

**Czy pokrywanie się śladów jonowych może
wytłumaczyć kwadratową zależność krzywych dawka-efekt
obserwowanych dla aberracji chromosomowych ?**



25.01.2018, Warszawa

Agata Kowalska



1. MOTYWACJA

2. METODYKA

3. WYNIKI EKSPERYMENTALNE

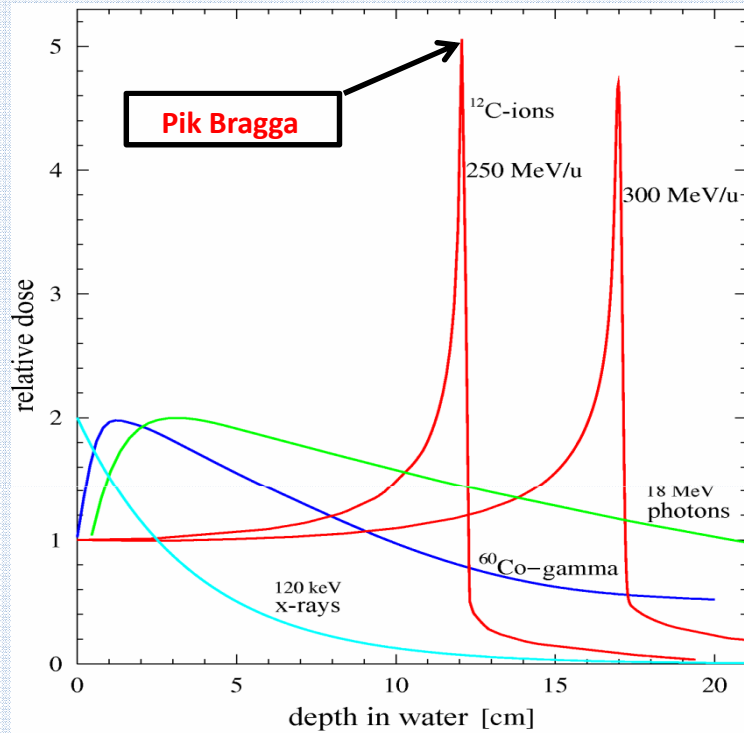
4. MODELOWANIE TEORETYCZNE

5. PODSUMOWANIE I PERSPEKTYWY

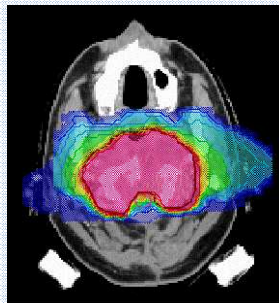


CEL PROWADZENIA BADAŃ RADIOBIOLOGICZNYCH

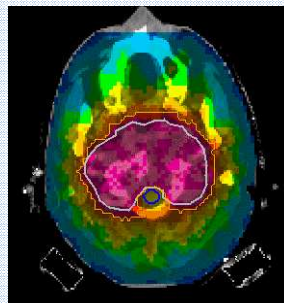
RADIOTERAPIA



Terapia węglowa (2 pola)

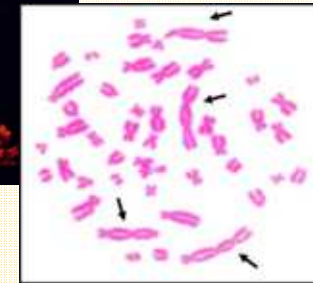


Terapia fotonowa (9 pól)



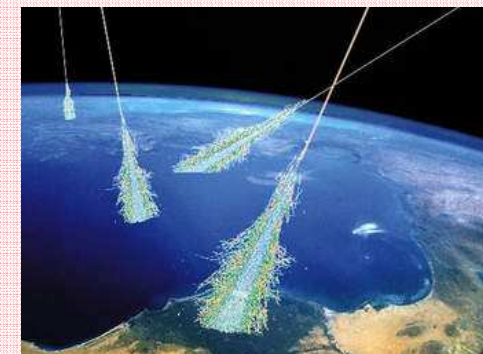
Jäkel et al, Med Phys 35, 2008

OCHRONA RADIOLOGICZNA



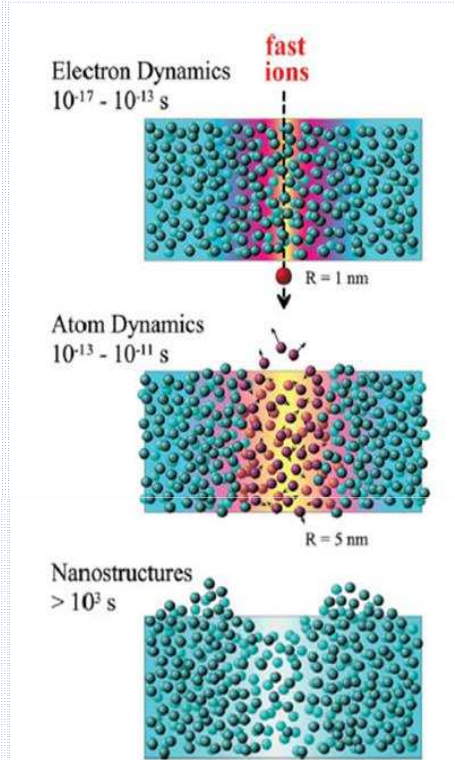
poszukiwanie tzw. „radiation fingerprint”

ochrona przed pierwotnym i wtórnym promieniowaniem kosmicznym

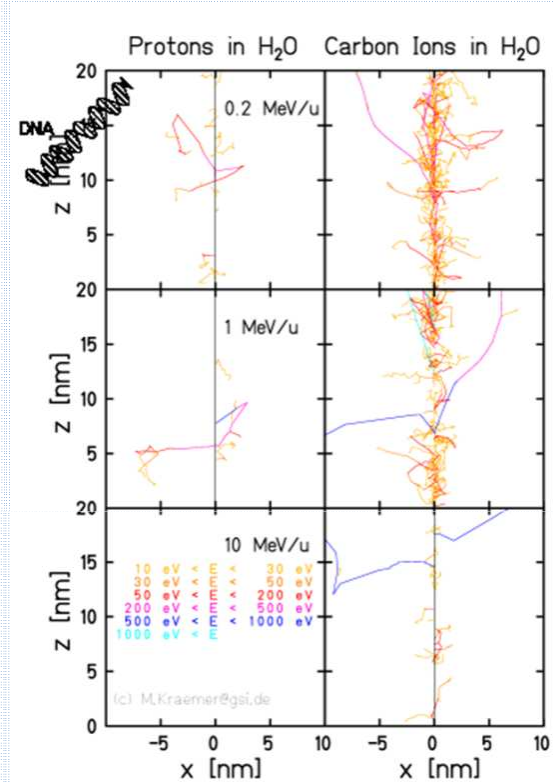


ŚLADY JONOWE

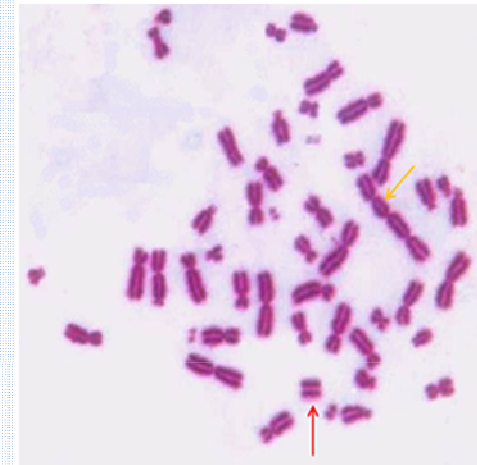
Fazy fizyczne



Rozkład elektronów – rozkład dawki



Faza biologiczna – aberracje chromosomowe

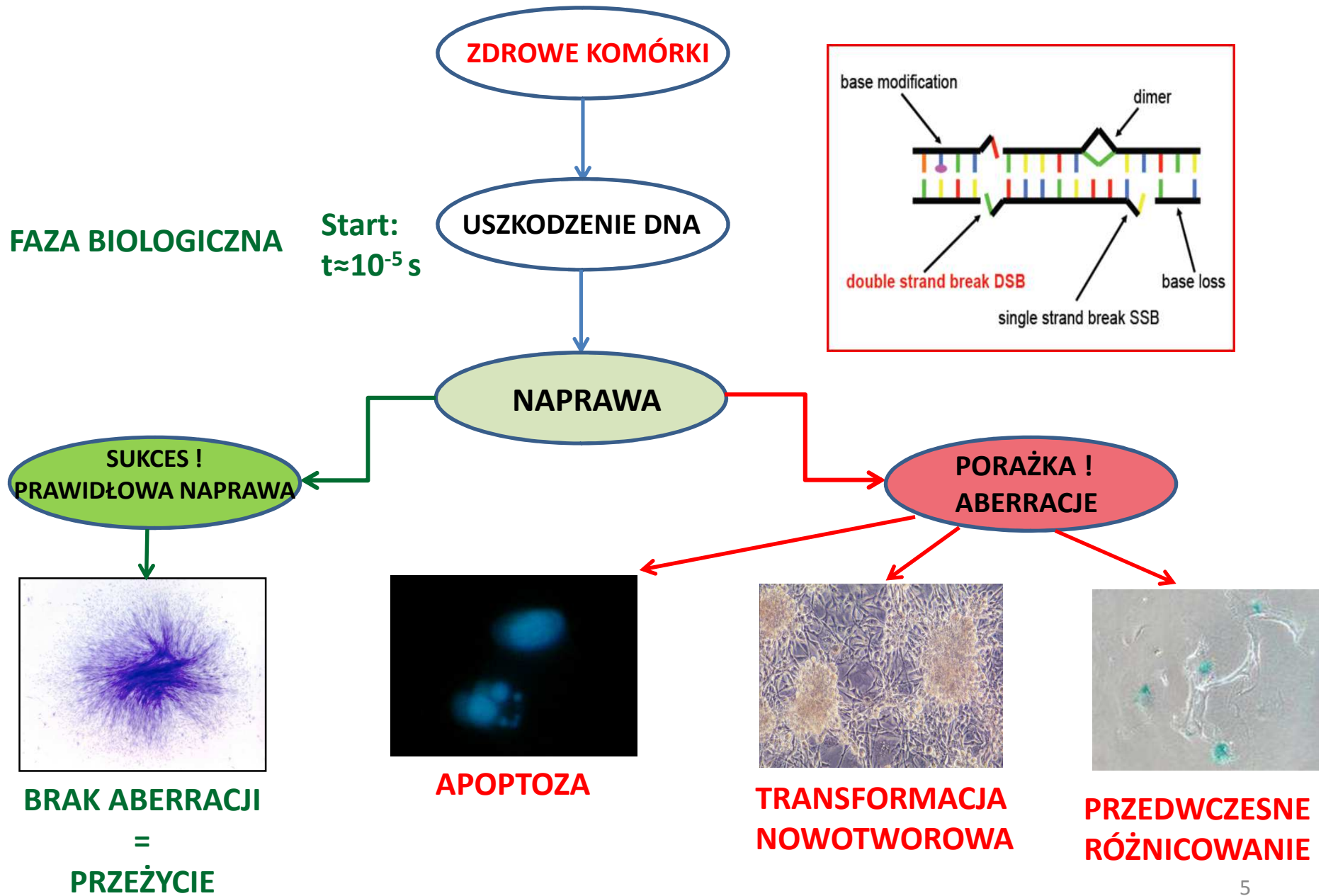


Średnia strata energetyczna na jednostkę drogi [keV/ μ m] vs **Liniowy przekaz energii (LET) [keV/ μ m]**

$$S(E) = -\frac{dE}{dx} \approx \text{LET}$$

- LET odnosi się do tarcz mikrobiologicznych
- LET nie uwzględnia wkładu od elektronów δ o energiach > 100 eV

