



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
MATEMATIKOS IR GAMTOS MOKSLŲ FAKULTETAS

Vaidas Jackevičius

**DOZĖS GALIOS IR STEBĖTOJO EFEKTO ĮTAKA LĄSTELIŲ
ELGSENAI SPINDULINĖJE TERAPIJOJE**

Baigiamasis magistro projektas

Vadovas

Doc. dr. Saulius Mickevičius

KAUNAS, 2016

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
MATEMATIKOS IR GAMTOS MOKSLŲ FAKULTETAS

**DOZĖS GALIOS IR STEBĖTOJO EFEKTO ĮTAKA LĄSTELIŲ
ELGSENAI SPINDULINĖJE TERAPIJOJE**

Baigiamasis magistro projektas

Medicinos fizika (kodas 621B92002)

Vadovas

(parašas) Doc. dr. Saulius Mickevičius

(data)

Recenzentas

(parašas) Prof. dr. Diana Adlienė

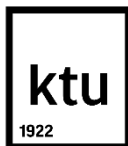
(data)

Projektą atliko

(parašas) Vaidas Jackevičius

(data)

KAUNAS, 2016



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

Matematikos ir gamtos mokslų fakultetas

(Fakultetas)

Vaidas Jackevičius

(Studento vardas, pavardė)

Medicinos fizika, 621B92002

(Studijų programos pavadinimas, kodas)

„Dozės galios ir stebėtojo efekto įtaka ląstelių elgsenai spinduliniėje terapijoje“

AKADEMINIO SAŽININGUMO DEKLARACIJA

20__ m. _____ mėn. __ d.

Kaunas

Patvirtinu, kad mano, **Vaido Jackevičiaus**, baigiamasis darbas tema „Dozės galios ir stebėtojo efekto įtaka ląstelių elgsenai spinduliniėje terapijoje“ yra parašytas visiškai savarankiškai, o visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena darbo dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymu nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

Aš suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo faktui, man bus taikomos nuobaudos, remiantis Kauno technologijos universitete galiojančia tvarka.

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

(parašas)

TURINYS

Ižanga.....	7
1. Literatūros apžvalga.....	8
1.1. Ląstelių išgyvenimo kreivės	8
1.2. Ląstelių žūties mechanizmai	8
1.3. Jonizuojančios spinduliuotės biologiniai efektai	9
1.3.1. Fizikinė stadija	10
1.3.2. Sugertoji dozė	14
1.3.3. Paviršinė apšvitos dozė.....	16
1.3.4. Cheminė stadija	17
1.3.5. Biologinė stadija	19
1.4. Dozės galios efektas	21
1.5. Stebėtojo efektas	22
1.6. Darbo temos ir uždavinių pagrindimas.....	26
2. Metodai ir įranga	27
2.1. Linijinis greitintuvas	27
2.2. Rentgeno terapinis įrenginys	28
2.3. Klonogeninės analizės metodas	29
2.3.1. Ląstelių auginimas	30
2.3.2. Ląstelių skaičiavimas hemocitometro kameroje (Tripano mėlio testas)	31
2.3.3. Ląstelių apšvita	32
2.3.4. Ląstelių kolonijų fiksavimas.....	33
2.3.5. Ląstelių kolonijų skaičiavimas	34
3. Rezultatai.....	36
4. Išvados	52
5. Literatūra	53

Jackevičius V. Dozės galios ir stebėtojo efekto įtaka ląstelių elgsenai spindulinėje terapijoje. *Magistro* baigiamasis darbas / vadovas doc. dr. Saulius Mickevičius; Kauno technologijos universitetas, Matematikos ir gamtos mokslų fakultetas.

Mokslo kryptis ir sritis: Medicina ir sveikata, Biomedicinos mokslai.

Reikšminiai žodžiai: *Stebėtojo efektas, dozės galios efektas, jonizuojanti spinduliuotė, ląstelių išgyvenamumas, klonogeninė analizė.*

Kaunas, 2016. 54 psl.

SANTRAUKA

Šio darbo metu buvo tirta jonizuojančios spinduliuotės sukulto stebėtojo ir dozės galios efektų įtaką Kinijos žiurkėno kiaušidžių ląstelių išgyvenamumui. Stebėtojo efektui sukelti buvo naudojamas Rentgeno terapinis įrenginys Gulmay D3225 ir terpės pernešimo metodas, kurio metu, iš spinduliuote paveiktų ląstelių, augimo terpė buvo perkelta sveikoms ląstelėms. Dozės galios efekto įtaka ląstelėms buvo tiriama naudojant linijinį greitintuvą Varian Clinac DMX, Tyrimui buvo naudojamos trys skirtingos dozės galios: 1 Gy/min, 2 Gy/min, 3 Gy/min. Abiejų efektų poveikis ląstelėms buvo tirtas naudojant klonogeninės analizės metodą, vertinant suformuotų kolonijų skaičių eksperimentinėse ir kontrolinėse grupėse.

Tyrimo metu nustatyta, kad ląstelių išgyvenamumas mažėja didėjant sugertajai dozei ir dozės galiai. Didžiausias dozės galios efekto poveikis užfiksuotas mažų dozių intervale, kur padidinus dozės galią dvigubai, ląstelių kolonijų kiekis sumažėja 8 %, o padidinus dozės galią 3 kartus, kolonijų kiekis sumažėja 28 % daugiau, nei naudojant mažiausią tirtą dozės galią.

Stebėtojo efektas recipientinių ląstelių išgyvenamumui turėjo analogišką poveikį, kaip ir mažoms dozėms (iki 0,5 Gy) apšvitintų donorinių ląstelių atveju.

Jackevičius, Vaidas. *Influence of bystander and dose rate effects on cells behaviour in radiotherapy: Master's thesis in Medical physics / supervisor doc. dr. Saulius Mickevičius. The Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Kaunas University of Technology.*

Research area and field: Medicine and Health, Biomedical Sciences.

Key words: bystander effect, dose rate effect, ionizing radiation, cell survival, clonogenic assay.

Kaunas, 2016. 54 p.

SUMMARY

The aim of this work was to investigate ionizing radiation-induced dose rate and bystander effects to Chinese hamster ovary cells survival. Orthovoltage X-ray treatment unit Gulmay D3225 was used initiate bystander effect and media transfer assay method was applied. Applying media transfer assay method irradiated cell growth media was transferred to non-irradiated cells. Dose rate effect in irradiated cells was investigated using linear accelerator Varian Clinac DMX. Three different dose rates: 1 Gy/min, 2 Gy/min and 3 Gy/min were applied. The influence of both effects on irradiated cells was investigated using clonogenic assay. Clonogenic assay is the method used to determine cell reproductive death after irradiation. Method is based on calculation of grown cell colonies after irradiation.

It is shown that the cell survival decreases with increasing dose and dose rate. The biggest dose rate effect is seen in a small dose range, while twice increased dose rate corresponds to the decrease of the colonies number by 8 % and the triple increase of dose rate results in the decrease of colonies number by 28 %.

In low dose (0,5 Gy) region bystander effect on recipient cells survival was the same as in the case of donor cells irradiation.

IŽANGA

Jonizuojančios spinduliuotės sukeltas poveikis ląstelėse, kurios tiesiogiai nekontaktavo su spinduliuote, bet jose pastebimas biologinis atsakas yra vadinamas spinduliuotės sukeltu stebėtojo efektu. Šis reiškinys sulaukė nemažo susidomėjimo spindulinėje terapijoje dar 1953 m. [1] pastebėjus, jog po spindulinės terapijos pokyčiai organizme vyksta ne tik vėžinėse, tačiau ir šalia esančiose sveikose ląstelėse. Gretimuose audiniuose ir ląstelėse už švitinamo lauko ribų pradeda formotis metastazės, atsiranda DNR struktūros pakitimai ląstelėse.

Kitas svarbus faktorius į kurį svarbu atsižvelgti spinduliniame gydyme yra dozės galios efektas. Jis pasireiškia ląstelių išgyvenamumo pokyčiais esant tai pačiai dozei, bet skirtingai dozės galiai. Padidinus dozės galią galima sukelti didesnę biologinį efektą naudojant tas pačias dozes. Tačiau jei spindulinėje terapijoje būtų sumažinta paciento dozės galia paskirtajai dozei, tai atsiranda tikimybė pacientui likti neišgydytam nuo vėžio.

Darbo tikslas: Įvertinti jonizuojančios spinduliuotės sukulto stebėtojo bei dozės galios efekto poveikį Kinijos žiurkėno kiaušialąstės ląstelėms.

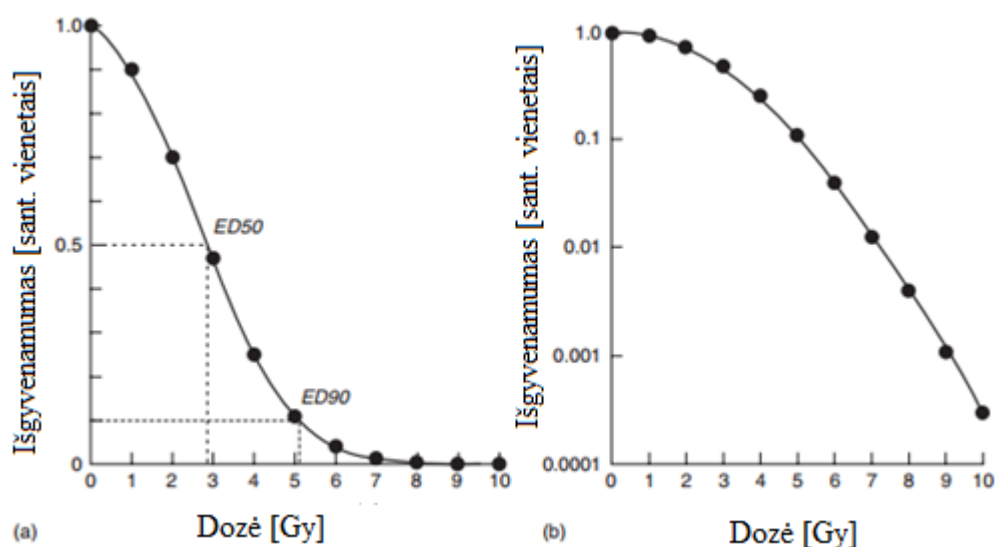
Darbo uždaviniai:

- Išanalizuoti jonizuojančios spinduliuotės poveikio mechanizmus ląstelėms.
- Išanalizuoti stebėtojo ir dozės galios efektus apšvitintose ląstelėse.
- Klonogeninės analizės metodu įvertinti dozės galios įtaką ląstelių išgyvenamumui.
- Klonogeninės analizės metodu įvertinti stebėtojo efekto įtaką ląstelių išgyvenamumui.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Ląstelių išgyvenimo kreivės

Jonizuojančios spinduliuotės paveiktoje ląstelėje vyksta įvairūs biologiniai procesai, dėl kurių ląstelė žūsta arba sugeba išgyventi. Ląstelių išgyvenamumas po jonizuojančios spinduliuotės poveikio atvaizduojamas kreive, kuri parodo ląstelių išgyvenamumo priklausomybę su sugerta doze. Kai yra naudojama ląstelių išgyvenamumo tiesinė skalė, kreivė yra sigmoidinės formos ir ties pabaiga labai lėkšta. Tai apsunkina išgyvenusių ląstelių vertinimą (1 pav. a)). Kad būtų lengviau įvertinti ir palyginti ląstelių išgyvenamumą dažnai yra pasirenkama ląstelių išgyvenamumo kreivę vaizduoti pusiau logaritminėje skalėje (1 pav. b)). Kita priežastis dėl kurios reikėtų rinktis tokį būdą yra ta, kad kai ląstelių žūtis yra atsitiktinė, tuomet ląstelių išgyvenamumo kreivė yra eksponentinė dozės funkcija. Tokiu atveju kreivė turėtų būti tiesi pusiau logaritminiame grafike [2].



1 pav. Tipinės ląstelių išgyvenamumo kreivės: a) linijinėje skalėje, b) pusiau logaritminėje skalėje (ED50 – apšvitos dozė, kuri nužudo 50 % ląstelių, ED90 – apšvitos dozė, kuri nužudo 90% ląstelių) [3]

1.2. Ląstelių žūties mechanizmai

Yra trys pagrindiniai ląstelių žuvimo būdai, apoptozė, autofagija ir nekrozė. Apoptozė apibūdinama kaip genetiškai užprogramuota ląstelių mirtis atsirandanti dėl biocheminių procesų, vykstančių ląstelėje. Autofagija yra procesas, kurio metu ligotos ląstelės yra pašalinamos iš organizmo. Trečia ląstelių mirties priežastis yra nekrozė. Nekrozė vyksta dėl išorinių veiksnių tokių kaip fermentų, cheminių medžiagų ar jonizuojančios spinduliuotės, poveikio ląstelei [2].

Apoptozės metu ląstelė traukiasi dėl citoplazminės kondensacijos, deformuojasi ir praranda tarpląstelines jungtis su gretimomis ląstelėmis. Branduolio chromatinas pradeda kauptis ant branduolio membranos kol ląstelė suyra į daugybę įvairaus dydžio apoptozinių kūnelių, kuriuose

yra citoplazmos, sukaupto chromatino ir organoidų. Tada apoptoziniai kūneliai yra absorbuojami mikroorganizmais ir tokiu būdu pašalinami iš audinio nesukeldami jam žalos. Šie morfologiniai įvykiai yra proteazės fermentų aktyvavimo pasekmė. Fermentai sukelia DNR skilimą tarp nukleosomų ir suskaldo baltymus, kurie atsakingi už citoplazmos ir organoidų vientisumą bei formą [3].

Terminas „*autofagija*“ reiškia „save valgantis“ ir aprašo procesą, kuriame „susidėvėjusios“ ląstelės dalys yra skaidomos pačioje ląstelėje norint gauti energiją bei naujas medžiagas ląstelei. Autofagija aktyvuojasi kaip atsakas į deguonies ar baltymų trūkumą, pakilus temperatūrai ar paveikus jonizuojančia spinduliuote. Dažniausiai šis mechanizmas skirtas padėti ląstelei išgyventi, tačiau taip pat gali lemti ląstelės žūtį, kai pašalinama ligota ląstelė. Kai kuriais aspektais ši ląstelių žūtis forma panaši į apoptozę, tačiau jos metu nėra aktyvuojami jokie fermentai [2].

Nekrozė pasireiškia tada, kai išorinis aplinkos poveikis ląstelę paveikia taip stipriai, jog ji nebegali atsistatyti. Šiuo atveju įvykus ląstelėje pratrūksta plazminė membrana, išsilieja citoplazma ir dėl to kyla uždegimas. Priešingai nei apoptozės atveju, ląstelių pašalinimas iš audinio yra daug sudėtingesnis, nes netvarkingai žūstančios ląstelės nesiunčia jokių signalų fagocitams, kurie turėtų jas praryti ir pašalinti. Todėl imuninei sistemai yra sunkiau surasti ir panaikinti dėl nekrozės žuvusias ląsteles. Pagrindiniai nekrozės tipai yra: koaguliacinė nekrozė, kuri atsiranda dėl išėmijos, kolikvacinė nekrozė – atsiranda dažniausiai dėl bakterinės infekcijos ir kazeozinė nekrozė, kuri yra koaguliacinės nekrozės rūšis ir atsiranda dėl mikobakterinės infekcijos [3].

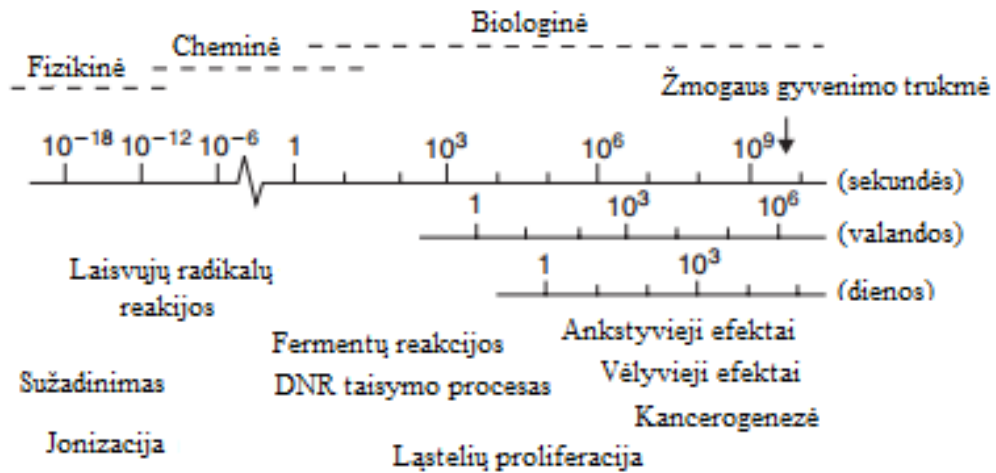
1.3. Jonizuojančios spinduliuotės biologiniai efektai

Biologinės sistemos apšvita sukelia seką įvairių procesų, kuriuos galima suskirstyti į 3 grupes (2 pav.):

Fizikinė stadija ($0 - 10^{-8}$ s) jos metu spinduliuotė sąveikauja su ląstelės atomais.

Cheminė stadija ($10^{-12} - 10$ s) tai periodas per kurį sužadinti ir jonizuoti atomai bei molekulės chemiškai reaguoja su kitomis ląstelės dalelėmis.

Biologinė stadija ($10^{-1} - 10^9$ s) jos metu pasireiškia ląstelių, audinių ir organizmo atsakas į apšvitą.



2 pav. Jonizuojančios spinduliuotės sukeltų efektų laiko skalė [3]

1.3.1. Fizikinė stadija

Fizikinė stadija prasideda, kai jonizuojančios spinduliuotės pradeda sąveikauti su ląstelės atomais. Sąveikaudama su medžiaga, spinduliuotė jonizuoja atomus (išmušdama orbitinius elektronus) arba juos sužadina (perkeldama elektronus į aukštesnį energetinį lygmenį). Antriniai elektronai, kurie buvo išmušti jonizacijos metu, taip pat gali sužadinti arba jonizuoti atomus taip sukeldami jonizacijos laviną.

Spinduliuotė klasifikuojama į jonizuojančią ir nejonizuojančią. Nejonizuojanti spinduliuotė neturi pakankamai energijos elektronams iš atomo išmušti, tačiau gali turėti pakankamai energijos juos sužadinti. Jonizuojanti spinduliuotė turi pakankamai energijos nutraukti chemines jungtis ir išmušti elektronus iš atomų [4]. Toliau ši spinduliuotė yra skirstoma į tiesiogiai ir netiesiogiai jonizuojančias. Tiesiogiai jonizuoja krūvį turinčios dalelės, tokios kaip elektronai, protonai, alfa dalelės ir sunkieji jonai. Tiesiogiai jonizuojanti spinduliuotė (energingos dalelės) perduoda energiją elektronams Kulononinės sąveikos su aplinkos atomais metu. Netiesiogiai jonizuoja neutralios dalelės: fotonai (Rentgeno ir gama spinduliuotė) ir neutronai. Šios dalelės aplinkai energiją perduoda dviem žingsniais. Pirma fotonai iš aplinkoje esančių atomų išmuša elektronus arba pozitronus (neutronai – protonus arba sunkiuosius jonus), o vėliau šios išmuštos dalelės sąveikauja su aplinka kaip tiesiogiai jonizuojančios dalelės [5].

Abi jonizuojančių spinduliuočių grupės yra naudojamos spinduliniame gydyme.

1.3.1.1. Fotonų sąveika su medžiaga

Pagal kilmę jonizuojanti fotoninė spinduliuotė gali būti:

- Stabdančioji Rentgeno spinduliuotė, generuojama elektronų ir branduolio sąveikos metu;
- Charakteringoji Rentgeno spinduliuotė, siejama su elektronų šuolių orbitalėse;

- Radioaktyviųjų branduolių skleidžiama gama spinduliuotė;
- Spinduliuotė dėl pozitronų ir elektronų anihiliacijos.

