkcje. Wszystkie komórki eukariota oprócz jądra zawierają mitochondria, lizosomy, rybosomy oraz aparat Golgiego. Komórki roślinne posiadają dodatkowo chloroplasty, umożliwiające im pobieranie energii bezpośrednio ze światła

¹⁴ Archeony żyją w środowiskach wrogich dla innych typów komórek - np. w wodzie silnie zasolonej, w gorących kwaśnych źródłach, w bardzo wysokich lub bardzo niskich temperaturach, a także w żołądku krowy, gdzie wspomagają przetwarzanie pokarmu [6].

słonecznego [6]. Z kolei mitochondria w komórkach zwierzęcych przetwarzają tlen na "paliwo chemiczne", co pomaga komórce efektywnie działać. Stanowią pewnego rodzaju komórkową elektrownię. Pobierają tlen i wydzielają dwutlenek węgla, odpowiadają zatem za oddychanie komórki [6]. W lizosomach zachodzi trawienie wewnątrzkomórkowe. Lizosomy wychwytują z pokarmu składniki odżywcze i wydalają składniki niepożądane. Z kolei aparat Golgiego kieruje wydalane składniki na zewnątrz komórki. W cytoplazmie zachodzi synteza białek, za co odpowiedzalne są rybosomy. Chemicznie komórka składa się głównie z atomów węgla, wodoru, azotu oraz tlenu, które stanowią w przybliżeniu 96% masy komórki.

W jądrze komórkowym znajduje się najważniejszy składnik komórki - cząsteczka DNA. DNA to kwas deoksyrybonukleinowy (deoxyribonucleic acid) zawierający w sobie informację genetyczną dotyczącą budowy oraz funkcjonowania komórki. DNA zbudowany jest z dwóch długich łańcuchów polinukleotydowych określanych jako nici lub łańcuchy DNA. Ogniwami tych łańcuchów są 4 zasady - adenina (A), guanina (G), cytozyna (C) oraz tymina (T), nazywane nukleotydami [6]. Dwa łańcuchy połączone są ze sobą wiązaniami wodorowymi pomiędzy zasadami wchodzącymi w skład nukleotydów znajdujących się "na tej samej wysokości" obu łańcuchów. Dodatkowo nici DNA są wzajemnie skręcone, tworząc "wiertłokształtną" strukturę zwaną helisą (Rys. 68).



Rys. 68 Schemat helisy DNA [6]

Adenina może łączyć się tylko z tyminą, a guanina tylko z cytozyną. Jeżeli zatem w danym miejscu na jednym z łańcuchów znajduje się adenina, to po przeciwnej stronie w drugim łańcuchu może znajdować się tylko tymina. Wynika z tego tzw. komplementarność nici DNA. Zasady A, G, T, C możemy zatem traktować jak litery czteroliterowego "alfabetu DNA" [6]. Organizmy różnią się od siebie, ponieważ zawarte w nich cząsteczki DNA mają inne sekwencje nukleotydowe, a więc zawierają różną informację genetyczną [6].

Jądro typowej komórki ludzkiej ma średnicę 5-8 µm i zawiera ok. 2 metrów DNA [6]. Zadanie upakowania DNA wykonują białka, które wiążąc się z DNA fałdują go, tworząc uporządkowane ciągi zwojów i pętli [6]. Kompleks DNA i białek to chromatyna, tworząca chromosomy.



DNA w jądrze rozdzielony jest pomiędzy komplet różnych chromosomów. Kompletna informacja genetyczna (genom) człowieka składa się z 3,2*10⁹ nukleotydów w zawartych w 24 chromosomach [6]. Większość komórek człowieka zawiera po 2 kopie każdego chromosomu - po matce i po ojcu. Obraz pełnego zestawu 46 chromosomów nazywany jest kariotypem człowieka. Wszystkie zróżnicowane komórki w organizmie człowieka powstają z jednej zapłodnionej komórki jajowej wskutek jej podziałów. Wszystkie zawierają identyczne kopie DNA, a ich zróżnicowanie wynika ze sposobu, w jaki wykonują zawarte w DNA instrukcje [6].

