

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Wydział Lekarski

Katedra i Zakład Fizyki i Biofizyki

Temat rozprawy doktorskiej

**„Wpływ sposobu preparatyki próbek i techniki pomiaru na sygnały EPR
generowane w tkance kostnej przez promieniowanie jonizujące”**

Imię i nazwisko:

mgr inż. Karolina Krefft

Promotor:

dr hab. Bartłomiej Ciesielski

Gdańsk, 2016

1	Wprowadzenie i cel pracy	4
2	Odziaływanie promieniowania jonizującego w środowisku biologicznym	7
3	Elektronowy Rezonans Paramagnetyczny (EPR)	14
3.1	Zjawisko elektronowego rezonansu paramagnetycznego	14
3.2	Efekt Zeemana	15
3.3	Budowa spektrometru EPR.....	17
3.4	Podstawy techniki pomiaru sygnału EPR.....	18
3.5	Zastosowania spektroskopii EPR w badaniach biologicznych	20
3.6	Dozymetria EPR promieniowania jonizującego	21
4	Tkanka kostna jako dozometr	25
4.1	Przykłady zastosowania dozymetrii EPR w kości w dozymetrii powypadkowej	28
4.2	Budowa tkanki kostnej	31
5	Badania własne	34
5.1	Materiał i metody	34
5.1.1	Przygotowanie próbek tkanki kostnej	35
5.1.2	Pomiary EPR.....	38
5.1.2.1	Wybór mocy mikrofalowej.....	40
5.1.2.2	Mapowanie rozkładu czułości wnęki rezonansowej wzdłuż osi wnęki	44
5.1.3	Analiza widm	46
5.1.4	Powtarzalność pomiarów EPR	47
5.2	Procedura dozymetrii retrospektywnej dawek u pacjentów po radioterapii	48
6	Wyniki.....	50
6.1	Sygnały EPR w nienapromienionej kości zbitej.....	50
6.1.1	Wpływ wody na sygnał natywny	50
6.2	Wpływ kruszenia i wielkości ziaren na sygnał tła	52
7	Sygnały EPR generowane radiacyjnie.....	54
7.1	Zmiany w czasie tło–podobnego sygnału generowanego radiacyjnie	55

7.2	Zależność od czasu sygnału RIS w zależności od warunków napromieniowania	60
7.3	Sygnały radiacyjne w kości pokruszonej	65
7.4	Wpływ KOH na sygnały EPR tkance kostnej.	67
7.4.1	Redukcja masy próbek w wyniku hydrolizy kości w 2M KOH.....	68
7.4.2	Redukcja sygnału tła (BG) w wyniku hydrolizy napromieniowanych próbek kości w 2 M KOH.....	68
7.4.3	Zależność intensywności sygnału EPR od dawki pochłoniętego promieniowania. .	70
7.4.4	Zastosowanie dozymetrii EPR do pomiaru dawki pochłoniętej in vivo.....	73
7.4.4.1	Wyniki dozymetrii retrospektywnej dawek pochłoniętych w czasie radioterapii.	73
7.4.4.2	Analiza niepewności pomiarowych.....	77
8	Dyskusja	78
8.1	Wpływ parametrów mocy mikrofalowej na rejestrowane sygnały EPR.....	78
8.2	Wpływ wody na amplitudę sygnałów EPR.....	79
8.3	Wpływ kruszenia i wielkości ziaren na sygnały EPR	80
8.4	Wpływ warunków napromieniowania na sygnały EPR generowane radiacyjnie.....	80
8.5	Wpływ hydrolizy kości w 2M KOH na rejestrowane sygnały EPR.....	83
8.6	Zależność intensywności sygnału EPR od dawki pochłoniętego promieniowania.	85
8.7	Zastosowanie metody dozymetrii EPR w kościach w pomiarach ex vivo dawki promieniowania u pacjentów po radioterapii	85
9	Podsumowanie.....	86
10	Piśmiennictwo	88

1 Wprowadzenie i cel pracy

W obecnych czasach pomimo stosowania wielu środków ostrożności, nadal zdarzają się wypadki, w których ludzie ulegają napromieniowaniu wysokimi, nieobojętymi dla zdrowia dawkami promieniowania jonizującego. Według Emergency Assistance Center od 1944 do 2004 miało miejsce 421 poważnych wypadków radiacyjnych na świecie [1]. Istnieje też obawa przed atakami terrorystycznymi z wykorzystaniem materiałów radioaktywnych, czego skutkiem może być narażenie na niekontrolowane napromieniowanie zarówno personelu wojskowego, jak również ludności cywilnej, niewyposażonej w indywidualne dozymetry promieniowania. W takich sytuacjach możliwość szybkiego, indywidualnego pomiaru dawki może mieć kluczowe znaczenie dla kategoryzacji ofiar w wypadkach masowych w zależności od stopnia ich napromieniowania oraz rokowania. Wiedza o pochłoniętej dawce ma także wpływ na planowanie postępowania medycznego. W związku z tym istnieje ciągła potrzeba udoskonalania metod określania dawki pochłoniętego przez ludzi promieniowania.

Źródła promieniowania, które mogą być zagrożeniem dla ludzi wykorzystywane są w wielu dziedzinach działalności człowieka: w przemyśle, nauce, armii czy w medycynie, gdzie promieniowanie wykorzystywane jest zarówno w diagnostyce jak i terapii. W rezultacie tak licznych zastosowań promieniowania zdarzają się wypadki, w wyniku których człowiek może przyjąć niekontrolowaną, dużą dawkę promieniowania. Jeden z takich wypadków wydarzył się na terenie Polski w 2001 roku w Białostockim Centrum Onkologii, gdzie podczas prowadzonej radioterapii u pięciu pacjentek z rakiem piersi doszło do tragicznego w skutkach przedawkowania. Spowodowane było to uszkodzoną blokadą bezpieczeństwa i przestarzałym systemem zabezpieczeń akceleratora liniowego [2].

