



Praca poglądowa/Review paper

Ocena wpływu dawki i mocy promieniowania jonizującego na komórki raka piersi

The assessment of the effect of ionizing radiation dose and dose rate for breast cancer cells

Marika Musielak¹

¹Pracownia Radiobiologii, Wielkopolskie Centrum Onkologii, Poznań, Polska

Streszczenie

Rak piersi jest najczęściej występującym typem nowotworu wśród kobiet. Ze względu na odmienne typy histologiczne guzów, stosuje się różne podejścia terapeutyczne. Najczęściej jest to leczenie skojarzone, obejmujące chirurgiczne usunięcie ogniska nowotworowego, radioterapię oraz leczenie cytostatykami. Jednakże głównym celem każdej stosowanej terapii jest zniszczenie komórek nowotworowych przy odpowiednio niskim uszkodzeniu tkanek zdrowych. Celem pracy była ocena wpływu stosowanych klinicznie schematów napromieniania radioterapeutycznego, za pomocą wiązki promieniowania jonizującego.

Zbadano wpływ wielkości dawki (ang. *Dose*, D) 0 Gy; 1,0 Gy; 2,0 Gy; 4,0 Gy oraz mocy dawki (ang. *Dose Rate*, DR) 300 i 600 cGy/min na komórki raka piersi. W doświadczeniu wykorzystano dwie linie komórkowe raka piersi MDA-MB-231 oraz MDA-MB-468, zaliczające się do typu potrójnie negatywnego (ang. *triple negative breast cancer*, TNBC). Przy pomocy testów klonogennych obliczono frakcję przeżywalności (ang. *surviving fraction*, SF) dla poszczególnych dawek oraz wykreślono krzywe przeżycia będące zależnością SF(D). Wykazano, że wraz ze wzrostem dawki, przeżywalność komórek maleje, zgodnie z założeniami modelu liniowo-kwadratowego. Porównując obydwie linie komórkowe, zaobserwowano różnice w krzywych przeżywalności obejmujących niskie dawki promieniowania. W przypadku MDA-MB-231, w przedziale dawki poniżej 2 Gy, stwierdzono znaczne obniżenie przeżywalności, które sugeruje wystąpienie zjawiska hiperwrażliwości na promieniowanie. Odmienne wyniki zaobserwowano dla linii MDA-MB-468 w zakresie <2 Gy, gdzie współczynnik SF przeżycia przekraczał wartości powyżej 1,0, co może świadczyć o wzmożonej stymulacji proliferacji.

Nie wykazano istotnych różnic w krzywych przeżywalności pomiędzy zastosowaniem dwóch różnych mocy przy tej samej dawce. Poprzez zwiększenie DR, skraca się czas trwania ekspozycji. Śledząc wykreślone zależności SF(D), można jednoznacznie określić, jak dany typ linii nowotworowej odpowiada na traktowanie różnymi schematami promieniowania.

Adres do korespondencji

Marika Musielak

Pracownia Radiobiologii

Wielkopolskie Centrum Onkologii, ul. Garbary 15, 61-866 Poznań, Polska

Telefon. +48 61 88 50 477

e-mail: marikamusielak@gmail.com

Abstract

Breast cancer is the most common type of cancer among women. Due to different histological types of breast cancer, various forms of therapeutic approaches are applied. Most often, it is a combination of different types of treatments that includes surgical removal of cancer, radiotherapy and treatment with cytotoxic drugs. However, the main goal of any treatment is to kill cancer cells with a sufficiently small damage to healthy tissues.

The effect of four doses (D) 0.0 Gy; 1.0 Gy; 2.0 Gy; 4.0 Gy as well as two dose rates (DR) 300 and 600 cGy/min was investigated on two triple negative breast cancer (TNBC) cell lines MDA - MB - 231 and MDA - MB - 468. The essential part of the work was to perform a clonogenic assay, on the basis of which the surviving fraction (SF) for individual doses was calculated and survival curves, which are the function of SF(D), were plotted. After analysis, it was found that with increasing dose, cellular proliferation decreased in line with the linear-quadratic model. Considering both cell lines, differences in the shape of the curves were observed for low radiation doses. In the case of the MDA-MB-231 line, in the range below 2 Gy, there was a significant decrease in survival, which suggests hypersensitivity to radiation. A different situation occurred for MDA-MB-468 in the range of <2 Gy, where an increase in the survival fraction above 1.0 was observed, which may indicate an increased stimulation of proliferation.

There were no major differences between the use of the two different dose rates, thus with increased DR, only the duration of exposure is reduced. By following SF (D) dependency, it is possible to determine unequivocally how different types of cancer lines respond to different radiation patterns.

