

Analiza przeżywalności komórek glejaka mózgu M059K pod wpływem promieniowania β .

Gabriela Górską, Emilia Burmer, Lena Wosik, Mateusz Jakielaszek

31 sierpnia 2026

1 Wprowadzenie

Promieniowanie jonizujące znajduje szerokie zastosowanie w medycynie, między innymi w diagnostyce obrazowej oraz radioterapii. Skuteczność leczenia zależy od odpowiedzi komórek na zdeponowaną dawkę promieniowania, dlatego istotnym zagadnieniem radiobiologii jest badanie przeżywalności komórek po napromienieniu. Jedną z najczęściej stosowanych metod oceny promieniowrażliwości jest test klonogeny, pozwalający określić zdolność pojedynczych komórek do dalszego wzrostu i tworzenia kolonii po ekspozycji na promieniowanie.

Celem niniejszego doświadczenia była analiza wpływu promieniowania β na przeżywalność komórek glejaka linii M059K. W tym celu wyznaczono wydajność tworzenia kolonii oraz frakcję przeżywających komórek dla różnych dawek promieniowania, a następnie sporządzono krzywą przeżywalności.

2 Wstęp teoretyczny

Promieniowanie jonizujące jest zdolne do przekazywania energii atomom i cząsteczkom, prowadząc do ich wzbudzenia. W tkankach biologicznych skutkuje to powstawaniem wolnych rodników oraz bezpośrednimi, jedno- lub podwójnoniciowymi, uszkodzeniami DNA. Pęknięcia podwójnoniciowe łańcucha DNA są najbardziej niebezpieczne, ponieważ najczęściej prowadzą bezpośrednio do śmierci komórki. W przypadku promieniowania o niskim współczynniku liniowego przekazywania energii (LET), takiego jak wiązka elektronów wykorzystana w niniejszym doświadczeniu, zachodzą uszkodzenia bezpośrednie (elektron trafiający w łańcuch DNA), ale również pośrednie wywołane radiolizą wody i powstawaniu reaktywnych form tlenu, które następnie reagują z materiałem genetycznym oraz innymi strukturami znajdującymi się wewnątrz komórki.

W badaniach została wykorzystana linia komórkowa M059K, wyprowadzona z ludzkiego glejaka (*glioblastoma*). Linia ta jest powszechnie wykorzystywana w badaniach radiobiologicznych jako model nowotworu o zachowanej zdolności do naprawy uszkodzeń DNA. Z tego względu stanowi wartościowy model do badań wpływu promieniowania na przeżywalność komórek nowotworowych oraz skuteczność mechanizmów naprawczych.

Zdolność komórek do naprawy uszkodzeń DNA jest jednym z głównych czynników determinujących ich odpowiedź na promieniowanie jonizujące. Skutki oddziaływania promieniowania zależą od zdeponowanej dawki oraz zdolności komórek do naprawy powstałych uszkodzeń. Jeżeli mechanizmy naprawcze okażą się niewystarczające lub naprawa przebiegnie nieprawidłowo, komórka traci zdolność do dalszych podziałów lub ulega śmierci. Z tego względu analiza przeżywalności komórek stanowi jedną z podstawowych metod oceny biologicznych efektów promieniowania.

Do ilościowej oceny promieniowrażliwości komórek stosuje się test klonogeny, który pozwala określić zdolność pojedynczej komórki do utworzenia kolonii po napromienieniu. Za komórkę przeżywającą uznaje się taką, która zachowała możliwości do proliferacji i utworzyła kolonię liczącą nie mniej niż 50 komórek. Wyniki testu przedstawia się w postaci krzywej przeżywalności, opisującej zależność pomiędzy zastosowaną dawką promieniowania a frakcją komórek zachowujących zdolność do tworzenia kolonii. Im bardziej stromy przebieg krzywej, tym większy spadek przeżywalności komórek wraz ze wzrostem dawki [1].

Podstawowym parametrem wykorzystywanym w analizie wyników jest wydajność tworzenia kolonii *PE* (Plating Efficiency), określającą stosunek liczby utworzonych kolonii do liczby wysianych komórek dla próbki kontrolnej:

$$PE = \frac{N_{\text{kolonii}}}{N_{\text{wysianych}}}, \quad (1)$$

gdzie N_{kolonii} to liczba zliczonych kolonii, natomiast $N_{\text{wysianych}}$ to liczba wysianych komórek.