Fotono tikimybė sąveikauti su medžiagos atomu ir sąveikos skerspjūvis priklauso nuo fotonų energijos $h\nu$ ir medžiagos atominio numerio. Fotonai gali sąveikauti su medžiagos atomo stipriai surištais elektronais (fotoefektas), su branduolio Kulono lauku (porų susidarymas) arba su silpnai surištu elektronu (Komptono efektas). Sąveikaujant su medžiaga fotonas gali visiškai išnykti (fotoefektas, porų susidarymas) arba gali būti išsklaidytas (koherentinė sklaida, Komptono efektas) [5].

- *Fotoefektas*

Šiame procese fotono energija $h\nu$ yra sunaudojama išmušti orbitinį elektroną iš atomo. Dažniausiai yra išmušami (išlaisvinami) vidinio (K sluoksnio) elektronai. Šios sąveikos metu visa fotono energija yra absorbuojama elektrono. Dalis energijos yra sunaudojama elektrono išlaisvinimo darbui, o kita virsta elektrono kinetine energija [6]:

$$h\nu = E_j + E_e, \quad (1)$$

kur E_j – jonizacijos energija, E_e – elektronui suteikta kinetinė energija [6].

Jei fotoelektronai įgyja pakankamai energijos, jie toliau sąveikauja su medžiaga kaip ir elektroninės spinduliuotės metu. Į išmušto elektrono vietą atkeliauja aukštesnio energetinio lygmenio elektronas išspinduliuodamas perteklinę energiją charakteringųjų Rentgeno spindulių pavidalu [3].

- *Koherentinė (Reilėjaus) sklaida*

Šios sąveikos metu fotonas yra išsklaidomas, tačiau jis nepraranda energijos, nepakinta jo dažnis nei bangos ilgis. Audinyje ar audiniui ekvivalenčiai medžiagai Reilėjaus sklaida lyginant su kitomis sąveikomis yra maža, tik keli procentai [5].

- *Komptono sklaida*

Fotonas susidurdamas su atomo elektronu dalį savo energijos perduoda jam, o likusi dalis energijos $h\nu^*$ pereina išsklaidytam fotonui. Elektronas gavęs pakankamai energijos, išlekia iš atomo:

$$h\nu = E_j + E_e + h\nu^*. \quad (2)$$

Kadangi pakinta fotono energija, todėl pakinta ir jo dažnis, todėl Komptono sklaida yra nekoherentinė. Išsklaidytas fotonas sąveikauja su kitų atomų elektronais ir galiausiai išnyksta fotoefekto procese [6].

- *Elektrono – pozitrono porų susidarymas.*

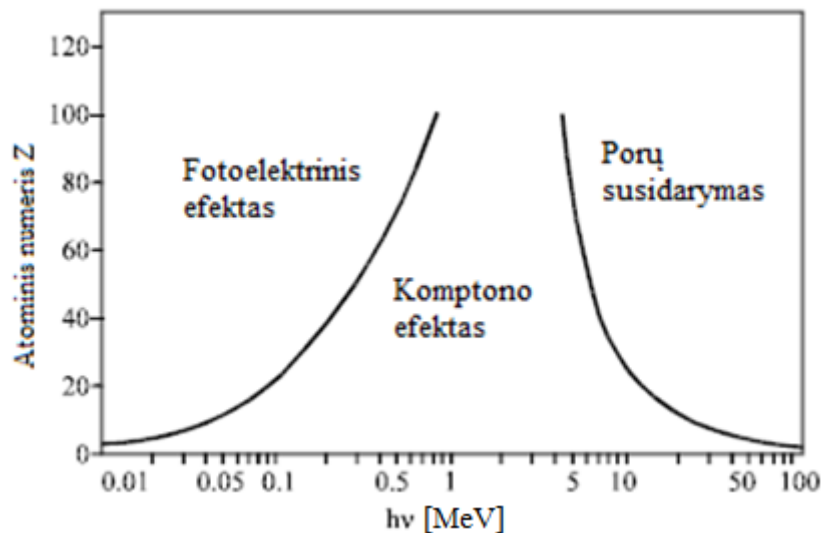
Porų susidarymas yra absorbcinis procesas, kuriame didelės energijos Rentgeno ir gama fotonai atomo branduolio lauke sukuria elektrono ir pozitrono porą. Norint įvykti šiam procesui, būtina, kad fotono energija viršytų suminę elektrono ir pozitrono energiją [3]:

$$h\nu > m_e c^2 + m_{e^+} c^2 = 2m_0 c^2 = 1,02 \text{ MeV} \quad (3)$$

kur, m_e , m_{e^+} – elektrono ir pozitrono rimties masės, c – šviesos greitis [6].

Kuomet fotono energija yra didesnė negu 1,02 MeV, vyksta elektrono – pozitrono porų susidarymas [3].

Esant mažoms fotonų energijoms (iki 0,5 MeV), dominuoja fotoefektas. Energijų intervale nuo 0,5 iki 5 MeV dominuoja Komptono efektas, o jei energija viršija 5 MeV dominuojantis procesas tampa porų susidarymas (3 pav.) [6].



3 pav. Fotonų sąveikos su medžiaga procesų dominavimas pagal fotono energiją [7]

1.3.1.2. Elektronų sąveika su medžiaga

Krūvį turinčios ir neturinčios dalelės savo energiją praranda skirtingai. Pavieniai fotonai gali keliauti per medžiagą be jokios sąveikos ir prarasti savo energiją tik viename ar keliuose susidūrimuose, tačiau krūvį turinčios dalelės yra apsuptos Kulono elektriniu lauku, dėl kurio sąveikauja su visais atomais pro kuriuos pralekia. Jei nagrinėjamas tik sąveikos atsirandančios dėl Kulono jėgos, tai yra keturi sąveikų tipai su medžiaga [3].

- *Netamprioji sąveika su elektronais*

Tai yra pagrindinis energijos perdavimo mechanizmas tarp spinduliuotės ir atomų elektronų, ypač kai dalelių greitis yra mažas. Dėl šios sąveikos atomo elektronas yra sužadinamas arba yra išmušamas. Jonizacija yra galima tada, kai perduota energija viršija jonizacijai reikalingą energiją.

- *Netampri sąveika su atomų branduoliais*

Šios sąveikos metu elektronas sužadina branduolį arba įvyksta stabdomasis spinduliavimas. Stabdomasis spinduliavimas įvyksta dėl Kuloninės sąveikos su atomų branduoliais, kurių metu yra išspinduliuojamos elektromagnetinės bangos. Spinduliavimo intensyvumas proporcingas elektrono kinetinei energijai ir branduolio atominiam numeriui [3].

- *Tamprioji sąveika su atomų branduoliais*

Tampriai sąveikaujant elektronams su atomų branduoliais, elektronas gali perduoti branduoliui tik labai mažą dalį savo kinetinės energijos, tik apie 10^{-4} dalį savo energijos. Todėl galima teigti, kad tampraus smūgio metu elektronai branduoliams energijos neperduoda, elektronų energija nepakinta, tik pasikeičia jų judėjimo kryptis. Neįvyksta nei sužadinimas, nei jonizacija [6].

- *Tamprioji sąveika su elektronais*

Kaip ir tampriosios sąveikos su atomų branduoliais metu, spinduliuotės elektronas nepraranda energijos, o tik pakeičia kryptį (sklaidą) [3].

Pagrindiniai elektronų energijos nuostoliai medžiagoje susiję su netampria sklaida. Judėdami medžiagoje elektronai patiria labai daug netampriosios sklaidos aktų, todėl galima sakyti, kad elektronai patiria tolydų stabdymą, kurį aprašo Betės teorija [6].

1. elektronai patiria energetinius nuostolius tolydžiai visoje judėjimo trajektorijoje.

2. elektrono energija E bet kuriame trajektorijos taške vienareikšmiškai priklauso nuo elektronų nueito kelio R iki to taško [6].

Betės teorijoje elektronų energijos nuostoliai netampraus stabdymo metu išreiškiami taip:

$$\frac{dE(R)}{dR} = -\frac{2\pi N_A Z E^4 \rho}{AE} \ln\left(\frac{bE}{I}\right) = -7,85 \cdot 10^4 \frac{Z\rho}{AE} \ln\left(\frac{bE}{I}\right), \quad (4)$$

kur N_A – Avogadro skaičius, e – elektrono krūvis, Z ir A – medžiagos atomų atominis numeris ir atominė masė, ρ – medžiagos tankis, g/cm^3 , E – elektronų energija, eV, $b = 1,166$ – koeficientas, I – atomo sužadinimo energija, eV, R – kelias, cm [6].

Iš šios lygties seka, kad nustatyto sklaidos kampo ir nustatytos elektronų energijos sklaidos tikimybė didėja didėjant medžiagos atomų atominiam numeriui Z . Elektronų energijos nuostolių maksimumas yra ne paviršiuje, o gilesniuose medžiagos sluoksniuose. Juose elektronai perduoda medžiagai didžiausią savo energijos dalį. Netoli paviršiaus elektronų kinetinė energija yra didžiausia, todėl elektronai trumpai sąveikauja su paviršiniaus medžiagos atomais. Judėdami medžiaga bei prarasdami kinetinę energiją elektronai sulėtėja. Dėl šios priežasties elektronų sąveikos laikas su medžiagos atomais padidėja ir elektronų tampriosios sąveikos tikimybė išauga. Gilesnėse nei energijos nuostolių maksimumo srityse elektronų energija jau pakankamai

maža, todėl ir energetiniai nuostoliai mažėja. Elektronų nuostolių maksimumas, didėjant elektronų energijai, slenka į didesnių gylių pusę [6].

1.3.2. Sugertoji dozė

Sugertoji dozė yra nestochastinis dydis naudojamas tiek tiesioginei, tiek netiesioginei jonizuojančiai spinduliuotei įvertinti. Esant netiesioginės spinduliuotės atvejui, energija medžiagai yra perduodama dviem etapais. Pirmiausiai tiesioginė spinduliuotė perduoda energiją antrinėms krūvį turinčioms dalelėms, o vėliau šios dalelės dalį savo kinetinės energijos perduoda medžiagai (sugertoji dozė) bei praranda dalį savo energijos dėl radiacinių nuostolių.

Sugertoji dozė yra apibrėžiama kaip vidutinė energija E , sugerta m masės medžiagoje, kurios tūris yra V .

Sugertoji energija E yra skirtumas tarp suminės visų dalelių į tiriamąjį tūrį V perduotos energijos ir suminės visų dalelių, palikusių tūrį V , energijos, įskaitant energijos ir masės transformacijas tūryje [5].

$$D = \frac{dE}{dm} \quad (5)$$

kur dE – medžiagos tūrio elementui suteikta vidinė jonizuojančiosios spinduliuotės energija, dm – to tūrio elemento medžiagos masė.

Pagrindinis dozės matavimo vienetas yra grėjus (Gy), $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg}$.

1.3.2.1. Lygiavertė dozė

Kadangi žalingas jonizuojančios spinduliuotės poveikis nekoreliuoja tiesiškai su sugertąja doze ir kiekvienos spinduliuotės tipas bei energija sukelia skirtingus biologinius poveikius, todėl norint, tai įvertinti įvedama lygiavertės dozės sąvoka. Lygiavertė dozė įvertina spinduliuotės daromą poveikį lyginant su etaloniniu 200 keV energijos Rentgeno spindulių poveikiu. Ši dozė apskaičiuojama sugertąją dozę D , padauginant iš svorinio jonizuojančios spinduliuotės daugiklio w_R [8].

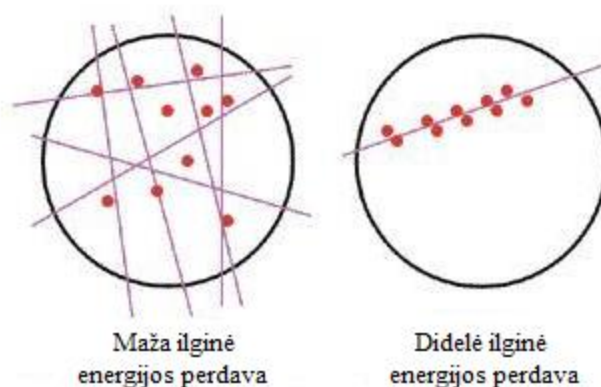
$$H_T = \sum_R w_R D_{T,R} \quad (6)$$

Kur w_R – svorinis jonizuojančios spinduliuotės daugiklis, $D_{T,R}$ – vidutinė sugertoji dozė T audinyje arba organe, apšvitintame R spinduliuote. Ši sistemos vienetas sivertas (Sv).

Lygiavertės dozės sąvoka yra taikoma tik žmonių gautai apšvitai. Svorinis daugiklis w_R yra priklausomas ir nuo spinduliuotės tipo, ir nuo energijos. Visų spinduliuočių tipų biologinis poveikis yra lyginamas su Rentgeno ir gama spinduliuotės biologiniais poveikiais. Šių spinduliuočių svorinis daugiklis w_R visoms energijoms yra lygus 1, todėl lygiavertė dozė yra

lygi sugertajai dozei. Tokį patį svorinį daugiklį turi ir visų energijų elektronai ir miuonai. Tačiau alfa spinduliuotė daro 20 kartų stipresnį poveikį, o neutronams svorinis daugiklis kinta nuo 5 iki 20, priklausomai nuo energijos.

Svorinis daugiklis yra apibrėžiamas kaip ilginės energijos perdavos funkcija, kuri apibūdina kaip jonizuojanti spinduliuotė praranda energiją pereidama vienetinį atstumą medžiagoje. Skirtingos spinduliuotės perduoda nevienodus kiekius energijos medžiagai, todėl turi skirtingas ilgines energijos perdavos. Rentgeno, gama spinduliuotės ir elektronai turi mažas perdavos, nes jonizacijos aktai medžiagoje pasiskirsto atsitiktinai (4 pav.). Didele perdava pasižymi protonai, neutronai ir alfa dalelės. Šių spinduliuočių jonizaciniai aktai pasiskirsto netolygiai ir yra sutelkiami mažoje erdvėje, kas sukelia didesnę žalą. Todėl šios spinduliuotės daro didesnę biologinį poveikį, nei mažą ilginę energijos perdavą turinčios spinduliuotės [8].



4 pav. Vienodos dozės ir vienodo skaičiaus jonizacijų pasiskirstymas esant skirtingoms energijos perdavoms [9]

1.3.2.2. Efektinė dozė

Jonizuojančios spinduliuotės poveikis priklauso ne vien nuo spinduliuotės tipo ir energijos, tačiau ir nuo biologinio audinio tipo. Efektinė dozė yra lygi audinių lygiaverčių dozių, padaugintų iš atitinkamo audinio jautrio svorinio daugiklio w_T suma:

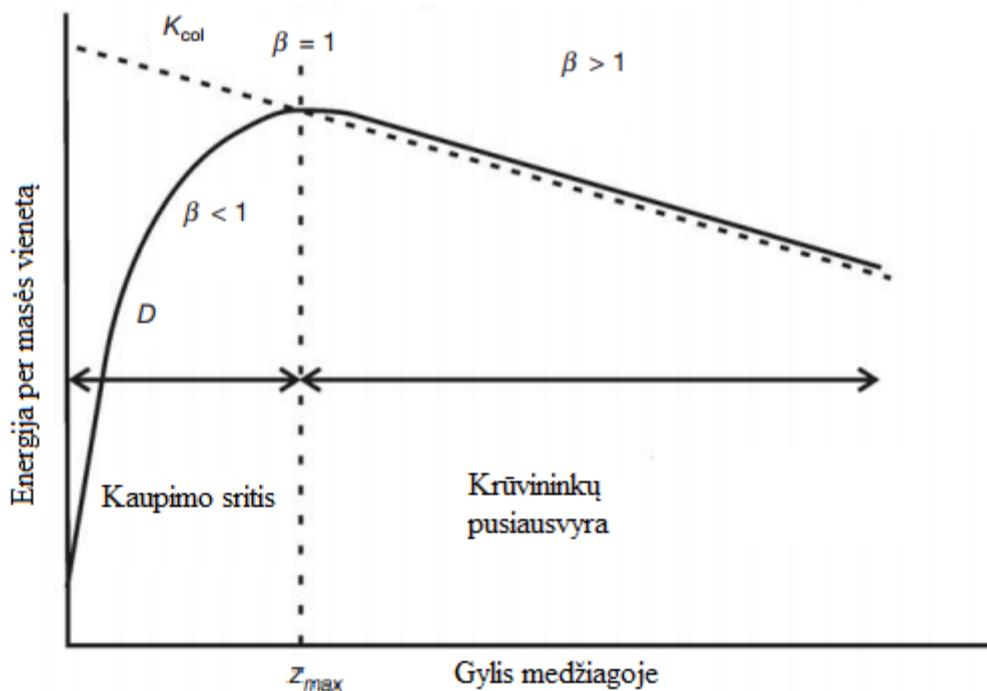
$$E = \sum_T w_T H_T = \sum_T w_T \sum_R w_R D_{T,R} \quad (7)$$

Kur H_T – T organo ar audinio lygiavertė dozė, w_T – svorinis audinių jautrio daugiklis, $D_{T,R}$ – T audinio arba organo vidutinė sugertoji dozė.

Svorinis audinio daugiklis w apibūdina tam tikro audinio atsitiktinių (stochastinių) spinduliuotės poveikio efektų atsiradimo tikimybę. Patys jautriausi organai jonizuojančiai spinduliuotei yra lytinės liaukos (0,2), raudonieji kaulų čiulpai (0,12), storoji žarna, plaučiai ir skrandis [10].

1.3.3. Paviršinė apšvitos dozė

Esant megaelektronvoltų eilės Rentgeno spinduliutei, paviršiaus dozė yra daug mažesnė, nei maksimali dozė tam tikrame gylyje z_{max} (5 pav.). Paviršinė apšvitos dozė priklauso nuo spinduliuotės energijos ir lauko dydžio. Kuo didesnė spinduliuotės energija, tuo mažesnė paviršinė apšvitos dozė. Naudojant $10 \times 10 \text{ cm}^2$ dydžio apšvitos lauką bei 6 MeV energijos Rentgeno spindulius, paviršius gauna 15% maksimalios apšvitos dozės, o naudojant 18 MeV energijos Rentgeno spindulius tik 10% maksimalios apšvitos dozės. Esant tai pačiai Rentgeno spindulių energijai paviršinė apšvitos dozė didėja didinat apšvitos lauką [5].



5 pav. Didelės energijos Rentgeno spinduliuotės sugertosios dozės ir susidūrimų kermos pasiskirstymas medžiagoje pagal gylį [5]

Apšvitos dozės profilio sritis tarp paviršiaus $z = 0$ ir gylio $z = z_{max}$ yra vadinamas kaupimo sritimi. Šioje srityje neegzistuoja krūvį turinčių dalelių pusiausvyra ir sugertoji dozė yra daug mažesnė nei susidūrimų kerma. Tačiau pasiekus gylį z_{max} , kuris apytiksliai atitinka antrinių elektronų lėkį yra pasiekama pusiausvyra ir ten sugertoji dozė yra lygi susidūrimų kermai. Einat gilyn $> z_{max}$ tiek sugertoji dozė, tiek susidūrimų kerma mažėja dėl Rentgeno spinduliuotės silpimo medžiagoje [5].

Paprastai tam tikroje vietoje fotonų energijos perdavimas (kerma) krūvį turinčioms dalelėms neatitinka sugertosios dozės toje pačioje vietoje. Tai atsitinka todėl, kad sugeneruoti antriniai elektronai turi baigtinį lėkį medžiagoje. Kai didelės energijos fotonai pasiekia medžiagos paviršius jų srautas tuo metu yra didžiausias ir susidūrimų kerma yra maksimali.

Tačiau krūvininkų srautas kartu su sugertąja doze didėja kaip gylis funkcija kol pasiekiamas z_{max} . Kadangi paviršiuje krūvininkų srautas mažiausias todėl ir sugertoji dozė yra mažiausia. Susivienodinus fotonų srautui su krūvininkų srautu yra pasiekama pusiausvyra [5].