Słowa kluczowe: moc dawki, rak piersi, radioterapia

Keywords: dose rate, breast cancer, radiotherapy

Wstęp

Według najnowszych danych, 3 najczęściej diagnozowane nowotwory wśród kobiet to raki: piersi, płuca i oskrzeli oraz jelita grubego, które łącznie stanowią połowę wszystkich przypadków w skali światowej. Analizując badania przeprowadzone przez American Cancer Society, rak piersi stanowi 30% wszystkich nowo zdiagnozowanych przypadków raka u kobiet (1). Co więcej, zachorowalność na nowotwór piersi stale wzrasta, a wyniki 5-letnich przeżyć są wciąż niezadowalające (2). Jedną z przyczyn jest zbyt późny czas diagnozowania choroby, wynikający z niskiego odsetka kobiet uczestniczących w badaniach profilaktycznych (3). Ok. 10-15% wszystkich guzów stanowi rak potrójnie negatywny, którego nazwa wiąże się z brakiem ekspresji receptorów estrogenowych, progesteronowych oraz receptora naskórkowego czynnika wzrostu na powierzchni komórek. Z tego względu nowotwory te charakteryzują się wysokim stopniem złośliwości oraz większą skłonnością do tworzenia przerzutów w jamie brzusznej. Co więcej, ma to konsekwencje w postaci ograniczonego działania terapii celowanych, dlatego najczęściej stosowaną metodą leczenia jest leczenie radioterapeutyczne (4). Oszacowano, że ok. 40% pacjentów zdiagnozowanych na raka zostanie skierowanych na radioterapię, a ok. 50% osób cierpiących na nowotwór będzie wymagało tego rodzaju terapii w pewnym momencie ich leczenia (5). Głównym celem radioterapii jest uszkodzenie komórek nowotworowych przy jednoczesnym zachowaniu tkanki zdrowej (6). Wykorzystywane promieniowanie jonizujące oddziałuje na struktury biologiczne znajdujące się w komórce poprzez działanie pośrednie (poprzez radiolizę wody) oraz bezpośrednio. Głównym efektem użytego promieniowania jest wystąpienie letalnych dwuniciowych pęknięć DNA. Ponadto obserwuje się uszkodzenie białek i lipidów. Działanie promieniowania jonizującego wywołuje finalnie tzw. katastrofę mitotyczną, przez co komórka nie jest w stanie ulegać cytokinezie i obumiera (7). W zależności od sposobu dostarczania promieniowania, wyróżniamy różne metody radioterapeutyczne m.in. teleradioterapię (wiązka promieniowania jest dostarczona ze źródła zewnętrznego) oraz brachyterapię (polegającą na umieszczeniu źródła promieniowania w guzie) do leczenia wewnętrznego lub powierzchniowego. Najczęściej stosowaną metodą jest napromienianie pacjenta megawoltowa wiązką fotonową, która stanowi formę wysokoenergetycznego promieniowania elektromagnetycznego generowanego przez akceleratory liniowe (8).

W przypadku promieniowania X lub γ , moc dawki (ang. *Dose Rate*, DR) jest jednym z czynników, które określają biologiczne konsekwencje zaabsorbowanej dawki (ang. *Dose*, D). Mianem mocy dawki określamy ilość promieniowania jonizującego zaabsorbowaną w danej jednostce czasu (9). W radioterapii wykorzystuje się szeroki zakres mocy dawek, od kilku cGy dziennie do setek Gy w ułamku sekundy. Główny efekt tempa absorpcji dawek w leczeniu radioterapeutycznym znajduje się w zakresie od około 0,1 Gy/h do kilku Gy/min (10). DR w radioterapii jest dobrze znanym parametrem i opiera się na prostej zależności: promieniowanie dostarczane przy wyższej wartości mocy jest biologicznie bardziej skuteczne (zabija więcej komórek), niż ta sama dawka dostarczana przy mocy niższej. W miarę zmniejszania się jej wartości i wydłużania czasu ekspozycji, efekt biologiczny, na ogół ulega zmniejszeniu. Klasyczny efekt mocy dawki (ang. *Dose Rate Effect*, DRE), znaczący w radioterapii, wynika z naprawy subletalnego uszkodzenia (ang. *Sublethal Damage Repair*, SLD), które występuje podczas ekspozycji. Wielkość wpływu DR wynikającego z naprawy SLD jest różna w zależności od typu komórek (11). Stosowanie promieniowania o dużej i małej mocy odnosi różne skutki w reakcji zarówno komórek prawidłowych, jak również nowotworowych (12,13).

Badając napromienione komórki eukariotyczne zaobserwowano różne typy uszkodzeń popromiennych m.in. jedno- oraz dwuniciowe pęknięcia DNA, zmiana lub odłączenie zasady bądź reszty cukrowej. Zastosowanie dawki promieniowania fotonowego o wielkości 1 Gy skutkuje powstaniem ok. 1000 pojedynczych pęknięć nici DNA (14). W rezultacie, może dojść zarówno do apoptozy lub nekrozy, jak również genetycznych uszkodzeń, skutkujących śmiercią komórki lub niestabilnością genetyczną. Powyższe konsekwencje wywołane przez bezpośrednią i pośrednią jonizację wynikają z utlenienia (peroksydacji) makrocząsteczek komórki. Należy zauważyć, że wydajność powstawania uszkodzeń w organizmach zależy nie tylko od rodzaju struktury biologicznej, ale również od liniowego transferu energii (ang. *Linear Energy Transfer*, LET), przy jednoczesnym zachowaniu podobnych efektów ilościowych (15). Tempo absorpcji energii, określone jako liniowy transfer energii, jest definiowane jako średnia energia lokalnie przekazywana do absorbującego ośrodka przez elektron, podczas przechodzenia przez jednostkę odległości w tym ośrodku (16). Potencjalnie, wszystkie te czynniki obejmujące DRE mogą mieć decydujący wpływ na skuteczność leczenia radioterapeutycznego, jak i na intensywność efektów ubocznych zarówno w tkankach nowotworowych objętych polem napromieniowania, jak i okolicznych tkankach zdrowych znajdujących się w polu dawki. Jednym z powszechnie używanych testów do oceny efektu promieniowania jonizującego jest test klonogeny. Umożliwia ocenę różnic w żywotności reprodukcyjnej (klonogenność; zdolność pojedynczej komórki do tworzenia kolonii składającej się z min. 50 klonów) pomiędzy komórkami kontrolnymi, a komórkami poddanymi działaniu czynników fizycznych i chemicznych tj. ekspozycja na promieniowanie jonizujące czy cytostatyków. Test stał się powszechnie akceptowaną techniką w radiobiologii oraz toksykologii. (17).