Na podstawie wartości PE wyznacza się frakcję przeżywających komórek SF (Surviving Fraction), zdefiniowaną jako:

$$SF = \frac{N_{\text{kolonii}}}{N_{\text{wysianych}} \cdot PE} \quad (2)$$

Wraz ze wzrostem dawki promieniowania wartość ta powinna maleć, odzwierciedlając zwiększającą się liczbę nieodwracalnych uszkodzeń komórek. Analiza zależności SF od dawki umożliwia ocenę promienio-wrażliwości badanej linii komórkowej.

3 Przebieg doświadczenia

3.1 Hodowla komórkowa

Przeprowadzono hodowlę komórek glejaka mózgu linii M059K w Laboratorium Radiobiologicznym w Środowiskowym Laboratorium Ciężkich Jonów. W zależności od stopnia konfluencji komórek w naczyniu hodowlanym wymieniano pożywkę lub przeprowadzano pasaż komórkowy. Po czwartym pasażu komórki umieszczono w specjalnych butelkach hodowlanych T-25 z podłożem hodowlanym [2].

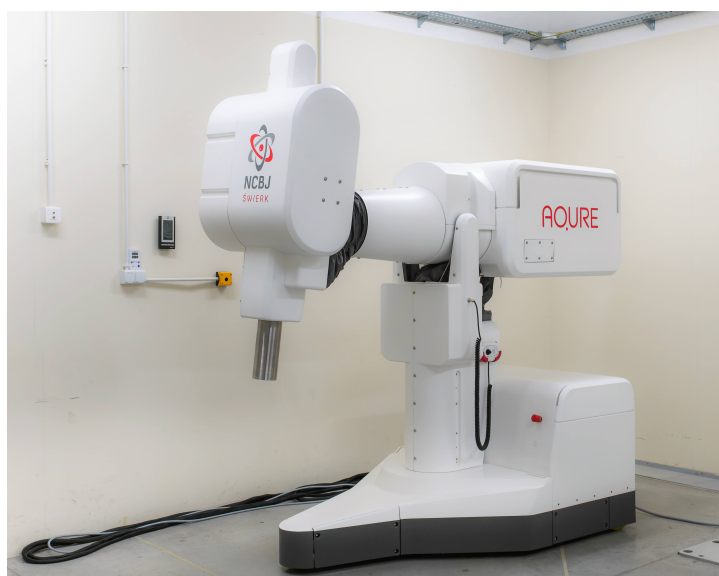
3.2 Napromienianie

Tak przygotowane butelki z komórkami przetransportowano do Narodowego Centrum Badań Jądrowych w specjalnym, przenośnym inkubatorze zapewniającym stałe warunki środowiskowe [3].

Do napromieniania próbek wykorzystano akcelerator AQUIRE FLASH-RT generujący wiązkę elektronów o energii 9 MeV (rys. 1). Każdą z butelek napromieniano inną dawką promieniowania (1,01 Gy; 4,64 Gy; 6,08 Gy; 7,22 Gy). Dokładne określenie zdeponowanej dawki było możliwe dzięki zastosowaniu filmów radiochromowych Gafchromic.

Dodatkowo przygotowano butelki kontrolne, które podczas transportu były narażone na takie same warunki środowiskowe jak próbki napromieniane, jednak nie zostały bezpośrednio poddane działaniu wiązki promieniowania. W czasie napromieniania pozostałych próbek znajdowały się w odpowiedniej odległości od akceleratora i stanowiły próbę kontrolną (0 Gy). Po zakończeniu ekspozycji wszystkie próbki przetransportowano z powrotem do Laboratorium Radiobiologicznego.

Napromienianie przeprowadzano w trzech kolejnych dniach, każdorazowo wykorzystując nowy zestaw butelek z komórkami. W każdym dniu próbki napromieniano tymi samymi dawkami promieniowania oraz przygotowywano odpowiadające im próby kontrolne. Dzięki temu dla każdej dawki uzyskano trzy niezależne powtórzenia eksperymentu.



Rysunek 1: Akcelerator elektronowy AQUIRE FLASH - RT (fot. mgr Aleksandry Lenartowicz, NCBJ).

3.3 Utrwalanie szalek z komórkami + liczenie kolonii

Po zakończeniu inkubacji umożliwiającej wzrost kolonii, komórki utrwalono używając roztworu formaldehydu i wybarwiono roztworem giemsy, co pozwoliło na ich łatwiejszą obserwację pod mikroskopem. Proces utrwalania zatrzymuje aktywność metaboliczną komórek, zachowując przy tym strukturę powstałych kolonii, natomiast barwienie zwiększa kontrast między koloniami a podłożem hodowlanym. Następnie wszystkie szalki poddano dwudniowemu osuszaniu.