SCHEMAT ODPOWIEDZI KOMÓREK NA PROMIENIOWANIE JONIZUJĄCE

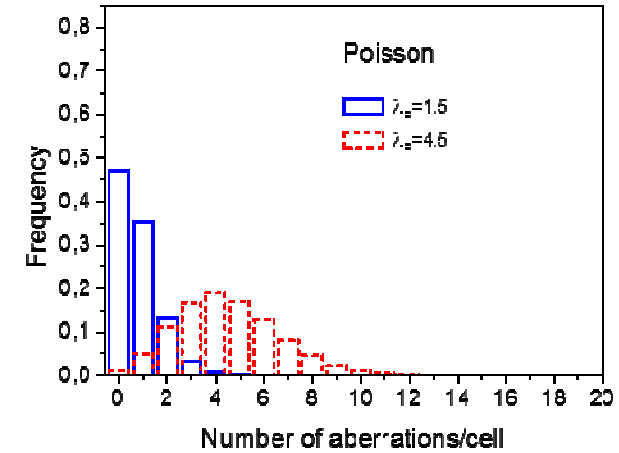
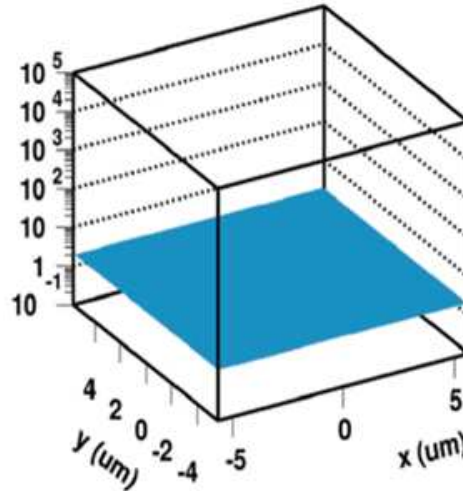


Mikroskopowy rozkład dawki a statystyczny rozkład aberracji

Rozkład Poissona:

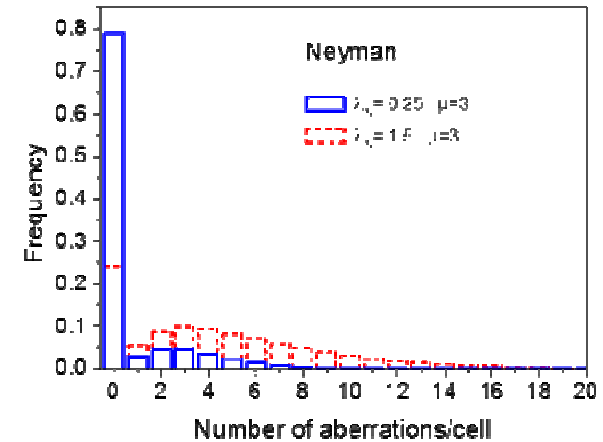
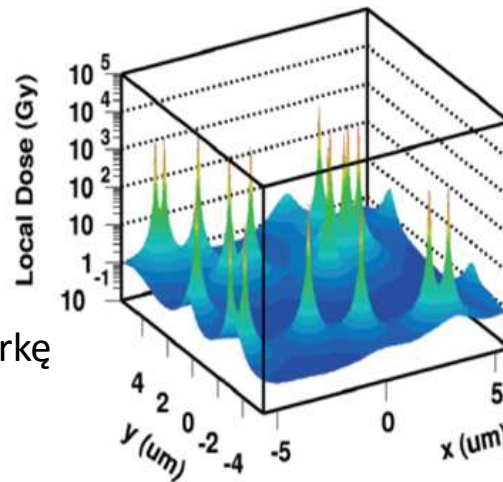
$$P_p(k) = \frac{\lambda_p^k e^{-\lambda_p}}{k!}$$

k – liczba aberracji na komórkę
 λ_p - średnia liczba aberracji na komórkę w populacji



Rozkład Neymana

n – liczba uderzeń w komórkę
 λ_N - średnia liczba uderzeń w komórkę
 μ – średnia liczba aberracji na komórkę na każde uderzenie

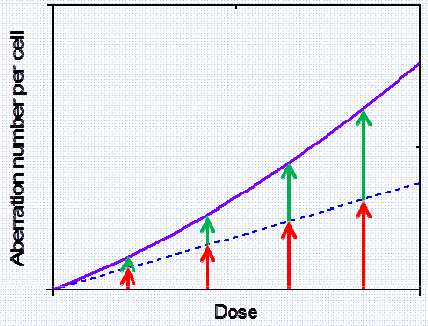


$$P_N(m) = \sum_{n=0}^{\infty} P_{n\mu}(k) P_{\lambda_N}(n) = \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(n\mu)^k e^{-n\mu}}{k!} \cdot \frac{\lambda_N^n e^{-\lambda_N}}{n!} = \frac{\mu^k}{k!} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{n^k}{n!} (e^{-\mu} \lambda_N)^n$$

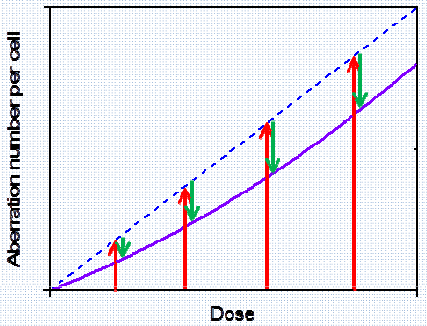
KRZYWE DAWKA-EFEKT

MODEL LINIOWO-KWADRATOWY:

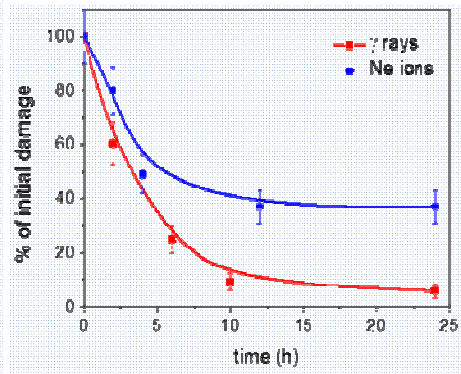
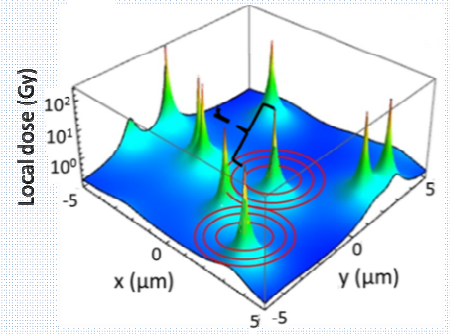
$$Y = \alpha D + \beta D^2$$