Cel pracy

Celem ogólnym pracy była ocena wpływu zmiany mocy dawki promieniowania jonizującego na przeżywalność (ang. *surviving fraction*, SF) linii komórkowych potrójnie negatywnego raka piersi MDA – MB – 231 i MDA – MB – 468. Cele szczegółowe obejmowały:

1. Ocenę wpływu określonych dawek promieniowania jonizującego na komórki obu linii
2. Analizę różnic w przebiegu krzywych przeżywalności przy DR: 300 cGy/min i DR: 600 cGy/min

Materiał i metody

• Hodowla komórkowa

Wykorzystane w doświadczeniach linie komórkowe utrzymywane były w warunkach standardowych, tj. w temperaturze 37°C, w atmosferze wzbogaconej 5% CO₂ przy zachowanej wilgotności wynoszącej około 95%. W doświadczeniu wykorzystano linie komórkowe MDA – MB – 231 oraz MDA – MB – 468, wyizolowane w latach 70', z wysięku opłucnowego 51-letnich kobiet, odpowiednio: rasy Kaukaskiej oraz Afroamerykańskiej, z przerzutowym gruczolakorakiem piersi. Obie linie są adherentne, charakteryzując się morfologią nabłonkową [7-9]. Podstawowym medium hodowlanym była pożywka Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Biowest, Francja) suplementowana 10% płodową surowicą bydlęcą (ang. *Fetal*

bovine serum, FBS) (Biowest, Francja) i 1% roztworu penicyliny/streptomycyny (P/S) (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA, Stany Zjednoczone). Po osiągnięciu 90% konfluencji, komórki pasażowano (średnio co 2-3 dni). Po zebraniu medium i odplukaniu pozostałości pożywki, buforem fosforanowym PBS (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA, Stany Zjednoczone) pasaż wykonywano z wykorzystaniem 1x stężonej trypsyny (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA, Stany Zjednoczone).

• Plan napromieniania

Schematy napromieniania zostały przygotowane w oparciu o standardowy system do planowania leczenia Varian Eclipse (Varian Medical Systmes Inc, Stany Zjednoczone, CA), dzięki uprzejmości dr Eweliny Konstany, kierownik Pracowni Dozymetrii Klinicznej w Wielkopolskim Centrum Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie w Poznaniu. Komórki napromieniono w fantomie wodnym za pomocą akceleratora Varian UNIQUE (Wielkopolskie Centrum Onkologii, Poznań) (Varian Medical Systmes Inc, Stany Zjednoczone, CA). Fantom wodny jest urządzeniem wykorzystywanym podczas pomiarów dozymetrycznych, składa się z pleksiglasowego pojemnika wypełnionego wodą, ze względu na parametry fizyko – chemiczne, odpowiadające tkance miękkiej.

• Napromienianie komórek raka piersi

Po trypsynizacji komórki zostały wysiane na 10 butelek hodowlanych bez wentylacji, o powierzchni 25 cm². Po 24 godzinach butelki uzupełniono buforem fosforanowym w celu usunięcia pęcherzyków powietrza i zapewnienia jednorodnego rozkładu dawki. Następnie, butelki w fantomie napromieniano odpowiednio dawkami: 1 Gy, 2 Gy, 4 Gy, (0 Gy – komórki kontrolne), wykorzystując moce: 300 cGy/min i 600 cGy/min dla każdej podanej dawki promieniowania.

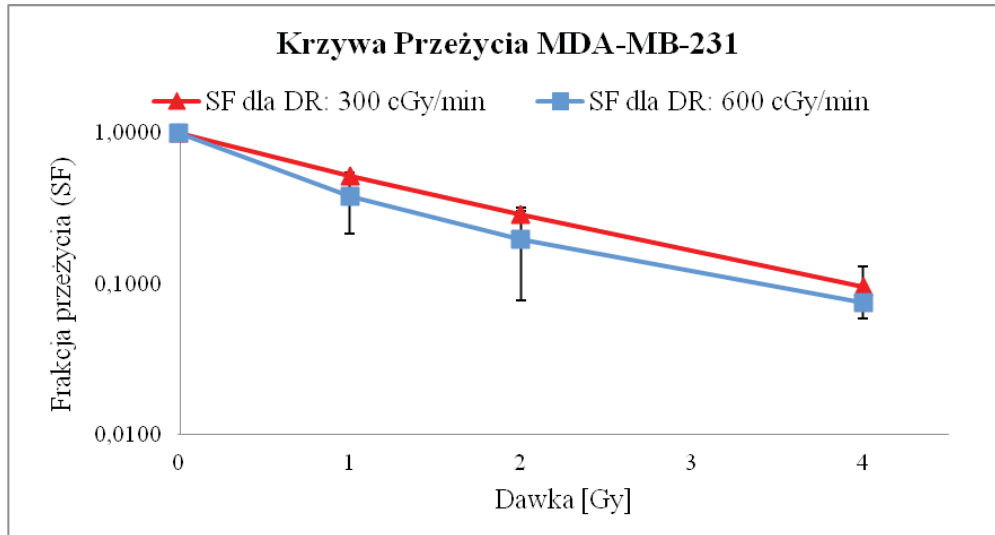
Po wykonanym napromienianiu, komórki poddano trypsynizacji po uprzednim usunięciu pożywki i PBS. Następnie wprowadzono 10 ml świeżego medium do każdej butelki i przepłukano. Do przygotowanych probówek wiano zawiesinę komórkową, odpowiednio z napromieniowanymi komórkami o danej dawce i mocy. Za pomocą licznika komórek Moxi Z (Orflo Technologies, Stany Zjednoczone, ID), została wyznaczona liczba komórek na 1ml pożywki hodowlanej. Następnie komórki zostały wysiane w odpowiednich liczbach dla danej dawki.