Istnienie elektrowni jądrowych zawsze związane jest z pewnym ryzykiem awarii, które mogą skutkować narażeniem ludności na działanie promieniowania jonizującego. Przykładem może tu być wybuch elektrowni jądrowej 26 kwietnia 1986 roku w Czarnobylu, po którym chmura radioaktywnych cząstek przeszła nad Europą, w tym także nad Polską [3,4]. Do innej awarii elektrowni jądrowej o wielkiej skali radioaktywnego oddziaływania na środowisko doszło w Fukushima w Japonii w 2011 roku w wyniku trzę-

sienia ziemi u wybrzeży wyspy Honsiu [5]. Dużym potencjalnym zagrożeniem również jest terroryzm. Może on przybierać różne formy: od groźby detonacji bomb jądrowych przez organizacje terrorystyczne do prób rozprzestrzenienia substancji radioaktywnych przez tzw. „brudne bomby”. Powyższe przykłady pokazują jak ważną kwestią jest dzisiaj ochrona ludzi przed skutkami promieniowania jonizującego, a więc i możliwość ilościowej charakterystyki poziomu dawek [6,7].

W wypadkach radiacyjnych dawki otrzymane przez poszkodowanych mogą być wysokie i niejednorodnie rozmieszczone w objętości ciała i dlatego powinny być określone jak najdokładniej zarówno co do ich wielkości jak i rozkładu w ciele aby ułatwić diagnozę i wybór najlepszej strategii terapeutycznej [8]. Jedną z metod pomiaru dawek pochłoniętych w tkankach jest dozymetria wykorzystująca elektronowy rezonans paramagnetyczny (EPR). Polega ona na detekcji i ilościowej charakterystyce sygnałów EPR pochodzących od trwałych wolnych rodników wygenerowanych promieniowaniem w tkankach twardych: szkliwie, kości lub paznokciach. Metoda ta, obok metod cytogenetycznych, [9,10,11], należy do jednej z kilku podstawowych metod biodozymetrii, rozwijanych w laboratoriach dozymetrycznych na świecie.

Celem tej pracy jest opracowanie procedury pomiaru *ex vivo* sygnałów EPR w próbkach kości w celu retrospektywnej dozymetrii promieniowania jonizującego, określenie jej dokładności i wpływu na nią techniki pomiaru EPR i oraz weryfikacja stosowalności dozymetrii EPR dla pomiaru dawek w kości napromieniowanej *in vivo* na podstawie porównania dawek zmierzonych w próbkach kości pochodzących od pacjentów po radioterapii z dawkami obliczonymi przez stosowane rutynowo w planowaniu leczenia radiacyjnego komputerowe systemy planowania radioterapii.

Przedstawione w tej pracy wyniki są częściowo przedmiotem następujących doniesień i publikacji:

Publikacje:

1. “Application of EPR dosimery in bone for verification of doses in radiotherapy patients”, K. Krefft, B. Drogoszewska, J. Kamińska, M. Juniewicz, G. Wołąkiewicz, I. Jakacka, B. Ciesielski, *Radiat. Prot. Dosimetry* 2014, 162 (1-2): 38-42

2. „Effects of water treatment and sample granularity on radiation sensitivity and stability of EPR signals in x- ray irradiated bone samples” , B. Ciesielski, K. Krefft, M. Penkowski, J. Kamińska, B. Drogoszewska, 2014, Radiat. Prot. Dosimetry 159: 141-148

Doniesienia Zjazdowe:

1. J. Kamińska, B. Ciesielski, K. Krefft, M. Juniewicz, K. Emerich, B. Drogoszewska, “Verification of radiotherapy doses in patient' teeth by EPR dosimery”, The Second International Conference on Radiation and Dosimetry in Various Fields of Research (RAD 2014) and the Second East European Radon Symposium (SEERAS), Niš, Serbia, May 27- 30, 2014
2. B. Ciesielski, K. Krefft, J. Kamińska, “The effect of normalization of intensities of EPR spectra to Mn²⁺ standard lines on accuracy of dosimetry in bone and enamel”, The Joint International Symposium on EPR Dosimetry and Dating and the International Conference on Biological Dosimetry, Leiden, The Netherlands, 24-28 March 2013
3. K. Krefft, B. Ciesielski, M. Penkowski, M. Juniewicz, B. Drogoszewska, “The effect of KOH on electron paramagnetic resonance signals measured in irradiated bone”, 39th Annual Meeting of the European Radiation Research Society, Vietri sul Mare, [Italy], 15-19 Październik 2012
4. M. Juniewicz, K. Krefft, J. Kamińska, A. Marciniak, B. Ciesielski, „Sygnały EPR generowane radiacyjnie w tkankach człowieka i ich zastosowanie w biodozymetrii”, XXIII Szkoła Jesienna Polskiego Towarzystwa Badań Radiacyjnych im. Marii Skłodowskiej-Curie pt. "Współczesne zagrożenia ze strony promieniowania jonizującego i niejonizującego - zasady przeciwdziałania i udzielania pomocy poszkodowanym", Zakopane, 5-9 listopada 2012

2 Oddziaływanie promieniowania jonizującego w środowisku biologicznym

Promieniowanie jonizujące jest to promieniowanie przenoszące energię zdolną do oderwania elektronów z atomu, czyli jonizacji atomów lub cząsteczek ośrodka. Rozróżniamy promieniowanie jonizujące bezpośrednio i pośrednio. Do promieniowania bezpośrednio jonizującego zalicza się strumienie rozpędzonych cząstek naładowanych takich jak elektrony, protony, cząstki α i wysokoenergetyczne wiązki jonów, które jonizują materię poprzez oddziaływania kulombowskie rozpędzonych ładunków elektrycznych z elektronami ośrodka. Promieniowanie pośrednio jonizujące to wysokoenergetyczne fotony jak promieniowanie rentgenowskie i fotony gamma oraz rozpędzone strumienie neutronów. Jonizują one ośrodek wtórnie poprzez cząstki naładowane (elektrony, protony, produkty rozszczepienia jąder) powstające w trakcie pierwotnych oddziaływań fotonów lub neutronów z materią. Oba rodzaje promieniowania jonizującego wywołują w organizmach podobne skutki chemiczne, a w konsekwencji i biologiczne, choć poziom reakcji radiobiologicznej w ogólności zależy od lokalnej gęstości jonizacji, którą ilościowo charakteryzuje parametr LET (Linear Energy Transfer), zdefiniowany jako ilość energii przekazanej materii na jednostkę długości śladu cząstki jonizującej. Ciężkie cząstki takie jak protony, neutrony i cząstki α mają wysokie wartości LET, podczas gdy elektrony mają niskie wartości LET. Promieniowania o wysokim LET charakteryzują się wyższą efektywnością generowania uszkodzeń radiobiologicznych.