1.3.4. Cheminė stadija

Ląstelių jonizacija ir sužadinimas gali nutraukti cheminius ryšius tarp ląstelės molekulių ir suformuoti laisvuosius radikalus. Šie radikalai gali būti labai reaktyvūs ir sąveikaudami su ląstelės molekulėmis jas pažeisti (ypač DNR molekules) [3].

Maždaug 75-80% ląstelių turinio sudaro vanduo. Todėl dėl jonizuojančios spinduliuotės poveikio susidarantys vandens radiolizės produktai yra pagrindiniai ląstelių DNR pažeidimų sukėlėjai. Esant mažai ilginei energijos perdavai, dominuoja tiesioginis vandens sužadinimas ir jonizacija antriniais elektronais (6 pav.). Jei jonizuojanti spinduliuotė sužadina vandens molekulę, tai ji gali disocijuoti į H^\bullet ir OH^\bullet :



Jei vanduo jonizuojamas – susidaro H_2O^+ jono radikalas:



Sužadinta vandens molekulė H_2O^* , H^\bullet ir OH^\bullet radikalai ir vandens jonizacijos produktai H_2O^+ ir e^- yra pirminiai vandens radiolizės produktai. H_2O^+ jonas turi teigiamą krūvį ir turi nesuporuotą elektroną išorinėje orbitalėje, kad padaro jį labai reaktyviu. Šio jono gyvavimo laikas yra tik 10^{-10} s. H_2O^+ jono radikalas reaguoja su vandens molekulėmis ir suformuoja reaktyvų hidroksilo radikalą OH^\bullet [3]:



arba disocijuoja:



Jonizacijos metu išmuštas elektronas sąveikauja su H_2O ir sukuria H_2O^- arba reaguoja ir padaro OH^- ir H^\bullet :



Per pirmas 10^{-11} s yra sukuriama H^\bullet , OH^\bullet ir e^- [3].

Hidroksilo radikalai gali reaguoti tarpusavyje ir sudaryti labai reaktyvų junginį – vandenilio peroksidą:



Jei laisvasis deguonis patenka į ląstelę, tai elektronas sąveikaudamas su juo sukuria radikalus:



o šie reaguoja su vandens molekulėmis:

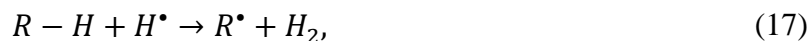


Kaip matome iš (14) lygties deguonies perteklius ląstelėse skatina labai reaktyvių deguonies radikalų gamybą, kas veda prie tolesnės DNR žalos [3].

1.3.4.1. Reakcijos su DNR

Vandens radiolizės metu susidarę radikalai DNR molekulę gali pažeisti keletu skirtingų būdų [3]:

- Vandenilio atomo ekstrakcija



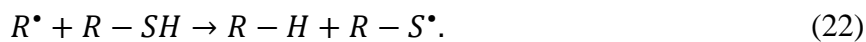
- Disociacija:



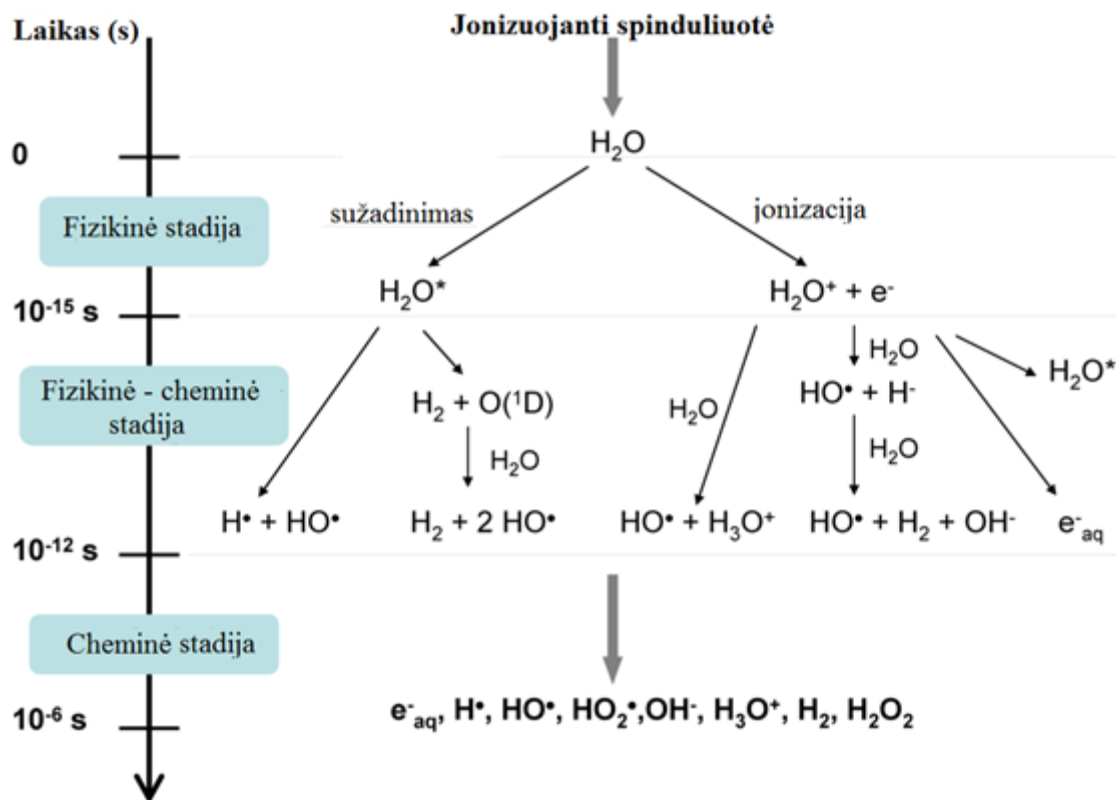
- Papildymo reakcija:



- Atkūrimo reakcija:



Ne visos šios reakcijos vienodai pavojingos ląstelės gyvybingumui. Pagal atliktus bandymus nustatyta, kad pagrindinis DNR pažeidų sukėlėjas yra hidroksilo OH^{\bullet} radikalas [4].



6 pav. Pagrindinės radiolizės reakcijos [11]

1.3.5. Biologinė stadija

Biologinei fazei būdingas laikotarpis, kai visi inicijuoti procesai ląstelėse jau vyksta. Fermentai ištaiso daugumą pažeidimų DNR molekulėje, tačiau dalis likusių neištaisytų pažeidimų gali sąlygoti ląstelės žūtį ar mutacijas. Prieš žūvant, ląstelės gali keletą kartų mitotiškai pasidalinti. Per pirmas savaites ir mėnesius po apšvitos pirmiausiai žūsta kamieninės ląstelės, o vėliau prarandamos ir kitos paveiktos ląstelės, sukeldamos žalą audiniams. Tai yra ankstyvasis efektas atsirandantis po apšvitos. Praėjus tam tikram laiko tarpui pasireiškia vėlyvosios reakcijos į jonizuojančią spinduliuotę, tokios kaip fibrozė ir kraujo kūnelių pažeidimai. Dar vėliau gali išsivystyti navikai. Tai iliustruoja faktą, kad jonizuojančios spinduliuotės poveikis gali užsitęsti net iki kelių metų po apšvitos [3].

Įvairūs pokyčiai atsiranda DNR molekulėje dėl dalijimosi klaidų, karščio, metabolinių procesų ir jonizuojančios spinduliuotės. Vidutiniškai per vieną dieną šie procesai ląstelės DNR pažeidžia nuo 10^3 iki 10^6 kartų. Daugumą šių pažeidimų ištaiso pati ląstelė, tačiau mažiau kaip 1000 ilgalaikių pažeidimų lieka [3].

DNR pažaidų šaltinius galima suskirstyti į dvi grupes [4]:

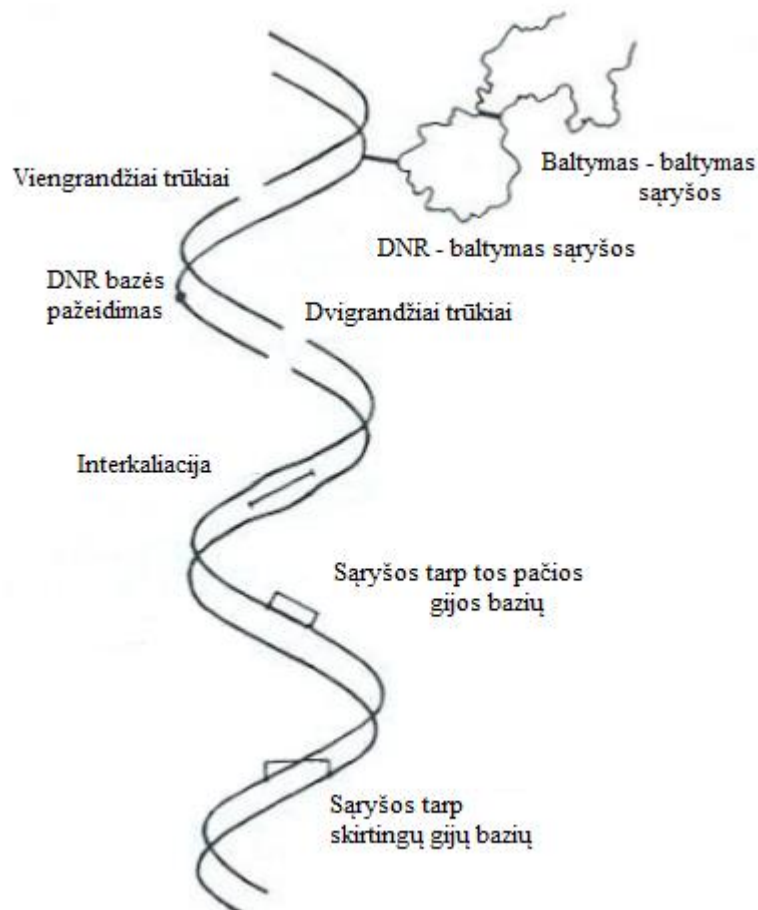
- *Endogeninius* – dauginimosi klaidos, reaktyviųjų deguonies formų pažeidimai atsirandantys ląstelei kvėpuojant ir ypač dėl oksidacinio deaminavimo proceso.

- *Eksogeninius* – išorinių priežasčių (radiacija, toksinai, mutageninės cheminės medžiagos ir kt.) sukeltus procesus.

Pažeistų DNR replikacija prieš ląstelių dalijimąsi gali lemti pažeistų bazių įtraukimą į DNR grandinę. Tuo būdu dukterinės ląstelės gali paveldėti mutacijas, iš kurių jau nebegali atstatyti originalios DNR sekos.

DNR pažaidų tipai (7 pav.):

- *DNR bazių modifikacijos* – visos keturios DNR molekulės bazės gali būti modifikuojamos įvairiuose pozicijose.
- *Normalių bazių nesutapimai* – tai DNR replikacijos pasekmė, kai netinkama DNR bazė yra įterpiama naujai formuojamą DNR grandį.
- *DNR viengrandžiai trūkiai ir dvigrandžiai trūkiai.*
- *Tos pačios grandies DNR – DNR sąryšos.*
- *DNR – DNR sąryšos tarp priešingų grandžių.*



7 pav. DNR pažaidų tipai [3]

1.3.5.1. Radiacijos sukeltos mutacijos

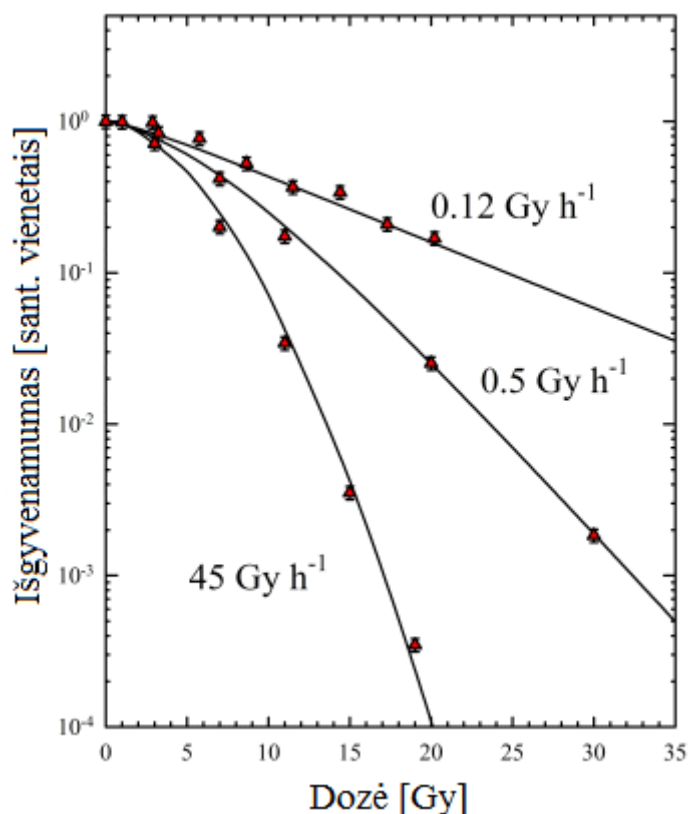
Spinduliuotės gali pakeisti molekulės genetinę informaciją taip sukeldama mutaciją. Mutacija atsiranda dėl DNR bazių sekos modifikacijos. Šie DNR pokyčiai gali būti kokybiniai (bazė yra įterpiama, panaikinama arba pakeista) ir kiekybinė (sumažinamas arba padidinamas genų skaičius). Mutacijos lemia skirtingų baltymų ekspresiją arba gali pakeisti baltymų gamybą. Spinduliuotės sukeltų mutacijų dažnis proporcingai didėja didėjant apšvitos dozei. Esant didelėms spinduliuotės dozėms ląstelės dažniau žūsta, nei spėja mutuoti, todėl mutacijų dažnis mažėja [4].

1.4. Dozės galios efektas

Klasikinis dozės galios efektas, kuris yra labai svarbus spindulinėje terapijoje, atsiranda dėl ląstelių atsistatymo mechanizmo, kurį suaktyvina jonizuojanti spinduliuotė. Yra žinoma, kad dozės galia įtakoja ląstelių atsaką į jonizuojančią spinduliuotę. Sumažinus dozės galią, išauga švitinimo laikas ir dozės sukelti biologiniai efektai ląstelei sumažėja, tačiau sugertoji dozė lieka ta pati. Taigi kuo ilgesnis švitinimo laikas, tuo daugiau laiko ląstelė turi atsistatymui [12].

Dozės galios efektas smarkiai priklauso nuo ląstelių kultūros. Dėl sąlyginai ilgo pažaidų atstatymo laiko, daugumos žmogaus ląstelių kultūrų išgyvenamumo kreivės yra gulsčios po mažos dozės galios apšvitos. Priešingas poveikis stebimas naudojant dideles dozės galias, kai ląstelės nespėja atstatyti sukeltų pažaidų – išgyvenamumo kreivė tampa statesnė. Tačiau yra išimčių tarp ląstelių kultūrų. HeLa ląstelių kultūros atskas į skirtingas dozių galias yra priešingas. Yra toks dozių galių intervalas, kuriame mažinant dozės galią mažėja ir ląstelių išgyvenamumas [2].

Ląstelių išgyvenamumo kreivė, sumažinus dozės galią, ląstelių išgyvenamumo kreivė tampa plokštesnė, „petys“ dingsta (8 pav.). Dozės galiai esant mažesnei nei 0,1 Gy/min, gauta dozė yra efektyvi nei dažniausiai naudojamos dozių galios spindulinėje terapijoje (1 – 10 Gy/min). Tai atsitinka dėl to, kad dalis jonizuojančios spinduliuotės sukeltų pažaidų nėra mirtinos ir gali būti ištaisytos net ekspozicijos metu [4].



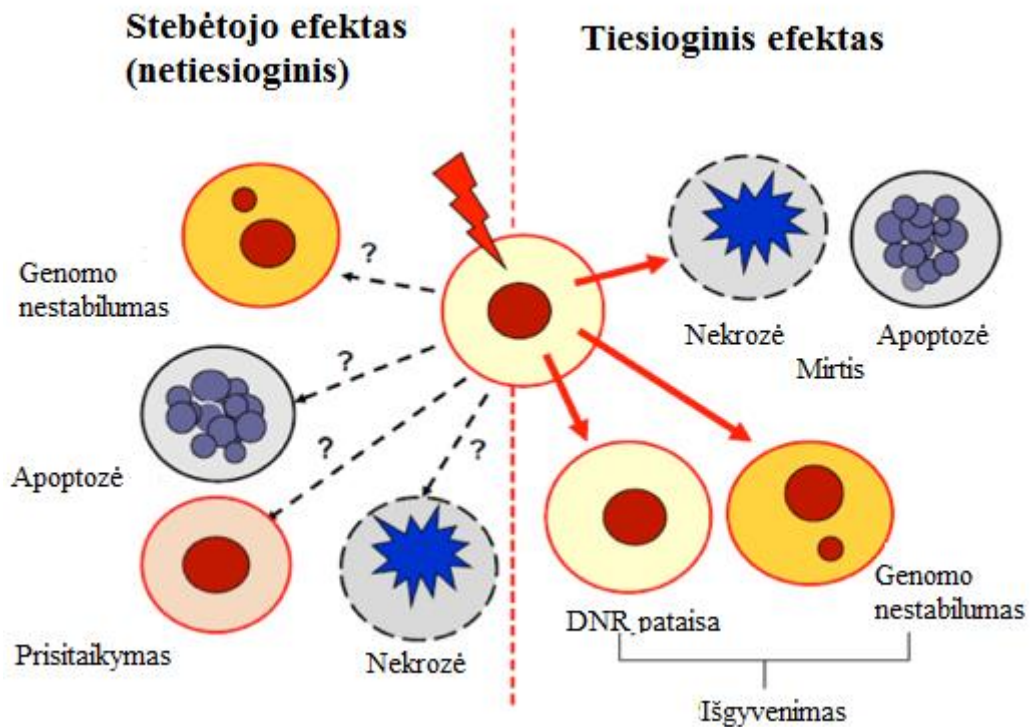
8 pav. Kinijos žiurkėno kiaušidės ląstelių išgyvenamumo kreivė, esant skirtingoms dozės galioms [13]

Dozės galios efektas yra pasitelkiamas gydant tam tikros rūšies navikus. Nevisos vėžinės ląstelės yra vienodai jautrios dozės galios kitimui. Vienos iš jų yra prostatos karcinomos ląstelės, kurios yra jautresnės dozės galios efektui nei aplink juos esančios sveikos audinių ląstelės. Todėl pasinaudojus šia savybe galima išgydyti pacientą sukeliant jam mažiausią įmanomą žalą [2].