DODATEK E) Cykl komórkowy

Nowe komórki mogą powstać tylko poprzez podziały komórek już istniejących. *Tam gdzie powstaje komórka, musi istnieć komórka poprzednia, tak samo jak zwierzęta mogą powstawać tylko ze zwierząt, a rośliny z roślin* [6]. Powyższe stwierdzenia są konsekwencją tzw. teorii komórkowej. Zatem jedynym sposobem na pomnożenie liczby komórek jest podział tych, które już istnieją. *Wszystkie żywe organizmy są produktami cyklicznych aktów wzrostu i podziału komórek, które powtarzają się nieprzerwanie od chwili powstania życia na Ziemi¹⁵ [6]. U organizmów jednokomórkowych, takich jak bakterie lub drożdże, każdy podział komórki tworzy całkowicie nowy organizm, natomiast do zbudowania wielokomórkowego organizmu potrzebnych jest wiele powtarzających się cyklicznie podziałów komórek [6]. Porces podziału komórek nazywany jest proliferacją.*

Komórka rozmnaża się podlegając uporządkowanej sekwencji zdarzeń, zwanej cyklem komórkowym. W trakcie tego cyklu komórka pobierając substancje odżywcze ulega wzrostowi. W pewnym momencie cyklu podwaja ona swoją zawartość, a następnie dzieli się na dwie nowe komórki [6]. Podstawowym zadaniem komórki jest skopiowanie i przekazanie swojej informacji genetycznej do następnego pokolenia. Dlatego podstawową funkcją cyklu komórkowego jest dokładne podwojenie zawartości DNA w chromosomach, a następnie precyzyjne rozmieszczenie ich kopii w genetycznie identycznych komórkach potomnych [6]. Eukariotyczny cykl komórkowy dzieli się na cztery kolejno następujące po sobie fazy: M, G1, S oraz G2 [6]. Faza M dzieli się na dwa etapy: mitozę, w czasie której następuje podział jądra komórkowego, oraz cytokinezę, kiedy następuje podział cytoplazmy, i tym samym podział komórki na dwie potomne. Okres pomiędzy kolejnymi fazami M (fazy G1, S oraz G2) nazywany jest interfazą (Rys. 70). W czasie fazy S komórka prowadzi replikację swojego

¹⁵ Teoria komórkowa tworzy tzw. problem biogenezy [40]. Skoro komórka może powstać tylko z innej komórki, to w jaki sposób powstała pierwsza komórka? Istnieje pogląd, iż biogeneza poprzedzona była nieorganiczną ewolucją materii, tworzącą autoreplikujące informację struktury. Z kolei tzw. hipoteza panspermii głosi, że pierwsze żywe komórki trafiły na Ziemię z kosmosu za pośrednictwem meteorytu lub planetoidy. To jednak nie rozwiązuje ogólnie problemu pochodzenia pierwszej żywej komórki.
DNA. Fazy G1 oraz G2 to przerwy, w czasie których komórka sprawdza, czy warunki wewnętrzne oraz zewnętrzne są odpowiednie do przejścia w kolejną fazę.



Czas trwania cyklu jest różny dla różnych komórek. W komórkach wczesnego zarodka żaby trwa on 30 minut. U ssaków komórki nabłonka jelit dzielą się co 12 godzin, a komórki wątroby rzadziej niż raz na rok [6]. Jeśli chodzi o aktywność proliferacyjną to możemy wyróżnić cztery następujące rodzaje populacji komórek [12]:

- rozrastająca się, w której wszystkie komórki są w cyklu mitotycznym, a ich wzrasta wykładniczo. Przykładem takich populacji są komórki we wczesnym rozwoju zarodkowym oraz populacje komórek nowotworowych.
- wzrastająca tylko część komórek ulega podziałom. Są to populacje komórek w organizmie rosnącym po urodzeniu.
- odnawiająca się część komórek jest w cyklu komórkowym i dzieli się, część natomiast ulega eliminacji np. drogą złuszczania. Proliferacja komórek równoważy ich "zużycie", dlatego całkowita liczba komórek nie ulega zmianie. Przykładem moga być komórki nabłonka jelitowego.

 statyczna - komórki nie ulegają podziałom, a ich liczba przez większą część życia organizmu zmienia się nieznacznie. Przykładem mogą być komórki nerwowe oraz mięśniowe.