Efekty oddziaływania promieniowania jonizującego na organizmy żywe zależą od wielkości energii przekazanej materii, przez którą przechodzi (czyli pochłoniętej dawki), jej rozkładu w czasie (mocy dawki), wielkości napromieniowanego obszaru i rodzaju struktur, na które działa promieniowanie oraz rodzaju promieniowania jonizującego wpływającego na jego skuteczność radiobiologiczną. Oddziaływanie fotonów z materiałem pochłaniającym odbywa się za pośrednictwem następujących pierwotnych procesów.

➤ Rozpraszanie koherentne

Zjawisko rozpraszania zachodzi podczas oddziaływania fotonów traktowanych jako fala elektromagnetyczna z elektronami orbitalnymi atomów ośrodka. Oscylujące pole elektryczne fali elektromagnetycznej powoduje chwilowe wibracje elektronów w atomie. Oscylujące elektrony emitują promieniowanie elektromagnetyczne o tej samej długości fali co padająca na atom fala elektromagnetyczna. Prawdopodobieństwo zajścia zjawiska rozpraszania maleje gwałtownie wraz ze wzrostem energii fotonów i jest pomijalnie małe dla energii większych niż 100 keV w materiałach o niskiej liczbie atomowej. Rozpraszanie koherentne nazywane jest również rozpraszaniem Rayleigha. Rozkład kątowy fotonów rozproszonych w zjawisku rozpraszania Rayleigha opisany jest wzorem [12,13] :

$$\sigma_R(\theta, E) = \frac{1}{2} r_e^2 (1 + \cos^2 \theta) F^2(\theta, E, Z) \quad (1)$$

gdzie:

$r_e = e^2 / m_e c^2 = 2,818 \cdot 10^{-15}$ – promień elektronu,

E – energia padającego fotonu,

θ – kąt pomiędzy fotonem padającym, a rozproszonym,

e – ładunek elektronu,

m_e – masa spoczynkowa elektronu,

c – prędkość światła,

$F(\theta, E, Z)$ – atomowy współczynnik zależny od rozkładu ładunków w powłoce elektronowej,

Z – liczba atomowa atomu rozpraszającego.

W rozpraszaniu koherentnym nie zachodzi przekazywanie energii promieniowania do ośrodka, dlatego w rozważaniach dozymetrycznych jest ono pomijane, natomiast ma ono wpływ na tworzenie się kontrastu na obrazach radiologicznych [9].

➤ Efekt fotoelektryczny

W efekcie fotoelektrycznym foton o energii $h\nu$ zderzając się z atomem wybija elektron z powłoki ulegając całkowitemu pochłonięciu. Wybity elektron nazywany jest fotoelektronem. Energia kinetyczna wybitego elektronu jest różnicą energii pochłoniętego fotonu i energii wiązania elektronu na powłoce i określa ją wzór:

$$E_k = h\nu - E_w \quad (2)$$

gdzie:

E_k – energia kinetyczna wybitego elektronu,

$h\nu$ – energia fotonu,

E_w – energia wiązania elektronu na powłoce atomu.

Prawdopodobieństwo σ_f wystąpienia efektu fotoelektrycznego dla energii fotonów wyższych od energii jonizacji danej powłoki zależy od energii padającego fotonu i rodzaju atomów substancji pochłaniającej, co wyrazić można wzorem :

$$\sigma_f = C \frac{Z^k}{E_\gamma^n} \quad (3)$$

gdzie :

Z – liczba atomowa atomu absorbenta,

C – współczynnik proporcjonalności,

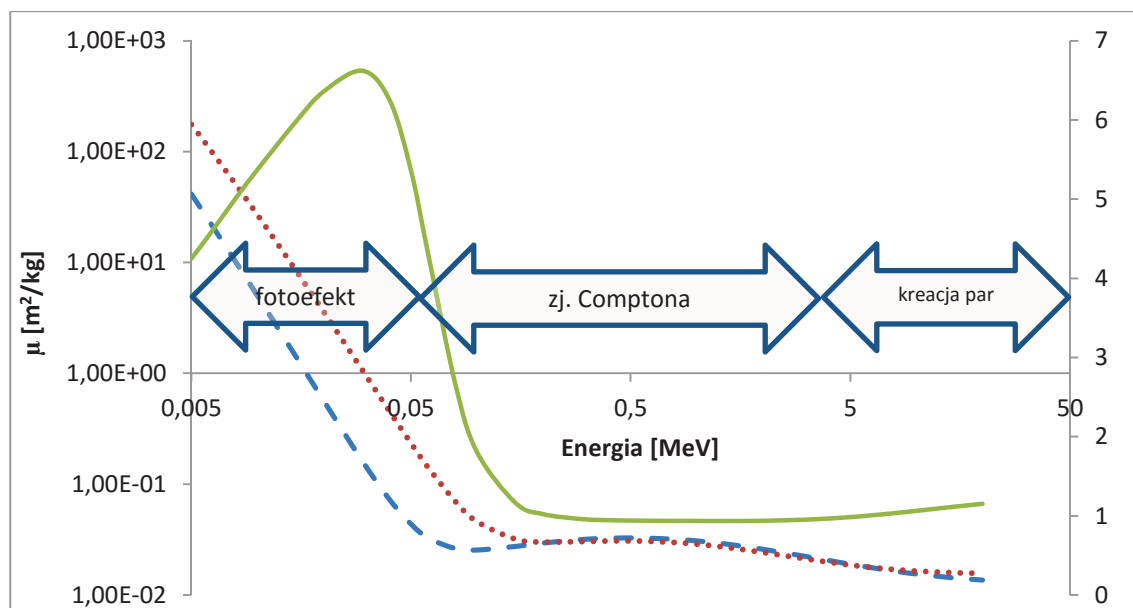
E_γ – energia fotonu,

dla niskich energii : $k=4.0$, $n=3.5$

dla wysokich energii : $k=4.6$, $n=1.0$ [14]