1.5. Stebėtojo efektas

Ankščiau radiobiologijoje buvo teigiama, kad ląstelės yra pažeidžiamos tik tiesiogine apšvita į jų branduolius. Šis modelis teigia, kad tik apšvitintoje vietoje atsiranda spinduliuotės sukeltos mutacijos, o greta esantys audiniai išlieka sveiki. Tačiau mokslininkai pastebėjo, kad tiek *in vivo*, tiek *in vitro* eksperimentuose yra pažeidžiami greta esantys neapšvitinti audiniai bei ląstelės. *In vitro* eksperimente apšvitinus 1% ląstelių alfa dalelėmis buvo pastebėta chromatidų apsikeitimai, kurie yra pirminis ląstelių mutacijos požymis, daugiau nei 30% ląstelių. Ši priklausomybė tarp spinduliuote paveiktų ir nepaveiktų ląstelių buvo pavadinta stebėtojo efektu. Buvo atlikti eksperimentai su Černobylio avariją išgyvenusių žmonių kraujo serumais. Kraujo serumo perkėlimas tų pačių žmonių ląstelių kultūroms sukėlė chromosomų pažeidimus. Tokias pat pažeidimus sukėlė ir spindulinės terapijos pacientų kraujo serumai. Šie eksperimentai parodė, kad stebėtojo efektas yra ilgalaikis ir gali daryti poveikį net po 20 metų. Stebėtojo efektas gali sukelti įvairiausių pažeidimus, tokius kaip: genų pakitimai, DNR pažeidimai, mutacijos, ląstelių

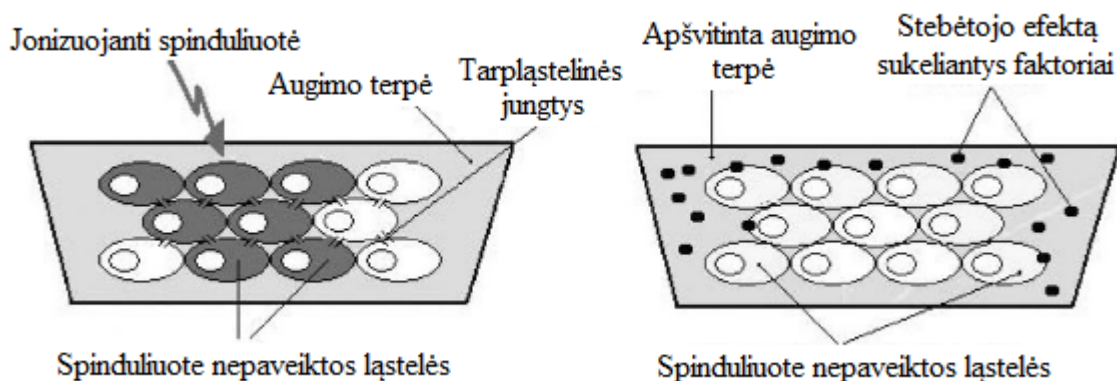
žūtis greta esančioms ląstelėms, kurios nebuvo paveiktos jonizuojančia spinduliuote (9 pav.) [14].



9 pav. Tiesioginio spinduliuotės poveikio ir apšvitintų ląstelių sukeltas stebėtojo efektas. Klausukai reiškia, kad nėra iki galo išsiaiškinta kokie signalai daro įtaką pakitimams sveikose ląstelėse [15]

Terminas stebėtojo efektas (bystander effect) aprašo procesus, kurie atsiranda šalia esančioms ląstelėms dėl streso ar dirgiklių esant greta spinduliuote pažeistų ląstelių. Šie procesai yra kitokie nei tiesiogiai paveiktų ląstelių. Manoma, kad sveikos ląstelės reaguoja gavusios tam tikrus molekulinis signalus iš jonizuojančia spinduliuote paveiktų ląstelių [14]. Šie molekuliniai signalai gali būti perduodami dviem būdais: ląstelėms fiziškai kontaktuojant viena su kita, arba per terpę ir audinius (10 pav.) [1]. Molekuliniais signalais gali būti laisvieji deguonies radikalai, kurie sukelia oksidacinius DNR pažeidimus, taip pat citokinai, oksidaciniai fermentai, uždegiminio atsako žymės, kalcio jonų cirkuliacijos sutrikimai. Nustatyta, kad paveikus ląstelės citoplazmą jonizuojančia spinduliuote, sukeliama stiprūs pakitimai ląstelių mitochondrijoms. Paveikus ląsteles jonizuojančia spinduliuote, dėl DNR pažeidimų jose gali didėti p53 koncentracija ar pasireiškia neįprasta šio baltymo veikla. Baltymas p53 yra žinomas kaip ląstelės apoptozės, bei ciklo reguliatorius ir yra svarbus DNR atsistatymui. Šio baltymo perteklius skatina ląstelių ankstyvą apoptozę – programuotą žūtį. Apoptozės procesas pirmiausia apima pradinę fazę, kuri priklauso nuo minėtų skleidžiamų signalų. Yra daroma prielaida, kad ląstelės apoptozės signalus gali siųsti tiesiogiai viena kitai, taip sukeliant stebėtojo efektą [16]. Tačiau šie perdavimo mechanizmai šiuo metu nėra iki galo suprasti, o stebėtojo efektas svarbiausias esant mažoms

apšvitos dozėms, kai tiesiogiai paveikiama tik maža dalis ląstelių ir smarkiai išauga rizika likusioms sveikoms ląstelėms [3].



10 pav. Stebėtojo efekto pasireiškimo mechanizmai: a) kontaktuojant ląstelėms tarpusavyje per tarpląstelines jungtis; b) per faktorius, kurie yra išskirti į augimo terpę [2]

Spindulinėje terapijoje dažnai po plaučių ir prostatos gydymo spinduliuote, susiformuoja antriniai vėžiai už švitinamojo lauko ribų. Mažo ploto kūno apšvita gretimoms audiniams sukelia ląstelinio ir molekulinio lygio pokyčius. Po apšvitos audinių ląstelėse smarkiai padidėja P53 aktyvumas, chromosomų trūkiai, mitotinė mirtis bei apoptozė. Stebėtojo efekto ar spindulinių efektų pasireiškimas už spinduliuotės lauko yra siejami su imunine sistema, laisvaisiais deguonies radikalais, oksidaciniu stresu, genu ekspresijos pokyčiais ir epigenetiniais modulatoriais.

Imuninė sistema susideda iš daugybės įvairaus tipo molekulių, kurios saugo žmogaus organizmą nuo infekcijų ir ląstelių žūties. Imuninę sistemą aktyvuoja citokinai. Citokinai yra labai didelė grupė baltyminių medžiagų, kuri koordinuoja imunines reakcijas, uždegimus ir kraujo ląstelių gamybą. Pagrindiniai stebėtojo efekto sukiantys imuninės sistemos faktoriai yra makrofagai [17]. Jų stimuliacija jonizuojančia spinduliuote pakelia citokino IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF α ir TNF β lygius greta esančioms neapšvitintoms ląstelėms. Pavyzdžiui dalinė plaučių apšvita parodė, kad citokino lygis išauga apsaugotoje plaučių vietoje. Šis citokino kiekio padidėjimas yra siejamas su antrinių navikų susidarymu po spindulinės terapijos [18]. Naviko nekrozės faktorius alfa (TNF α) navike sukelia nekrozę bei ląstelių žūtį nedarant žalos sveikoms ląstelėms. Tačiau šio citokino kiekio padidėjimas suaktyvina makrofagus, kurie padidina chromosomų pažaidų kiekį, sukelia pokyčius DNR bazėse, mutagenezę ir apoptozę spinduliuote nepaveiktoms ląstelėms. Išaugusi tiek citokinių, tiek makrofagų gamyba, stimuliuoja azoto oksidų gamybą, o tai sukelia oksidacinį stresą [19].

Laisvieji deguonies radikalai mažais kiekiais ląstelėse susidaro nuolat. Jie saugo organizmą nuo bakterijų, virusų bei naikina pažeistas ląsteles. Tačiau kai jų kiekis pasidaro per didelis, pavyzdžiui dėl jonizuojančios spinduliuotės, sutrinka ląstelių gyvybiniai procesai. Kad to

išvengtų ląstelės gamina antioksidantus, kurie skirti neutralizuoti šiuos radikalus. Tačiau jei radikalų koncentracija yra labai didelė, sukliamas oksidacinis stresas, kuris gali sukelti apoptozę. Aktyvūs deguonies junginiai ima reaguoti su baltymais, lipidais ir DNR. Oksiduoti lipidai ir baltymai gali būti pakeisti tuoju pat naujai gaminamais. Tačiau, jei DNR pažeista ir neištaisyta, tai sukelia ilgalaikes genotoksines pasekmes.

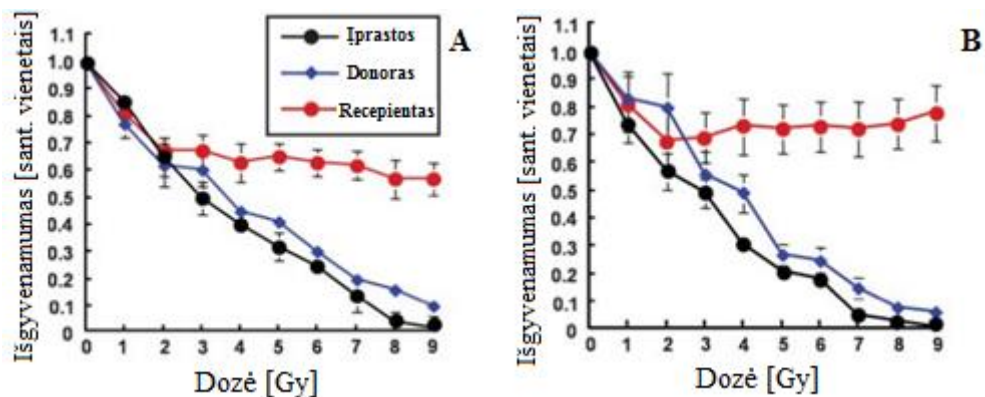
Įprastai laisvieji deguonies radikalai yra trumpaamžiai ir negali pasiekti kitų ląstelių bei jų pažeisti. Tačiau gali susijungti su deguonimi ir suformuoti ilgaamžius peroksidus. Peroksidas yra aktyvus deguonies junginys ir yra labai panašus į H_2O , todėl gali lengvai difunduoti tarp ląstelių. Eksperimentai parodė, kad peroksido radikalų pusamžis yra apie 20 valandų. Nors toks daugumos peroksidų pusamžis padaro juos mažiau aktyvius, tačiau jie jau gali sukelti greta esančioms ląstelėms žalą. *In vitro* eksperimentai parodė, kad antioksidantai ir vitaminas C sumažina chromosomoms tenkančią žalą [20].

Genai, kurie atsakingi už uždegimines reakcijas dažniausiai yra atsakingi ir už stebėtojo efekto atsiradimą. Išaugusi šių genų ekspresija sukelia uždegimus ir NO gamybą, dėl ko atsiranda oksidacinis stresas. Vėliau šie visi faktoriai gali sukelti daugybę genetinių pakitimų, kaip chromosomų ir chromatidų anomalijos, dukterinių chromatidų apsikeitimai, genų pašalinimai, mutacijos ir genų ekspresija [21].

Siekiant plačiau ištirti stebėtojo efektą, atlikta daug tyrimų. Daugiausia jų remiasi metodika, kad apšvitintos ląstelės yra perkeliamos augti kartu su sveikomis ląstelėmis. Šiuo atveju tiriamas baltymo p53 ir ROS junginių koncentracijos pokytis ir ar tai turi įtakos šalia esančioms sveikoms ląstelėms. Bandymai su limfoblastinėmis ląstelėmis rodo, jog sveikose ląstelėse didėja šių medžiagų koncentracija [22]. Tyrimai taip pat atliekami *in vivo*, naudojant modelinius organizmus – peles, žuvis. Apšvitinus tam tikrą audinio dalį vėliau stebima, ar vyksta stebėtojo efektas, nustatinėjant metastazes. Rezultatai byloja, jog pažaidos aptinkamos ir kaimyninėse sveikose ląstelėse [23].

Augimo terpės perkėlimo eksperimentai parodė, kad apšvita skatina ląstelėse faktorius ar faktorių išskyrimus, kurie patenka į augimo terpę ir atsitiktinai ima jungtis prie sveikųjų ląstelių receptorių [24; 25]. Šie faktoriai patekę į ląstelę sumažina neapšvitintų ląstelių dauginimosi efektyvumą, stimuliuoja apoptozę, bei išskiria dar faktorių, kurie gali toliau veikti ląsteles [26]. Ląstelės, kurios buvo apšvitintos ir pakeista augimo terpė, rodė geresnius gyvybingumo rezultatus nei ląstelės, kurios buvo apšvitintos, tačiau terpė liko ta pati (11 pav.). Perkėlus terpę sveikų ląstelių išgyvenamumas mažėja, didėjant dozei, tačiau pasiekus 2 Gy ribą, kreivė stabilizuojasi ir ląstelių išgyvenamumas mažai bekinta didėjant dozei [27].

Stebėtojo efektas yra priklausomas nuo ląstelių kiekio švitinimo metu ir gali būti pastebėtas 30 minučių po apšvitos, ir išlikti dar efektyviu praėjus 60 valandų nuo augimo terpės perkėlimo [24].



11 pav. UVW/ANT (A) ir EJ138/ANT (B) ląstelių išgyvenamumo kreivės po apšvitos gama spinduliuote. Kontrolinė – apšvitintos ląstelės su ta pačia augimo terpe, donoras – apšvitintos ląstelės kurių augimo terpė perkelta recipientui [27]

Daugybė vėži sergančių žmonių renkasi gydymą spinduline terapija. Viena pagrindinių šio gydymo komplikacijų yra antrinių navikų susidarymas po spindulinio gydymo. Šių antrinių navikų susidarymą gali inicijuoti jonizuojančios spinduliuotės sukeltas stebėtojo efektas. Stebėtojo efektas gretimoms neapšvitintoms ląstelėms sukelia chromosomos pažeidimus ir padidina vėžio riziką. Antriniai navikai, kurie susiję su stebėtojo efektu dažniausiai atsiranda po plaučių, bronchų, melanomos, sarkomos, tiesiosios žarnos, gimdos kaklelio ir kiaušidžių vėžio spindulinio gydymo [2]. Todėl vėži sergantiems pacientams spindulinis gydymas dėl stebėtojo efekto padidina antrinių navikų riziką. Tai rodo, koks pavojingas yra stebėtojo efektas, ir kaip svarbu yra išsiaiškinti jo susidarymo mechanizmus.

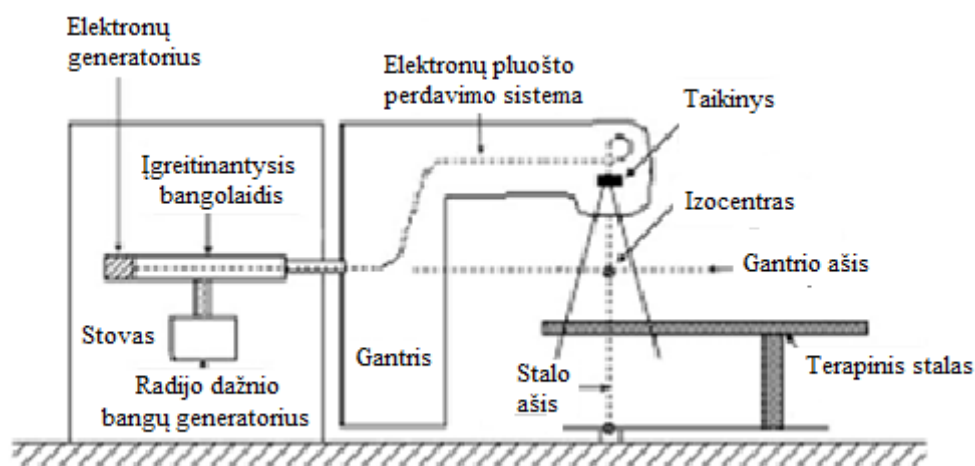
Taigi, labai svarbu yra išsiaiškinti stebėtojo ir dozės galios efektų poveikį navikams, sveikiems audiniams, imuninį atsaką molekuliniam lygyje. Paaiškinti kaip šie efektai yra susiję su ląstelių tipu, dozės galia, sugertąja doze, spinduliuotės kokybe, apšvitos trukme ir mikroaplinka.

1.6. Darbo temos ir uždavinių pagrindimas

Darbo tema pasirinkta atsižvelgus į aktualią ir mažai ištirtą problemą spinduliniame gydyme, tai jonizuojančios spinduliuotės sukeltas stebėtojo ir dozės galios efektai. Dėl stebėtojo efekto pacientui padidėja antrinių navikų atsiradimo tikimybė už švitinamo lauko ribų o neatsižvelgus į naudojamą dozės galią, navikas gali būti visiškai nesunaikinamas ir atsinaujinti ateityje. Todėl yra labai svarbu įvertinti šių efektų poveikį ląstelėms.

2. METODAI IR ĮRANGA

2.1. Linijinis greitintuvas



12 pav. Linijinio greitintuvo schema [5]

Medicininiai linijiniai greitintuvai, elektronus įgreitina nuo 4 MeV iki 25 MeV energijos, naudodami mikrobangų radijo dažnio (nuo 10^3 MHz iki 10^4 MHz) laukus. Šie greitintuvai linijiniais yra vadinami todėl, kad bangolaidžiuose elektronai yra greitinami tiesioje (linijoje) trajektorijoje.

Medicininiai linijiniai greitintuvai, tai izocentrinės sistemos, kurios yra sudarytos iš tokių pagrindinių sudedamųjų dalių (12 pav.):

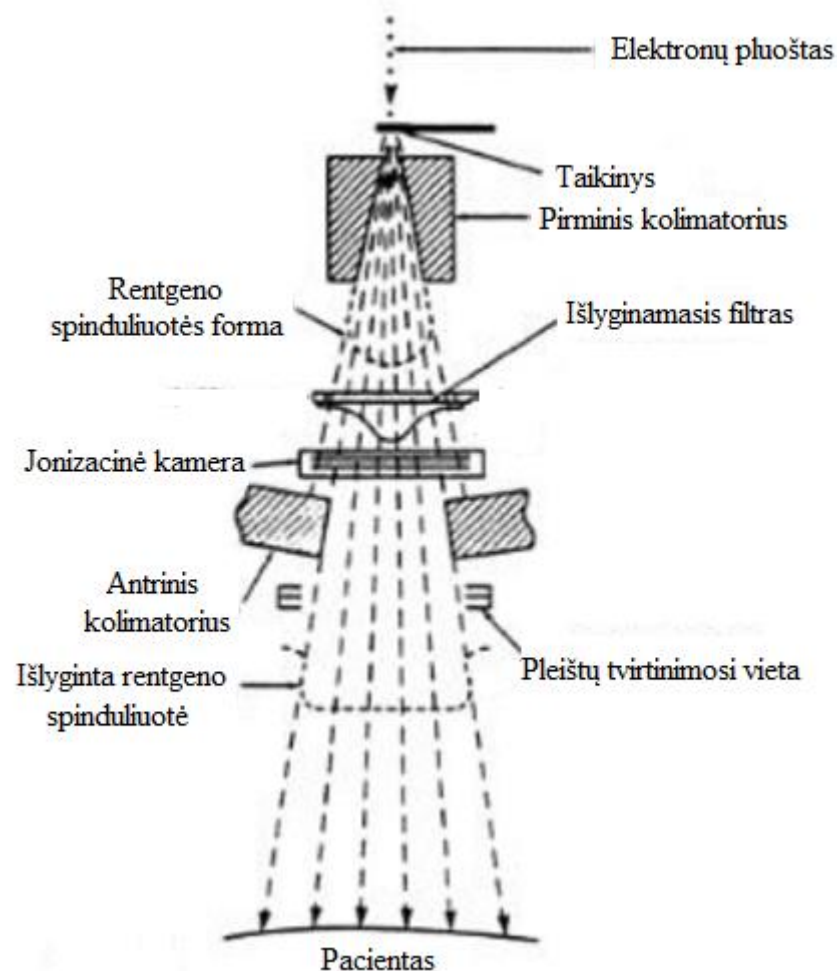
- Gantry
- Gantry stovas;
- Modulatorius;
- Spindulinio gydymo stalas;
- Valdymo pultas.

Gantry sukasi aplink izocentrą – tašką erdvėje, į kurį nukreiptas jonizuojančios spinduliuotės spindulio centras. Yra 6 komponentai, kurie atsakingi už spinduliuotės formavimą:

- Elektronų padavimo sistema;
- Mikrobangų radijo dažnio generavimo sistema;
- Įgreitinantysis bangolaidis;
- Pagalbinė sistema;
- Spindulio transportavimo sistema;
- Spindulio kolimacijos ir stebėjimo sistema.

Įkaitintas katodas termoemisijos būdu emituoja elektronus, kurie bangolaidyje yra įgreitinami. Įgreitintiems elektronams bombarduojant taikinio (anodo) paviršių yra generuojama

Rentgeno spinduliuotė. Vėliau gauta Rentgeno spinduliuotė yra filtruojama išlyginamuoju filtru, kuris tolygiai paskirsto spinduliuotės intensyvumą (13 pav.). Taikiniai dažniausiai yra gaminami iš didelį atominį numerį turinčių medžiagų, o išlyginamasis filtras iš mažą atominį numerį turinčių medžiagų nepriklausomai nuo spinduliuotės energijos. Vėliau Rentgeno spinduliuotės pasiskirstymas yra formuojama paprastais ir daugialapiais kolimatoriais. Kad spinduliuotės pluoštas būtų tiksliai suformuotas, kolimatorių lapeliai yra gaminami iš volframo arba švino, nes dėl didelio atominio numerio jie gerai sugeria sklaidos spinduliuotę [5].



