

Magdalena Grochowska, nr albumu 382630

Karolina Plenzner, nr albumu 417848

Julia Pucińska, nr albumu 417868

Opiekunowie: dr Beata Brzozowska-Wardecka, mgr Adrianna Tartas

Zespołowy Projekt Studencki

Badanie wpływu mocy dawki na przeżywalność komórek nowotworowych gruczołu krokowego poddanych działaniu promieniowania jonizującego.

1. Cel projektu

Celem projektu była analiza odpowiedzi komórkowej opisanej testem klonogennym na działanie promieniowania alfa ze źródła Am-241. Komórki nowotworowe gruczołu krokowego zostały napromienione w taki sposób, żeby dawka równa 1 Gy została w nich zaabsorbowana w różnym czasie (różna moc dawki). Czas napromieniania był regulowany liczbą warstw ochronnych folii Mylar oddzielających szalkę, na której zostały wysiane komórki od źródła.

W ramach projektu zostały przeanalizowane dwa niezależnie wyhodowane replikanty. Dla każdego z nich obliczono frakcje przeżywalności dla trzech różnych mocy dawek. Wyniki testu klonogennego zostały obliczone z uwzględnieniem przeżywalności komórek kontrolnych, czyli takich, które nie zostały poddane działaniu cząstek alfa.

2. Wstęp teoretyczny

Zgodnie z literaturą czas, w którym dawka została zaabsorbowana przez organizm ma wpływ na skutek biologiczny jaki nastąpi po ekspozycji na promieniowanie jonizujące [1]. Zgodnie z definicją dawka pochłonięta w jednostce czasu to moc dawki, co wyraża się za pomocą poniższego wzoru:

$$\dot{D} = \frac{dD}{dt} \quad (1)$$

Im większa moc dawki, tym krótszy czas jest do podania tej samej dawki. W przypadku źródła izotopowego moc dawki związana jest z aktywnością tego źródła.

Jednym z najbardziej przydatnych metod, pozwalających ocenić wpływ danego rodzaju promieniowania na komórki wyhodowane in vitro jest test klonogeny, inaczej test przeżywalności [2]. Aby go wykonać, komórki są wysiewane na szalki, napromieniane, a następnie inkubowane. Niezbędne jest również stworzenie próbki kontrolnej, czyli szalki z komórkami niepoddawanymi napromienianiu. Na tej podstawie wyznacza się przeżywalność komórek w zadanych warunkach stresowych. Test klonogeny jest

powszechnie stosowany m.in. ze względu na jego dużą czułość, daje dokładne wyniki dla nawet 0,05 Gy.

Parametrem często używanym do określenia rodzaju promieniowania jest współczynnik liniowego przekazu energii, tzw. *LET* (ang. Linear Energy Transfer). Mówi on, ile energii cząstka jonizująca przekaże ośrodkowi wzdłuż swojej drogi. Wyraża się wzorem

$$LET = \frac{dE}{dx} \quad (2)$$

gdzie dE oznacza energię wytraconą na odcinku drogi dx . Promieniowanie o wysokim *LET*, tzw. promieniowanie gęsto jonizujące, cechuje się występowaniem wielu aktów jonizacji wzdłuż drogi, tworząc tzw. kompleksowe uszkodzenie DNA. Taki rodzaj promieniowania powoduje więcej podwójnych pęknięć nici DNA (ang. DSB - Double Strand Breaks) - niż promieniowanie o niskim *LET*, dla którego uszkodzenia DNA nie są skumulowane w jednym miejscu, co często skutkuje przerwaniem tylko jednej nici DNA (ang. SSB - Single Strand Breaks). Warto przy tym wspomnieć, że SSB są z reguły szybko naprawiane przez komórkę, o ile zastosuje się przerwę w napromienieniu. Naprawy DSB trwają znacznie dłużej i takie uszkodzenia z większym prawdopodobieństwem mogą spowodować śmierć komórki. Przykładem cząstek o niskim *LET* są fotony i elektrony, zaś cząstki gęsto jonizujące to neutrony i ciężkie jony.