Po wybiciu elektronu atomy pozostają w stanie wzbudzenia z nieobsadzonymi pustymi miejscami na powłokach. W procesie powrotu do stanu podstawowego podczas zapełniania luk po wybitych elektronach następuje emisja nadmiaru energii w postaci fotonów promieniowania charakterystycznego oraz elektronów zwanych elektronami Augera [12]. Ze względu na ich niską energię elektrony Augera mają niewielki zasięg w tkankach i można uznać, że cała energia fotonu ulegającego zjawisku fotoelektrycznemu jest pochłonięta lokalnie.

Jak wynika ze wzoru (3) prawdopodobieństwo zajścia zjawiska fotoelektrycznego rośnie ze wzrostem liczby porządkowej Z i szybko maleje wraz ze wzrostem energii promieniowania. Gdy energia fotonu przekracza 100 keV, udział efektu fotoelektrycznego w całkowitym oddziaływaniu z materiałami biologicznymi jest znikomy. W dozymetrii zamiast prawdopodobieństwa oddziaływania wprowadza się proporcjonalne do niego wielkości: masowy współczynnik osłabienia i masowy współczynnik absorpcji. Określają część energii promieniowania, która odpowiednio ulega osłabieniu i pochłonięciu przez materię o jednostkowej masie powierzchniowej. Zjawisko fotoelektryczne jest w znacznym stopniu odpowiedzialne za tworzenie kontrastu radiologicznego między tkankami i powoduje, że dawka pochłonięta w kości jest kilkakrotnie wyższa od dawki w tkankach miękkich dla promieniowania w zakresie do kilku-kilkudziesięciu keV (Rys. 1)



Rys. 1 Zależność masowego współczynnika absorpcji μ dla kości zbitej (linia kropkowana), tkanki miękkiej (linia przerywana) i ich stosunku (linia ciągła, prawa oś rzędnych) od energii promieniowania fotonowego [<http://physics.nist.gov/PhysRefData/XrayMassCoef/>]. Dwustronne strzałki zaznaczają obszary dominowania poszczególnych typów oddziaływań.

➤ Zjawisko Comptona

Zjawisko Comptona polega na sprężystym zderzeniu się fotonu z elektronem, w rezultacie którego część energii fotonu przekazywana jest elektronowi. Powstaje kwant promieniowania rozproszonego o mniejszej energii zależnej od kierunku rozproszonego fotonu. Kierunek ruchu elektronu comptonowskiego leży w jednej płaszczyźnie z fotonem rozproszonym i pierwotnym. Różnica energii pomiędzy energią fotonu padającego a energią fotonu rozproszonego zostaje pochłonięta przez elektron (tzw. elektron comptonowski), którego energia może wynosić od zera do maksymalnej wartości (przy rozproszeniu wstecznym fotonu) danej wzorem:

$$E_{max} = hv \frac{2\alpha}{1+2\alpha} \quad (4)$$

gdzie:

hv - energia fotonu

α - stosunek energii fotonu do energii spoczynkowej elektronu m_0c^2

m_0 - masa elektronu

c - prędkość światła

Bilans energetyczny w zjawisku Comptona przedstawia wzór 5:

$$E_k = hv - hv' \quad (5)$$

gdzie :

E_k - Energia kinetyczna elektronu comptonowskiego

hv - Energia pierwotnego fotonu

hv' - Energia rozproszonego fotonu

Ze względu na stosunkowo wysoką energię elektronów comptonowskich generowanych przez promieniowanie X stosowane w radioterapii, ich zasięg w tkankach może sięgać kilku centymetrów, co jest odpowiedzialne za przesunięcie obszarów depozycji energii kinetycznej przez elektrony wtórne względem miejsca ich generacji w odziały-

waniu comptonowskim. Efekt ten jest istotną przyczyną występowania zjawiska narastania dawki (tzw. build-up'u) w obszarze wlotowym wiązek fotonowych o energii powyżej 1 MeV.

Prawdopodobieństwo zajścia zjawiska Comptona dla całego atomu jest proporcjonalne do ilości elektronów w atomie, a masowe współczynniki osłabiania i absorpcji są proporcjonalne do gęstości elektronowej absorbentu (ilości elektronów w jednostce masy). Ponieważ gęstości elektronowe wszystkich pierwiastków (poza wodorem) są podobne, prawdopodobieństwo zajścia zjawiska Comptona praktycznie nie zależy od składu pierwiastkowego absorbentu. Prawdopodobieństwo zajścia tego zjawiska maleje wraz ze wzrostem energii powyżej kilkudziesięciu keV. W tkankach miękkich jak i w kości efekt Comptona jest dominujący w zakresie energii od 100 keV do 10 MeV. To głównie za jego pośrednictwem następuje depozycja w tkankach energii promieniowania X stosowanego obecnie w radioterapii.