• Zamknięcie i analiza testu klonogenego

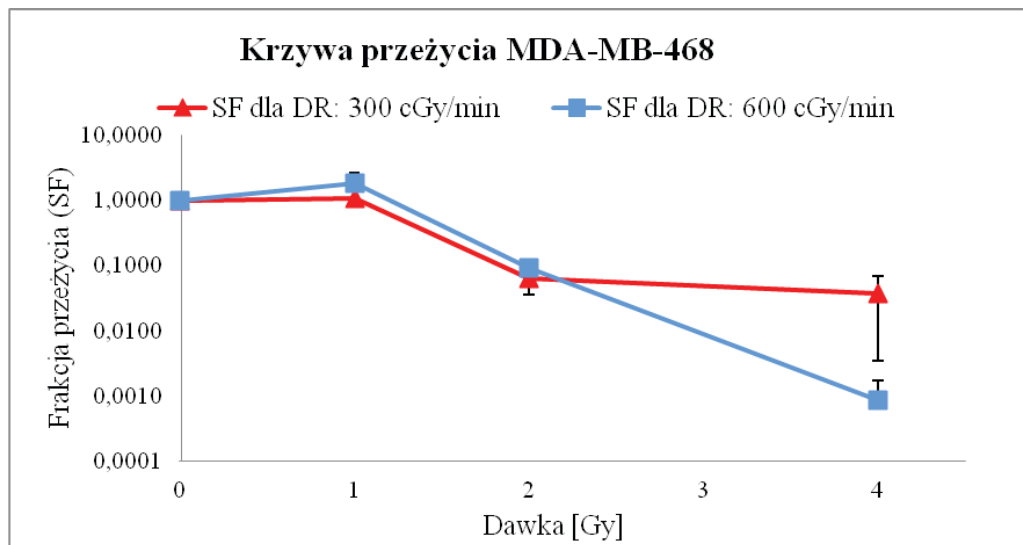
Po 14 dniach hodowli zakończono testy klonogenne. Za moment świadczący o zakończeniu testu przyjęto czas w którym kolonia komórek kontrolnych złożona jest z co najmniej 50 komórek. Następnie pożywka została usunięta, dołek płytki 6-dolkowej przepłukano PBS. Komórki zostały utrwalone z wykorzystaniem skażonego alkoholu. W celu wybarwienia powstałych kolonii, komórki zostały potraktowane 1% roztworem błękitu kumassi. Po 10 minutach inkubacji barwnik aspirowano, odplukano pozostały nadmiar i przeprowadzono odczyt. Płytki zostały sfotografowane za pomocą systemu ChemiDoc Touch Bio–Rad. Automatyczne zliczenie kolonii zostało wykonane za pomocą programu Gene Tools Syngene. Po zliczeniu kolonii, obliczono wydajności posiewu (ang. *plating efficiency*, PE), wyrażające stosunek zliczonych kolonii do liczby posianych komórek. Na podstawie wartości PE komórek napromienianych i PE komórek kontrolnych, obliczono frakcję komórek, które przeżyły (ang. *surviving fraction*, SF) dla każdej dawki i mocy (11,21).

Wyniki

W oparciu o wyniki eksperymentu wygenerowano krzywe przeżycia linii MDA–MB–231 (ryc. 1) oraz MDA–MB–468 (ryc. 2) dla zastosowanych DR w celu porównania przebiegu krzywych. Przeprowadzone badania wykazały spadek przeżycia komórek raka piersi w funkcji wzrostu dawki promieniowania jonizującego zgodnie z przebiegiem krzywej w modelu liniowo-kwadratowym. Jednakże, dla linii MDA – MB – 468 zaobserwowano początkowy wzrost przeżywalności, po którym nastąpił jej spadek oraz znaczącą różnicę w zastosowaniu dawki 4 Gy, gdzie DR: 600 cGy/min skutkowało obniżoną proliferacją w stosunku do mocy dwa razy mniejszej.



Rycina 1. Krzywa przeżycia linii MDA – MB – 231 dla zadanych dawek 1,0 Gy; 2,0 Gy; 4,0 Gy. DR: 300 cGy/min (kolor czerwony), DR: 600 cGy/min (kolor niebieski).



Rycina 2. Krzywa przeżycia linii MDA – MB – 468 dla zadanych dawek 1,0 Gy; 2,0 Gy; 4,0 Gy. DR: 300 cGy/min (kolor czerwony), DR: 600 cGy/min (kolor niebieski).

Dyskusja

Radioterapia szybko ewoluuje w kierunku dostarczania promieniowania z użyciem wyższych DR w celu poprawy leczenia onkologicznego. Znajomość efektów biologicznych w zależności od stosowanych schematów promieniowania ma na celu poszerzenie możliwości terapeutycznych w radioterapii, jednocześnie przyczyniając się do ograniczenia powikłań popromiennych. Wpływ promieniowania jonizującego na komórki koreluje w znacznym stopniu z mocą zastosowanej dawki (22).