13 pav. Gantrio galvos schema [28]

2.2. Rentgeno terapinis įrenginys

Didelės energijos Rentgeno spinduliai yra generuojami Rentgeno terapiniame aparate, kurio pagrindiniai komponentai yra: Rentgeno vamzdis, taikinio aušinimo sistema, valdymo pultas ir energijos šaltinis.

Kaitinant katodą yra išmušami elektronai, kurie vakuume ir pastovaus potencialo lauke yra greitunami link taikinio (anodo). Elektronams sąveikaujant su taikiniu yra generuojama Rentgeno spinduliuotė. Didžioji dalis elektrono kinetinės energijos sąveikaujant su taikiniu virsta šiluma ir

tik 1% visos energijos virsta Rentgeno spinduliuote. Todėl dėl didelio šilumos generavimo yra reikalinga efektyvi aušinimo sistema.

Norint turėti kuo didesnę Rentgeno spindulių išeigą yra naudojami didelio atominio numerio ir aukštos lydymosi temperatūros taikiniai. Pusiausvirines darbo sąlygas Rentgeno terapiniai įrenginiai pasiekia per tam tikrą laiką, todėl norint sužinoti tikslią dozę pacientui yra reikalinga laiko korekcija.

Rentgeno vamzdžio srovė yra kontroliuojama keičiant katodo temperatūra ir tokiu būdu keičiama elektronų emisiją. Esant tai pačiai katodo temperatūrai Rentgeno vamzdžio srovę galima didinti su vamzdžio įtampa. Pirma elektronai greitėja proporcingai didinant įtampą, kol prie aukštų įtampų yra pasiekiamas įsotinimas ir visi elektronai emitavę iš katodo yra pritraukiami anodo [5].



14 pav. Rentgeno terapinis įrenginys Gulmay D3225

2.3. Klonogeninės analizės metodas

Klonogeninė analizė arba kolonijų formavimo analizė yra *in vitro* ląstelių gyvybingumo analizė, pagrįsta vienos ląstelės gebėjimu formuoti, daugintis ir suformuoti koloniją. Šis metodas padeda nustatyti ląstelių išgyvenamumo kreivę, kuri parodo priklausomybę tarp sugertosios

dozės ir išgyvenusių ląstelių frakcijos. Klonogeninė ląstelių išgyvenamumo analizė nuo 1950 metų yra pagrindinis metodas padedantis tirti jonizuojančios spinduliuotės efektus [29].

Yra aprašyta daugybė ląstelės žūtį nulemiančių mechanizmų, tačiau pagrindiniai yra reprodukcijos praradimas bei negalėjimas daugintis neribotai. Dėl to ląstelės, kurios išlaiko gebėjimą sintetinti baltymus ir DNR bei pereiti vieną ar dvi mitozes, bet negali dalintis ir generuoti naujos kartos ląstelių. Tai yra vadinama reprodukcijos gebėjimo praradimu arba reprodukcine mirtimi. Kita vertus, ląstelės, kurios nėra praradusios reprodukcijos gebėjimo, gali daugintis neribotai, suformuoja dideles ląstelių kolonijas, kurios vadinamos klonogeninėmis [29].

Viena ląstelė užaugusi į didelę koloniją, kuri susideda iš mažiausiai 50 ląstelių ir, kuri gali būti vizualiai matoma, laikoma gyvybinga. Šios savybės praradimas yra apibūdinamas išgyvenamumo kreive [29].

2.3.1. Ląstelių auginimas

Bandymams naudotos Kinijos žiurkėno kiaušidžių (CHO) ląstelės. Ląstelės auginamos monoslukšniu 25 cm² flakonėliuose pripildytuose augimo terpės. Augimo terpė yra paruošta iš: Dulbecco's modifikuotos Eagle's terpės – DMEM, 10% embrioninio jaučio serumo – FBS, 1% L – Glutamino tirpalo, 1% penicilino ir streptomicino antibiotikų. Serumai suteikia pakankamą hormonų kiekį ir augimo faktorių, L – glutaminas – didelį kiekį amino rūgščių (energijos šaltinis), o antibiotikai naudojami siekiant išvengti bakterinio užterštumo. Flakonėliai su ląstelėmis laikomi inkubatoriuje, kuriame yra pastovi 37° C temperatūra, 5% CO₂ koncentracija ir drėgnumas. CO₂ reikalingas palaikyti tinkama ląstelių augimo terpės pH. Flakonėliai yra laikomi prasukti, kad į jo vidų galėtų patekti CO₂ reikalingas palaikyti pH pusiausvyrą augimo terpėje.

Siekiant apsaugoti auginamą ląstelių kultūrą nuo infekcijos yra dirbama steriliomis sąlygomis vertikalios srauto laminare ir su steriliomis priemonėmis. Laminaras yra 2 min. sterilizuojamas UV spinduliuote. Po to visas laminaro darbinis paviršius ir jame esantys įrankiai papildomai sterilizuojami 70% etanolio tirpalu siekiant kiek įmanoma daugiau sumažinti infekcijos riziką. Visi eksperimente naudoti buteliai su terpėmis, flakonėliai su ląstelėmis iš inkubatoriaus ir kiti įrankiai bei priedai prieš perkeliant juos į laminarą taip pat yra nuvalomi 70% etanolio tirpalu.

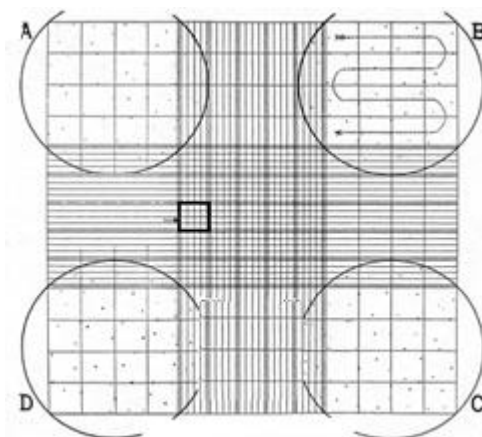
Prieš atliekant bandymus ląstelės visuomet persėjamos. Pirma yra įvertinamas sėjimui skirtas ląstelių monoslukšnis, terpės spalva ir drumstumas. Augant ląstelių kultūrai stebimas terpės spalvos pasikeitimas iš rausvos į geltoną, nes reaguoja terpėje esantis indikatorius – fenolio raudonasis, kuris parodo terpės parūgštėjimą.

Ląstelių suspensija ruošama iš sveikų ir gyvybingų ląstelių monosluoksnio. Atsargiai nupilama augimo terpė, o ląstelių monosluoksnis praplaunamas 2 ml PBS tirpalu (fosfatinis buferis), kad nuplautų senos terpės likučius ir mirusias ląsteles. Ir iškarto nupilamas. Kadangi ląstelės yra prisitvirtinusios prie flakonėlio sienelių, todėl ant jų yra užpilama 2 ml tripsino/EDTA tirpalo (Sigma) ir paliekama inkubatoriuje 2 – 5 min., kol ląstelės ima plaukioti tirpale. Po to įpilamas toks pat kiekis augimo terpės (2 ml) norint sustabdyti tripsino poveikį. Tada visa ląstelių suspensija perpilama į 15 ml talpos mėgintuvėlį ir centrifuguojama 5 min. 1000 aps./min. greičiu centrifugoje. Supernatantas nupilamas, o nusėdusios ląstelės suspenduojamos 1 ml Minimum essential medium Eagle.

2.3.2. Ląstelių skaičiavimas hemocitometro kameroje (Tripano mėlio testas)

Norint visuose bandymų taškuose turėti vienodą kiekį ląstelių, reikia žinoti kokį kiekį ląstelių turime 1ml ląstelių suspensijoje. Tam tikslui yra naudojamas Neubauer hemocitometras (15 pav.).

Hemocitometras turi dvi specialiai graviruotas kameras. Kiekviena kamera yra 1,0 mm × 1,0 mm dydžio kvadratą atskirti vienas nuo kito triguba linija. Kiekvienas kampinis kvadratas yra padalintas į 16 mažesnių kvadratų. Tai pagelbsti orientuotis skaičiuojant ląsteles ir išvengti ląstelių pakartotinio skaičiavimo. Centrinis 1 mm² kvadratas yra padalintas į 25 mažus kvadratus, kiekvienas iš jų padalinti dar į 16 kvadratėlių. Jie skirti ląstelių skaičiavimui naudojant didesnę padidinimą.



15 pav. Hemocitometro kamera. A, B, C, D – kampiniai kvadratai, kuriuose skaičiuojamos ląstelės, o B kvadrate pavaizduota skaičiavimo tvarka [30]

Į mėgintuvėlį dedama 10 μl terpės su ląstelėmis bei 90 μl tripsino mėlio dažų ir gerai sumaišoma. Paruošiamas Neubauer hemocitometras: ant jo papučiamas oro ir atsargiai prispaudžiamas dengiamasis stiklelis taip, kad matytųsi Niutono žiedai. Lašas dažų su ląstelėmis paskirstomas Neubauer kameroje ir per mikroskopą suskaičiuojamos ląstelės. Ląstelės

skaičiuojamos 4 dideliuose kvadratuose, kur kiekviename yra po 16 kvadratėlių (15 pav. Kvadratuose skaičiuojamos tik viduje esančios ląstelės, bei ant viršutinės ir dešinės kraštinės. Kiekvieno langelio ląstelių skaičius sudedamas ir padalinama iš keturių. Atsižvelgiant į skiedimą dar padauginamas iš 10, gaunamas ląstelių skaičius esantis 1 ml suspensijos. Iš to pagal proporcią apskaičiuojamas reikalingas tūris ląstelių ir išsėjamas į Petri lėkšteles, kuriose jau yra 2 ml augimo terpės.

2.3.3. Ląstelių apšvita

Prieš apšvitinimą lėkštelės užklijuojamos Parafilm sandarinimo plėvele, kad neištekėtų augimo terpė ir ląstelės neužsikrėstų. Paruošti bandiniai patalpinami į terminę dėžę.

Ląstelių gyvybingumo eksperimentas

LSMU ligoninės Kauno klinikos filiale Onkologijos ligoninėje, naudojant Rentgeno terapinį įrenginį – D3225 Gulmay, ląstelės buvo apšvitinamos Rentgeno spinduliuote 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1, 2, 3, 5 Gy dozėmis. Rentgeno vamzdžio anodo įtampa 100 kV, stipris – 20 mA, o dozės galia - 1,47 Gy/min.. Šiam eksperimentui buvo naudojamos 28 Petri lėkštelės. Kiekvienai eksperimento dozei teko po 3 bandinius. 2 kontrolinės lėkštelės buvo paliktos laboratorijoje ir 2 kontrolinės lėkštelės skirtos įvertinti transportavimo faktorių ląstelių gyvybingumui. Į kiekvieną lėkštelę buvo pasėta po 400 ląstelių.

Dozės galios eksperimentas

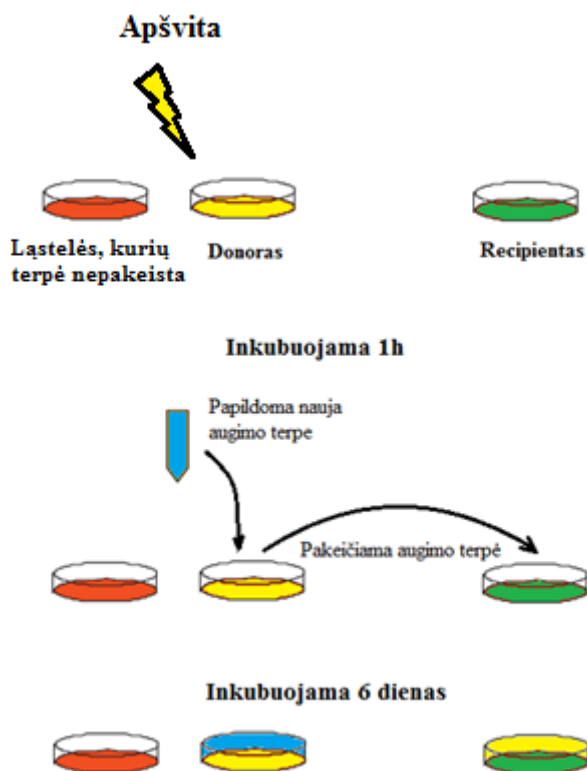
Tiriant dozės galios įtaką ląstelių išgyvenamumui buvo naudojamas Onkologinėje ligoninėje esantis linijinis greitintuvas – Varian Clinac DMX, nes tik šis įrenginys nekeičiant kitų eksperimento sąlygų galėjo apšvitinti bandinius skirtingomis dozės galiomis. Eksperimento metu naudota 6 MeV energija ir trys skirtingos dozės galios: 1 Gy/min., 2 Gy/min. ir 3 Gy/min.

Šį eksperimentą sudarė 3 grupės bandinių po 12 Petri lėkštelių. Visos trys grupės apšvitinamos tokiomis pačiomis Rentgeno spindulių dozėmis (0,25, 0,5, 1, 2, 5, 8 Gy), tačiau skirtingomis dozės galiomis. Švitinimo metu ant bandinių buvo uždėtos specialios 1,5 cm PMMA plokštės skirtos tam, kad ląstelės būtų paveiktos maksimalia doze.

Stebėtojo efekto eksperimentas

Buvo paruoštos trys ląstelių kultūrų grupės. Prima – ląstelės, kurių terpė nepakeista tai bandinių grupė, kuri patirs fizikinį ir biologinį spindulinį poveikį, nes po švitinimo iš jų terpė nebus pašalinama, tai reiškia, kad šias ląsteles veiks ir stebėtojo efektas. Kita grupė yra donorai iš kurių po švitinimo buvo pašalinta visa augimo terpė ir perkelta recipientui. Pašalinus iš donorų terpę, ji buvo pakeista nauja augimo terpe. Todėl donorų grupės ląstelės bus paveiktos pagrinde tik tiesioginiu jonizuojančios spinduliuotės poveikiu. Paskutinė grupė yra recipientai. Tai

ląstelės, kurios nebuvo apšvitintos, tačiau joms yra perpilama apšvitintų donorų augimo terpė, kuri po apšvitinimo turi stebėtojo efektą sukeliančių faktorių.



16 pav. Augimo terpės perkėlimo schema

Ląstelių, kurių terpė nepakeista ir donorų bandiniai yra apšvitinami Rentgeno spinduliuote su Gulmay D3225, kambario temperatūroje, 1,47 Gy/min dozės galia. 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 5, 8 Gy dozėmis. Po apšvitos ląstelės kuo greičiau gražinamos į inkubatorių. 1 valanda po apšvitos recipientų grupės ląstelių augimo terpė yra nupilama ir pakeičiama donorų augimo terpė. 1 valandos pertrauka po švitinimo buvo pasirinkta todėl, kad dauguma autorių eksperimentuose naudoja būtent tokį laiką.

Po to donorų ląstelės yra papildomos nauja augimo terpė. Visos tyrimo grupės vėliau yra laikomos inkubatoriuje vienodomis sąlygomis.

Baigus bandymus apšvitintos ląstelės gražinamos į laboratoriją, Parafilm sandarinimo plėvelė nuimama, kad galėtų patekti CO₂. Iš petri lėkštelių atsargiai nupilama augimo terpė ir papildoma nauja. Laikoma inkubatoriuje 6 dienas.

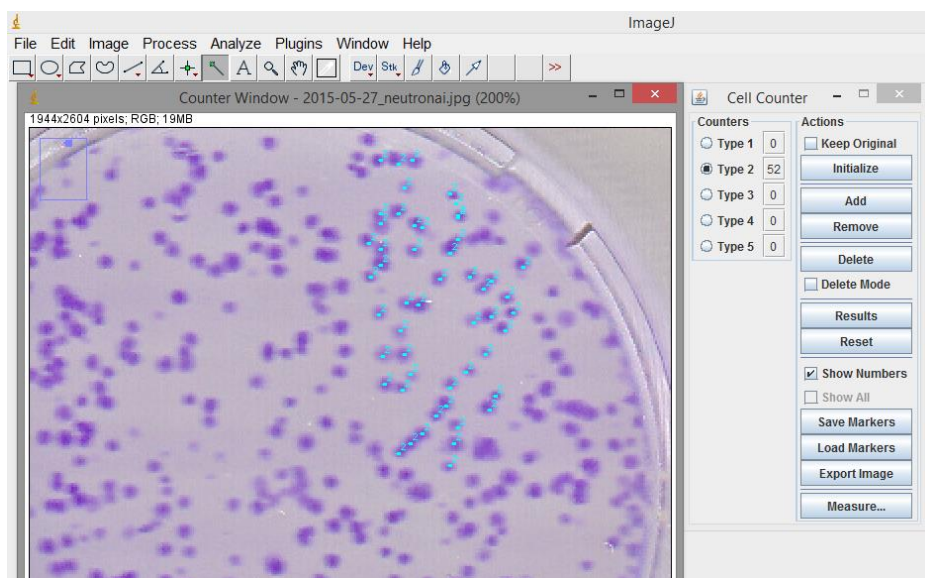
2.3.4. Ląstelių kolonijų fiksavimas

Po 6 dienų susiformavusios kolonijos fiksuojamos. Prieš fiksavimą pašalinama augimo terpė iš Petri lėkštelių. Ląstelių kolonijos 10 min. fiksuojamos 96 % etanoliu, į Petri lėkštelę dedant 1 ml etanolio. Po to etanolis nupilamas, Petri lėkštelės nuplaunamos po šaltu tekančiu vandeniu ir dažomos Gram kristalo violeto tirpalu. Į kiekvieną lėkštelę jo pilama po 1 ml,

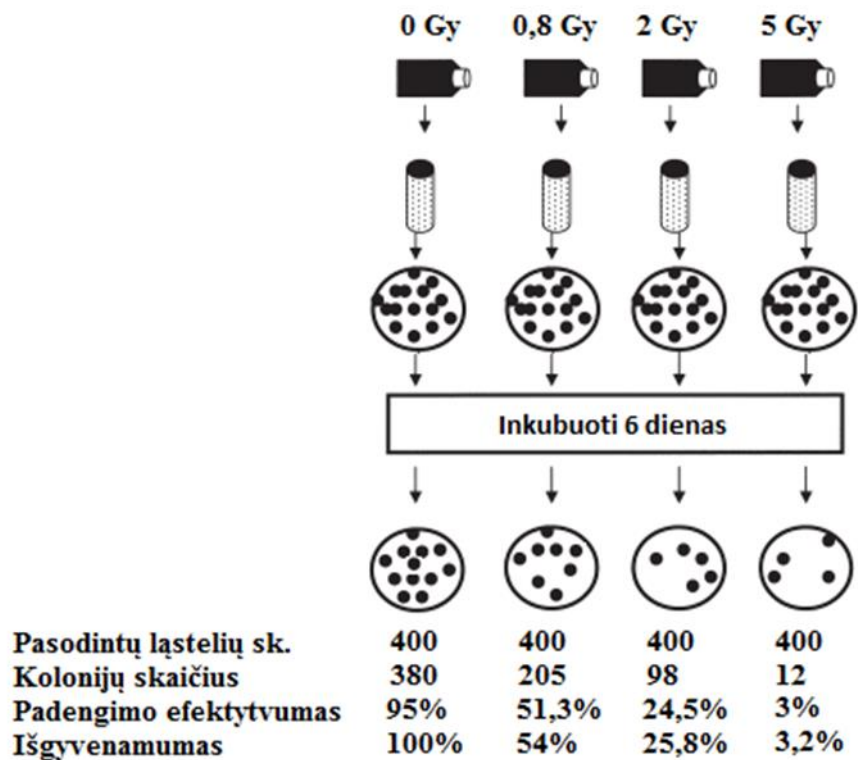
palaikoma 3 s ir dažas nupilamas. Po to Petri lėkštelės vėl nuplaunamos po tekančiu vandeniu. Likęs vanduo lėkštelėse nupilamas ir jos atsargiai nusausinamos, tada paliekamos per naktį džiovinti.