POKRYWANIE ŚLADÓW JONOWYCH



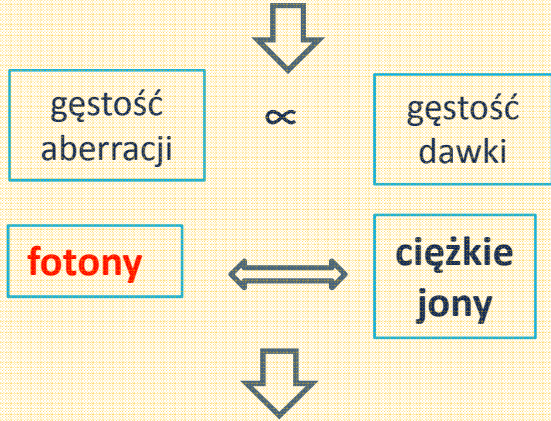
NAPRAWA USZKODZEŃ



Ne: 50 MeV/u; LET:136 keV/μm

γ : 1.3 MeV; LET:0.2 keV/μm

Local Effect Model

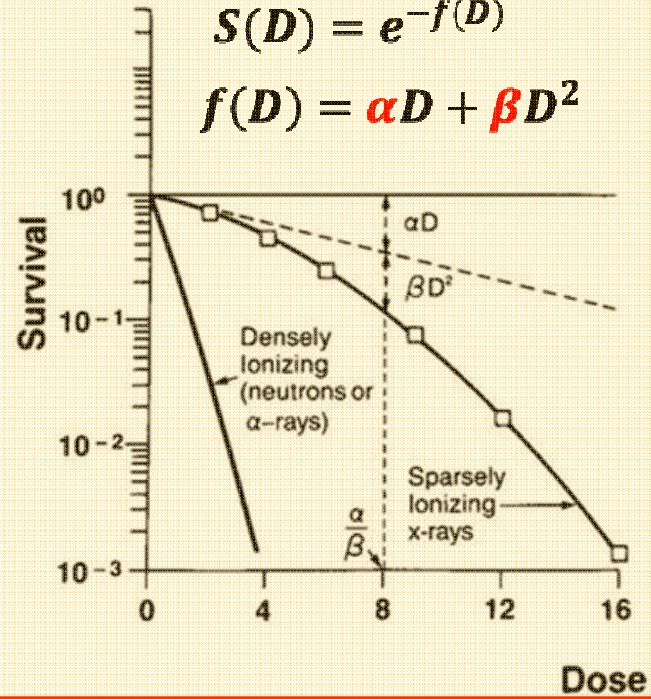


RADIOTERAPIA

$$S(D) = e^{-f(D)}$$

$$f(D) = \alpha D + \beta D^2$$

$\frac{\alpha}{\beta} = ?$



1. MOTYWACJA

2. METODYKA

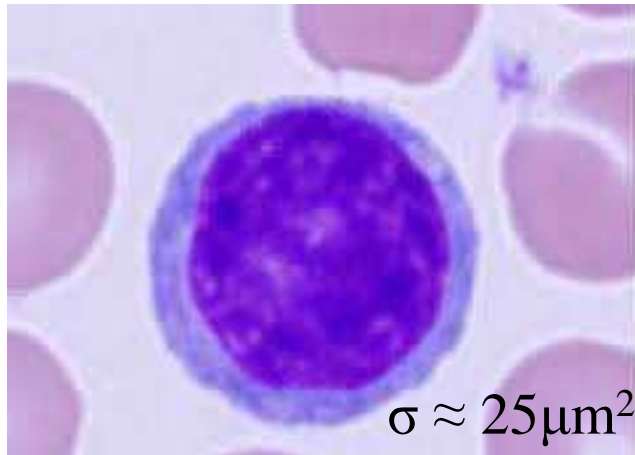
3. WYNIKI EKSPERYMENTALNE

4. MODELOWANIE TEORETYCZNE

5. PODSUMOWANIE I PERSPEKTYWY



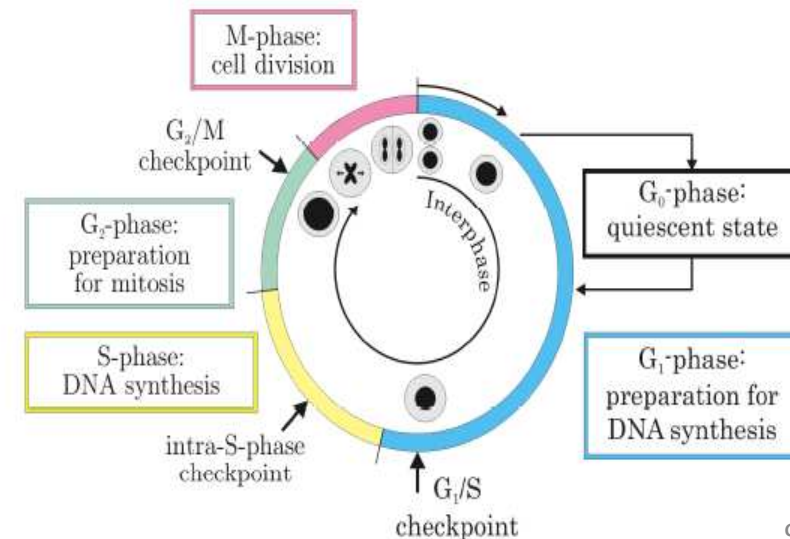
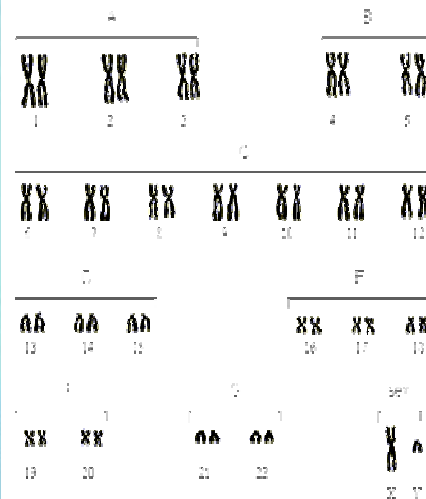
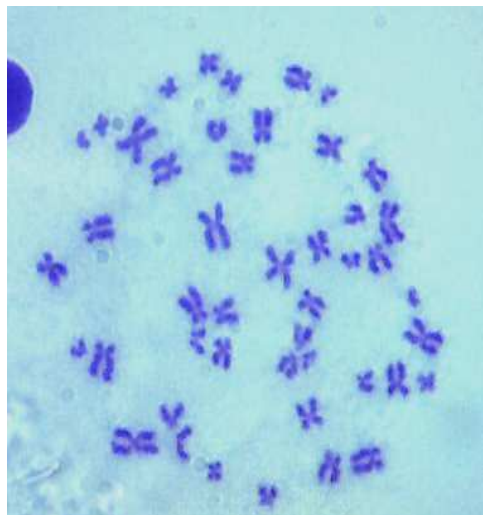
METODYKA



LIMFOCYTY KRWI OBWODOWEJ:

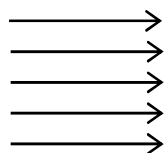
- ✓ Łatwo dostępna tkanka
- ✓ Mało inwazyjny sposób pobrania
- ✓ Zsynchronizowana populacja
- ✓ Wrażliwość na promieniowanie jonizujące limfocytów zbliżona jest do wrażliwości komórek szpiku kostnego

CHROMOSOMY WIDOCZNE SĄ JEDYNIEM W METAFAZIE PODZIAŁU KOMÓRKOWEGO!



PROCEDURA PRZYGOTOWANIA MATERIAŁU BADAWCZEGO

Irradiation



Cell culture
(48 h; 37°C; 5% CO₂)



Fixation

- drop KCl
- keep 20 min in 37°C



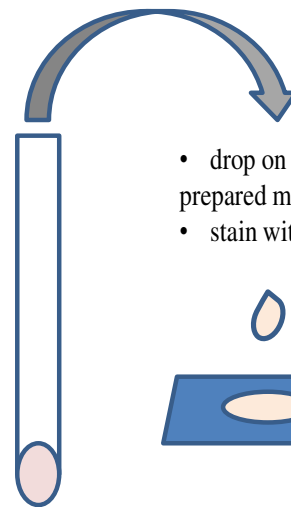
- centrifuge 1000 rpm, 10 min;
- remove supernatant



- centrifuge 1000 rpm, 10 min;
- remove supernatant



- drop fixator (metanol+acetic acid)
- centrifuge 1200 rpm, 10 min
- remove supernatant
- **repeat this process**



- drop on slides prepared material
- stain with Giemsa

Normal	Chromatid break (ctb)	Chromosome fragment (csb)	Acentric ring (dmin)	Centric ring with fragment (r)	Translocation (t)
Chromatid exchange (cte)		Dicentric with fragment (dic)		Reciprocal exchange (not observable)	

ABERRACJE CHROMOSOMOWE

J.R.K. Savage J Med. Genetics **12**,103-122 (1975)

IAEA Cytogenetic dosimetry: application in preparedness for and response to radiation emergencies. IAEA, Vienna (2011)

PARAMETRY WIĄZEK UŻYTYCH DO NAPROMIENIOWANIA

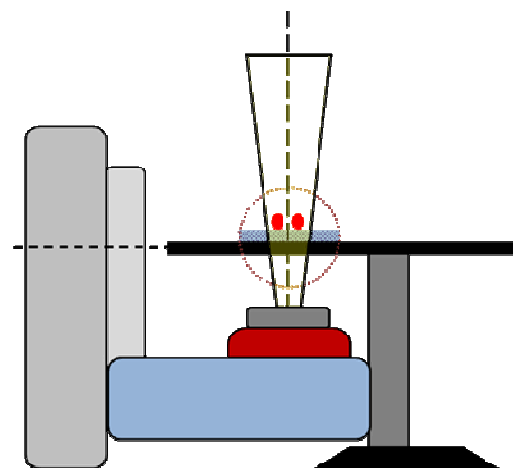
	<i>Particle type</i>	<i>Particle Energy (MeV/u)</i>	<i>LET (keV/μm)</i>	<i>Dose (Gy)</i>	<i>Fluence (particles/cm²)</i>
Phasotron JINR, Dubna	<i>high energy protons</i>	150	0.57	0.5	547.6×10^6
				1	1095.1×10^6
				1.5	1642.7×10^6
				2	2190.3×10^6
				3	3285.4×10^6
	<i>SOBP protons</i>	~20	1.31	0.5	222.9×10^6
				1	445.9×10^6
				1.5	668.8×10^6
				2	891.7×10^6
				3	1337.6×10^6
Akcelerator ITEP-TWAC Moskwa	¹² C ions	199	16	0.8	31.2×10^6
				1.49	56.1×10^6
				2.92	113.9×10^6
				4.44	173.2×10^6
				5.89	229.8×10^6
				Cyklotron MC-400 JINR, Dubna	¹¹ B ions
0.07	0.58×10^6				
0.1	0.82×10^6				
0.2	1.64×10^6				
0.5	4.1×10^6				
1	8.2×10^6				
1.5	12.3×10^6				
2	16.4×10^6				

➤ Promieniowanie referencyjne:

Kwanty γ z rozpadu ⁶⁰Co

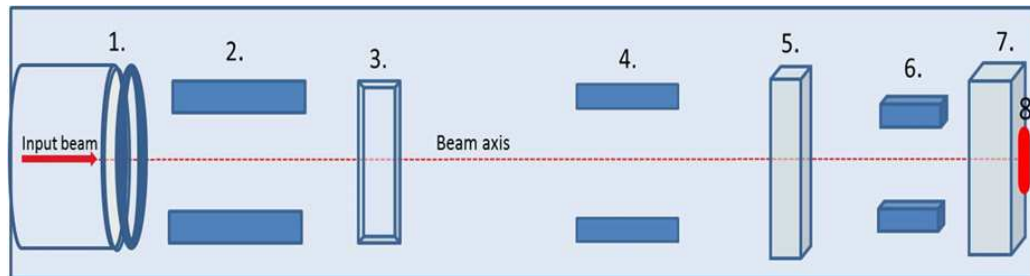
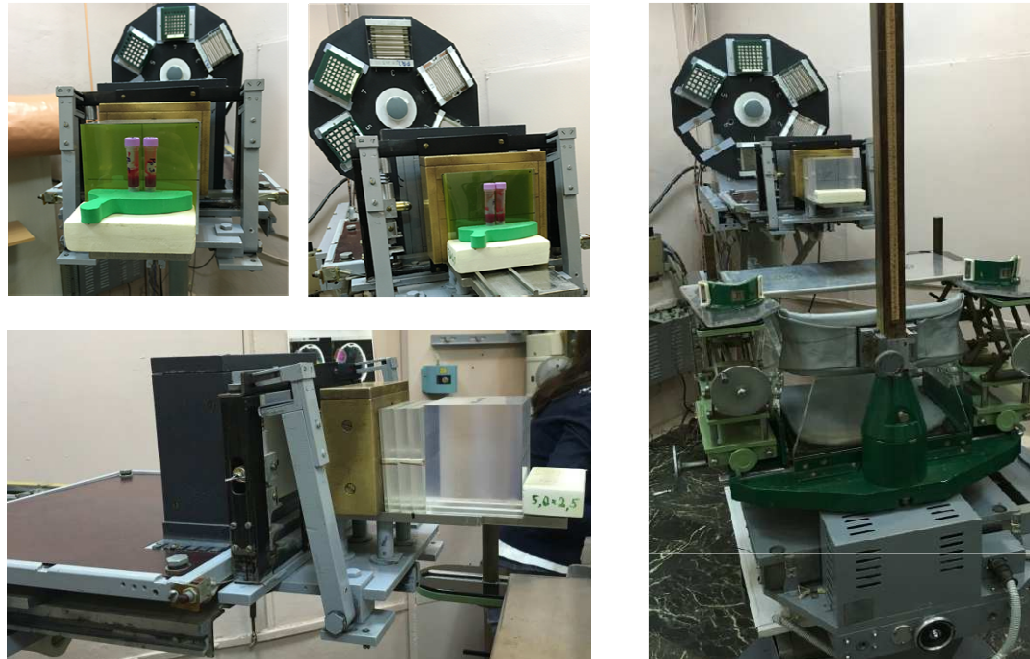
➤ Dawki:

0.5 ; 0.75 ; 1.0 ; 1.5 ; 2.0 ; 3.0 Gy

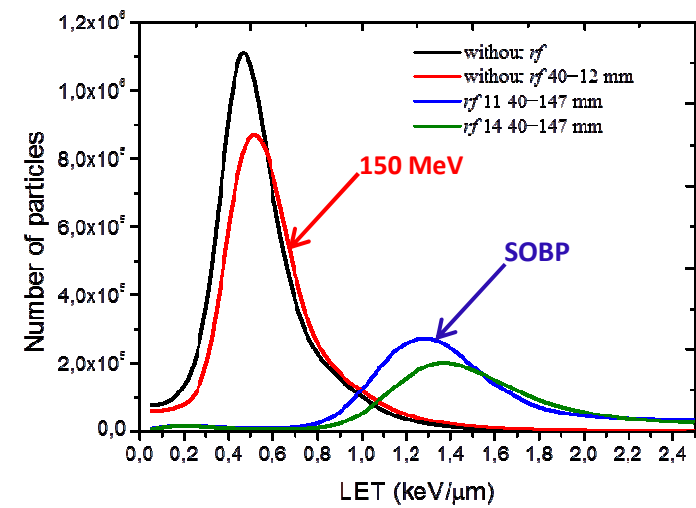
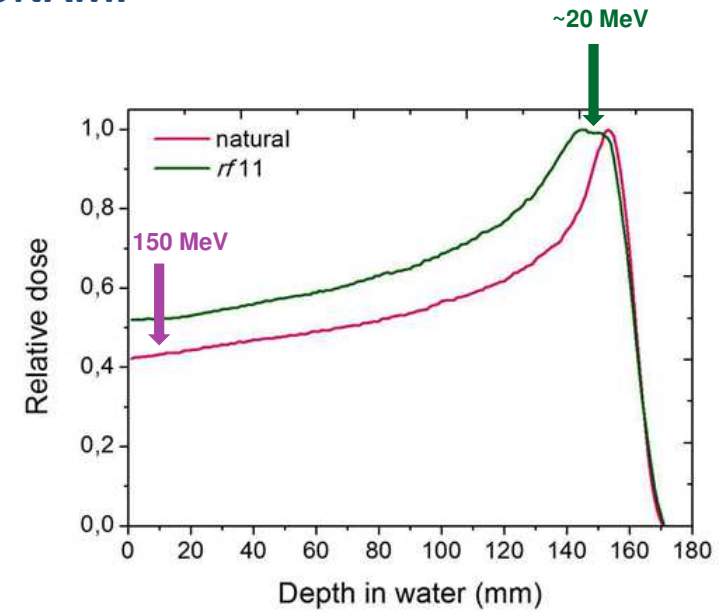