Wykorzystany w tej pracy test klonogeny jest dobrze znanym i powszechnie stosowanym testem do oceny radiowrażliwości komórek nowotworowych po ekspozycji na promieniowanie jonizujące (23). Zastosowaną metodą ilościowego opisu odpowiedzi na promieniowanie jonizujące jest model liniowo-kwadratowy (ang. *Linear-quadratic model*, LQ) (19), gdzie zależność między przeżywalnością a dawką promieniowania wyrażana jest za pomocą wielomianu drugiego stopnia. Stosunek oszacowanych parametrów, odpowiednio, dla składowej liniowej i kwadratowej, reprezentuje dawkę przy której oba parametry mają tę samą wagę

przy analizie klonogenego przeżycia. Stosunek ten jest znany jako stosunek α/β (24,25). Opisanie frakcji przeżywalności komórek klonogennych (SF) w zależności od dawki promieniowania jonizującego jest kluczowym zagadnieniem radiobiologii. Najczęściej wykorzystywanym do tego sposobem jest, wyżej wspomniany, model liniowo-kwadratowy, oparty na 3 założeniach. Pojedyncze trafienie może wywołać dwuniciowe pęknięcie DNA, w wyniku czego może dojść do letalnej zmiany w genotypie komórki, a w konsekwencji doprowadzić do utraty klonogenności. Prawdopodobieństwo takiego zdarzenia zależy liniowo od składowej dawki (parametr α). Zmiany mogą również powstać na skutek błędnej naprawy położonych blisko siebie dwuniciowych pęknięć DNA, które powstały w wyniku dwóch niezależnych trafień. Przyjmuje się, że liczba tego typu zmian jest wprost proporcjonalna do kwadratu dawki (parametr β). Liczba zmian przypadających na pojedynczą komórkę ma w całej populacji rozkład Poissona. W przypadku modelu LQ, teorie molekularne leżących u podstaw mechanizmów biologicznych zostały zdefiniowane w latach 70. XX wieku i zostały później udoskonalone (18). W ostatnich latach, dzięki szerszemu zastosowaniu modelu liniowo – kwadratowego efekt mocy dawki został przeanalizowany, z uwzględnieniem aspektów biofizycznych, w konsekwencji zaliczając go do parametrów, które mogą mieć największy wpływ na odpowiedź biologiczną (19). Ma on zasadnicze znaczenie dla metodologii LQ, będąc parametrem, który dla danej tkanki określa wrażliwość na promieniowanie. Znajomość i wykorzystanie tych współczynników jest kluczowe podczas prób definiowania nowych, lepszych metod dostarczania promieniowania (14). U obu linii spadek przeżywalności dla zastosowanego zakresu dawek, jest bardzo łagodny, co może świadczyć o niskiej wartości współczynnika α/β . Uzyskane wyniki potwierdzają dane literaturowe (9).

Zgodnie z oczekiwaniami (26) zwiększenie dawki promieniowania znacząco wpłynęło na proliferację linii komórkowych raka piersi prowadząc do zmniejszenia frakcji przeżywającej. Wraz ze zwiększającą się wartością dawki, komórkowa proliferacja malała, natomiast nie wykazano większych różnic w przebiegu krzywych dla dwóch różnych mocy dawek. Uważa się, że w radioterapii klinicznej nie obserwuje się wpływu mocy dawki promieniowania w zakresie stosowanym w konwencjonalnej terapii wiązką promieniowania uzyskiwaną ze źródeł kobaltowych ^{60}Co czy liniowych akceleratorów. Takie przekonanie okazuje się uzasadnione dla mocy w zakresie 1–10 Gy/min (27). Klasyczna radioterapia wykorzystuje promieniowanie jonizujące obejmujące dawki o dużym DR, tj. od ok. 1 do kilku Gy/min (10).

W przebiegu uzyskanych krzywych zauważalne są znaczne różnice w zakresie niskich dawek. W przypadku linii MDA – MB – 468 interesujący jest wzrost SF powyżej wartości 1,0. Można przypuszczać, że mniejsze wartości dawki dla tej linii powodują stymulację proliferacji, jako odpowiedź na czynnik niszczący. Zalecane jest powtórzenie eksperymentu dla większej liczby dawek poniżej 1 Gy, w celu potwierdzenia tej hipotezy. Tego typu stymulacja została określona jako hormeza radiacyjna (28). Termin ten obejmuje stymulację każdego układu na ekspozycję niskich dawek dowolnego czynnika (29). Liang et al. analizowali i porównywali wpływ LDR na komórki nowotworowe i prawidłowe (30). Fakt, że niska dawka może wywoływać hormezę w zdrowych komórkach może stanowić nowe podejście do zapewnienia pacjentom ekspozycji na LDR przed właściwą radioterapią. Ma to na celu zmniejszenie stopnia uszkodzenia wywołanego przez radioterapię normalnych tkanek, bez osłabienia działania terapeutycznego na komórki nowotworowe.