➤ Zjawisko tworzenia par elektron – pozyton

W zjawisku tworzenia par następuje całkowite pochłonięcie fotonu w wyniku jego oddziaływania z polem elektrycznym jądra atomu lub, dużo rzadziej, z polem elektrycznym elektronu. Energia E_0 fotonu promieniowania elektromagnetycznego zostaje zamieniona w masę i energię kinetyczną dwóch cząstek: elektronu i pozytonu. Energia kinetyczna E_k powstałych cząstek jest różnicą energii oddziaływującego fotonu i energii spoczynkowej ($2m_0c^2 = 1,02 \text{ MeV}$) powstałych cząstek, czyli

$$E_k = E_0 - 1,02 \text{ MeV} \quad (6)$$

Prawdopodobieństwo zajścia tego zjawiska rośnie wraz ze wzrostem liczby porządkowej Z i z energią promieniowania powyżej energii progowej 1,02 MeV. Wytworzone pozytony ulegają anihilacji z elektronami ośrodka pochłaniającego, co prowadzi do emisji dwóch fotonów gamma o energii 0,511 MeV. Z tego powodu za pochłoniętą lokalnie przyjmuje się nie całą energię E_0 oddziaływującego fotonu lecz tylko energię kinetyczną wytworzonych cząstek, daną wzorem (6).

W substancjach biologicznych zjawisko to odgrywa istotną rolę dla fotonów o wysokich energiach powyżej kilku MeV.

➤ Efekt fotojądrowy

Reakcje fotojądrowe mają miejsce wtedy, gdy foton o wysokiej energii jest absorbowany przez jądro atomu. Rezultatem tej reakcji jest transformacja jądra w radioaktywny produkt i emisja neutronu bądź protonu. Prawdopodobieństwo reakcji fotojądrowej zależy od energii fotonu i dla większości jąder zachodzi przy energiach rzędu 10 MeV lub wyższych. Wyjątkiem jest deuteron i ^9Be , dla których reakcje te zachodzą przy energiach rzędu 2 MeV. Prawdopodobieństwo zajścia reakcji fotojądrowej jest znacznie mniejsze niż prawdopodobieństwa reakcji fotonowych omówionych wyżej, a ich udział w całkowitym współczynniku osłabiania wynosi tylko kilka procent (dla energii fotonów powyżej progu reakcji). Uwzględnienie reakcji fotojądrowych jest istotne w radioterapii z powodu neutronów wytwarzanych w reakcjach (x,n) , które stwarzają zagrożenie zdrowotne dla personelu i muszą być wzięte pod uwagę w projektowaniu sal i urządzeń do radioterapii. Stosowanie osłon pochłaniających promieniowanie neutronowe, zainstalowanie systemu wentylacji w salach i użycie odpowiednich materiałów zmniejszających zagrożenie reakcjami aktywacji neutronowej pozwala na zminimalizowanie problemu radioaktywności.

➤ Odziaływanie cząstek naładowanych

Przedstawione powyżej pierwotne procesy odziaływania fotonów prowadzą do wygenerowania w materii strumienia elektronów wtórnych jonizujących ośrodek bezpośrednio poprzez ich oddziaływanie kulombowskie z elektronami ośrodka. Do cząstek jonizujących stosowanych w medycynie zaliczamy także elektrony wygenerowane przez przyspieszacze medyczne dla celów radioterapii, cząstki α (np. wytworzone przez izotopy stosowane w medycynie nuklearnej), protony i jony stosowane w tzw. terapii hadronowej.

Konsekwencją opisanych powyżej procesów oddziaływania fotonów i cząstek nładowanych jest zdeponowanie w ośrodku pewnej ilości energii jednostce jego masy. Wielkość tą nazywamy dawką promieniowania (D) i wyraża ją wzór

$$D = \frac{\Delta E}{\Delta m} \quad (7)$$

gdzie:

ΔE – energia zdeponowana przez promieniowanie jonizujące w elemencie objętości ośrodka o masie Δm .

Jednostką dawki pochłoniętego promieniowania jest grej (1 Gy = 1 J/kg). Dawka ok. 4 Gy (na całe ciało) powoduje śmierć u ok 50% ludzi pozbawionych pomocy medycznej. Dawki podawane na niewielkie obszary ciała w radioterapii sięgają 60-70 Gy. Wielkość efektów biologicznych promieniowania i ich rodzaj są ściśle związane z wartością dawki, dlatego możliwość jej dokładnego określenia ma istotne znaczenie zarówno dla radioterapii jak i ochrony radiologicznej. Dział fizyki zajmujący się obliczeniami i pomiarami dawek promieniowania jonizującego nazywa się dozymetrią.

3 Elektronowy Rezonans Paramagnetyczny (EPR)

3.1 Zjawisko elektronowego rezonansu paramagnetycznego

Spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) jest metodą badawczą coraz bardziej rozpowszechnianą w badaniach medycznych na świecie ze względu na rosnące zainteresowanie środowiska naukowego określeniem roli i konsekwencji procesów biochemicznych i biologicznych, w których udział biorą struktury zawierające niesparowane wolne elektrony, w szczególności wolne rodniki [12,15].

Pierwszy raport na temat elektronowego rezonansu paramagnetycznego ukazał się w 1945 roku. Pracujący na Uniwersytecie w Kazaniu J.K. Zawojski zaobserwował, że próbka posiadająca niesparowane elektrony pochłania promieniowanie elektromagne-

tyczne po umieszczeniu jej w zewnętrznym polu magnetycznym [16,17]. W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat metoda spektroskopii EPR szybko się rozwijała i obecnie jest wykorzystywana w różnych obszarach nauki, o czym świadczyć mogą liczne publikacje naukowe z różnych dziedzin [13,15,16,17,18].

Zjawisko elektronowego rezonansu paramagnetycznego zachodzi tylko w substancjach, które posiadają niesparowane elektrony. Niesparowane elektrony mogą występować w różnych cząstkach - nazywane są one centrami paramagnetycznymi. Przykładem centrów paramagnetycznych są: jonorodniki, wolne rodniki, jony metali przejściowych i ziem rzadkich, defekty sieci krystalicznej, elektrony przewodnictwa oraz molekuly, u których naturalnie w budowie występują niesparowane elektrony (O_2 , NO , NO_2) [19].