Aparat radioterapeutyczny
Rokus-M, JINR, Dubna

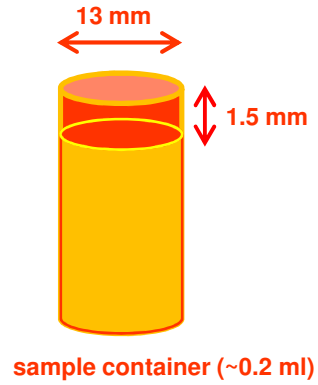
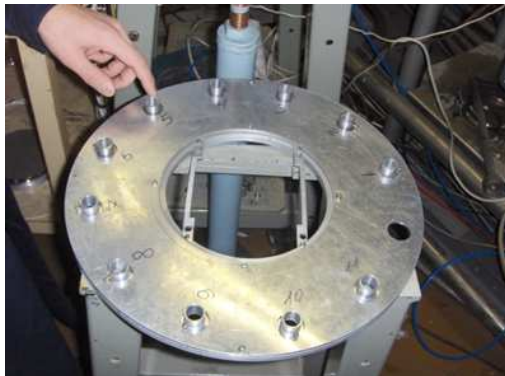
NAPROMIENIANIE PROTONAMI



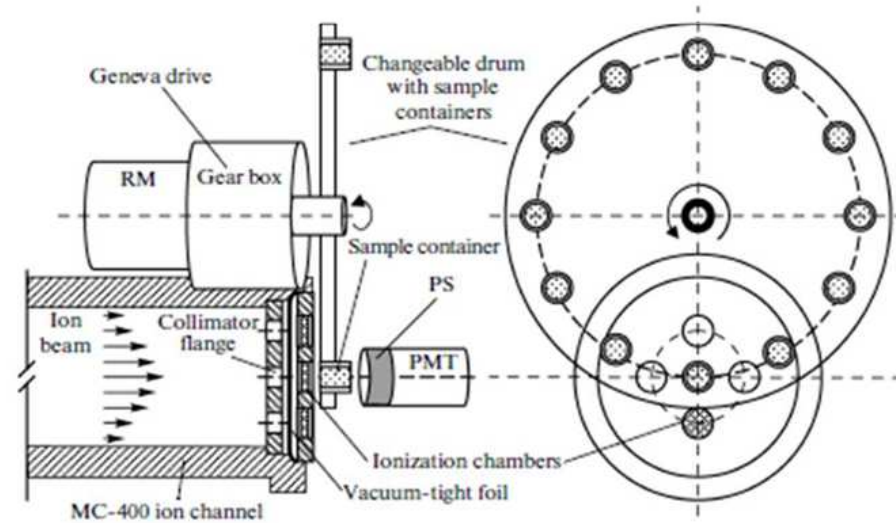
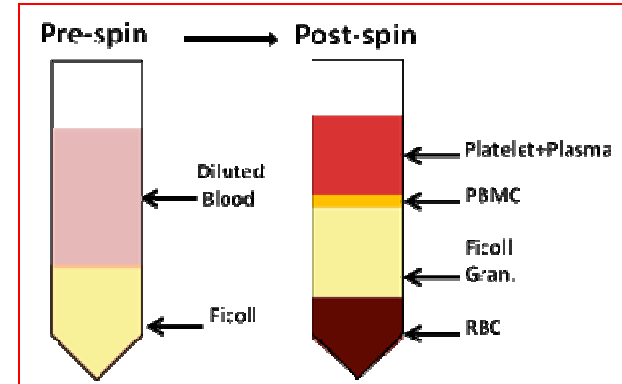
1. Komory jonizacyjne
2. Kolimator I
3. Filtr grzebieniowy
4. Kolimator II
5. blok z plexiglasu (o szerokości odpowiadającej 40mm wody)
6. Kolimator III
7. blok z plexiglasu (o dowolnie dobranej szerokości)
8. próbka krwi



NAPROMIENIANIE JONAMI BORU



IZOLACJA LIMFOCYTÓW



1. MOTYWACJA

2. METODYKA

3. WYNIKI EKSPERYMENTALNE

4. MODELOWANIE TEORETYCZNE

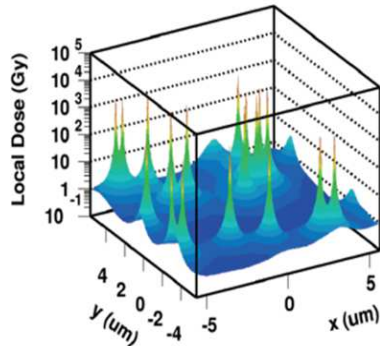
5. PODSUMOWANIE I PERSPEKTYWY



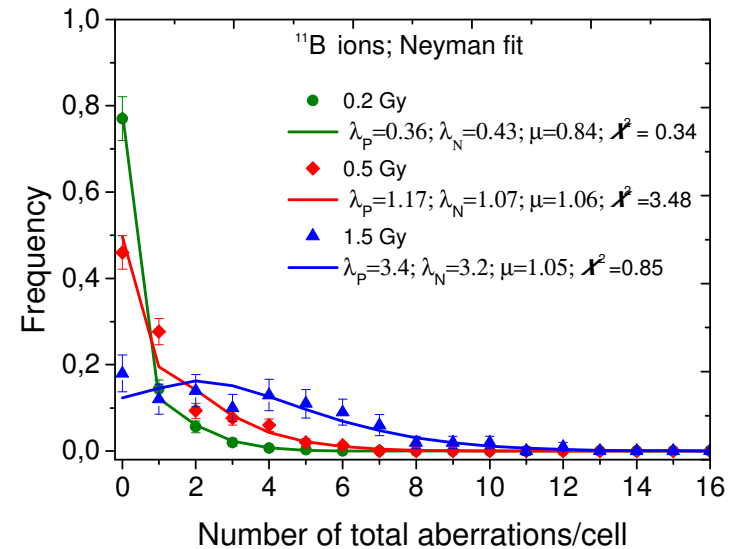
ROZKŁADY STATYSTYCZNE ABERRACJI CHROMOSOMOWYCH DLA WYBRANYCH DAWEK - PRZYKŁADY

NEYMAN A

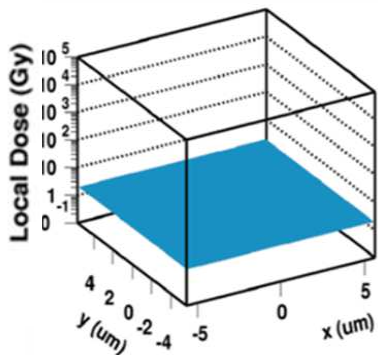
$$P_N(m) = \sum_{n=0}^{\infty} P_{n\mu}(k) P_{\lambda_N}(n) = \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(n\mu)^k e^{-n\mu}}{k!} \cdot \frac{\lambda_N^n e^{-\lambda_N}}{n!} = \frac{\mu^k}{k!} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{n^k}{n!} (e^{-\mu} \lambda_N)^n$$



n – liczba uderzeń w komórkę;
 λ_N - średnia liczba uderzeń w komórkę;
 μ – średnia liczba aberracji na komórkę
 na każde uderzenie

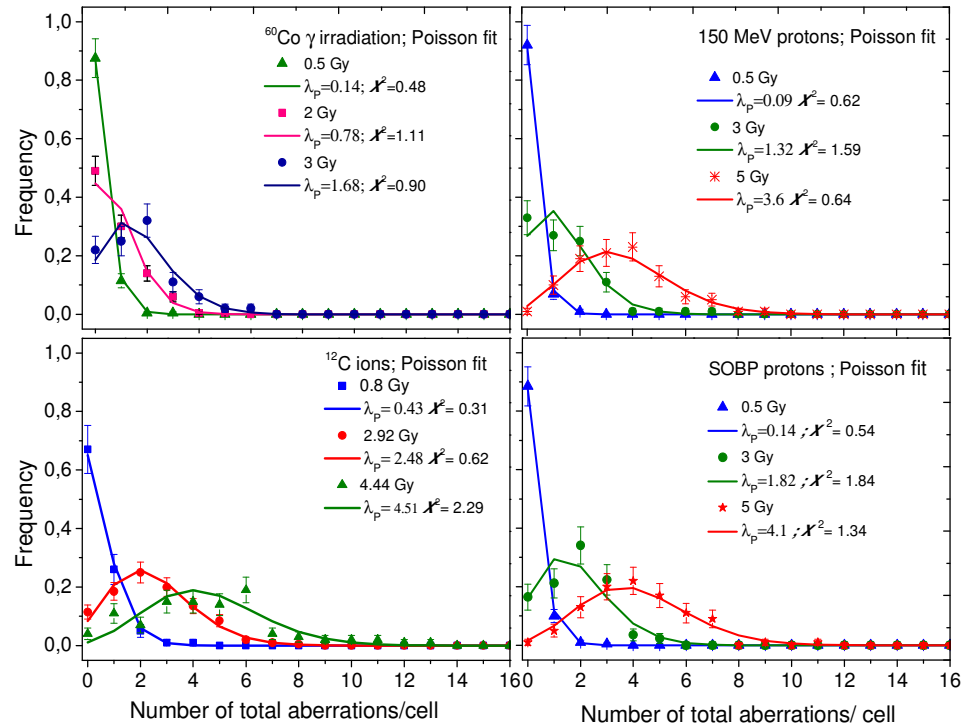


POISSON

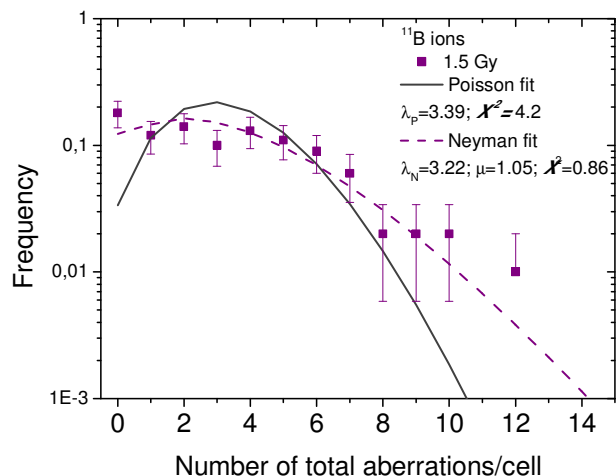


$$P_p(k) = \frac{\lambda_p^k e^{-\lambda_p}}{k!}$$

k – liczba aberracji na komórkę
 λ_p - średnia liczba aberracji na komórkę w populacji