Analizując krzywą linii MDA – MB – 231 w tym samym zakresie dawek, zauważalny jest znaczny spadek wartości SF. By zweryfikować to założenie również wskazane byłoby powtórzenie eksperymentu przy wykorzystaniu większej liczby niskich dawek poniżej 1,0 Gy. Obniżenie przeżywalności w obszarze niskich dawek określane jest jako hiperwrażliwość na promieniowanie jonizujące (ang. *hyper-radiosensitivity*, HRS) (11). Zjawisko to, zostało wcześniej opisane w badaniach Mitchella i Bedforda (31); wykazali oni niewielką inwersję, którą przypisano niższej mocy dawki, z powodu akumulacji komórek w fazie G2, która jest radiowrażliwą fazą cyklu komórkowego. Linie komórkowe przejawiające radiowrażliwość cechują się mniejszą proliferacją po ekspozycji na niskie dawki, co jest prawdopodobnie wywołane mało wydajnym radioochronnym mechanizmem naprawczym lub tylko częściowo wykorzystaną zdolnością naprawczą (31).

Ocena radiobiologicznej odpowiedzi komórek na promieniowanie jonizujące może być pomocna przy rozróżnieniu populacji odpowiadających na zastosowaną radioterapię lub wykształcenie oporności. Ilościowe wartości odzwierciedlające przeżywalność klonogenną, w całym analizowanym zakresie dawek, mogą nieść ważne informacyjne dla analiz korelacji profilowania z zestawami danych ekspresji genów i innych zmiennych (32,33). Grupa Oktaria (35) przeprowadziła eksperymenty *in vitro* w celu zbadania odpowiedzi

linii komórkowych raka piersi (MCF-7) i glejaka złośliwego (9L), wystawionych na promieniowanie jonizujące 10 MV. Do analizy wykreślono krzywe przeżycia w celu określenia wartości α i β , mając na celu ocenę radiowrażliwości. Wykorzystano dawki w zakresie do 8 Gy stosując wybrane wartości DR: 50 cGy/min i 5 Gy/min. Zmniejszenie mocy dawki nie miało wpływu na krzywą przeżywalności komórek linii 9L, natomiast zaobserwowano obniżenie proliferacji w przypadku MCF-7 wraz ze zmniejszeniem wartości DR. Uzyskane dane podkreślają znaczenie uwzględnienia parametrów nie tylko fizycznych, ale także radiobiologicznych, przy planowaniu konkretnego leczenia nowotworu. Inna grupa (36) zastosowała akcelerator liniowy Varian Trilogy TX do napromieniania, a w rezultacie, bezpośredniego porównania efektu trzech różnych mocy dawki (5,01; 9,99 i 29,91 Gy/min, z chwilową dawką w impulsie 56,5; 112,8 i 338 Gy/s) na przetrwanie klonogenne. Komórki prawidłowe płuca (V79) oraz płaskonabłonkowego nowotworu gardła (FaDu) napromieniano dawkami w zakresie od 1 do 10 Gy w celu uzyskania krzywych przeżywalności w odpowiedzi na dawkę. W przypadku obu linii komórkowych również nie zaobserwowano żadnych różnic wpływu zmiany DR na przeżycie komórek. W niektórych liniach komórkowych dopuszcza się obniżanie DR, aby kontynuując cykl, doprowadzić do akumulacji w G₂, w celu wywołania odwrotnego efektu mocy (IDRE, ang. *inverse dose rate effect*). Stosowany IDRE powoduje, że krzywa przeżywalności staje się bardziej stroma, przedstawiając mniejsze przeżycie komórkowe. W ostatnich dziesięcioleciach odnotowano zwiększoną indukcję mutacji lub aberracji chromosomowych (37,38) co znacznie wpływa na zjawisko IDRE. Chociaż zakłada się udział sygnalizacji komórkowej w IDRE, mechanizm ten pozostaje niejasny. Ponowna ocena DRE na przeżywalność komórek, w tym IDRE, jest kluczową kwestią z punktu widzenia radioterapii i ochrony radiologicznej (39).

Zmniejszenie wartości mocy dawki przy napromienianiu linii nowotworowej pobranej z szyjki macicy (HeLa) (40) z 1,54 do 0,37 Gy/h zwiększyło skuteczność radioterapii, tak że efekt końcowy LDR jest porównywalny z zastosowaniem silnej ekspozycji. Przy DR: 1,54 Gy/h komórki są blokowane w różnych fazach cyklu i nie proliferują. Natomiast, wraz ze spadkiem mocy do DR: 0,37 Gy/h, komórki przechodzą do bloku w G₂, czyli radiowrażliwej fazy cyklu. W tej fazie znaczące są dwa punkty kontrolne (41). Pierwszy, określany „sinclair” indukowany przez niskie dawki (<0,3 Gy), zatrzymuje w fazie G₂ kontynuację cyklu komórek uszkodzonych w fazie G₁ lub S. Drugi punkt kontrolny fazy G₂, „wczesny”, niewrażliwy na stosowanie dawek w zakresie 1–10 Gy, wywołany przez białko ATM, powoduje blok dalszej progresji komórek w fazie G₂ (42,43). Przypuszcza się, że HRS może być rezultatem efektu sąsiedztwa (bystander effect), a podwyższona wrażliwość, wynikając z genetycznej charakterystyki, może prawdopodobnie umożliwiać wystąpienie podobnych efektów w tkankach nienapromieniowanych (44). W praktyce, biorąc pod uwagę teleradioterapię, napromienianie niskimi dawkami o małej mocy, wydaje się być szczególnie trudne do zrealizowania ze względu na dyskomfort pacjenta poddawanego kilkugodzinnej sesji napromieniania koniecznej do dostarczenia dawki frakcyjnej 2 Gy lub wyższej (45).