Wyróżniamy dwa główne sposoby oddziaływania promieniowania jonizującego z materiałem biologicznym, oddziaływanie pośrednie i bezpośrednie. Oddziaływanie pośrednie powoduje radiolizę wody i powstawanie wolnych rodników, które uszkadzają materiał genetyczny, zaś oddziaływanie bezpośrednie powoduje uszkodzenie nici DNA.

Źródło Am-241, które zostało wykorzystane podczas eksperymentu, ulega rozpadom alfa o energiach 5,433 MeV (85%) i 5,388 MeV (13%) przy niewielkim udziale (2%) promieniowania gamma o energii 59,54 keV. Promieniowanie alfa charakteryzuje się wysoką wartością *LET* i głównie bezpośrednim sposobem oddziaływania. Wysoka wartość *LET* wynika z faktu, że cząstki alfa posiadają ładunek 2+ i relatywnie dużą masę, przez co poruszają się wolno i silniej jonizują materię. Cząstka alfa składa się z dwóch protonów i dwóch elektronów, co odpowiada jonowi helu He²⁺. Schemat rozpadu ameryku, w wyniku którego powstaje promieniowanie alfa, wygląda następująco:



3. Materiały i metody

Projekt składał się z kilku etapów. W pierwszej kolejności zostały wysiane komórki nowotworowe gruczołu krokowego DU-145 [3], które następnie zostały poddane promieniowaniu alfa ze źródła Am-241. Po 14 dniach od napromienienia komórki zostały utrwalone. Ostatnim etapem była analiza szalek w programie countPHICS [4] i policzenie liczby powstałych kolonii w oparciu o test przeżywalności [2]. Wszystkie prace wykonane zostały w Laboratorium Radiobiologicznym w Zakładzie Fizyki Biomedycznej, a dla zachowania sterylnych warunków większość procedur wykonywano w komorze laminarnej.

3.1 Wysianie komórek

Komórki hodowano w dwóch butelkach w pożywce DMEM, która stanowi źródło substancji odżywczych: cukrów, aminokwasów, witamin, minerałów, etc. Pożywka zapewnia także właściwe pH. DMEM była suplementowana FBS, czyli płodową surowicą bydłą (ang. Fetal Bovine Serum), ważną dla wzrostu i utrzymania hodowli. Aby zapobiec zakażeniom, dodano także antybiotyki - penicylinę i streptomycynę.

Każdorazowo do przepłukania komórek stosowano DPBS, sól fizjologiczną będącą roztworem buforowym, pomagającą utrzymać stałe pH. DPBS w swoim składzie zawiera m.in. chlorek sodu, fosforan sodu i potasu. Służy także do rozdzielania zlepionych komórek. W związku z tym, że żywe, prawidłowo wysiane komórki przyklejają się do dna szalki, przy pasażowaniu stosowano trypsynę - aminokwas, który powoduje odklejenie się komórek.

W pierwszym etapie eksperymentu z butelki z komórkami wylano starą pożywkę hodowlaną. Komórki przepłukano roztworem PBSu, następnie zlano go do czystej fiolki. Przepłukanie PBS jest konieczne, bo umożliwia pozbycie się FBS, który hamuje działanie trypsyny. Komórki przemyto roztworem trypsyny i wstawiono szalki na 5 minut do inkubatora. Następnie wyjęto je i po upewnieniu się pod mikroskopem, że komórki odkleiły się od podłoża, włąno do nich świeżej pożywki, żeby zablokować działanie trypsyny, która inaczej mogłaby uszkodzić niezbędne aminokwasy komórek. Małą objętość roztworu przelano do eppendorfa, do którego dodano również trypan blue, barwnik który ma na celu wybarwienie komórek. Roztwór wprowadzono na slajd, a następnie do licznika EVE, co pozwoliło sprawdzić liczebność komórek, jak także obliczyć objętość roztworu potrzebną do wysiania 150 000 komórek. Na każde szkiełko w szalce dodano pożywkę wzrostową i odłożono je do inkubatora.