ROZKŁADY STATYSTYCZNE ABERRACJI CHROMOSOMOWYCH – POISSON VS. NEYMAN A + ZALEŻNOŚĆ PARAMETRU μ OD DAWKI



Dla małych wartości μ :

$$\sigma_N^2 \approx \sigma_P^2$$

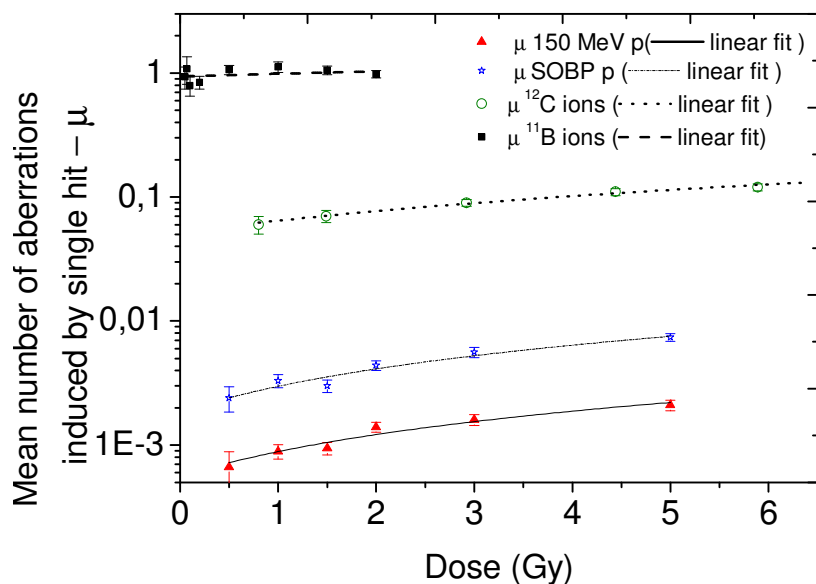
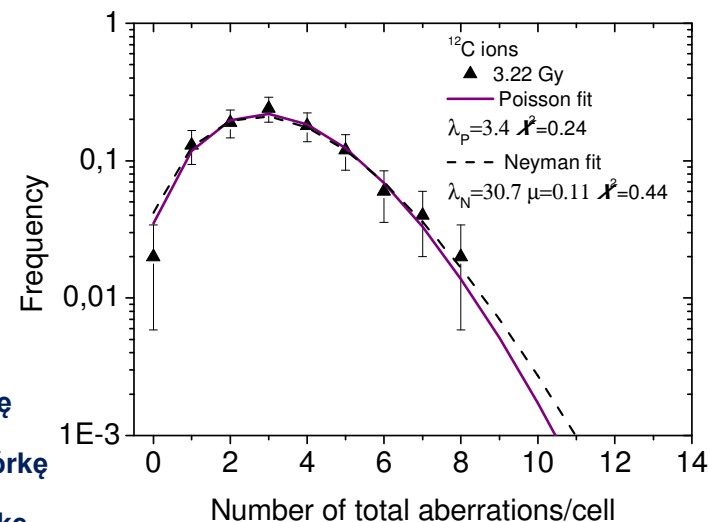
$$\lambda_P = \lambda_N \mu$$

$$\sigma_N^2 = \lambda_N \mu (1 + \mu)$$

λ_N - średnia liczba uderzeń w komórkę

λ_P - średnia liczba aberracji na komórkę

μ - średnia liczba aberracji na komórkę na każde uderzenie

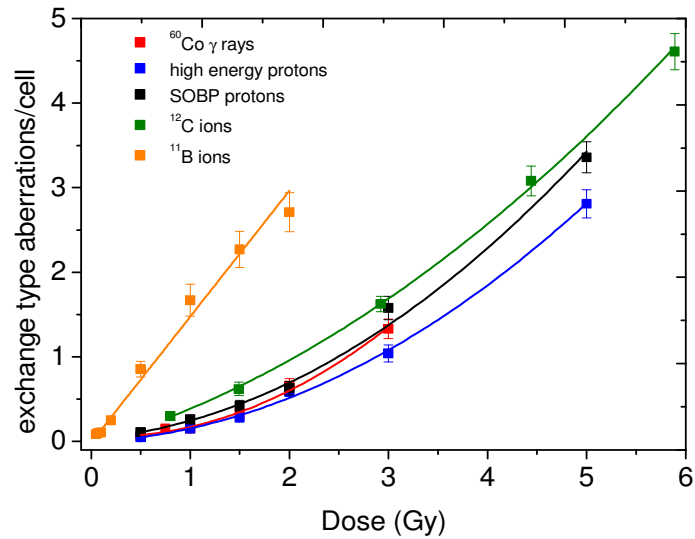


Zależność parametru μ od dawki:

- największy wzrost dla protonów (SOBP i 150 MeV)
- dla ^{11}B parametr μ nie zależy od dawki

POKRYWANIE SIĘ ŚLADÓW JONOWYCH ?

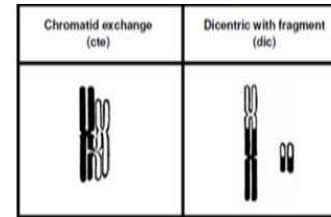
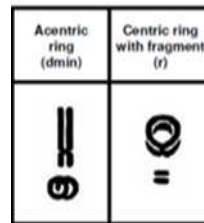
KRZYWE DAWKA-EFEKT



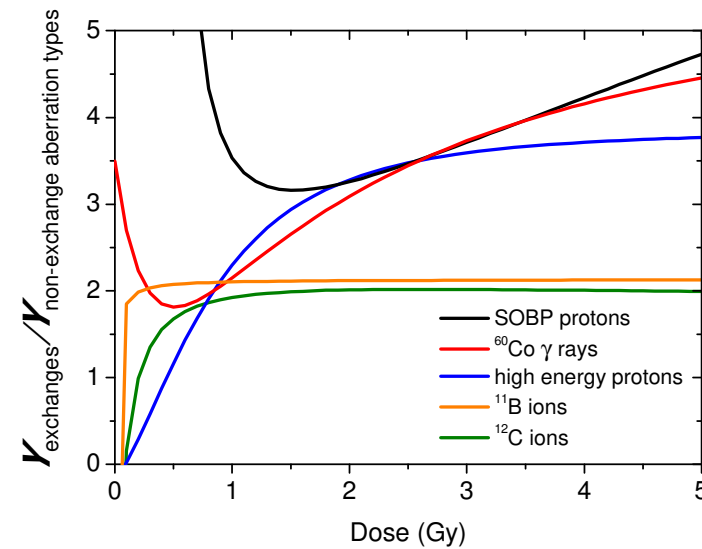
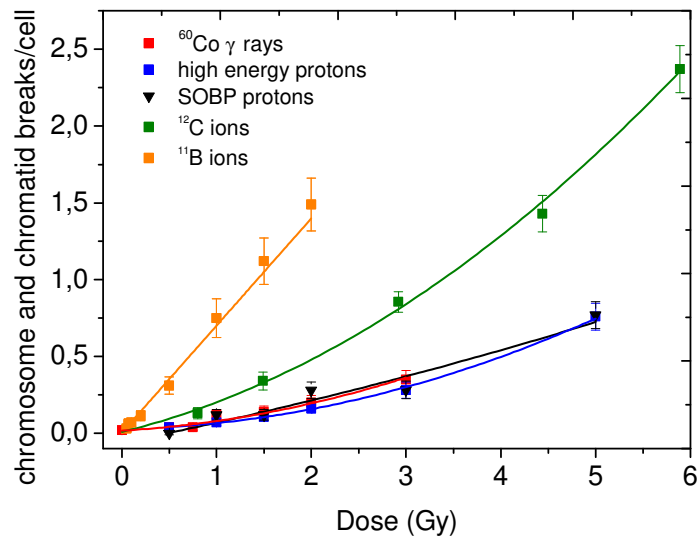
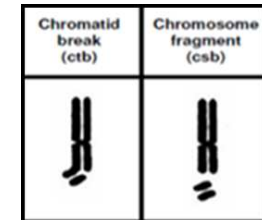
MODEL LINIOWO-KWADRATOWY:

$$Y = \alpha D + \beta D^2$$

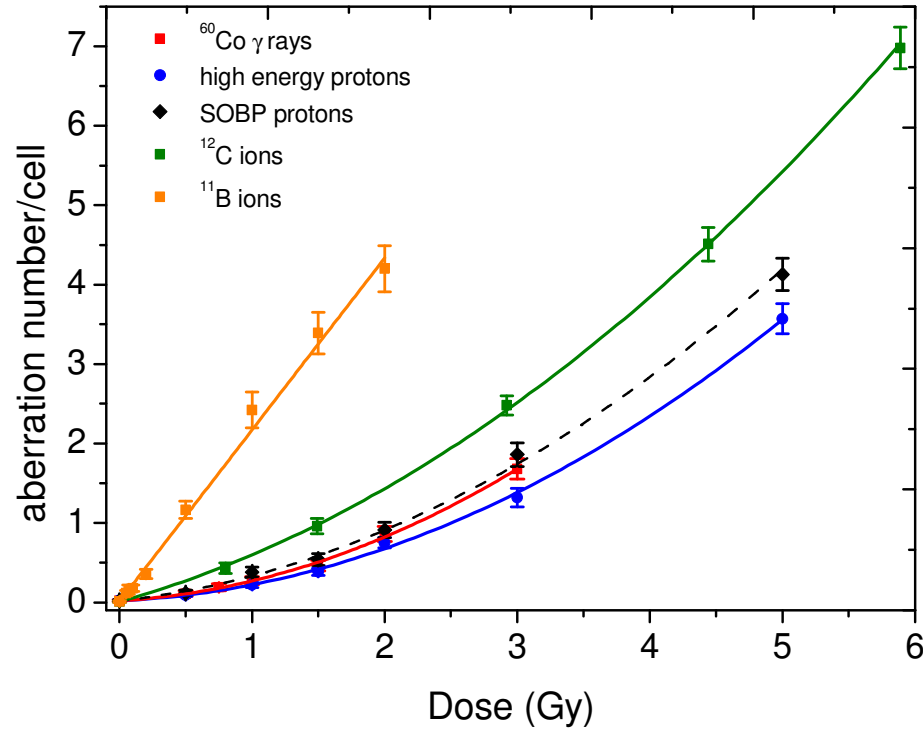
WYMIANA ELEMENTÓW CHROMATYD



ZŁAMANIA



KRZYWE DAWKA-EFEKT

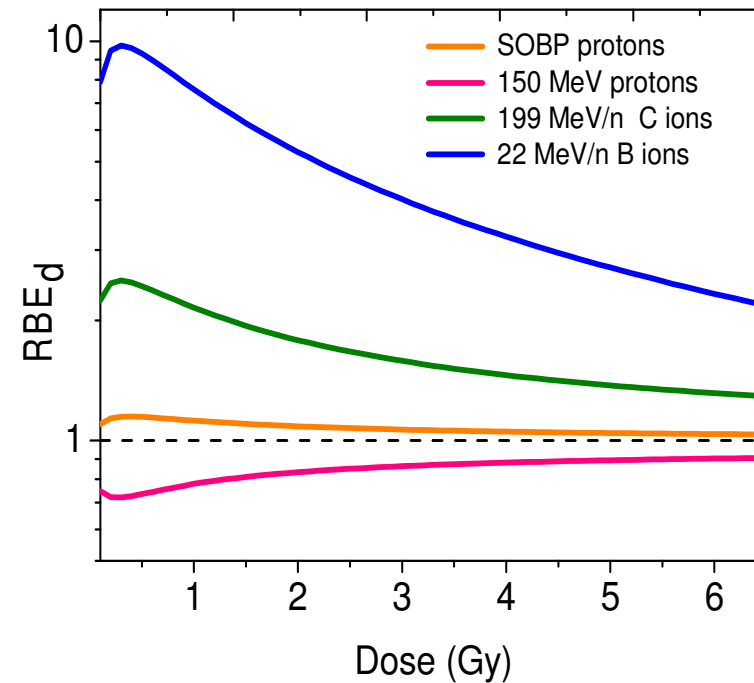
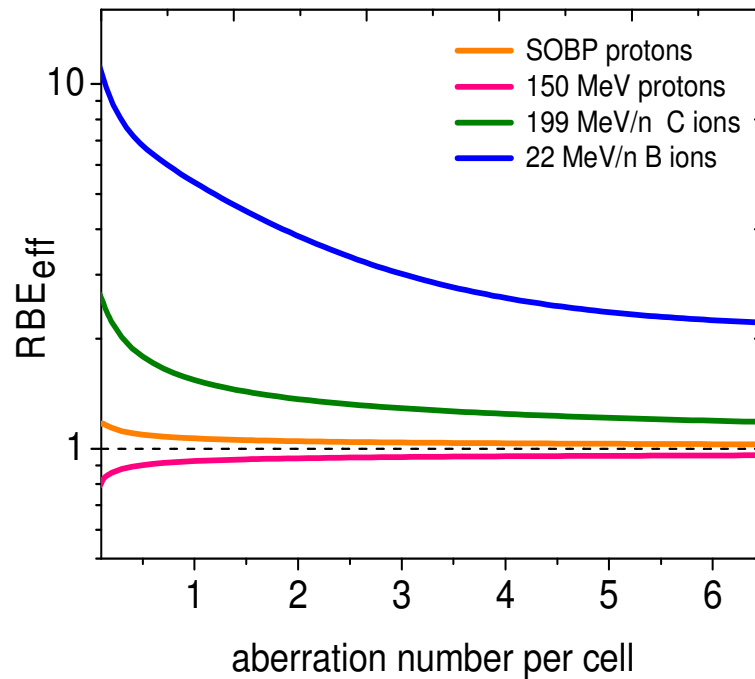