Wnioski

1. Na podstawie przeprowadzonego eksperymentu można stwierdzić, że wzrost dawki spowodował śmierć komórek raka piersi zgodny z modelem liniowo – kwadratowym w przypadku obu linii komórek nowotworowych sutka, przedstawiając obniżenie proliferacji wraz z rosnącą wartością dawki promieniowania jonizującego. Linia MDA–MB–468 przy bardzo niskich dawkach (poniżej 1 Gy) prawdopodobnie wykazuje stymulację proliferacji, natomiast w przypadku MDA – MB – 231 przypuszcza się hiperwrażliwość w tym samym zakresie. Fakt, że niskie dawki promieniowania jonizującego powodują znaczne obniżenie zdolności klonogennych komórek nowotworowych pozwala wnioskować, że ich stosowanie będzie skutkowało efektywniejszym leczeniem terapeutycznym.
2. Porównując krzywe przeżycia przy zastosowaniu różnych mocy promieniowania, 300 cGy/min i 600 cGy/min, nie można wykazać różnic w ich przebiegu, pozwala to wnioskować, że użyty zakres DR jest zbyt wysoki by zaobserwować zmiany przeżywalności komórek.

Konflikt interesu/ Conflict of interest

Nie występuje / None

Piśmiennictwo / References

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin.* 2017 Jan;67(1):7–30.
- [2] Boyle P, Levin B, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, editors. *World cancer report 2008.* Lyon : Geneva: International Agency for Research on Cancer ; Distributed by WHO Press; 2008. 510 p.
- [3] Kelsey JL, Bernstein L. Epidemiology and Prevention of Breast Cancer. *Annu Rev Public Health.* 1996 Jan 1;17(1):47–67.
- [4] Chavez KJ, Garimella SV, Lipkowitz S. Triple negative breast cancer cell lines: One tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. Eng-Wong J, Zujewski JA, editors. *Breast Dis.* 2011 Mar 15;32(1–2):35–48.
- [5] Atun R, Jaffray DA, Barton MB, Bray F, Baumann M, Vikram B, et al. Expanding global access to radiotherapy. *Lancet Oncol.* 2015 Sep;16(10):1153–86.
- [6] Baskar R, Lee KA, Yeo R, Yeoh K-W. Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. *Int J Med Sci.* 2012;9(3):193–9.
- [7] Nickoloff JA, Hoekstra MF, editors. *DNA Damage and Repair [Internet].* Totowa, NJ: Humana Press; 1998 [cited 2018 Oct 8]. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-59259-455-9>
- [8] Thompson MK, Poortmans P, Chalmers AJ, Faivre-Finn C, Hall E, Huddart RA, et al. Practice-changing radiation therapy trials for the treatment of cancer: where are we 150 years after the birth of Marie Curie? *Br J Cancer.* 2018 Aug;119(4):389–407.
- [9] Malicki J, Ślosarek K, Via Medica. *Planowanie leczenia i dozymetria w radioterapii.* T. 1 T. 1. Gdańsk: Via Medica; 2016.
- [10] Hall EJ, Brenner DJ. The dose-rate effect revisited: radiobiological considerations of importance in radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1991 Nov;21(6):1403–14.
- [11] Van Der Kogel A, Jioner M, EBSCO Publishing. *Basic clinical radiobiology.* London: Hodder; 2009.
- [12] Steel GG. The ESTRO Breur lecture. Cellular sensitivity to low dose-rate irradiation focuses the problem of tumour radioresistance. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol.* 1991 Feb;20(2):71–83.
- [13] Wan XS, Bloch P, Ware JH, Zhou Z, Donahue JJ, Guan J, et al. Detection of oxidative stress induced by low- and high-linear energy transfer radiation in cultured human epithelial cells. *Radiat Res.* 2005 Apr;163(4):364–8.
- [14] Gasińska A. *Biologiczne podstawy radioterapii: skrypt dla studentów fizyki medycznej oraz lekarzy specjalizujących się w zakresie radioterapii.* Kraków: Akademia Górniczo-Hutnicza im. St. Staszica. Ośrodek Edukacji Niestacjonarnej; 2001.
- [15] Limoli CL, Ponnaiya B, Corcoran JJ, Giedzinski E, Kaplan MI, Hartmann A, et al. Genomic instability induced by high and low let ionizing radiation. *Adv Space Res.* 2000 Jan;25(10):2107–17.
- [16] Podgoršak EB, International Atomic Energy Agency, editors. *Radiation oncology physics: a handbook for teachers and students.* Vienna: International Atomic Energy Agency; 2005. 657 p.
- [17] Rafahi H, Orlowski C, Georgiadis GT, Ververis K, El-Osta A, Karagiannis TC. Clonogenic Assay: Adherent Cells. *J Vis Exp [Internet].* 2011 Mar 13 [cited 2018 Sep 11];(49). Available from: <http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=2573>
- [18] Chadwick KH, Leenhouts HP. A molecular theory of cell survival. *Phys Med Biol.* 1973 Jan;18(1):78–87.
- [19] Dale RG. Dose-rate effects in targeted radiotherapy. *Phys Med Biol.* 1996 Oct;41(10):1871–84.
- [20] de Ruijter TC, Veeck J, de Hoon JPJ, van Engeland M, Tjan-Heijnen VC. Characteristics of triple-negative breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2011 Feb;137(2):183–92.
- [21] Hall EJ, Giaccia AJ. *Radiobiology for the Radiologist.* [Internet]. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2014 [cited 2018 Sep 10]. Available from: <http://public.eblib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=3418470>
- [22] Matsuya Y, Tsutsumi K, Sasaki K, Date H. Evaluation of the cell survival curve under radiation exposure based on the kinetics of lesions in relation to dose-delivery time. *J Radiat Res (Tokyo).* 2015 Jan 1;56(1):90–9.
- [23] Saunders MI. Predictive testing of radiosensitivity in non-small cell carcinoma of the lung. *Lung Cancer Amst Neth.* 1994 Mar;10 Suppl 1:S83–90.
- [24] Franken NAP, Oei AL, Kok HP, Rodermond HM, Sminia P, Crezee J, et al. Cell survival and