Liczebność komórek (zmierzona trzykrotnie) w próbkach przedstawia Tab. 1. Liczebność komórek została podana na mililitr roztworu. W ramach projektu zostało zaplanowane użycie dwóch hodowli i dwóch replikantów z takiej samej liczby wysianych komórek dla danego schematu napromieniania.

Tabela 1. Liczebność komórek zdrowych, martwych oraz ich suma i żywotność dla obu hodowli w 1ml roztworu.

Replikant	Pomiar	Wszystkie komórki	Żywe	Martwe	Żywotność
1	1	$2,4 \cdot 10^5$	$2,3 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^4$	96%
	2	$3,8 \cdot 10^5$	$3,5 \cdot 10^5$	$2,5 \cdot 10^4$	93%
	3	$4,1 \cdot 10^5$	$3,1 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^4$	76%
2	1	$1,6 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^5$	$5,0 \cdot 10^4$	69%
	2	$2,5 \cdot 10^5$	$2,5 \cdot 10^5$	$0,5 \cdot 10^4$	98%
	3	$1,5 \cdot 10^5$	$1,4 \cdot 10^5$	$0,5 \cdot 10^4$	97%

Średnia liczba komórek żywych w 1 ml replikanta 1 wyniosła: $3 \cdot 10^5$, a dla replikanta 2: $1,7 \cdot 10^5$.

3.2 Napromienienie komórek

Po upływie 2 dni od wysiania komórek szalki wyjęto z inkubatora w celu poddania ich działaniu promieniowania alfa o trzech różnych wartościach mocy dawki (1,1 mGy/s; 5,8 mGy/s; 11,2 mGy/s). Szkiełka z komórkami zostały przełożone do szalek Petriego. W każdej serii eksperymentu zostały wykorzystane 4 szalki z wysianymi komórkami. Moc dawki była modyfikowana przez dokładanie kolejnej warstwy folii Mylar, osłabiającej cząstki alfa emitowane ze źródła. Dla próbki o największej mocy dawki była to 1 warstwa, dla następnych 2 i 3 warstwy. Próbka kontrolna również była przykryta 1 warstwą folii. Każdą z szalek napromieniano oddzielnie. Źródło kładzione było bezpośrednio na folii Mylar, a szalki wstawiane były do inkubatora na czas napromieniania. Dokładne czasy napromieniania podane są w Tab. 2.

Tabela 2. Czasy napromieniania szalek (lub samej obecności warstwy Mylaru na kontroli)

Liczba warstw Mylaru	Czas naromieniania [s]	Moc dawki [mGy/s]
1	89	11,2
2	172	5,8
3	916	1,1
1	916	0

W celu odklejenia komórek od szkiełek dodano 0,5 ml trypsyny. Następnie zostawiono je w inkubatorze na czas 5 minut. Po upewnieniu się pod mikroskopem, że komórki się odkleiły przepłukano szalki 4,5 ml medium, aby zneutralizować trypsynę. Następnie zbadano ich liczebność i wyznaczono proporcje objętości roztworu komórek i medium do rozsiania komórek na większych szalkach. Średnią liczebność komórek (na 1 ml) dla poszczególnych replikantów przedstawiają Tab 3.

Tabela 3. Uśrednione liczby żywych komórek w 1ml roztworów, dla wszystkich badanych próbek

Moc Dawki	Replikant 1	Replikant 2
0	$5,8 \cdot 10^4$	$6,0 \cdot 10^4$
1,1	$7,3 \cdot 10^4$	$6,2 \cdot 10^4$
5,8	$10,1 \cdot 10^4$	$6,7 \cdot 10^4$
11,2	$9,3 \cdot 10^4$	$7,0 \cdot 10^4$

3.3 Utrwalenie komórek

Po 14 dniach od wysiania na szalkach powstały kolonie, które można było zaobserwować gołym okiem. W celu utrwalenia komórek wylano starą pożywkę i przepłukano szalki roztworem PBS. Do szalek dodano 10% roztwór formaldehydu (po to by utwalić komórki) i odczekano 10 minut. Po tym czasie formaldehyd wylano i przepłukano szalki wodą destylowaną. W celu wybarwienia komórek do szalek wiano 20% roztwór Giemsy i również odczekano 10 minut.