3.2 Efekt Zeemana

Podstawą spektroskopii EPR jest zjawisko Zeemana. Jest ono spowodowane oddziaływaniem niesparowanego elektronu z przyłożonym zewnętrznym polem magnetycznym B_0 . Swobodny elektron umieszczony w zewnętrznym polu magnetycznym może przyjmować różną orientację ze względu na zwrot jego spinu w stosunku do kierunku pola magnetycznego. Reguły fizyki kwantowej narzucają dwa dozwolone stany elektronu charakteryzujące się rzutem jego spinu na kierunek pola magnetycznego o wartościach $M_s = +\frac{1}{2}h/2\pi$ i $M_s = -\frac{1}{2}h/2\pi$ (gdzie h - stała Plancka, $+\frac{1}{2}$ i $-\frac{1}{2}$ są liczbami spinowymi elektronu w obu tych stanach). Ze względu na posiadany moment magnetyczny μ , który jest przeciwny do spinu elektronu s , oba te stany różnią się energią. Elektron jest w stanie o niższej energii kiedy jego spin skierowany jest przeciwnie do kierunku pola magnetycznego oraz w stanie o wyższej energii kiedy jego spin jest skierowany zgodnie z kierunkiem pola magnetycznego. Różnica energii ΔE pomiędzy tymi dwoma stanami zależy liniowo od natężenia pola magnetycznego (Rys. 2) i opisana jest równaniem.

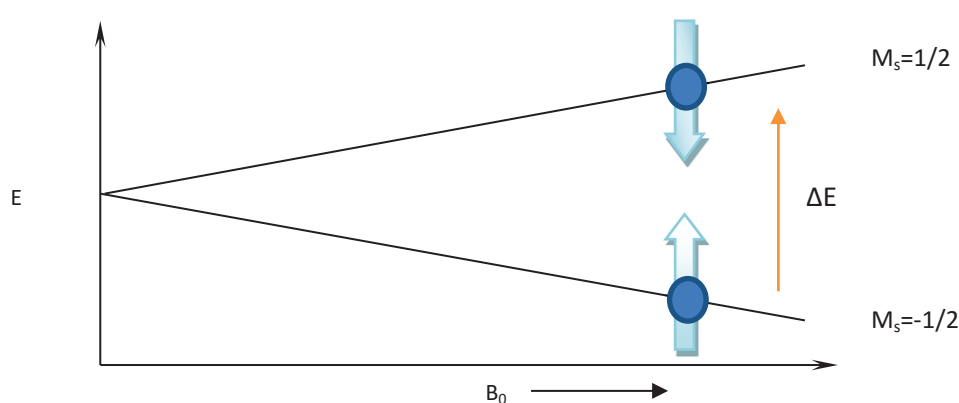
$$\Delta E = g \cdot \mu_0 \cdot B_0 \quad (8)$$

gdzie :

$g = 2,0023$ współczynnik giromagnetyczny, współczynnik rozszczepienia spektroskopowego swobodnego elektronu

$\mu_B = (9,2740755(31) \cdot 10^{-24} \text{ JT}^{-1})$ - stała zwana magnetonem Bohra

B_0 - indukcja pola magnetycznego



Rys. 2 Zjawisko Zeemana – rozszczepienie poziomów energetycznych elektronu w polu magnetycznym. Strzałki symbolizują orientację wektora momentu magnetycznego elektronu zgodną i przeciwną z zewnętrznym polem magnetycznym różniące się stanem energetycznym. energię.

Zjawisko rezonansu paramagnetycznego zachodzi, gdy energia kwantów promieniowania elektromagnetycznego $h\nu$ oddziałującego na układ elektronów w polu magnetycznym jest równa różnicy ΔE energii pomiędzy dwoma rozszczepionymi poziomami energetycznymi elektronu. Warunek ten przedstawia równanie [20]:

$$\Delta E = h \cdot \nu = g \cdot \mu_B \cdot B_0 \quad (9)$$

gdzie :

$h = 6,626176(36) \cdot 10^{-34} \text{ Js}^{-1}$ – stała Plancka

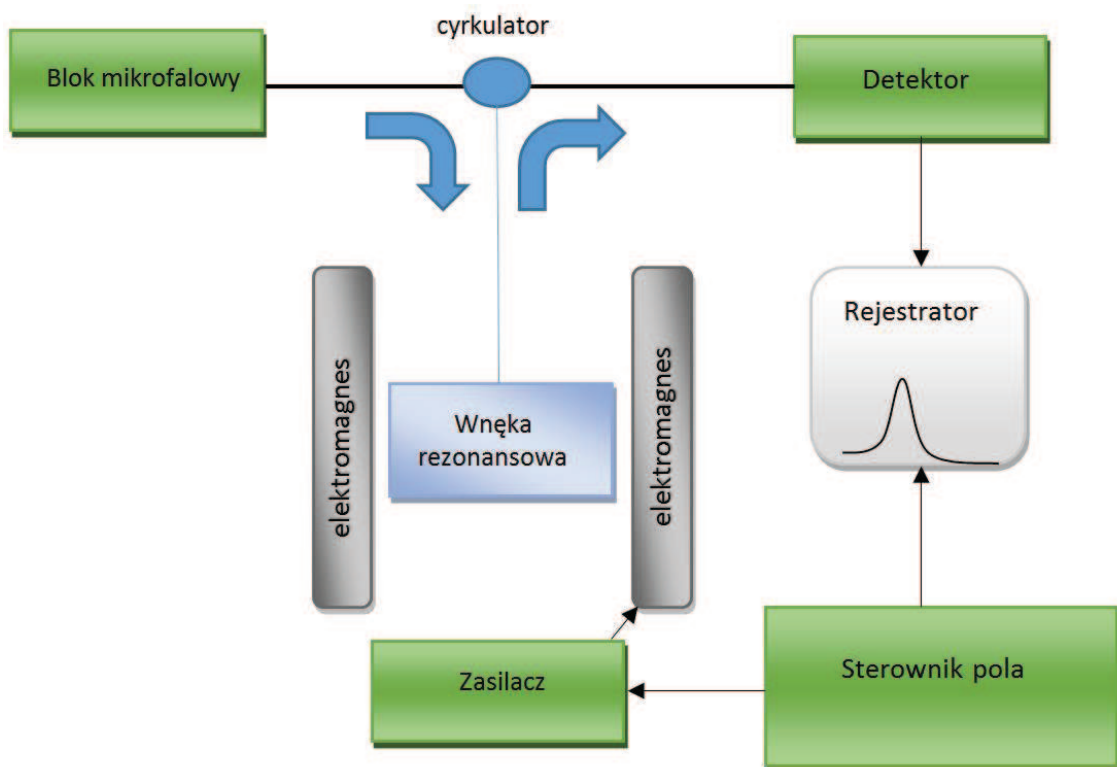
ν – częstotliwość

Ponieważ różnica energii pomiędzy dwoma stanami elektronów może zmieniać się w zależności od indukcji pola magnetycznego, istnieją teoretycznie dwa sposoby na uży-