2.3.5. Ląstelių kolonijų skaičiavimas

Kitą dieną lėkštelės fotografuojamos, o gauti vaizdai analizuojami ImageJ programa, skaičiuojant kolonijas (17 pav.). ImageJ – tai atvirojo kodo, laisvai prieinama programinė įranga, skirta vaizdų analizei, kuri turi ląstelių skaičiavimo funkciją. Įsijungus ląstelių skaičiavimo funkciją atsidaro langas su pasirinktu vaizdu (šiuo atveju nudažytos ląstelės). Norint pradėti skaičiuoti ląsteles užtenka tik paspausti ant norimo objekto/ląstelės. Toje vietoje atsiranda spalvotas kvadratėlis su skaičiumi virš jo. Skaičius žymi skaičiavimo grupę (counters) prie kurios yra išvedamas pažymėtų objektų (suskaičiuotų ląstelių) kiekis. Galima pasirinkti kitą skaičiavimo grupę jei norima skaičiuoti kitas ląsteles ar kitą lėkštelę. Kiekviena skaičiavimo grupė turi atskirą numerį ir spalvą, kas padeda nesuklysti skaičiuojant.



17 pav. Programos ImageJ ląstelių skaičiavimo langas. Žydros spalvos taškais pažymėtos suskaičiuotos ląstelės vaizde. Suskaičiuotų ląstelių kiekį galime matyti Cell Counter lange Counter Type 2 laukelyje



18 pav. Kolonijų testo atlikimo schema [29]

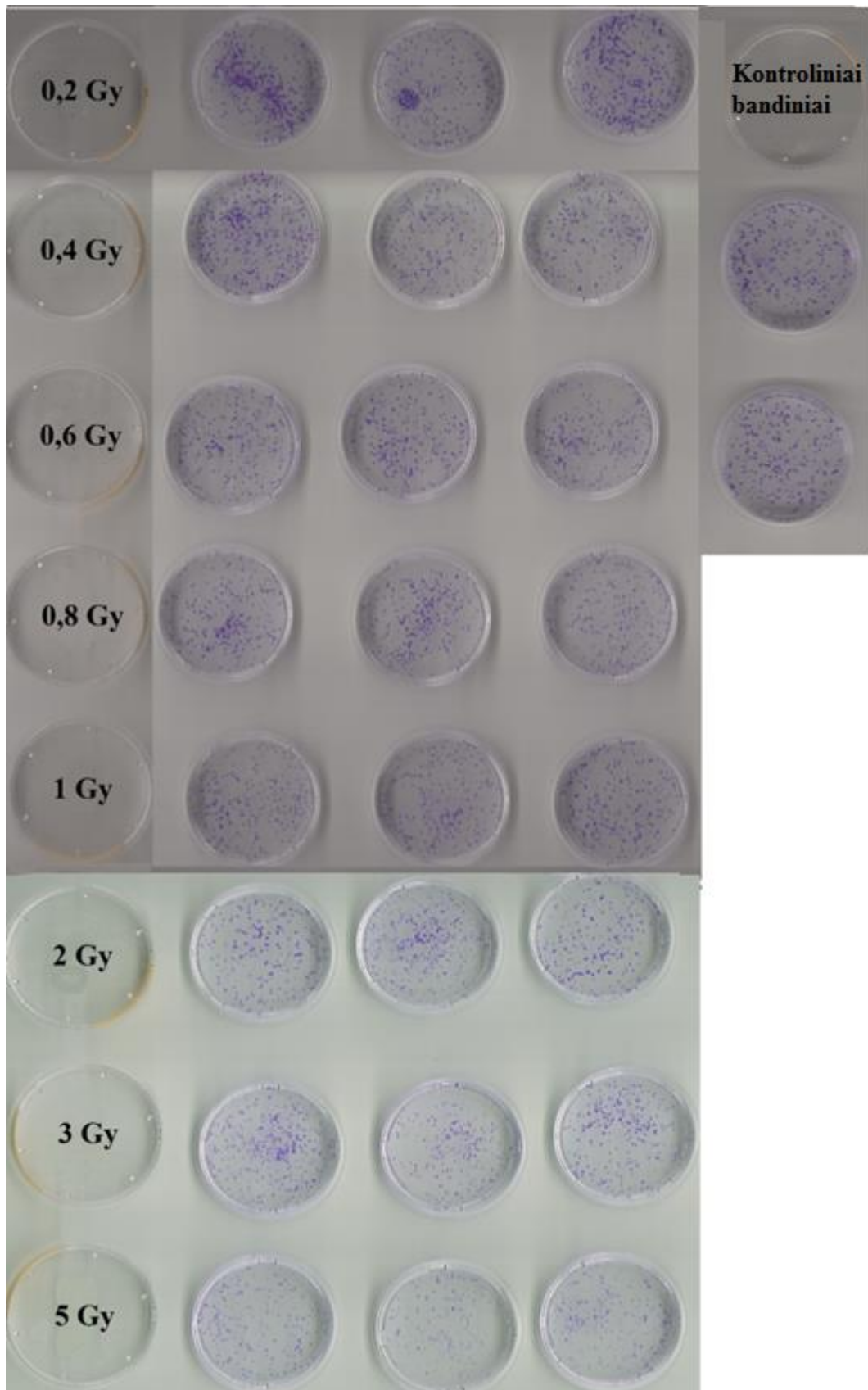
Suskaičius Petri lėkštelėse esančias kolonijas yra apskaičiuojamas padengimo efektyvumo koeficientas, kuris parodo koks procentas ląstelių išaugo į kolonijas (18 pav.) [29]:

$$PE = \frac{N_{kolonijų\ skaičius}}{n_{pasodintų\ ląstelių\ skaičius}} \cdot 100\% \quad (23)$$

Žinant padengimo efektyvumą galima apskaičiuoti koks yra ląstelių išgyvenamumas. Pirmą yra nustatoma, kad kontrolinių ląstelių išgyvenamumas yra 100%, nes jos nebuvo apšvitinamos. Tada apšvitintų ląstelių išgyvenamumas yra apskaičiuojamas padalinant jų padengimo efektyvumą iš kontrolinių ląstelių padengimo efektyvumo [29]:

$$S = \frac{PE_{apšvitinto\ bandinio}}{PE_{kontrolės}} \cdot 100\% \quad (24)$$

3. REZULTATAI

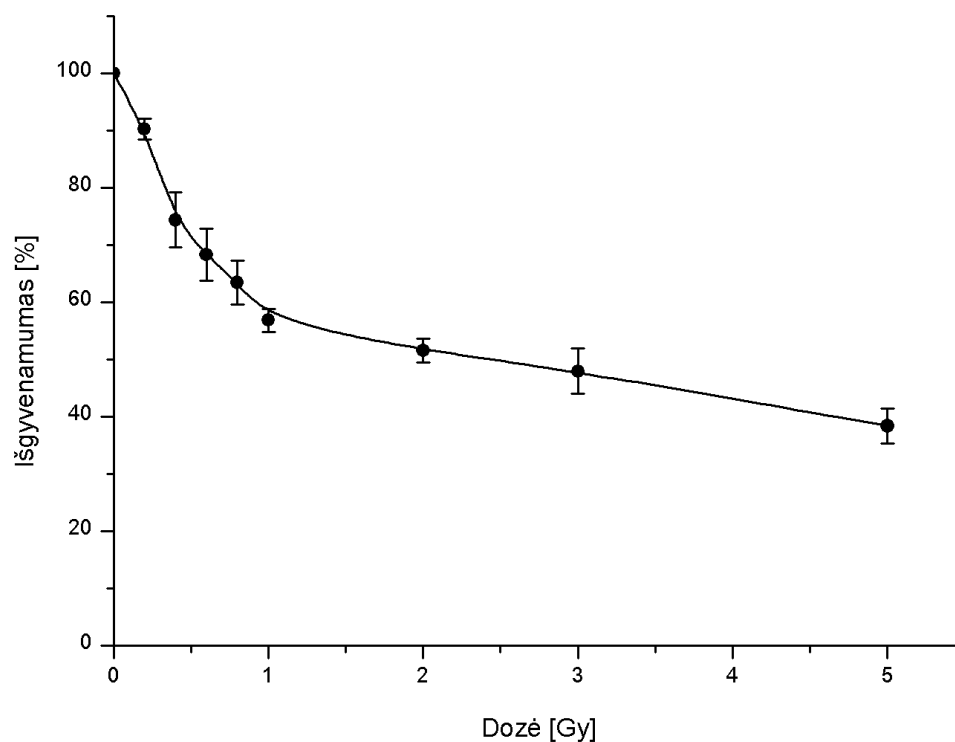


19 pav. Ląstelių kolonijos po skirtingų dozių Rentgeno spinduliuotės. Kiekvienoje lėkštelėje pasėta po 400 ląstelių

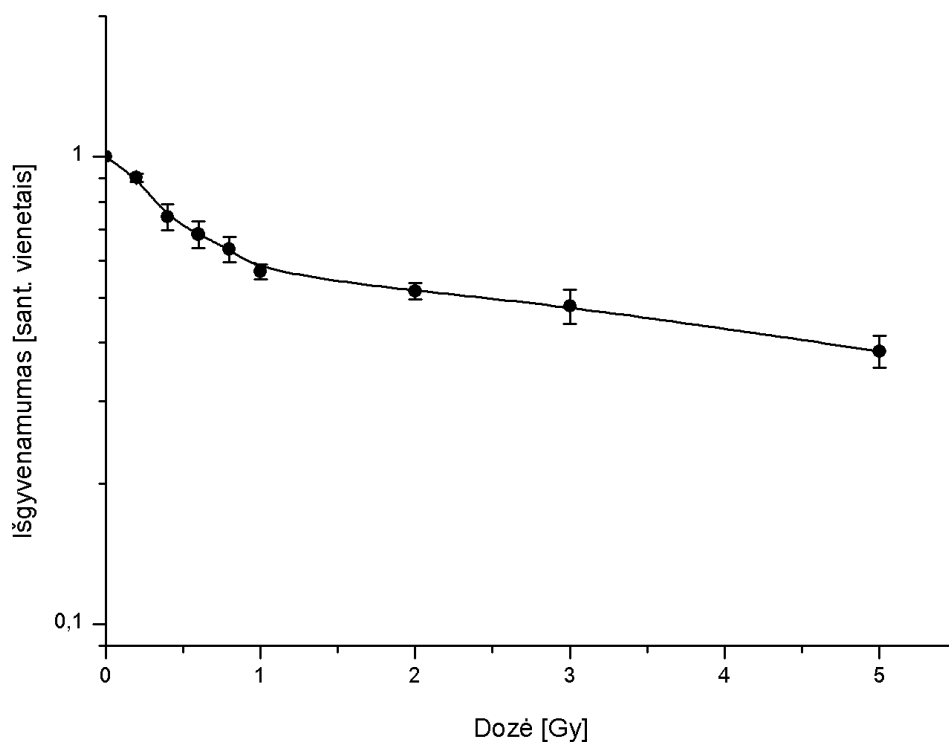
1 lentelė. Vidutinis suformuotų kolonijų skaičius, padengimo efektyvumas ir ląstelių išgyvenamumas po Rentgeno spinduliuotės apšvitęs, kai pasėta po 400 ląstelių.

Dozė, Gy	Vidutinis kolonijų sk.	Padengimo efektyvumas PE, %	Išgyvenamumas S, %	Vidurkio standartinis nuokrypis
0,2	223	56	90	1,8
0,4	184	46	74	4,8
0,6	169	42	68	4,5
0,8	157	39	63	3,9
1	141	35	57	2,0
2	128	32	52	2,1
3	119	30	48	4,0
5	95	24	38	3,0
Kontroliniai bandiniai	248	62	100	0,8

Iš 19 paveikslo matome, kad ląstelės gavusios 0,2 Gy dozę suformavo panašų kiekį kolonijų kaip kontrolinės. Tačiau esant didesnėms dozėms kolonijų skaičius sparčiai mažėja. 2 Gy dozė ląstelių populiaciją sumažino per pusę, o po 5 Gy ląstelių išgyvena tik 38%.

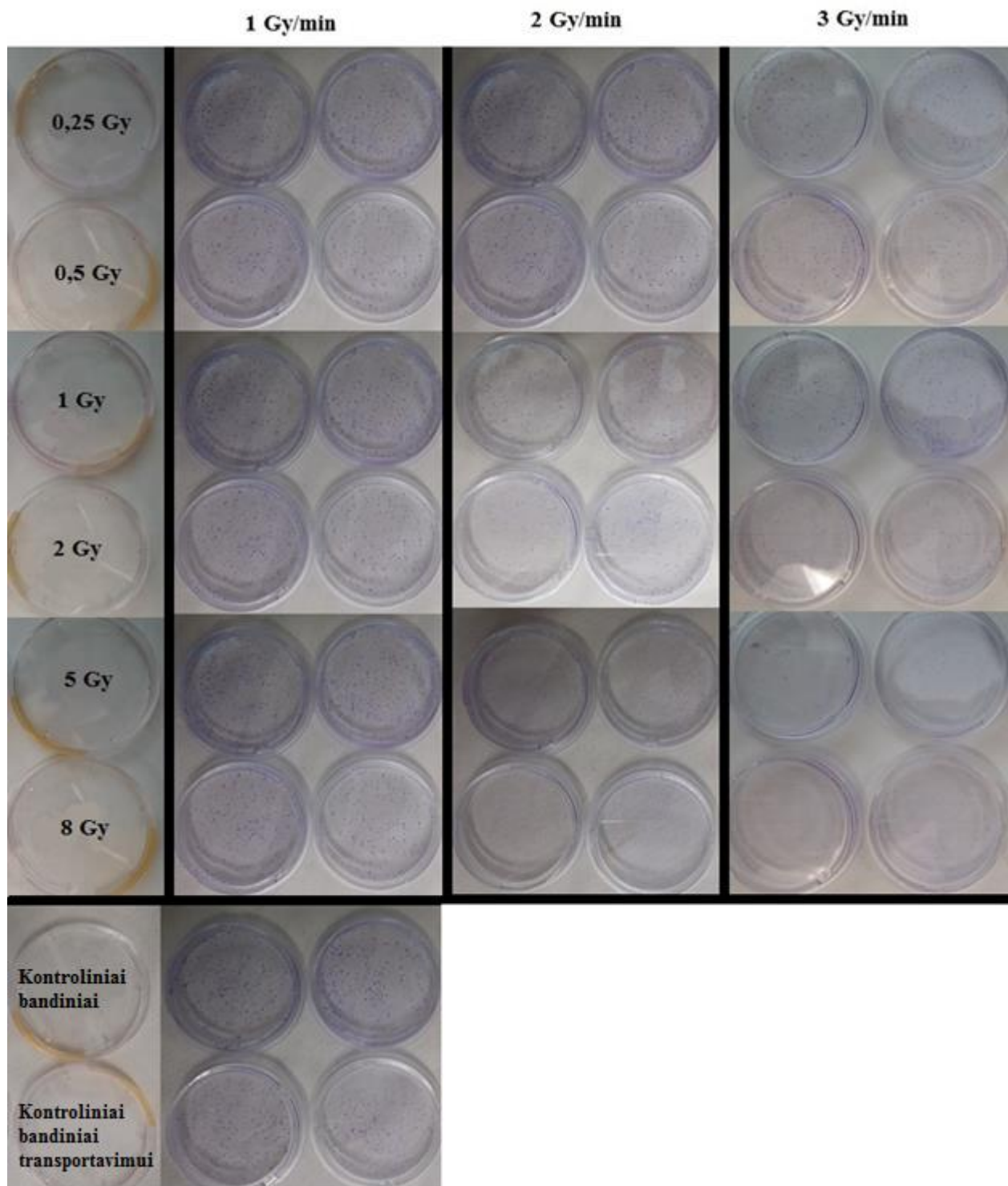


20 pav. Ląstelių išgyvenamumo priklausomybė nuo jonizuojančiosios spinduliuotės dozės



21 pav. Ląstelių išgyvenamumo priklausomybė nuo jonizuojančiosios spinduliuotės dozės pusiau logaritminėje skalėje

Iš 20 ir 21 grafikų matome, kad prie mažų dozių išgyvenamumo kreivės turi "pečius" – mažų dozių intervale ląstelių išgyvenamumas mažėja lėčiau nei esant vidutinėms dozėms. Tai rodo, kad veikiamos mažomis dozėmis jonizuojančios spinduliuotės ląstelės geba atitaisyti spinduliuotės sukeltą žalą. Sparčiausia ląstelių žūtis užfiksuota nuo 0,2 Gy iki 1 Gy. Toliau didėjant gautai dozei, ląstelių žūtis sulėtėja. 50% mirtingumas pasiekimas esant apie 2 Gy dozei.

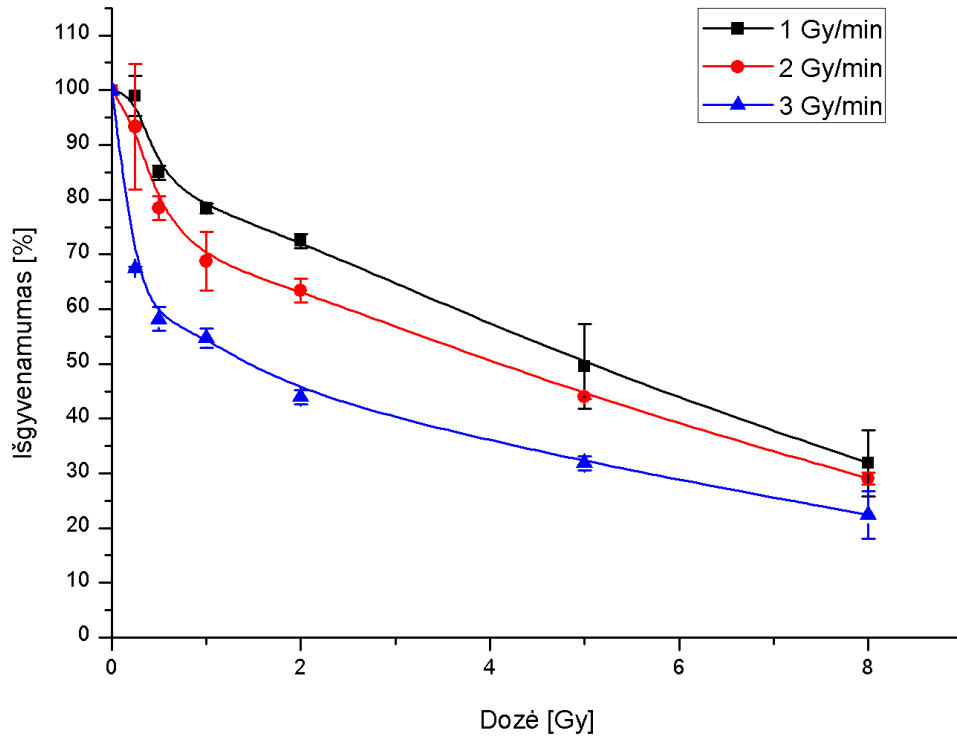


22 pav. Suformuotos ir nudažytos ląstelių kolonijos, kurios buvo apšvitintos skirtingomis dozėmis galiomis

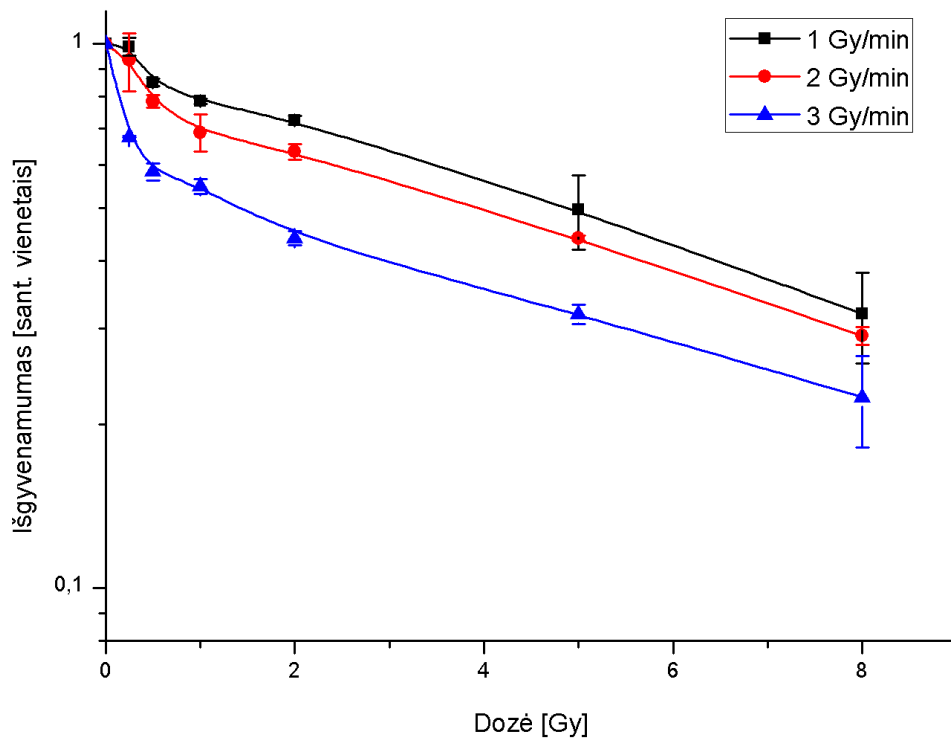
2 lentelė. Vidutinis suformuotų kolonijų skaičius, padengimo efektyvumas ir ląstelių išgyvenamumas po Rentgeno spinduliuotės apšvitos, skirtingomis dozės galiomis, kai pasėta po 400 ląstelių.