3.4 Test klonogeny

Celem testu klonogenego jest wyznaczenie tzw. frakcji przeżywalności (ang. *SF* - Surviving Fraction) na podstawie szalek z komórkami napromienionymi i nienapromienionymi. Wielkość ta jest opisywana poniższym wzorem:

$$SF = \frac{\text{wydajność klonowania napromienionej próbki}}{\text{wydajność klonowania komórek kontrolnych}} \quad (4)$$

gdzie komórki kontrolne to komórki nienapromienione.

Do wyliczenia *SF* potrzebna jest znajomość wydajności klonowania. Jest to tzw. parametr *PE* (ang. Plating efficiency), czyli stosunek liczby powstałych kolonii (przy czym za kolonie uważamy skupisko min. 50 komórek) do liczby wysianych komórek. Wyraża się on wzorem:

$$PE = \frac{\text{liczba powstałych kolonii}}{\text{liczba wysianych komórek}} \quad (5)$$

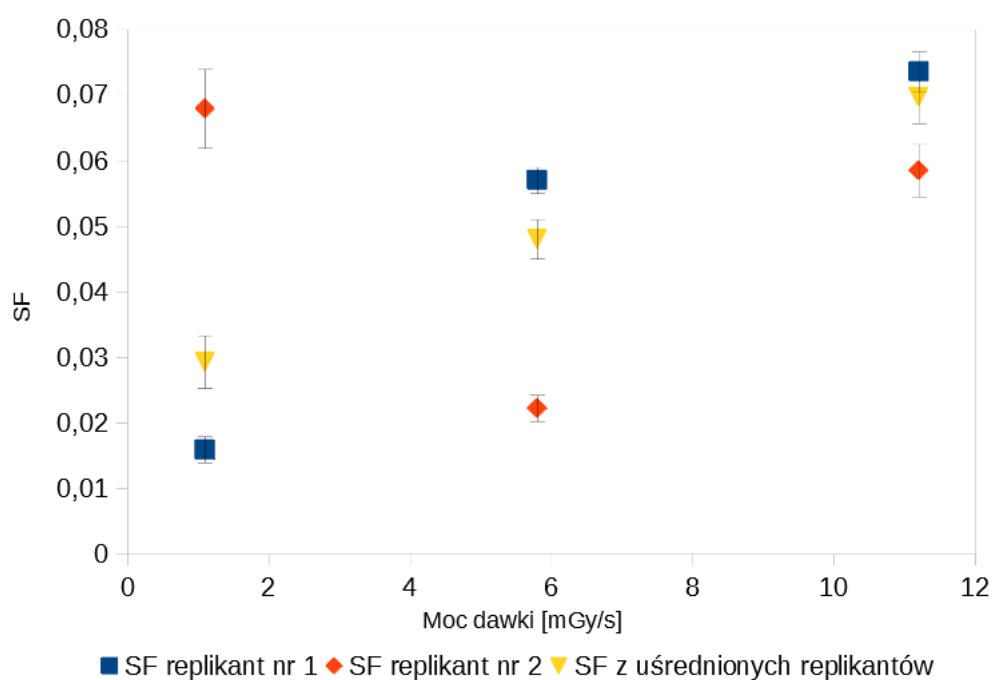
Przez wzgląd na wpływ promieniowania jonizującego na komórki (patrz rozdział 2.) dla próbki kontrolnej wysiano 3000 komórek, czyli znacznie mniej niż 50 000 w pozostałych próbkach.