Nie wszystkie komórki mogą odtworzyć się przez podział, dlatego duże znaczenie mają tzw. komórki macierzyste [6,12]. Są one zdolne do podziałów oraz różnicowania się w kierunku komórek wyspecjalizowanych. W ten sposób w szpiku kostnym z tej samej populacji komórek krwiotwórczych macierzystych powstaje kilka linii komórek wyspecjalizowanych.

Bibliografia

- 1. Medical Imaging Physics, W.R.Hendee, E.R.Ritenour, Wiley-Liss, 2002
- 2. *Człowiek i Promieniowanie Jonizujące*, praca zbiorowa p. red. A.Z.Hrynkiewicza, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2001
- 3. Radiation Biophysics, E.L.Alpen, Academic Press, 1990
- 4. O fizyce i energii jądrowej, B.Dziunikowski, Wydawnictwa AGH, 2001
- 5. Dobroczynne promieniowanie, Z.Jaworowski, Wiedza i Życie, 1997
- 6. Podstawy biologii komórki, Alberts et al, PWN, 2005
- 7. Druga twarz tlenu, G.Bartosz, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2008
- 8. *Biologiczne podstawy radioterapii*, A.Gasińska, AGH Ośrodek Edukacji Niestacjonarnej, 2001
- 9. *Medycyna zagrożen i urazów radiacyjnych*, M.Janiak, A.Wójcik, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2004
- 10. *Faster repair of DNA double-strand breaks in radioresistant human tumor cells*, Schwartz et al, Int J Radiat Oncol Biol Physics, 1988
- 11. The molecular biology of cancer, J.S.Bertram, Molecular Aspects of Medicine, 2001
- 12. *Podstawy cytofizjologii i histofizjologii*, A.Myśliwski, Akademia Medyczna w Gdańsku, 2005
- 13. *Ochrona przed skażeniami w obronie cywilnej*, Areczuk et al, Wydawnictwo Ministerstwa Obrony Narodowej, 1989
- 14. Ćwiczenia laboratoryjne z biofizyki Skrypt dla studentów Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, B.Mycek, M.Wójcik-Jawień, S.Bożek, W.Jawień, http://www.farmacja.cmuj.krakow.pl/dyd/biofiz/Laboratorium/skrypt.pdf
- Proton radiotherapy facility for ocular tumors at the IFJ PAN in Kraków Poland, B.Michalec, J.Swakoń, U.Sowa, M.Ptaszkiewicz, T.Cywicka-Jakiel, P.Olko, Applied Radiation and Isotopes, 68 (2010) 738–742
- 16. http://www.gel.usherbrooke.ca/casino/
- 17. Linia eksperymentalna do napromieniania pojedynczych żywych komórek przy stanowisku mikrowiązki rentgenowskiej w IFJ PAN. Opis techniczny, S. Bożek, J.Bielecki, Z.Stachura, J.Lekki, M.Sienkiewicz, J.Świerblewski, T.Pieprzyca, Z.Szklarz, E.Dutkiewicz, A.Z.Hrynkiewicz, W.M.Kwiatek, Raport IFJ PAN nr 2053/AP, http://www.ifj.edu.pl/publ/reports/2011/?lang=pl