skanie zjawiska rezonansu: dostrojenie częstotliwości ν fali elektromagnetycznej do ustalonej wartości indukcji B_0 pola magnetycznego lub dopasowanie indukcji pola magnetycznego do ustalonej energii kwantów promieniowania (czyli jego częstotliwości). Ze względów technicznych spowodowanych wysoką częstotliwością stosowanych fal elektromagnetycznych (w zakresie mikrofalowym) propagujących w układzie pomiarowym falowodem o ustalonej geometrii, w spektrometrach EPR stosuje się tą drugą metodę.

3.3 Budowa spektrometru EPR

Spektrometry składają się z trzech podstawowych elementów połączonych falowodem: źródła promieniowania elektromagnetycznego (klistronu lub diody Gunna), wnęki rezonansowej z próbką i detektora (diody) [21]. Schemat blokowy spektrometru EPR przedstawia Rys 3.



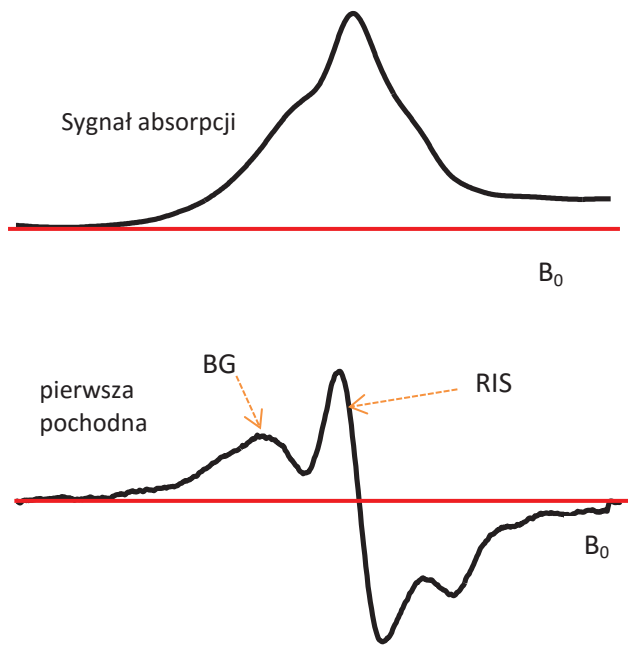
Rys. 3 Schemat ideowy budowy spektrometru EPR.

Mierzoną próbkę umieszcza się pomiędzy biegunami elektromagnesu we wnęcie rezonansowej będącej zakończeniem falowodu. Wytworzone przez klistron lub diodę Gunna promieniowanie mikrofalowe kierowane jest falowodem do cyrkulatora i następnie

do wnęki rezonansowej gdzie znajduje się badana próbka. Odbite od wnęki mikrofalowe kierowane są poprzez cyrkulator do detektora. Rejestrowana przez detektor zmiana mocy fali odbitej jest funkcją zmieniającego się pola magnetycznego B_0 wytworzonego przez elektromagnes, a wielkość zmiany prądu detektora odzwierciedla energię mikrofal zaabsorbowaną przez próbkę we wnęcie.

3.4 Podstawy techniki pomiaru sygnału EPR

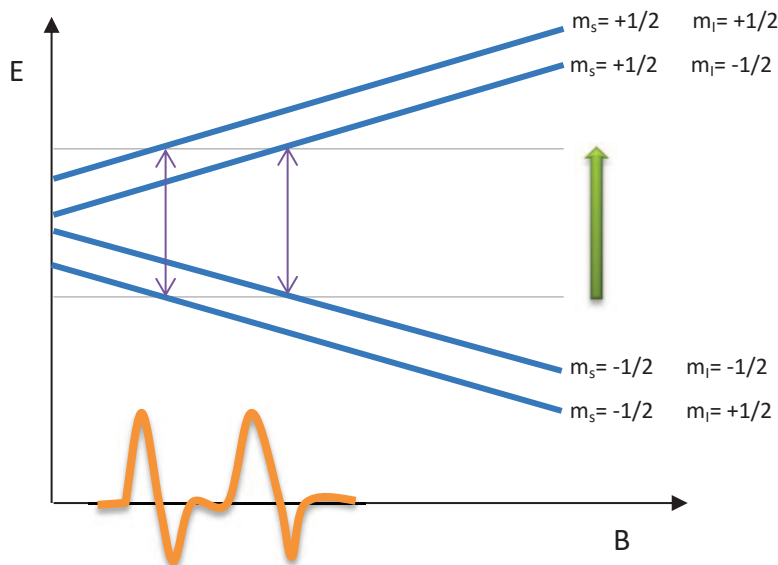
W spektrometrach EPR stosowane są różne pasma częstotliwości promieniowania mikrofalowego : pasmo L (1-2 GHz), S (2-4 GHz), X (9 – 10 GHz), K (24 GHz), Q (34 GHz), W (94 GHz) [17]. W większości komercyjnych spektrometrów EPR stosowane jest pasmo mikrofalowe X o częstotliwości rezonansowej 9,4 GHz. We współczesnych spektrometrach stosuje się metodę detekcji fazoczułej sygnału poprzez modulację indukcji pola magnetycznego B_0 o regulowanej amplitudzie i częstotliwości i w konsekwencji rejestruje się sygnał pierwszej pochodnej krzywej absorpcji w funkcji indukcji pola magnetycznego B_0 . W konsekwencji ilość centrów paramagnetycznych w próbce jest proporcjonalna do drugiej całki rejestrowanego sygnału. Ta metoda rejestracji widm EPR zwiększa stosunek sygnału do szumu i znacząco poprawia zdolność rozdzielania poszczególnych składowych widma, co wyraźnie przedstawia Rys. 4.