4. Wyniki

W celu wyznaczenia frakcji przeżywalności obliczono za pomocą programu countPHICS liczbę kolonii komórkowych na szalkach kontrolnych oraz na szalkach poddanych ekspozycji na promieniowanie alfa o różnej mocy dawki. Na podstawie liczby kolonii i liczby wysianych komórek zostały policzone wydajności klonowania zgodnie ze wzorem (5) z podrozdziału 3.4 oraz wartości *SF* na podstawie wzoru (4) z tego samego podrozdziału dla poszczególnych replikantów. Wartości frakcji przeżywalności dla zastosowanych trzech schematów napromienienia zostały przedstawione w Tab. 4. Za niepewności pomiarowe liczby komórek i kolonii ustalono pierwiastek z liczby zliczeń w oparciu o założenia rozkładu Poissona. Niepewność średniej liczby komórek i kolonii została obliczona jako niepewność złożona z odchylenia standardowego średniej i niepewności zliczania komórek. Niepewność wyznaczenia wydajności klonowania i frakcji przeżywalności została wyznaczona metodą różniczki zupełnej.

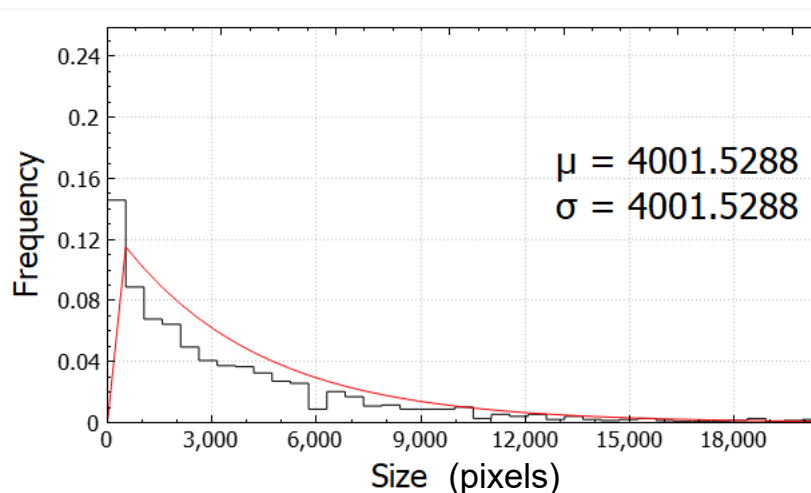
Tabela 4. Frakcja przeżywalności SF dla różnych replikantów

Moc Dawki [mGy/s]	SF Replikant nr 1	SF Replikant nr 2	Średnie SF
1,1	0,0159 (0010)	0,068 (006)	0,029 (004)
5,8	0,057 (002)	0,022 (002)	0,048 (003)
11,2	0,074(003)	0,058 (004)	0,070 (004)