- 18. X-ray microprobe A new facility for cell irradiations in Kraków, S.Bożek, J.Bielecki, J.Baszak, H.Doruch, R.Hajduk, J.Lekki, Z.Stachura, W.M.Kwiatek, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B, Volume 267, Issue 12-13, 2009
- 19. *Microbeam irradiation facilities for radiobiology in Japan and China*, Kobayashi at al, Journal of Radiation Research 2009 Suppl A:A29-47.
- 20. Investigation of porcelain art by means of combined µPIXE and µCT techniques, J.Bielecki, S.Bożek, E.Dutkiewicz, J.Lekki, Z.Stachura, W.M.Kwiatek, Abstract of the XLIV Zakopane School of Physics International Symposium, Zakopane, Poland, 18-23 May 2009
- Applications of the Cracow X-ray microprobe in tomography, J.Bielecki, S.Bożek, J.Lekki, Z.Stachura, W.M.Kwiatek, Acta Physica Polonica A, Vol. 115 No. 2 (2009) 537-541
- 22. *Badanie struktur złożonych metodą mikrotomografii komputerowej*, Jakub Bielecki, rozprawa doktorska, 2011
- 23. *Multipurpose X-ray microprobe in the IFJ PAN. Technical description*, J.Bielecki, S.Bożek, A.Banaś, J.Baszak, H.Doruch, R.Hajduk, J.Kowalska, T.Pieprzyca, Z.Szklarz, J.Lekki, Z.Stachura, W.M.Kwiatek, Raport IFJ PAN nr 2025/AP, http://www.ifj.edu.pl/dept/no5/nz52/publ2009/
- 24. *Induction of a bystander mutagenic effect of alpha particles in mammalian cells*, H.Zhou, G.Randers-Pehrson, CA.Waldren, D.Vannais, EJ.Hall, TK.Hei, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97 (5): 2099–104, 2000
- 25. Studies of bystander effects in human fibroblasts using a charged particle microbeam, KM.Prise, OV.Belyakov, M.Folkard, BD.Michael International journal of radiation biology 74 (6): 793–8. PMID 9881726, 1998
- 26. The bystander response in C3H 10T1/2 cells: the influence of cell-to-cell contact, SA.Mitchell, G.Randers-Pehrson, DJ.Brenner, EJ.Hall, Radiat. Res. 161 (4): 397–401. PMID 15038773, 2004
- 27. Progress Report on the IFJ PAN Microprobe for Living Cell Irradiations: Technical Setup and First Experimental Data, J.Lekki, W.Polak, R.Ugenskiene, O.Veselov, Z.Stachura, J.Styczen, M.Zazula, J.Stachura, 7th International Workshop: Microbeam Probes of Cellular Radiation Response, Radiation Research Vol.166, No 4, October 2006, p.666-667
- 28. Irradiating single cells using Kraków microprobe facility, W.Polak, O.Veselov, J.Lekki, Z.Stachura, M.Zazula, R.Ugenskiene, M.Polak, J.Styczeń, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B 249 (1–2) (2006) 743–746

- Automatic system for single ion / single cell irradiation based on Cracow microprobe, O.Veselov, W.Polak, J.Lekki, Z.Stachura, K.Lebed, J.Styczeń, R.Ugenskiene, Rev. Sci Instr., 77 (2006) 055101
- Single Proton Hit Facility at the IFJ PAN in Cracow, W.Polak, J.Lekki, O.Veselov, Z.Stachura, J. Styczeń, Acta Physica Polonica A 109 (2006), 417–420
- 31. Zastosowanie metody PIXE do badań procesów akumulacji i przemian związków chemicznych w osadach zbiornika Dobczyckiego, W.M.Kwiatek, B.Kubica, E.M.Dutkiewicz, M.Bartyzel, J.Golas, R.Hajduk, T.Pieprzyca, W.Reczynski, Cz.Sarnecki, M.Stobinski, Z.Szklarz, J.Wiltowska-Zuber, Raport IFJ PAN nr 2007/AP (2007)
- 32. Development of the IFJ Single Ion Hit Facility For Cells Irradiation, O.Veselov, W.Polak, R.Ugenskiene, K.Lebed, J.Lekki, Z.Stachura, J.Styczeń, Radiation Protection Dosimetry 122 No 1-4 (2007) 316-319
- 33. *Irradiation of cells with targeted ions using optical automatic recognition*, Oleksandr Veselov, rozprawa doktorska IFJ PAN, Kraków 2006
- 34. *Badanie reakcji komórek po naświetlaniu pojedynczymi jonami*, Wojciech Polak, rozprawa doktorska, IFJ, Kraków 2006
- 35. Scintillator Detectors for Scanning Transmission X-ray Microscopes at the Advanced Light Source, S. Fakra, A.L.D.Kilcoyne, T.Tyliszczak, http://beamline1102.als.lbl.gov/2004_pubs/Fakra_55365.pdf
- 36. *The Immortal Life of Henrietta Lacks*, Rebecca Skloot, 2010 http://rebeccaskloot.com/wp-content/uploads/2011/03/HenriettaLacks_RGG.pdf
- 37. Hodowla komórek i tkanek, p. red, Stanisławy Stokłosowej, PWN 2004
- 38. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3), Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW, Investigation Urology 1979
- 39. *The effect of low dose ionising radiation on normal human fibroblasts*, Rasa Ugenskiene, rozprawa doktorska, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, 2007
- 40. http://www.wikipedia.pl
- Changes in cellular response to the damage induced in PC-3 prostate cancer cells by proton microbeam irradiation, E.Lipiec, A.Wiecheć, J.Dulińska-Litewka, M. Kubica, J.Lekki, Z.Stachura, J.Wiltowska-Zuber, W.M.Kwiatek, Gen. Physiol. Biophys. (2012), 31
- 42. *γH2AX jako marker dwuniciowych pęknięć DNA*, Monika Podhorecka, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 2009; 63: 92-98, http://www.phmd.pl/fulltxthtml.php?ICID=880000