MODEL LINIOWO-KWADRATOWY:
 $Y = \alpha D + \beta D^2$

LET $\left\{ \begin{array}{l} \alpha \\ \beta = \text{const} \end{array} \right.$

	fit parameters	⁶⁰ Co γ rays	high energy protons	SOBP protons	¹² C ions	¹¹ B ions
Total aberration yield	α	0.10±0.05	0.07±0.03	0.18±0.04	0.46±0.06	2.2±0.1
	β	0.15±0.02	0.13±0.01	0.13±0.01	0.12±0.01	-
	Int.	0.02±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01	0.01±0.01	0.006±0.009
LET (keV/μm)	-	0.2	0.57	1.31	16	76

WZGLĘDNA SKUTECZNOŚĆ BIOLOGICZNA – (RELATIVE BIOLOGICAL EFFECTIVENESS – RBE)



$$RBE_{eff} = \frac{D_{\gamma}}{D_{ion}}$$

$$RBE_d = \frac{Y_{ion}}{Y_{\gamma}}$$

1. MOTYWACJA

2. METODYKA

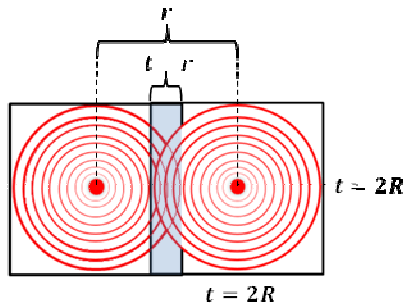
3. WYNIKI EKSPERYMENTALNE

4. MODELOWANIE TEORETYCZNE

5. PODSUMOWANIE I PERSPEKTYWY

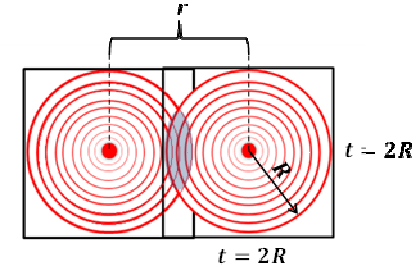


EFEKTYWNY PROMIEŃ ŚLADU JONOWEGO



gęstość prawdopodobieństwa
odległości między śladami jonowymi

$$P(r) = \frac{1}{2\pi L^2} e^{-\frac{r}{L}}$$



$$\langle r \rangle = \int_0^\infty r \frac{1}{2\pi L^2} e^{-\frac{r}{L}} 2\pi r dr = 2L$$

średnia odległość między uderzeniami

więcej uderzeń \Rightarrow

$\langle r \rangle \searrow$ $L \searrow$

$$S_{ov} = \frac{1}{2\pi L^2} \int_0^{2R} e^{-\frac{r}{L}} s_{ov} 2\pi r dr \approx \frac{F}{2\pi L^2} \int_0^t e^{-\frac{r}{L}} \boxed{(t-r)t} 2\pi r dr \approx F \frac{t^4}{6L^2}$$

średnia powierzchnia pokrywających się śladów

$$s_{ov} = 2R^2 \arccos \frac{r}{2R} - r \sqrt{R^2 - \frac{r^2}{4}} \quad \text{okręgi}$$

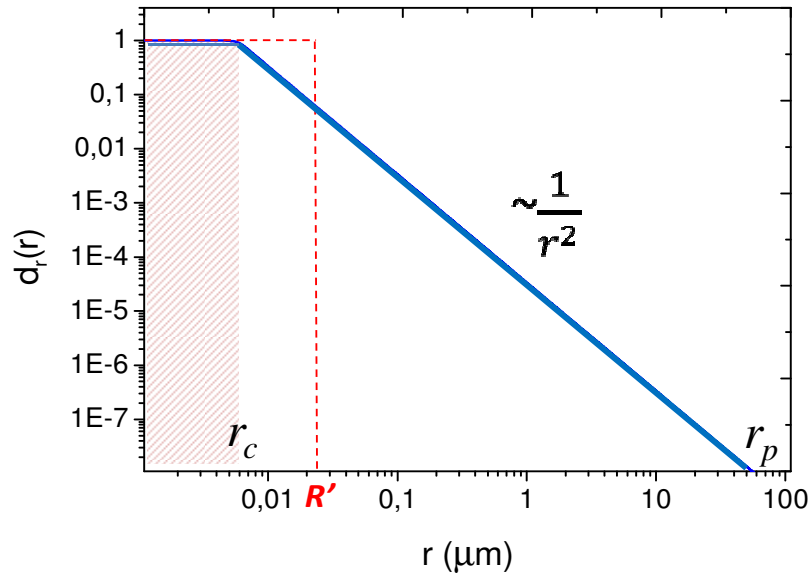
wsp. geometryczny
 $F \approx 0.58$

związek między promieniem
ślada a zakrzywieniem
odpowiedzi dawka-efekt:

$$R = \sqrt{\frac{3 \cdot LET}{8 \cdot F \cdot \rho_m}} \cdot \sqrt{\frac{\beta}{\alpha}}$$

$$Y = \alpha D + \beta D^2$$

EFEKTYWNY PROMIEŃ FIZYCZNY R' WYNIKAJĄCY Z ROZKŁADU DAWKI ELEKTRONÓW WOKÓŁ ŚLADU JONOWEGO



gęstość radialna dawki (radialny profil dawki)

$$d_r(r) = \begin{cases} \tau LET/r_c^2 & : r < r_c \\ \tau LET/r^2 & : r_c \leq r \leq r_p \\ 0 & : r > r_p \end{cases}$$

dawka jednego śladu jonowego:

$$d = \int_0^{r_p} d_r(r) 2\pi r dr = \frac{\tau LET}{r_c^2} \int_0^{r_c} 2\pi r dr + \tau LET \int_{r_c}^{r_p} \frac{2\pi r}{r^2} dr = 2\pi\tau LET \left(\frac{1}{2} + \ln \frac{r_p}{r_c} \right)$$

z drugiej strony: $d = \pi R'^2 \tau LET / r_c^2$

efektywny promień fizyczny: $R' = r_c \sqrt{1 + 2 \ln \frac{r_p}{r_c}}$

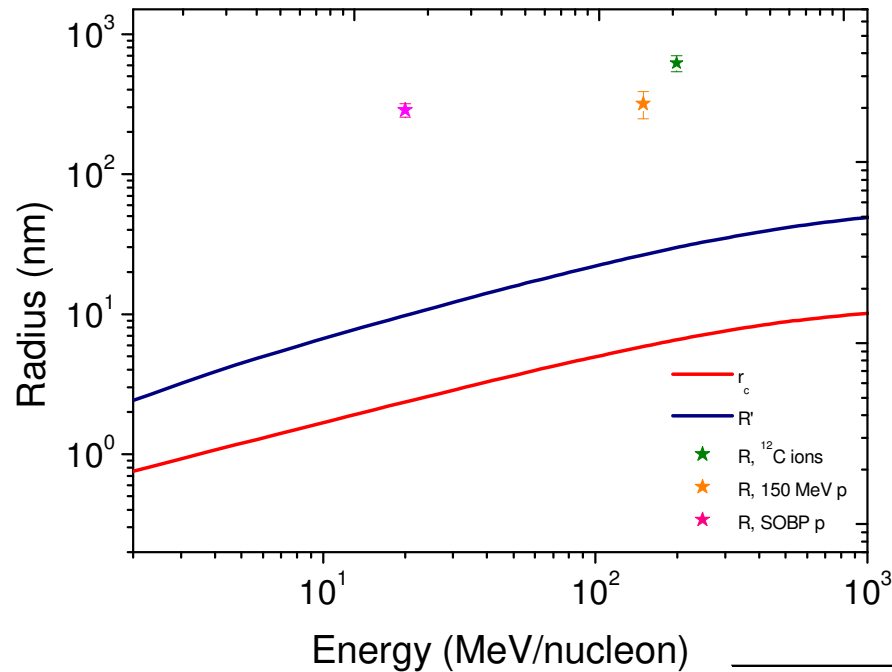
promień rdzenia r_c :

$$r_c = 0.0116 \beta \ (\mu\text{m})$$

promień otoczki r_p :

$$r_p = 0.768 E - 1.925 \sqrt{E} + 1.257 \ (\mu\text{m})$$

EKSPERYMENT vs. TEORIA



A. Chatterjee, H.J. Schaefer, 1976

$$r_c = 0.0116 \beta \text{ (}\mu\text{m)}$$

$$r_p = 0.768 E - 1.925 \sqrt{E}$$

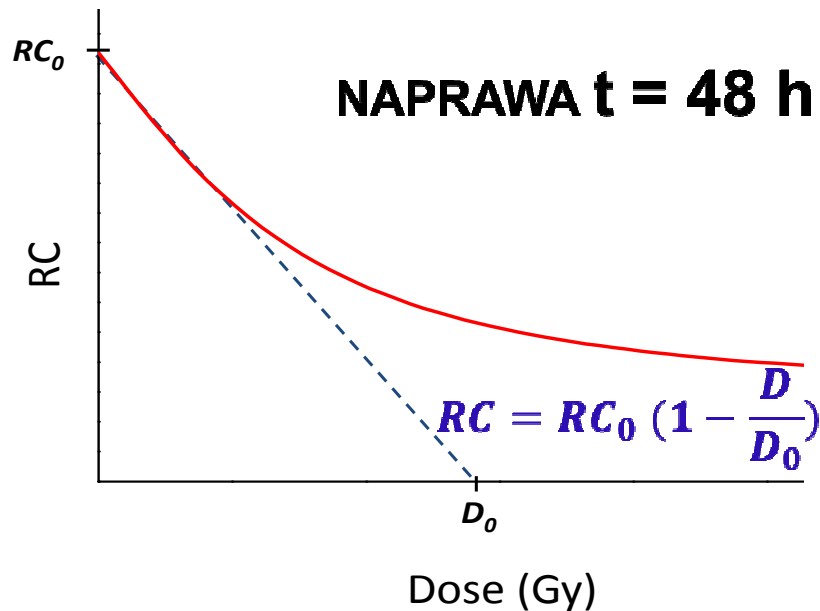
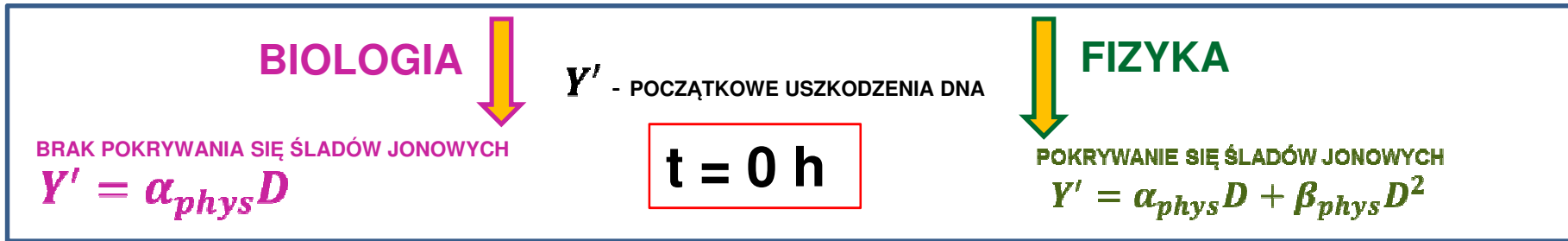
$$R' = r_c \sqrt{1 + 2 \ln \frac{r_p}{r_c}}$$

$$R = \sqrt{\frac{3 \cdot LET}{8 \cdot F \cdot \rho_m}} \cdot \sqrt{\frac{\beta}{\alpha}}$$