Dozės galia	Dozė, Gy	Vidutinis kolonijų sk.	Padengimo efektyvumas PE, %	Išgyvenamumas S, %	Vidurkio standartinis nuokrypis
1 Gy/min	0,25	230	57	99	3,7
	0,5	197	49	85	1,3
	1	182	46	78	0,9
	2	168	42	72	1,3
	5	115	29	50	7,8
	8	74	19	32	6,0
2 Gy/min	0,25	217	54	93	11
	0,5	182	46	78	2,2
	1	160	40	69	5,4
	2	147	37	63	2,2
	5	102	26	44	0,4
	8	68	17	29	1,1
3 Gy/min	0,25	157	39	67	0,2
	0,5	135	34	58	2,2
	1	127	32	55	1,7
	2	102	26	44	1,3
	5	74	19	32	1,3
	8	52	13	22	4,3
Kontroliniai bandiniai		263	66	113	0,4
Kontroliniai bandiniai transportavimui		232	58	100	3,5

Tiriant dozės galios efektą, 3 ląstelių grupės buvo apšvitinamos trimis skirtingomis dozės galiomis su linijiniu greitintuvu. Pirma ląstelių grupė buvo apšvitinta 1 Gy/min dozės galia, antra – 2 Gy/min ir trečia – 3 Gy/min. Buvo naudojamos dvi grupės kontrolinių bandinių, viena kontrolinė bandinių grupė liko laboratorijoje, kita keliavo kartu į eksperimento vietą, kad būtų įvertintas transportavimo faktorius ląstelių išgyvenamumui.



23 pav. Ląstelių išgyvenamumo priklausomybė nuo jonizuojančiosios spinduliuotės dozės, esant skirtingoms dozės galioms

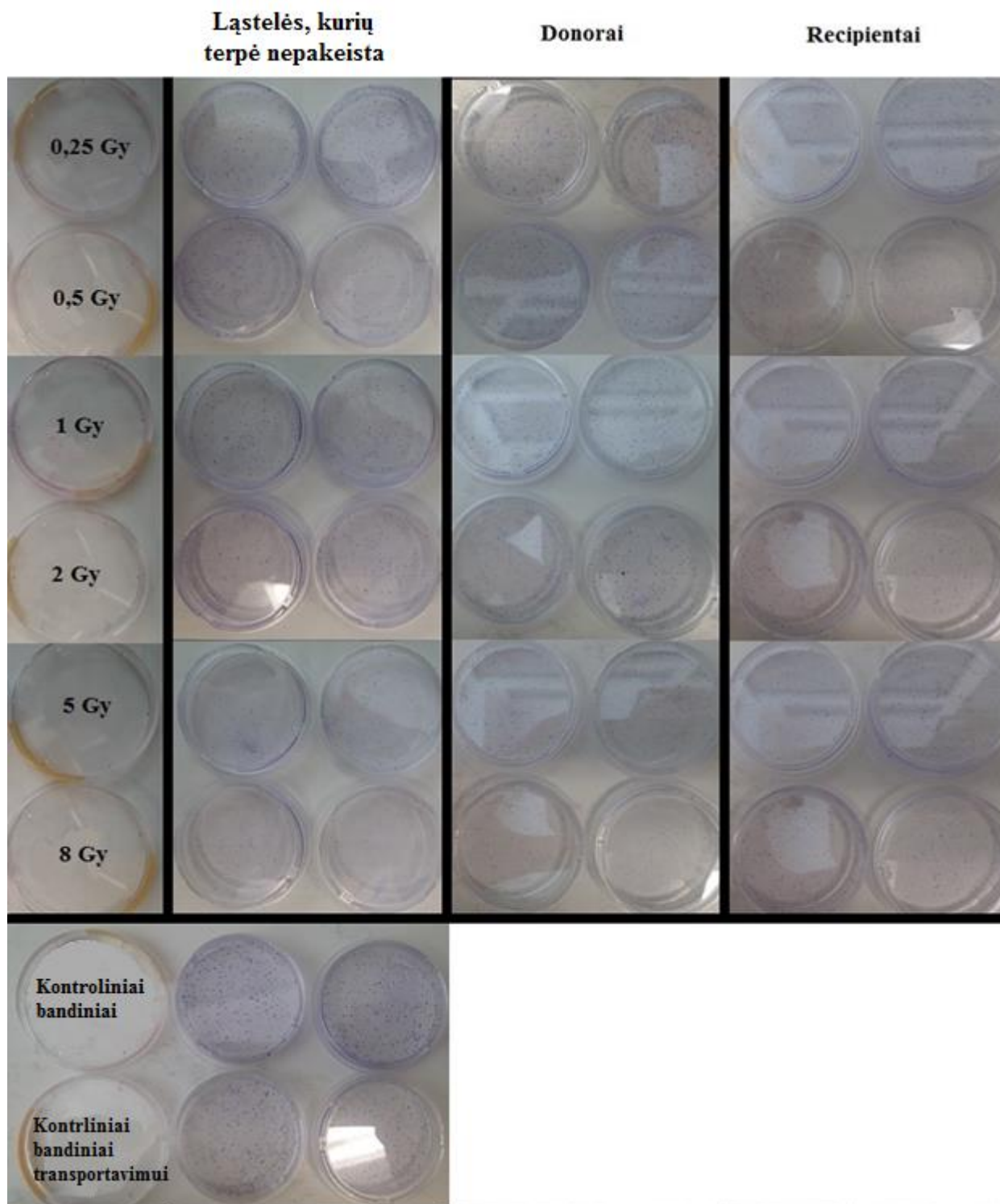


24 pav. Ląstelių išgyvenamumo priklausomybė nuo jonizuojančiosios spinduliuotės dozės, esant skirtingoms dozės galioms, pusiau logaritminėje skalėje

Iš 23 ir 24 grafikų matome, kad kolonijų kiekis laipsniškai mažėja didėjant dozės galiui. Esant 1 ir 2 Gy/min dozės galioms, mažų dozių intervale išgyvenamumo kreivės turi „pečius“. 3 Gy/min dozės galia kolonijų kiekį sumažina trečdaliu, esant mažiausiai naudotai dozei (0,25 Gy). Tai siejama su padarytu dideliu kiekiu pažaidų ląstelėse per trumpą laiką.

Skirtingų dozės galių efektyvumas kito netolygiai. Padidinus dozės galią nuo 1 Gy/min iki 2 Gy/min, išgyvenamumas sumažėjo vidutiniškai 7 %, o padidinus nuo 2 iki 3 Gy/min – apie 16 %. Padidinus dozės galią, norima dozė yra pasiekama per trumpesnę laiką ir pažaidos ląstelėse yra padaromos greičiau, nei ląstelės sugeba jas ištaisyti.

Didžiausi išgyvenamumo skirtumai tarp skirtingų dozės galių, tirtame dozių intervale, yra iki 2 Gy. Padidinus dozės galią dvigubai, nuo 1 iki 2 Gy/min ląstelių kolonijų kiekis sumažėja 8 %, o padidinus dozės galią 3 kartus, kolonijų kiekis sumažėja net 28 %. Tai parodo, kad spindulinėje terapijoje dažnai naudojama frakcija po 2 Gy, keičiant dozės galią, gali stipriai įtakoti paciento išgyjimo tikimybei. Ties 5 Gy dozės galios efektas pradeda mažiau įtakoti kolonijų kiekį. Esant 8 Gy dozei ir dozės galią padidinus dvigubai, ląstelių mirtingumas išauga 3 %, o padidinus tris kartus 10 %.

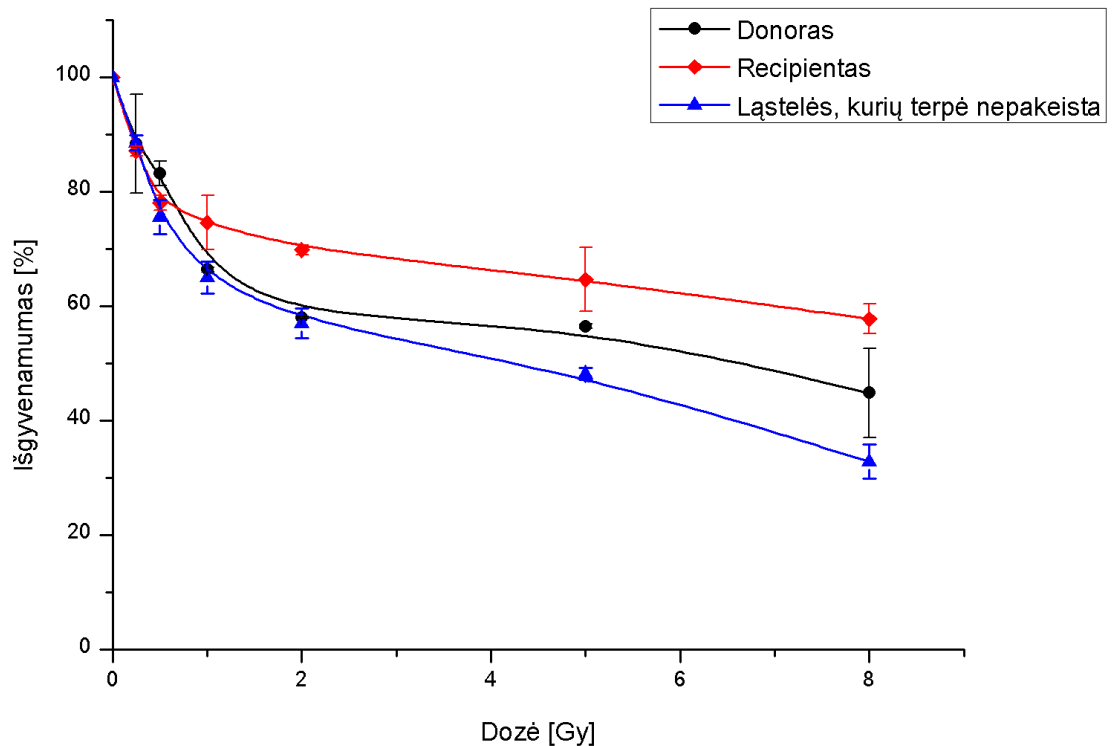


25 pav. Suformuotos ir nudažytos ląstelių kolonijos

3 lentelė. Vidutinis suformuotų kolonijų skaičius, padengimo efektyvumas ir ląstelių išgyvenamumas po Rentgeno spinduliuotės apšvitės, kai pasėta po 400 ląstelių

Pavadinimas	Dozė, Gy	Vidutinis kolonijų sk.	Padengimo efektyvumas PE, %	Išgyvenamumas S, %	Vidurkio standartinis nuokrypis
Ląstelės, kurių terpė nepakeista	0,25	205	51	89	1,3
	0,5	175	44	76	3,0
	1	150	38	65	2,8
	2	132	33	57	2,6
	5	111	28	48	1,1
	8	76	19	33	3,0
Donorai	0,25	205	51	88	8,6
	0,5	193	48	83	2,2
	1	154	39	66	0,4
	2	134	34	58	0,2
	5	131	33	56	0,4
	8	104	26	45	7,8
Recipientai	0,25	202	51	87	0,9
	0,5	181	45	78	1,3
	1	173	43	75	4,7
	2	162	41	70	0,9
	5	150	38	65	5,6
	8	134	34	58	2,6
Kontroliniai bandiniai		263	66	114	0,4
Kontroliniai bandiniai transportavimui		232	58	100	3,7

Šiame eksperimente buvo naudojamos trys grupės ląstelių: ląstelės, kurios buvo apšvitintos Rentgeno spinduliuote ir paliktos augti toje pačioje terpėje. Donorai – ląstelės, kurios buvo apšvitintos tomis pačiomis dozėmis kaip, tačiau jų terpė pakeista nauja po švitinimo. Recipientai – ląstelės, kurios nebuvo apšvitintos, tačiau augančios donorų terpėje. Buvo naudojamos dvi kontrolės, viena kontrolinė grupė liko laboratorijoje, kita keliavo kartu į eksperimento vietą, kad būtų įvertintas transportavimo faktorius ląstelių išgyvenamumui.

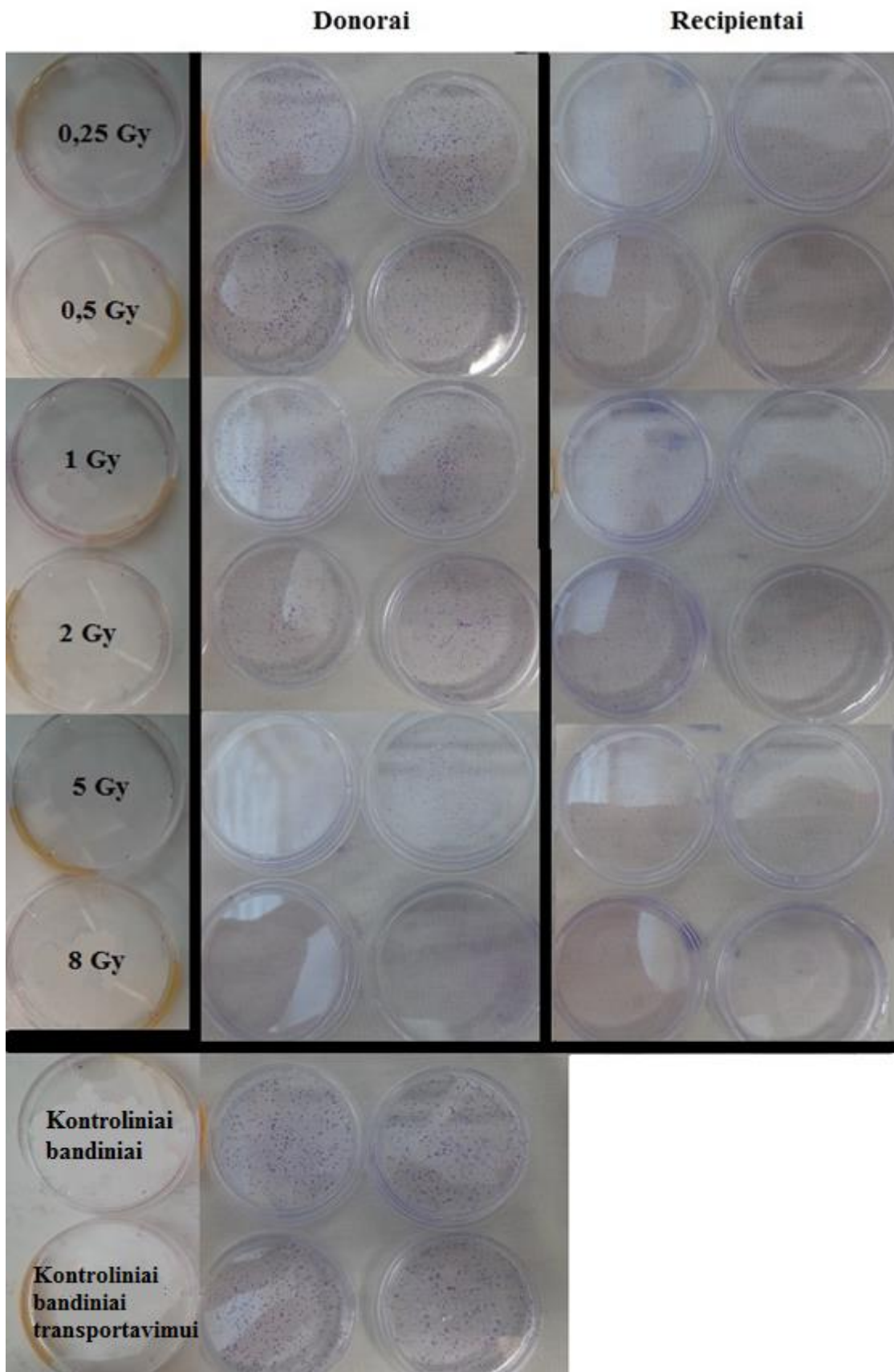


26 pav. Lašelių išgyvenamumo priklausomybė nuo jonizuojančiosios spinduliuotės dozės

Iš 26 pav. matome, kad kaip ir ankstesniuose atvejuose, jonizuojanti spinduliuotė laipsniškai sumažina lašelių gyvybingumai, didėjant dozei. Greičiausiai išgyvenusių lašelių dalis keičiasi mažų dozių intervale, iki 1 Gy. Donorų grupės lašelių, kurioms po švitinimo buvo pašalinta augimo terpė, rodė geresnį išgyvenamumą nei laštelės, kurių terpė nepakeista. Šis padidėjęs išgyvenusių lašelių kiekis, gali būti siejamas tuo, kad jonizuojančia spinduliuotė paveiktos laštelės į augimo terpę išskiria tam tikrus faktorius, kurie gali neigiamai paveikti greta esančias lašteles. Pašalinus terpę iš apšvitintų lašelių su ja buvo pašalinti ir stebėtojo efektą sukeliantys faktoriai, todėl šių lašelių išgyveno daugiau negu laštelės, kurių terpė nepakeista.

Recipientų grupės kreivė parodo, kad stebėtojo efektą sukeliantys faktoriai išsiskiria terpėje net prie mažiausių dozių. Iki 0,5 Gy dozę gavusių lašelių augimo terpė, lašelių gyvybingumui daro net didesnę poveikį, nei tiesioginė apšvita. Sveikų lašelių skaičių, pakeitus 0,5 Gy dozę gavusia donorų augimo terpę, sumažino 22 %, kai tik tiesioginė apšvita (donorų laštelės) sumažino 17 %. Donorų lašelių išgyveno daugiau, nes buvo pašalinta augimo terpė su kenksmingais faktoriais, o esant mažai dozei, laštelės spinduliuote yra veikiamos trumpą laiką ir gali atsiradusias pažeidas greitai išsitaisyti. Tačiau sveikos laštelės (recipientai) gavę augimo terpės su stebėtojo efektą sukeliančiais faktoriais jais buvo veikiami kur kas ilgesnį laiką. Tai parodo koks svarbus yra stebėtojo efektas net ir esant mažoms jonizuojančios spinduliuotės dozėms.