Każdą szalkę analizowano przy użyciu mikroskopu optycznego, zliczając liczbę utworzonych kolonii. Za kolonię uznawano skupisko komórek powstałe z pojedynczej komórki, zachowującej zdolność do wielokrotnych podziałów.

Uzyskane liczby kolonii posłużyły następnie do wyznaczenia wydajności tworzenia kolonii PE dla prób kontrolnych oraz frakcji przeżywających komórek SF dla poszczególnych dawek promieniowania.

4 Analiza wyników

W tabelach 2 i 3 w Suplemencie przedstawiono wyniki zliczeń liczby kolonii dla szalek, na które zostały wysiewane komórki z butelek kontrolnych oraz wyniki zliczeń kolonii dla szalek, na które wysiewano komórki pochodzące z butelek napromienianych dawkami 1,01 Gy; 4,64 Gy; 6,08 Gy oraz 7,22 Gy.

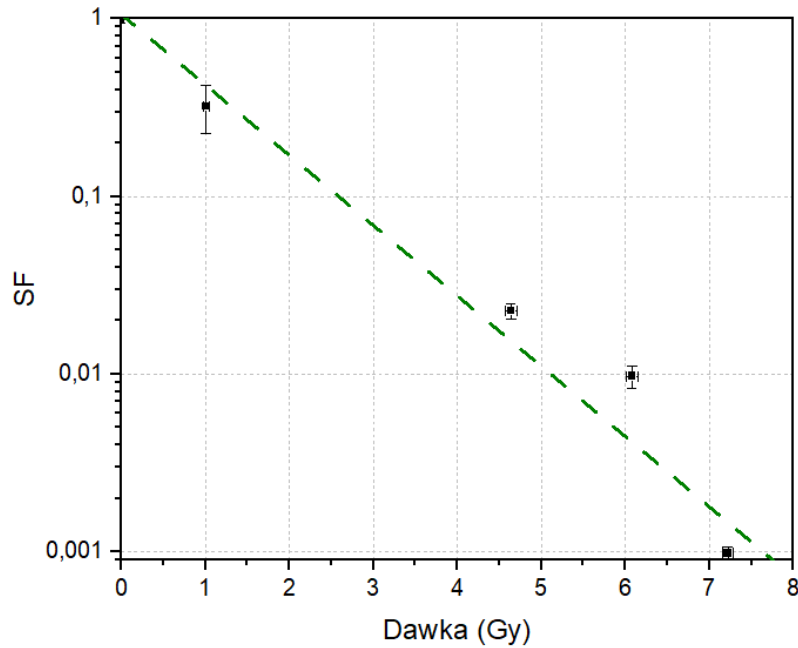
Na podstawie uzyskanych wyników przeprowadzono analizę danych w celu wyznaczenia krzywej przeżywalności komórek:

1. Na podstawie wyników dla prób kontrolnych (tab. 2) obliczono średnią liczbę kolonii na szalce oraz niepewność wyrażoną jako odchylenie standardowe średniej dla każdego powtórzenia eksperymentu. Na tej podstawie obliczono średnią ważoną wraz z niepewnością.
2. Korzystając ze średniej ważonej, wyznaczono wydajność tworzenia kolonii (PE) wraz z niepewnością, korzystając ze wzoru 1 ($PE = 0,1433 \pm 0,0076$).
3. Dla każdej dawki promieniowania wyznaczono średnią liczbę kolonii na szalce na podstawie trzech niezależnych powtórzeń (trzech kolejnych dni napromieniania), wraz z niepewnością.
4. Dla każdego powtórzenia w obrębie danej dawki obliczono frakcję przeżywających komórek (SF) zgodnie ze wzorem 2, wraz z niepewnością wyznaczoną na podstawie propagacji niepewności.
5. Dla każdej dawki obliczono końcową wartość frakcji przeżywających jako średnią ważoną z trzech powtórzeń wraz z niepewnością, która posłużyła do konstrukcji krzywej przeżywalności.

Uzyskane wyniki frakcji przeżywających dla kolejnych dawek wraz z niepewnościami przedstawiono w tabeli 1 oraz na rysunku 2.

Dawka (Gy)	SF
0	$1,000 \pm 0,056$
$1,010 \pm 0,035$	$0,322 \pm 0,098$
$4,640 \pm 0,071$	$0,0227 \pm 0,0022$
$6,080 \pm 0,077$	$0,0097 \pm 0,0014$
$7,220 \pm 0,069$	$0,000984 \pm 0,000081$

Tabela 1: Frakcja przeżywających komórek (SF) w zależności od dawki.