- 43. Horcas, R. Fernandez, J.M. Gomez-Rodriguez, J. Colchero, J. Gomez-Herrero and A. M. Baro, Rev. Sci. Instrum. 78, 013705 (2007), http://www.nanotec.es/products/wsxm/download.php
- 44. *Micro Resolution Chart for X-Ray*, JIMA-C006-R:2006, http://www.jima.jp/content/pdf/rt_ct-02cata02.pdf
- 45. Portal Farmaceutyczno Medyczny, http://www.pfm.pl
- 46. http://www.leukemia.pl
- 47. http://www.mediweb.pl
- 48. http://listverse.com/2010/03/25/10-famous-incidences-of-death-by-radiation/
- 49. *Gaussian Beams and the Knife-Edge Measurement* http://massey.dur.ac.uk/resources/grad_skills/KnifeEdge.pdf
- 50. *Knife Edge measurement of Gaussian Beam* http://www2.ensc.sfu.ca/~glennc/e894/e894la1-extra4.pdf
- 51. National Institute of Standards and Technology http://www.nist.gov/
- 52. http://www.amptek.com/xr100cr.html
- 53. Application of focused X-ray beams in radiation biology, J. Lekki, Z Stachura, S. Bożek, J. Bielecki, accepted in Handbook of short wavelength laboratory sources: Principles & Practices
- 54. ICRP, 2010. Conversion Coefficients for Radiological Protection Quantities for External Radiation Exposures, ICRP Publication 116, Ann. ICRP 40(2–5).
- 55. ICRP, 2003. *Relative Biological Effectiveness, Radiation Weighting and Quality Factor*, ICRP Publication 92. Ann. ICRP 33 (4).
- 56. Effect of High Dose Natural Ionising Radiation on the Immune System of the Exposed Residents of Ramsar Town, Iran, M.Attar, Y.Kondolousy, N. Khansari, Iran J Allergy Asthma Immunol, 2007
- 57. Microdosimetric Characteristics of Micro X-Ray Beam for Single Cell Irradiation, T.Kuchimaru, F.Sato, Y.Higashino, Y.Kato, T.Iida, IEEE Transactions on Nuclear Science, Vol. 53, no. 3, 2006
- 58. Soft X-Ray radiation effects on yeast cells with energies on and off the O_K absorption edge by a soft X-Ray microprobe, L.Chen, J.Yan, S.Jiang, W.Zhang, Radiation Protection Dosimetry, Vol. 133, No. 1, 2009

- 59. Review and evaluation of updated research on the health effects associated with low dose ionising radiation, L.T.Dauer et al, Radiation Protection Dosimetry, Vol. 140, No.2, 2010
- 60. *Health risks of low photon energy imaging*, J.L.Redpath, Radiation Protection Dosimetry, Vol. 122, No. 1-4, 2006
- 61. Understanding and characterisation of the risks to human health from exposure to low levels of radiation, D.T.Goodhead, Radiation Protection Dosimetry, Vol. 137, No.1-2, 2009