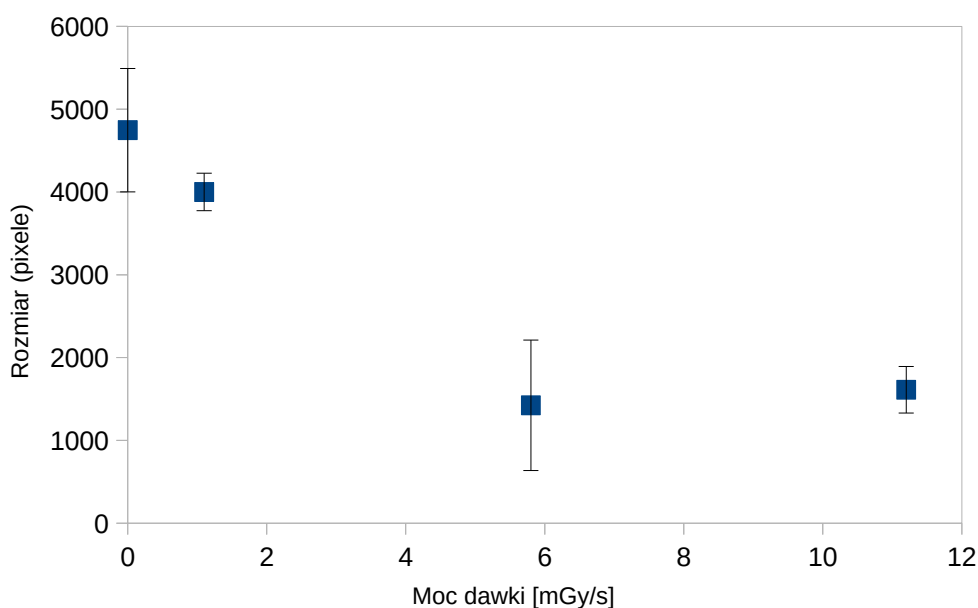


Rysunek 1. Frakcja przeżywalności komórek w funkcji mocy dawki

Wykorzystywany program umożliwił również zmierzenie rozmiaru poszczególnych kolonii dla każdej z szalek. Przykładowy rozkład rozmiarów kolonii został przedstawiony na Rys. 2. Po dopasowaniu rozkładu Weibulla do wszystkich histogramów rozmiarów kolonii wszystkich badanych szalek, zostały policzone wartości średnie z odchyleniami standardowymi. Średnie rozmiary kolonii (uśrednione dla obu replikantów) zostały zaprezentowane w funkcji mocy dawki na Rys.3.



Rysunek 2. Histogram rozmiaru kolonii dla jednej z szalek kontrolnych



Rysunek 3. Średnie rozmiary kolonii w funkcji mocy dawki

4. Wnioski

Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu mocy dawki na frakcję przeżywalności komórek nowotworowych gruczołu krokowego DU-145 przy zastosowaniu testu klonogenego. Na podstawie uzyskanych danych nie można jednoznacznie postawić twierdzenia definiującego zachowanie komórek pod wpływem zadanych warunków. Jak pokazuje Rys. 1 w przypadku replikanta nr 1 oraz dla średnich wartości z dwóch badanych replikantów wyliczona frakcja przeżywalności wskazuje na to, że im mniejsza moc dawki tym prawdopodobieństwo przeżycia komórek spada. Ta zależność została również zaobserwowana dla komórek HeLa poddanych działaniu promieniowania gamma (tzw.

odwrotny efekt mocy dawki) [5]. Z drugiej jednak strony analizując dane replikanta nr 2 zauważa się wzrost SF dla mocy dawki równej 1,1 mGy/s w stosunku do pozostałych. Dla tego ostatniego przypadku niepewność pomiarowa okazuje się być najwyższa.

Warto zwrócić również uwagę na znacząco mniejszą wydajność klonowania próbki kontrolnej w przypadku replikanta nr 2. Fakt ten oraz wyżej wymienione różnice w otrzymanych wynikach eksperymentu można tłumaczyć w pierwszej kolejności tym, iż oba replikanty pochodziły z dwóch różnych hodowli i były przygotowywane niezależnie przez różne osoby. Ponadto badanie przeprowadzały osoby niewprawione w pracy laboratoryjnej z wykorzystaniem tego typu aparatury oraz dla których była to pierwsza próba wykonania testu przeżywalności. W związku z powyższym szalki mogły zostać przygotowane z niewystarczającą precyzją, co rzutuje na otrzymane wyniki zwiększając niepewność pomiarów wynikającą z metodyki pracy. Dla wszystkich mocy dawek najwięcej było kolonii o wielkości mniejszej niż 1000 pikseli. Dla większych mocy dawek spadek liczebności kolonii był szybszy wraz z ich wzrostem niż dla niższych mocy dawek. Dodatkowo wraz ze wzrostem mocy dawki do 6mGy/s średni rozmiar kolonii malał.

Bibliografia

1. Malicki J, Ślosarek K (2016) Planowanie leczenia i dozymetria w radioterapii, Gdańsk, VIA MEDICA.
2. Hall EJ (2000) *Radiobiology for the Radiologist*, Philadelphia, J.B. Lippincott.
3. Stone KR, Mickey DD, Wunderli H, Mickey GH, Paulson DF (1978) Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *International Journal of Cancer*, 21(3): 274-281.
4. Brzozowska B, Galecki M, Tartas A, Ginter J, Kaźmierczak U, Lundholm L (2019) Freeware tool for analysing numbers and sizes of cell colonies. *Radiation and Environmental Biophysics*, 58: 1-9.
5. Hall EJ, Brenner DJ (1991) The dose-rate effect revisited: Radiobiological considerations of importance in radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 21: 1403–1414.