BIOLOGIA CZY FIZYKA?

	r_c (nm)	r_p (μm)	R (nm)	R' (nm)	$(\beta/\alpha)_{exp}$ (Gy^{-1})
^{60}Co γ rays	-	-	180 \pm 45	-	1.56 \pm 0.77
150 MeV protons	5.8	93	318 \pm 69	23.02	1.86 \pm 0.81
SOBP protons	2.32	8.14	287 \pm 32	9.65	0.72 \pm 0.17
^{12}C ions	6.56	126.9	620 \pm 81	29.86	0.26 \pm 0.04
^{11}B ions	2.55	9.65	-	10.95	-

BIOLOGIA CZY FIZYKA I



$$(\beta/\alpha)_{exp} = \frac{RC_0}{D_0(1-RC_0)} + \frac{\beta_{phys}}{\alpha_{phys}}$$

$$(\beta/\alpha)_{exp} = (\beta/\alpha)_{biol} + (\beta/\alpha)_{phys}$$

$$Y = \underbrace{(1 - RC_0)\alpha_{phys} D}_{\alpha_{biol}} + \underbrace{\frac{RC_0}{D_0} \alpha_{phys} D^2}_{\beta_{biol}}$$

$$(\beta/\alpha)_{biol} = \frac{RC_0}{D_0(1-RC_0)}$$

	$(\beta/\alpha)_{exp}$ (Gy ⁻¹)	$(\beta/\alpha)_{phys}$ (Gy ⁻¹)	$(\beta/\alpha)_{biol}$ (Gy ⁻¹)
150 MeV protons	1.86±0.81	0.01	1.85
SOBP protons	0.72±0.17	0.009	0.71
¹² C ions	0.26±0.04	0.0005	0.259

FIZYKA CZY BIOLOGIA II

FIZYKA:

PRZEWIDYWANIA MODELU POKRYWAJĄCYCH SIĘ TRAKÓW:

$$(\beta/\alpha)_{phys} = \frac{8 F \rho_m}{3 LET} R'^2 \sim \frac{R'^2}{LET} \sim \frac{E}{LET} \sim LET^{-2}$$

BIOLOGIA:

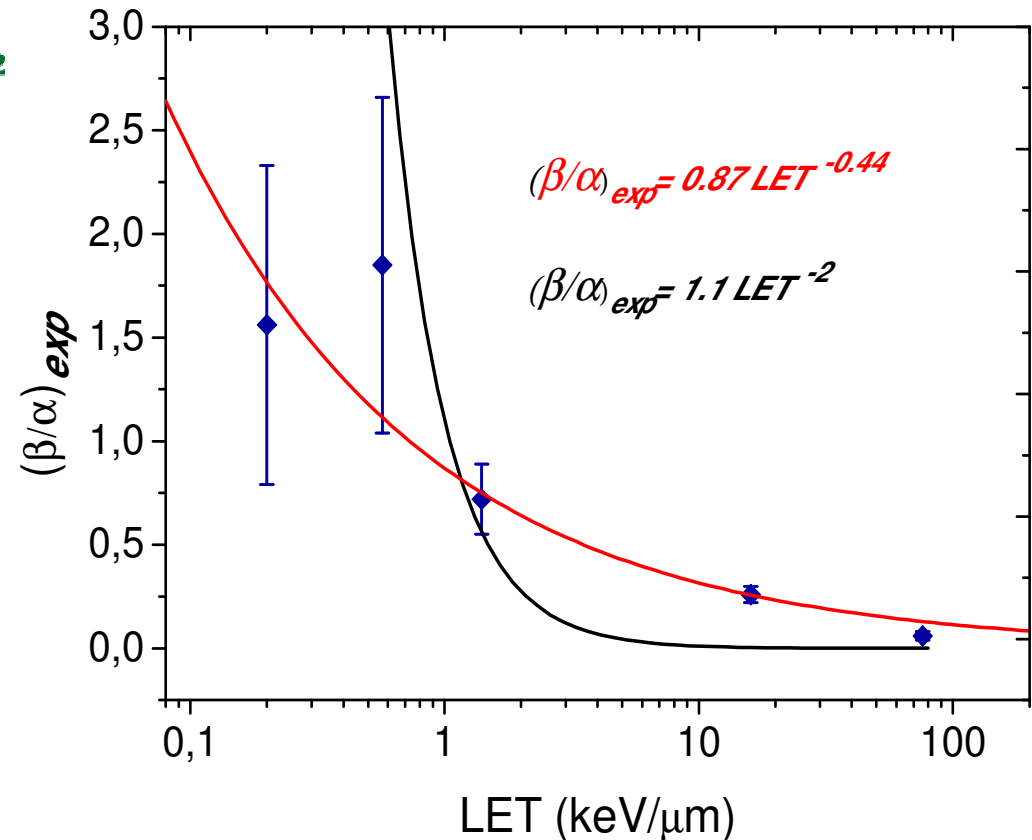
ZAKŁADAJĄC DLA $D \rightarrow 0$:

$$RC_0 = 1 - A \cdot LET^{0.5}$$

WÓWCZAS:

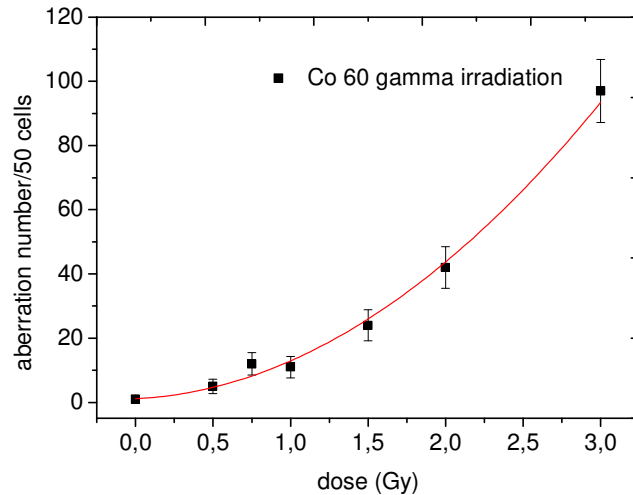
$$(\beta/\alpha)_{biol} = \frac{RC_0}{D_0(1 - RC_0)} = \frac{1 - A \cdot LET^{0.5}}{A \cdot D_0 \cdot LET^{0.5}}$$

$$(\beta/\alpha)_{biol} \approx \frac{1}{A \cdot D_0} LET^{-0.5}$$



PUNKTY POMIAROWE NALEŻĄ KOLEJNO DO: kwantów gamma z rozpadu ^{60}Co , szybkich protonów, protonów z rozszerzonego piku Bragga, jonów węgla oraz jonów boru (przy założeniu, że $\beta=1.13 \pm 0.01$)

EFEKTYWNOŚĆ MECHANIZMÓW REPERACJI



rozrzut punktów pomiarowych
dokoła krzywej teoretycznej:
funkcja chi kwadrat

$$\chi^2 = \frac{1}{n-3} \sum_{i=1}^n \frac{(y_i - a - b_1 x_i - b_2 x_i^2)^2}{\sigma_i^2}$$

Gdy $\sigma_{P_i} = \sigma_i$ (błędy są dobrze określone) $\chi^2 = 1$

Ale $\sigma_{P_i} > \sigma_i$, wprowadzamy $\sigma_{P_i}^2 = k^2 \sigma_i^2$ $k \geq 1$

$$\chi_P^2 = \frac{1}{n-3} \sum_{i=1}^n \frac{(y_i - a - b_1 x_i - b_2 x_i^2)^2}{k^2 \sigma_i^2}$$

$$\chi_P^2 = \frac{1}{k^2} \frac{1}{n-3} \sum_{i=1}^n \frac{(y_i - a - b_1 x_i - b_2 x_i^2)^2}{\sigma_i^2}$$