Rysunek 2: Frakcja przeżywających komórek (SF) w zależności od dawki. Użyto skali logarytmicznej na osi Y. Linia przerywaną zaznaczono linię trendu.

5 Podsumowanie

Celem przeprowadzonego doświadczenia była analiza wpływu promieniowania β na przeżywalność komórek glejaka linii M059K z wykorzystaniem testu klonogenego. Na podstawie liczby powstałych kolonii wyznaczono wydajność klonowania dla prób kontrolnych oraz frakcję przeżywających komórek dla poszczególnych dawek promieniowania.

Otrzymana krzywa jest zgodna z przewidywaniami. Wyniki wykazały wyraźną zależność pomiędzy dawką promieniowania, a przeżywalnością komórek. Wraz ze wzrostem dawki zaobserwowano systematyczny spadek wartości frakcji przeżywających. Oznacza to, że promieniowanie β istotnie ogranicza zdolność komórek M059K do dalszych podziałów.

Przeprowadzone doświadczenie pozwoliło zapoznać się z metodologią testu klonogenego oraz sposobem ilościowej oceny promieniowrażliwości komórek na podstawie wyznaczonej frakcji SF .

Literatura

- [1] Wiktoria M. Suchorska. Radiobiologia: podstawowe modele matematyczne opisujące przeżywalność komórek. *Zeszyty Naukowe Wielkopolskiego Centrum Onkologii*, 15(2):59–65, 2018.
- [2] Googlab SCI. Sterylne butelki hodowlane T-25 z filtrem do hodowli adherentnej (TC-treated, 50 ml). <https://googlab.pl/produkt/sterylne-butelki-t25-z-filtrem-do-hodowli-adherentnej-tc-treated-50ml-200szt/> [Dostęp: 10.03.2026], 2026.
- [3] Biogenet / N-biotek. Przenośny miniinkubator CO2 N-biotek NB-203M. <https://www.biogenet.pl/Inkubacja-hodowla-mikroorganizmow-i-komorek/Inkubatory-CO2-02/przenosny-miniinkubator-co2-n-biotek-nb-203m.html> [Dostęp: 10.03.2026], 2026.
- [4] Dr hab inż Piotr Konieczka. Statystyka. https://chem.pg.edu.pl/documents/175289/4236053/statystyka_seminarium1.pdf [Dostęp: 03.01.2026], 2026.

6 Supplement

Dawka (Gy)	Data napromieniania	Numer szalki	Liczba kolonii po napromienianiu	Liczba początkowo wysianych komórek
0 Gy	20.02	1	74	500
		2	137	
		3	71	
	21.02	1	186	
		2	130	
		3	112	
	22.02	1	70	
		2	77	
		3	78	
0 Gy	20.02	1	34	
		2	66	
		3	58	
	21.02	1	59	
		2	30	
		3	20	
	22.02	1	56	
		2	49	
		3	42	
0 Gy	20.02	1	54	
		2	54	
		3	38	
	21.02	1	80	
		2	72	
		3	75	
	22.02	1	80	
		2	72	
		3	75	

Tabela 2: Wyniki zliczeń liczby kolonii na szalkach z butelek kontrolnych z kolejnych powtórzeń eksperymentu. Na podstawie testu Q - Dixona przyjęto liczbę 186 jako błąd gruby i nie uwzględniano jej w dalszej analizie [4].

Dawka (Gy)	Data napromieniania	Numer szalki	Liczba kolonii po napromienianiu	Liczba początkowo wysianych komórek
$1,010 \pm 0,035$ Gy	20.02	1	130	3000
		2	120	
		3	-	
	21.02	1	-	
		2	-	
		3	-	
	22.02	1	-	
		2	129	
		3	200	
$4,640 \pm 0,071$ Gy	20.02	1	69	20000
		2	62	
		3	84	
	21.02	1	149	
		2	-	
		3	165	
	22.02	1	59	
		2	59	
		3	27	
$6,080 \pm 0,077$ Gy	20.02	1	38	25000
		2	36	
		3	-	
	21.02	1	74	
		2	65	
		3	30	
	22.02	1	20	
		2	39	
		3	33	
$7,220 \pm 0,069$ Gy	20.02	1	12	75000
		2	-	
		3	-	
	21.02	1	24	
		2	23	
		3	-	
	22.02	1	7	
		2	11	
		3	8	

Tabela 3: Wyniki zliczeń liczby kolonii na szalkach z butelek napromienianych z kolejnych powtórzeń eksperymentu. Znak „-” oznacza brak możliwości zliczenia liczby kolonii przy użyciu mikroskopu.