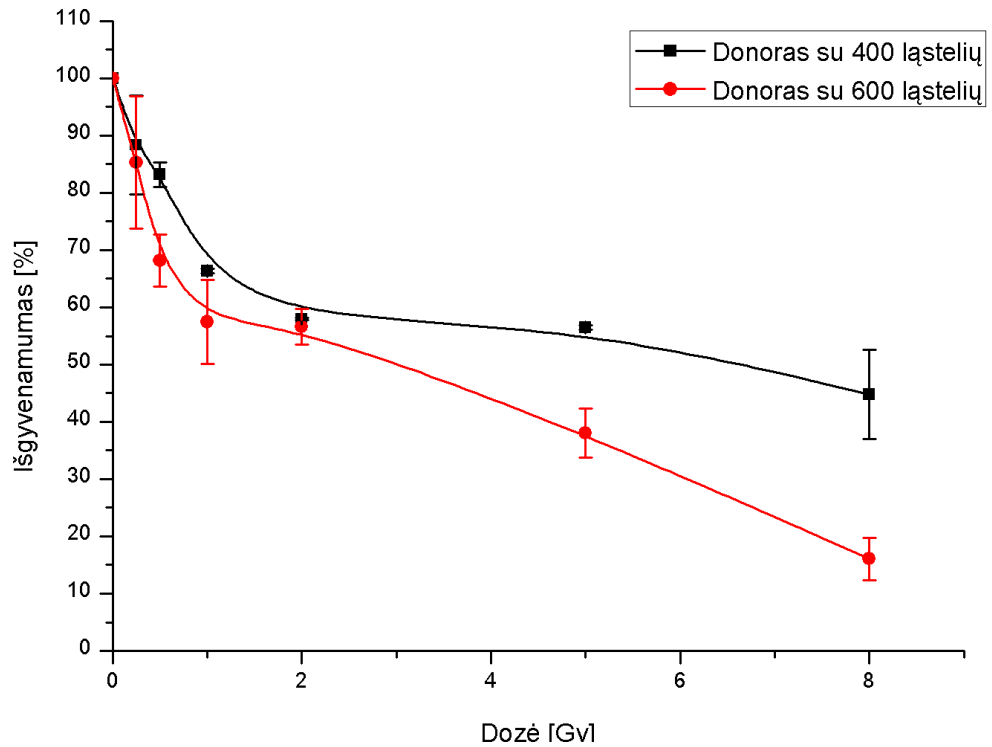
Didėjant dozei recipientų išgyvenamumo kreivė tampa plokštesnė. Sumažėjusį stebėtojo efektą galima sieti su sumažėjusiu stebėtojo efektą sukeliančių faktorių išskyrimu ląstelėse po apšvitos. Tai parodo, kad sukeliančių faktorių išskyrimas po apšvitos nėra proporcingas gautai dozei. Tokią pačią tendenciją, naudojant panašų metodą užfiksavo ir kiti autoriai (Boyd, M., ir kiti 2006) naudodami kitas ląsteles.



27 pav. Suformuotos ir nudažytos ląstelių kolonijos

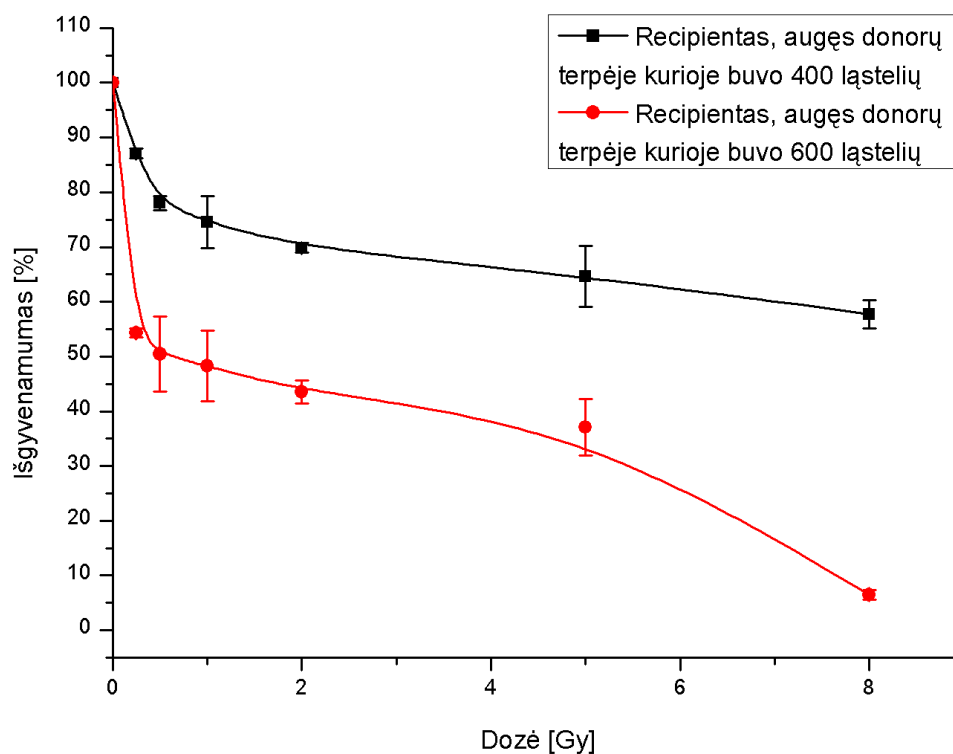
4 lentelė. Vidutinis suformuotų kolonijų skaičius, padengimo efektyvumas ir ląstelių išgyvenamumas po Rentgeno spinduliuotės apšvitos. Donoro ląstelių pasėta 600, recipientų – 400

Pavadinimas	Dozė, Gy	Vidutinis kolonijų sk.	Padengimo efektyvumas PE, %	Išgyvenamumas S, %	Vidurkio standartinis nuokrypis
Donorai	0,25	303	51	88	11
	0,5	242	40	71	4,7
	1	204	30	59	7,6
	2	201	34	59	3,2
	5	135	23	39	4,4
	8	57	10	17	3,8
Recipientai	0,25	126	32	54	0,8
	0,5	117	29	50	6,9
	1	112	28	48	6,5
	2	101	25	44	2,2
	5	86	22	37	5,2
	8	15	4	6	0,9
Kontroliniai bandiniai (Donorų)		355	59	104	0,9
Kontroliniai bandiniai transportavimui (Donorų)		343	57	100	2,6
Kontroliniai bandiniai (Recipientų)		232	58	100	0,7



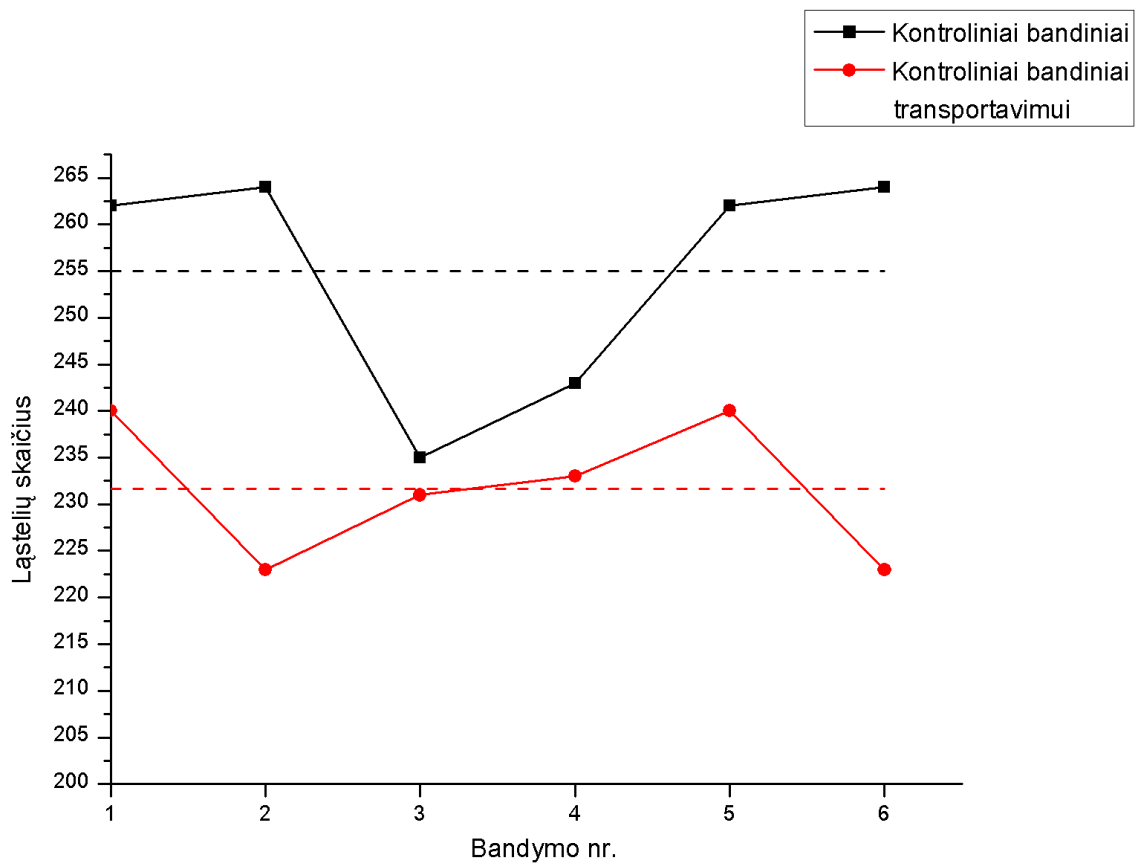
28 pav. Donorų ląstelių išgyvenamumo priklausomybė nuo jonizuojančiosios spinduliuotės dozės, esant skirtingam pasėtam ląstelių kiekiui

Šio eksperimento metu donorų grupėje buvo pasėta 600 ląstelių. Recipientų į šią terpę pasėta 400, nes buvo norima įvertinti kaip ląstelių kiekis gali įtakoti stebėtojo efektą. Iš 27 paveikslo matome, kad 8 Gy dozę gavusios ląstelės suformavo labai mažus kiekius kolonijų tiek donorų, tiek recipientų grupėse. Palyginus donorų grupes su skirtingu pasėtų ląstelių kiekiu ir, kurios buvo apšvitintos tomis pačiomis dozėmis (28 pav.), matome, kad didesnis ląstelių kiekis sąlygoja didesnę ląstelių žūtį. Esant didesniam kiekiui ląstelių tame pačiame plote (didesnė koncentracija), ląstelės yra mažesniais atstumais viena nuo kitos. Kadangi atstumai nedideli, joms tampa lengviau viena su kita susisiekti tarpląstelinėmis jungtimis ir jomis perduoti stebėtojo efektą sukeliančius signalus.



29 pav. Recipientų ląstelių išgyvenamumo priklausomybė nuo jonizuojančiosios spinduliuotės dozės. Recipientų visuose terpėse buvo pasėtas vienodas kiekis – 400 ląstelių

Visos recipientų grupės, kurios augo 600 ląstelių turėjusių donorų terpėje, suformavo labai mažą kolonijų kiekį. Palyginus recipientų ląstelių grupes, kurios augo skirtingose donorų terpėse (29 pav.), matyti, kad didesnis ląstelių mirtingumas yra ten kur buvo didesnis donorų ląstelių kiekis terpėje prieš švitinimą. Didesnis donorų ląstelių tankis sąlygojo didesnę stebėtojo efektą sukeliančių faktorių išskirimą į terpę, ko pasėkoje išaugo recipientų ląstelių mirtingumas.



30 pav. Kontrolinių bandinių susiformavusių kolonijų kiekis

Kontrolinių bandinių grafike matome, kad pasėtų ląstelių kiekis, visuose eksperimentuose, yra panašus ir vidutiniškai susiformuodavo 255 kolonijos iš 400 ląstelių. Padengimo koeficientas PE 64 %. Toks padengimo koeficientas galėjo atsirasti, todėl, kad nevisos ląstelės gali suformuoti koloniją arba gali kelios ląstelės tarpusavyje suformuoti vieną koloniją. Kadangi visų eksperimentų kontrolinių bandinių išaugusių kolonijų kiekis panašus, tai reiškia, kad užsėtų ląstelių kiekis visuose bandiniuose taip pat yra panašus ir atsiradę netikslumai dėl sėjimo yra minimalūs.

Ląstelių transportavimo įtaka išgyvenamumą sumažina vidutiniškai 23 ląstelėmis (9 %) nuo kontrolinių bandinių, kurie nebuvo transportuojami.

4. IŠVADOS

1. Kinijos žiurkėno kiaušidžių ląstelės išgyvenamumas yra atvirkščiai proporcingas sugertajai dozei, kuo didesnė dozė buvo sugerta, tuo daugiau ląstelių neišgyveno.
2. Esant dozėms iki 2 Gy, dozės galios padidėjimas 2 kartus, nuo 1 iki 2 Gy/min, ląstelių kolonijų kiekį sumažina apie 8 %, o dozės galios padidėjimas 3 kartus, kolonijų kiekį sumažina 28 %. Šis efektyvumo padidėjimas siejamas su greitesniu žalos padarymu ląstelėms, nei jos spėja jas ištaisyti.
3. Mažų dozių intervale, dėl stebėtojo efektą sukeliančių faktorių, sveikų ląstelių stebimas mažesnis išgyvenamumas, negu tik tiesiogiai apšvitintų ląstelių atveju. Augimo terpės pašalinimas po apšvitos, padidina ląstelių išgyvenamumą.
4. Ląstelių, kurios augo didesnę apšvitintų donorų ląstelių kiekį (600) turinčioje augimo terpėje, išgyvenamumas buvo 32 % mažesnis, nei ląstelių, kurios augo 400 donorų ląstelių augimo terpėje. Didesnio donorinių ląstelių kiekio poveikis terpei yra santykinai didesnis, todėl patalpinus recipientines ląsteles į šią terpę, buvo nustatytas ryškesnis stebėtojo efekto poveikis sveikoms ląstelėms.

5. LITERATŪRA

1. CHEN, D ir kt. The differential role of human macrophage in triggering secondary bystander effects after either gamma-ray or carbon beam irradiation. *Cancer Letters*. 2015, 363(1), 92-100.
2. MARCU, Loredana, Eva BEZAK ir Barry ALLEN. *Biomedical physics in radiotherapy for cancer*. Csiro Publishing, 2012. ISBN: 9780643094048.
3. VAN DER KOGEL, Albert ir Michael C. JOINER. *Basic Clinical Radiobiology*. 4-oji laida. London: Edward Arnold Publishers, 2009. ISBN 9780340929667.
4. HALL, Eric J. ir Amato J. GIACCIA. *Radiobiology for the radiologist*. 6-oji laida. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. ISBN 9780781741514.
5. PODGORSK, Ervin B. *Radiation Oncology Physics: A Handbook for Teachers and Students*. Austria: IAEA, 2005. ISBN 92-0-107304-6.
6. GALDIKAS, Arvidas. *Spinduliuotės sąveika su medžiaga nanotehnologijose*. Šiauliai: VšĮ Šiaulių universiteto leidikla, 2008. ISBN 978-9986-38-870-8.
7. RIZZI, M., M. D'Aloia ir B. Castagnolo. Semiconductor detectors and principles of radiation-matter interaction. *Journal of Applied Sciences*. 2010, 10, 3141-3155.
8. MATTSSON, Soren ir Christoph HOESCHE. *Radiation Protection in Nuclear Medicine*. Berlin: Springer-Verlag, 2013. ISBN 978-3-642-31167-3.
9. *Radiation Effects Research Foundation* [interaktyvus]. [žiūrėta 2016-04-30]. Prieiga per: http://www.rerf.jp/radefx/basic_kno_e/radcell.htm
10. LIETUVOS HIGIENOS NORMA HN 73:2001. *Pagrindinės radiacinės saugos normos*: 2001 m. gruodžio 21 d. Nr. 663 [interaktyvus] [žiūrėta 2016-05-02]. Prieiga per: <https://www.e-tar.lt/portal/lt/legalAct/TAR.751B6F8BF451>
11. LE CAER, S. Water radiolysis: Influence of oxide surfaces on H₂ production under ionizing radiation. *Water*. 2011, 3, 235-253.
12. SORENSEN, B. S., ir kt. Dependence of cell survival on instantaneous dose rate of a linear accelerator. *Radiotherapy and Oncology*. 2011, 101(1), 223-225.
13. *Virtual Cell Radiobiology Software* [interaktyvus]. [žiūrėta 2016-04-12]. Prieiga per: <http://faculty.washington.edu/trawets/vc/examples/sf/index.html>
14. CHAKRABORTY, A., ir kt. Bystander effects induced by diffusing mediators after photodynamic stress. *Radiat Res*. 2009, 172(1), 74-81.
15. WIDEL, M. Bystander effect induced by UV radiation; why should we be interested? *Postepy Hig Med Dosw*. 2012, 66, 828-837.
16. FURLONG, H., ir kt. Apoptosis is signalled early by low doses of ionising radiation in a radiation-induced bystander effect. *Mutat Res*. 2013, 741-742, 35-43.
17. LIU, SZ., SZ JIN ir XD LIU. Radiation - induced bystander effect in immune response. *Biomed Environ Sci*. 2004, 17(1), 40-46.
18. ZAMARRON, Bf. ir W. CHEN. Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. *Int. J. Biol. Sci*. 2011, 7(5), 651-658.

19. VEERARAGHAVAN, J., ir kt. Radiation - triggered tumor necrosis factor (TNF) alpha-NF kappa B cross-signaling favors survival advantage in. *J Biol Chem*. 2011, 286(24) 21588-21600.
20. KONOPACKA, M. ir J. RZESZOWSKA-WOLNY. The bystander effect-induced formation of micronucleated cells is inhibited by antioxidants, but the parallel induction of apoptosis and loss of viability are not affected. *Mutat Res*. 2006, 593, 32-38.
21. NAJAFI, M., ir kt. The Mechanisms of Radiation-induced Bystander Effect. *J Biomed Phys Eng*. 2014, 4(4), 163-172.
22. MINGYUAN, H., ir kt. Differential effects of p53 on bystander phenotypes induced by gamma ray and high LET heavy ion radiation. *Life Sciences in Space Research*. 2014, 1, 53-59.
23. NIKITAKI, Z., ir kt. Systemic mechanisms and effects of ionizing radiation: A new 'old' paradigm of how the bystanders and distant can become the players. *Seminars in Cancer Biology*. 2016.
24. MOTHERSILL, C. ir C. SEYMOUR. Medium from irradiated human epithelial cells but not human fibroblasts reduces the clonogenic survival of unirradiated cells. *Int J Radiat Biol* 1997, 71(4), 421-427.
25. KONOPACKA, M., J. ROGOLINSKI ir K. SLOSAREK. Bystander effects induced by direct and scattered radiation generated during penetration of medium inside a water phantom. *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy*. 2011, 16(6), 256-261.
26. LEWIS, D. A., B. M. MAYHUGH ir Y. QIN. Production of delayed death and neoplastic transformation in CGL1 cells by radiation-induced bystander effects. *Radia. Res*. 2001, 156(3), 251-258.
27. BOYD, M., ir kt. Radiation-Induced Biologic Bystander Effect Elicited In Vitro by Targeted Radiopharmaceuticals Labeled with α -, β -, and Auger Electron-Emitting Radionuclides. *The Journal of Nuclear Medicine*. 2006, 47(6), 1007-1015.
28. KARZMARK, C. J. ir R. J. MORTON. A primer on theory and operation of linear accelerators in radiation therapy. *Medical Physics*. 1985, 12(6).
29. MUNSHI, A., M. HOBBS ir R. E. MEYN. Clonogenic cell survival assay. *Methods in molecular medicine*. 2005, Vol. 110.
30. [interaktyvus]. [žiūrėta 2016-03-30]. Prieiga per: http://www.sweethaven02.com/MedTech/Hematology01/MD0853_05_img_0.jpg
31. KELSEY, Charles A ir kt. *Radiation biology of medical imaging*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2014. ISBN: 978-0-470-55177-6.
32. LANGEVIN, F., ir kt. Fancd2 counteracts the toxic effects of naturally produced aldehydes in mice. *Nature*. 2011, 475, 53-58.