= 1

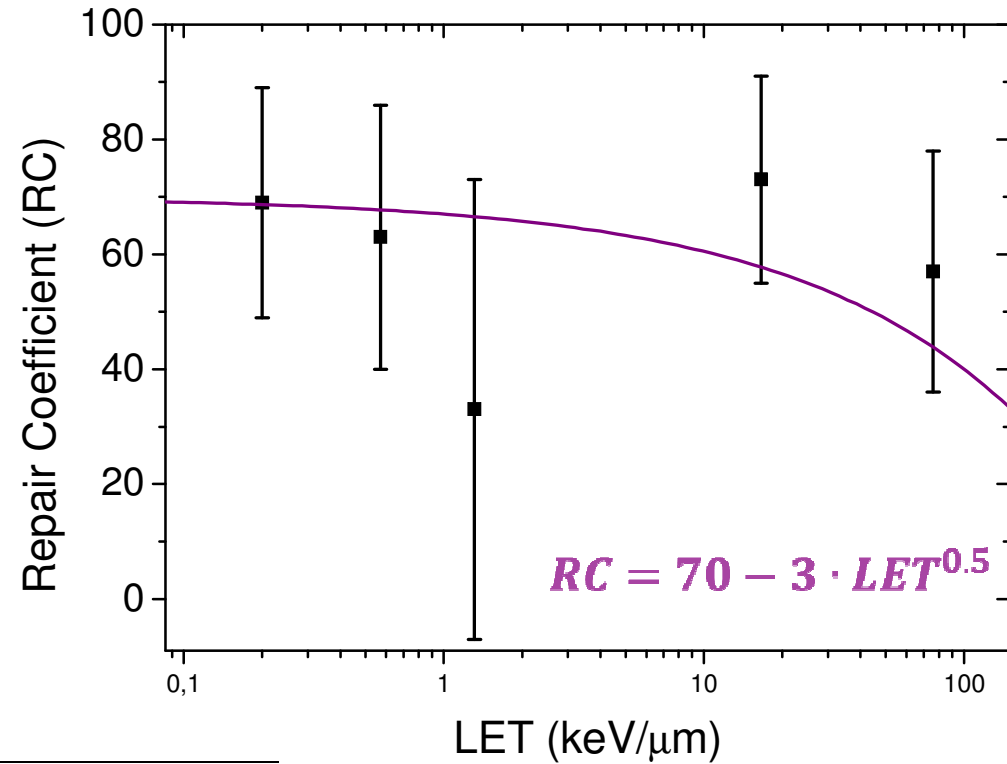
czynnik Fano

$$k^2 = \frac{1}{\chi_p^2} = RF = \frac{Y'}{Y}$$

WSPÓŁCZYNNIK REPERACJI I PROCENT ZRPEROWANYCH CHROMOSOMÓW

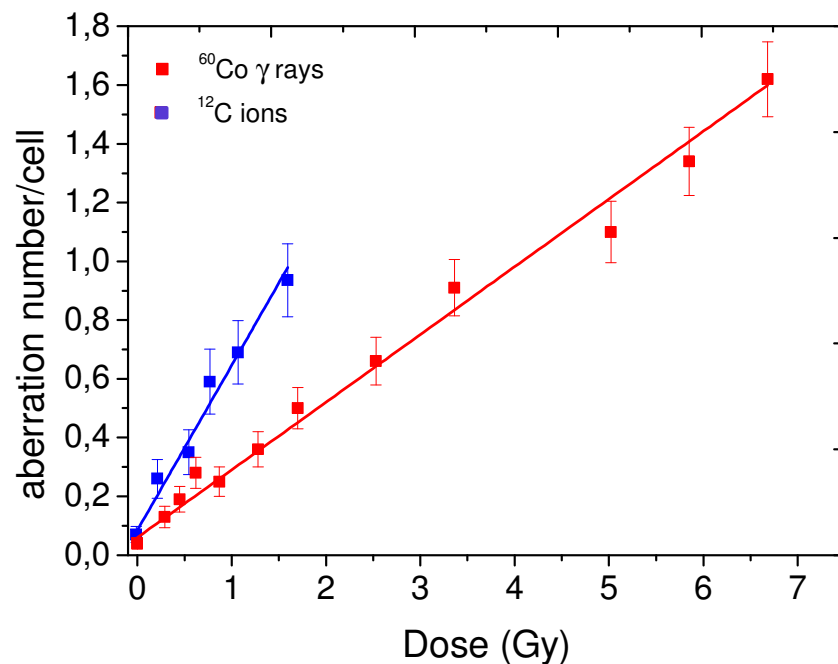
$$(\beta/\alpha)_{exp} \sim 1/\sqrt{LET}$$

$$RC = \frac{Y' - Y}{Y'} \cdot 100\%$$



	χ^2	RF	RC (%)
^{60}Co γ rays	0.31±0.20	3.2±2.0	69±20
150 MeV protons	0.37±0.23	2.7±1.7	63±23
SOBP protons	0.67±0.40	1.5±0.9	33±40
^{12}C ions	0.26±0.18	3.8±2.7	73±18
^{11}B ions	0.43±0.21	2.3±1.1	57±21

UNIwersALNOŚĆ METODY



KOMÓRKI CHO-K1 (CHINESE HAMSTER OVARY CELLS)



- KRÓTKI CYKL KOMÓRKOWY 12-14 h
- ZDOLNOŚCI ADHEZYJNE
- TWORZENIE KOLONII
- 22 CHROMOSOMY

Cell type	Radiation species	LET (keV/μm)	χ^2	RF	RC (%)
CHOK1	⁶⁰ Co γ rays	0.2	0.006±0.0025	160±70	99.0±0.3
	8.09 MeV ¹² C	830	0.44±0.28	2.3±1.4	56±28

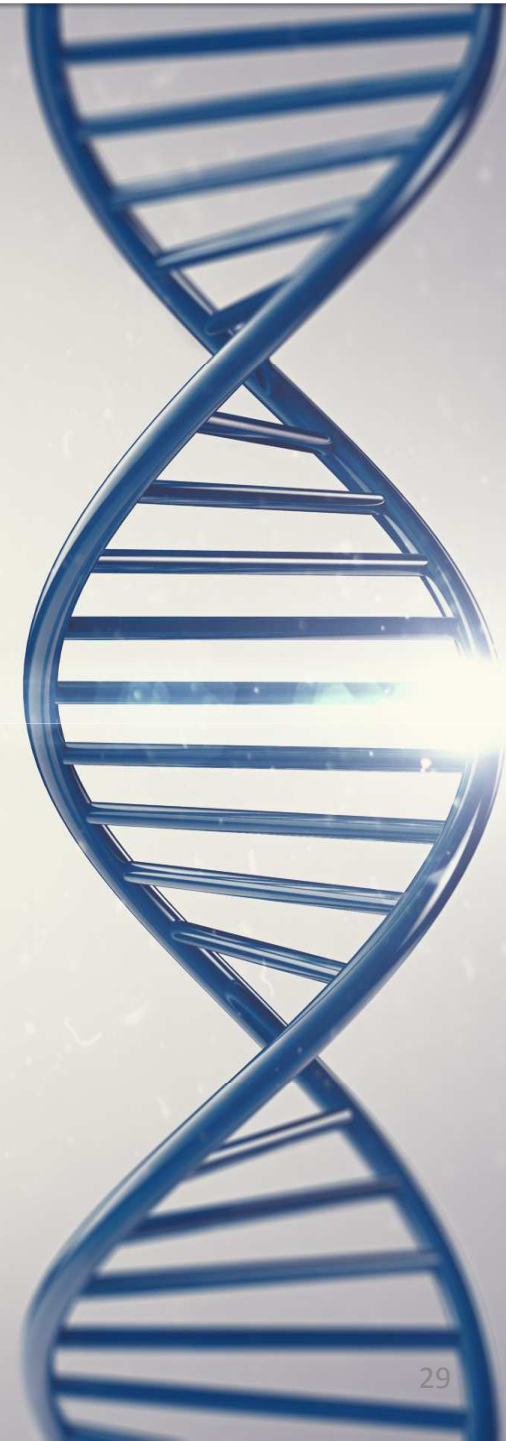
1. MOTYWACJA

2. METODYKA

3. WYNIKI EKSPERYMENTALNE

4. MODELOWANIE TEORETYCZNE

5. PODSUMOWANIE I PERSPEKTYWY

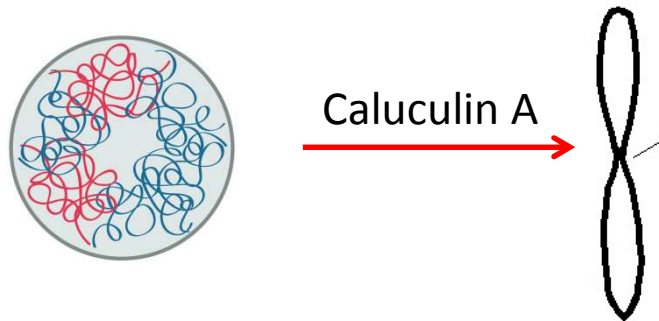
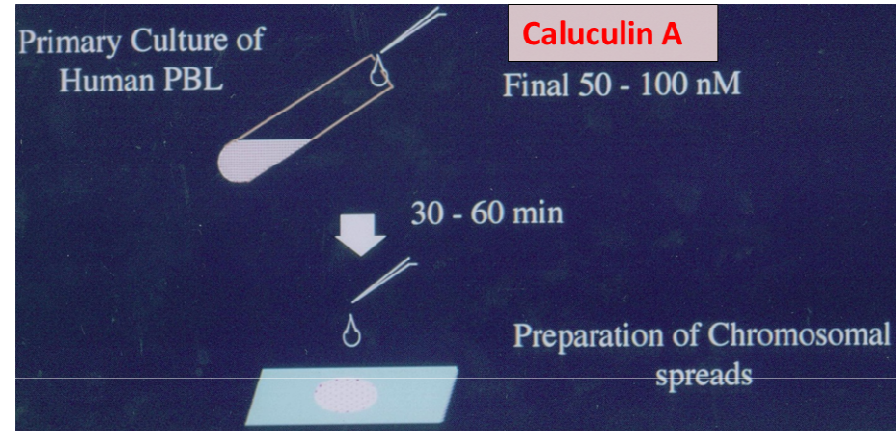
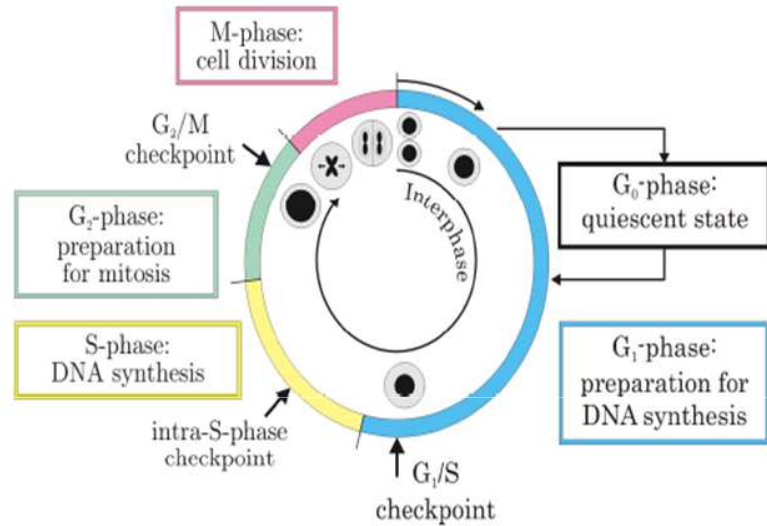


PODSUMOWANIE

- Zaobserwowano:
 - Stałą wartość parametru β modelu liniowo kwadratowego
 - Zależność parametru μ z rozkładu Neymana A (opisującego prawdopodobieństwo powstania aberracji na jedno uderzenie) od dawki
 - Dużą efektywność mechanizmów reperacji i ich dominujący wpływ na zakrzywienie odpowiedzi dawka-efekt
 - $RBE < 1$ dla szybkich protonów
 - Model pokrywających się śladów nie opisuje zależności β/α od LET

- Zaproponowano statystyczną metodę oszacowania mechanizmów reperacji →
faktor Fano dla aberracji chromosomowych

PERSPEKTYWY – PCC (Premature Chromosome Condensation)



γ-rays:
~20 chromatid
breaks/cell/Gy



PLANY NA PRZYSZŁOŚĆ

Badanie oddziaływania neutronów prędkich i termicznych z limfocytami krwi obwodowej

- Eksperymenty w Dubnej – reakcje D-T, neutrony reaktorowe, Cf, Pu-Be, Am-Be
- Eksperymenty w Szczecinie (eLBRUS) – reakcje D-D

Wykorzystanie metody PCC

- Badanie mechanizmów reperacji komórkowej w zależności od czasu po napromienianiu
- Wyznaczenie czynnika Fano w zależności od czasu po napromienianiu
- Badanie rozkładów statystycznych uszkodzeń po napromienianiu neutronami – wyjaśnienie obserwowanych odchyłeń od statystyki Poissona
- Badanie efektów porywania się obszarów oddziaływania pojedynczych neutronów – rozdzielenie efektów fizycznych i biologicznych

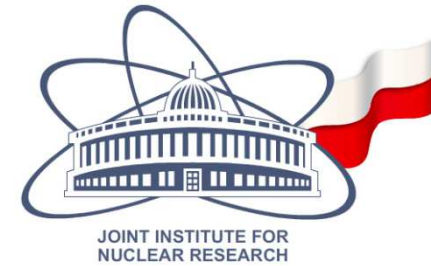
GRUPA BADAWCZA



K. Czerski
W. Pereira
M. Kaczmarek
N. Targosz-Ślęczka



A. Kowalska



E. Nasonova
P. Kutsalo
E. Krasavin

DZIĘKUJĘ ZA UWAGĘ !