- radiosensitisation: Modulation of the linear and quadratic parameters of the LQ model. *Int J Oncol.* 2013 May;42(5):1501–15.
- [25] Unkel S, Belka C, Lauber K. On the analysis of clonogenic survival data: Statistical alternatives to the linear-quadratic model. *Radiat Oncol [Internet]*. 2016 Dec [cited 2018 Oct 7];11(1). Available from: <http://www.ro-journal.com/content/11/1/11>
- [26] Buch K, Peters T, Nawroth T, Sanger M, Schmidberger H, Langguth P. Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT Assay--a comparative study. *Radiat Oncol Lond Engl.* 2012 Jan 3;7:1.
- [27] Hall EJ. Radiation dose-rate: a factor of importance in radiobiology and radiotherapy. *Br J Radiol.* 1972 Feb;45(530):81–97.
- [28] Calabrese EJ, Baldwin LA. Defining hormesis. *Hum Exp Toxicol.* 2002 Feb;21(2):91–7.
- [29] Luckey TD. Radiation Hormesis: The Good, the Bad, and the Ugly. *Dose-Response.* 2006 Jul;4(3):dose-response.0.
- [30] Liang X, Gu J, Yu D, Wang G, Zhou L, Zhang X, et al. Low-Dose Radiation Induces Cell Proliferation in Human Embryonic Lung Fibroblasts but not in Lung Cancer Cells: Importance of ERK1/2 and AKT Signaling Pathways. *Dose-Response.* 2016 Feb 26;14(1):155932581562217.
- [31] Guirado D, Aranda M, Ortiz M, Mesa JA, Zamora LI, Amaya E, et al. Low-dose radiation hyper-radiosensitivity in multicellular tumour spheroids. *Br J Radiol.* 2012 Oct;85(1018):1398–406.
- [32] Everitt B, editor. *Cluster analysis.* 5th ed. Chichester, West Sussex, U.K: Wiley; 2011. 330 p. (Wiley series in probability and statistics).
- [33] Jolliffe IT. *Principal component analysis.* 2nd ed. New York: Springer; 2002. 487 p. (Springer series in statistics).
- [34] Matsuya Y, McMahon SJ, Tsutsumi K, Sasaki K, Okuyama G, Yoshii Y, et al. Investigation of dose-rate effects and cell-cycle distribution under protracted exposure to ionizing radiation for various dose-rates. *Sci Rep [Internet]*. 2018 Dec [cited 2018 Oct 7];8(1). Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-018-26556-5>
- [35] Oktaria S, Lerch MLF, Rosenfeld AB, Tehei M, Corde S. In vitro investigation of the dose-rate effect on the biological effectiveness of megavoltage X-ray radiation doses. *Appl Radiat Isot.* 2017 Oct;128:114–9.
- [36] Sørensen BS, Vestergaard A, Overgaard J, Præstegaard LH. Dependence of cell survival on instantaneous dose rate of a linear accelerator. *Radiother Oncol.* 2011 Oct;101(1):223–5.
- [37] Amundson SA. Inverse dose-rate effect for mutation induction by gamma-rays in human lymphoblasts. *Int J Radiat Biol.* 1996 Jan;69(5):555–63.
- [38] Stevens DL, Bradley S, Goodhead DT, Hill MA. The Influence of Dose Rate on the Induction of Chromosome Aberrations and Gene Mutation after Exposure of Plateau Phase V79-4 Cells with High-LET Alpha Particles. *Radiat Res.* 2014 Sep;182(3):331–7.
- [39] Rühm W, Azizova TV, Bouffler SD, Little MP, Shore RE, Walsh L, et al. Dose-rate effects in radiation biology and radiation protection. *Ann ICRP.* 2016 Jun;45(1_suppl):262–79.
- [40] Bedford JS, Mitchell JB. Dose-rate effects in synchronous mammalian cells in culture. *Radiat Res.* 1973 May;54(2):316–27.
- [41] Xu B, Kim S-T, Lim D-S, Kastan MB. Two Molecularly Distinct G₂/M Checkpoints Are Induced by Ionizing Irradiation. *Mol Cell Biol.* 2002 Feb 15;22(4):1049–59.
- [42] Vilenchik MM, Knudson AG. Radiation dose-rate effects, endogenous DNA damage, and signaling resonance. *Proc Natl Acad Sci.* 2006 Nov 21;103(47):17874–9.
- [43] Krempler A, Deckbar D, Jeggo PA, Lohrich M. An Imperfect G₂ M Checkpoint Contributes to Chromosome Instability Following Irradiation of S and G₂ Phase Cells. *Cell Cycle.* 2007 Jul 15;6(14):1682–6.
- [44] Marín A, Martín M, Liñán O, Alvarenga F, López M, Fernández L, et al. Bystander effects and radiotherapy. *Rep Pract Oncol Radiother.* 2015 Jan;20(1):12–21.
- [45] Pierquin B, Calitchi E, Mazon JJ, Le Bourgeois JP, Leung S. A comparison between low dose rate radiotherapy and conventionally fractionated irradiation in moderately extensive cancers of the oropharynx. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1985 Mar;11(3):431–9.