Rys. 4 Wykres krzywej absorpcji sygnału EPR napromieniowanej próbki kości (a) i jej pierwszej pochodnej, czyli sygnału rejestrowanego przez spektrometr (b). Widmo EPR (b) wyraźnie wskazuje na złożoność całkowitego rejestrowanego sygnału z dwóch jego komponentów: tła BG i sygnału radiacyjnego RIS.

Metoda EPR charakteryzuje się dużą czułością wykrywania wolnych rodników (na poziomie 10^{10} spinów), a jej ograniczenia wynikają głównie z nietrwałości centrów paramagnetycznych w badanych substancjach oraz obniżonej czułości ich detekcji dla próbek zawierających wodę [12,19].

Rozszczepienie poziomów energetycznych niesparowanego elektronu pod wpływem pola magnetycznego wytworzonego przez sąsiadujące jadra atomowe o niezeraowym momencie magnetycznym (np. ^1H , ^2H , ^{14}N , ^{55}Mn) nazywane jest oddziaływaniem nadsubtelnym. Po przyłożeniu zewnętrznego pola magnetycznego w układzie, który zawiera jeden niesparowany elektron i jądro o spinie $I=1/2$, dochodzi do rozszczepienia nadsubtelnego poziomów energetycznych elektronu, a absorpcja fal elektromagnetycznych w takim układzie może zachodzić przy dwóch wartościach indukcji pola (Rys. 5).



Rys. 5 Rozszczepienie poziomów energetycznych i schemat powstawania struktury nadsubtelnej widma EPR w układzie zawierającym niesparowany elektron i jądro o spinie $m_I=1/2$

Występowanie struktury nadsubtelnej w widmach EPR i ich analiza pozwala na uzyskanie cennych informacji o budowie cząsteczkowej rodników i wzajemnych oddziaływaniach atomów tworzących centa paramagnetyczne [20].

3.5 Zastosowania spektroskopii EPR w badaniach biologicznych

Spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego pozwala na wykrycie oraz ilościową i jakościową charakterystykę molekuł posiadających niesparowane elektrony. Technika ta nie niszczy i nie zmienia struktury badanych molekuł czy materiałów, umożliwiając wielokrotny pomiar tej samej próbki, o ile nie zachodzą w niej zmiany spowodowane innymi czynnikami, np. upływem czasu, reakcjami chemicznymi jej składników. Wolne rodniki są wysoce reaktywne, chemicznie agresywne i nietrwałe ze względu na to, że dążą do uzupełnienia swojej pary i przez wiązanie się z innymi molekułami osiągnięcia sparowania elektronów na wszystkich orbitalach. Jest to stan bardziej stabilny. Istnieją jednak stabilne wolne rodniki, np. zakotwiczone w strukturze krystalicznej materiałów w fazie stałej, a także techniki pomiaru, które stabilizują reaktywne wolne rodniki w celu umożliwienia ich pomiaru EPR [22,23], są to tzw. techniki pułapkowania spinowego (spin-trapping). Naturalnie wolne rodniki tworzą się podczas podstawowych procesów enzymatycznych, a zwłaszcza podczas transportu elektronów

i w reakcjach utleniania i redukcji. Biochemia metaloenzymów jest obszarem badań, gdzie spektroskopia EPR wykorzystywana jest efektywnie i dzięki niej, razem z klasycznymi badaniami biochemicznymi, uzyskane zostały bardzo dokładne informacje na temat funkcjonowania niektórych enzymów. Wolne rodniki odgrywają istotną rolę w procesach starzenia i kancerogenezy, których badania często oparte są na spektroskopii EPR [24,25,26,27]. Spektroskopia EPR odegrała również istotną rolę w zrozumieniu procesu fotosyntezy; w procesie tym w trakcie absorpcji światła przez chlorofil tworzą się niesparowane elektrony [28].

Badania EPR obiektów biologicznych prowadzi się również stosując technikę sond i znaczników spinowych (spin labelling), która polega na wprowadzeniu sztucznie do badanych układów (np. komórek lub ich fragmentów) trwałych paramagnetycznych molekuł, które w normalnych warunkach w nich nie występują, np. nitroksylowe znaczniki spinowe w badaniach struktury białek i błon komórkowych [29,30]. Metodą spektroskopii EPR bada się zmiany ich stężenia i struktury widm EPR, odzwierciedlające wpływ na sondę (np. na stopień jej unieruchomienia) najbliższego otoczenia chemicznego.

Ważnym obszarem zastosowań spektroskopii EPR jest biologia radiacyjna. Głównym pośrednim skutkiem działania promieniowania jonizującego w materiałach biologicznych jest generacja wolnych rodników. Technika EPR wniosła istotny wkład w badania mechanizmu zniszczeń biomolekuł, komórek i tkanek wywołanych działaniem promieniowania jonizującego [17,31,32,33].

3.6 Dozymetria EPR promieniowania jonizującego

Dozymetria promieniowania jonizującego metodą EPR polega na pomiarze natężenia widm EPR w substancjach pełniących rolę detektora/dozymetru. Natężenie widma jest uzależnione od stężenia stabilnych wolnych rodników, które powstały w wyniku oddziaływania promieniowania z materiałem dozymetru. Materiał, który może być stosowany jako dozymetr EPR, powinien spełniać następujące praktyczne kryteria:

- stabilność generowanego radiacyjnie sygnału umożliwiająca jego wiarygodny pomiar w czasie co najmniej kilkudziesięciu minut po napromieniowaniu,

- monotoniczna zależność natężenia sygnału dozymetrycznego EPR od pochłoniętej dawki,
- wysoka wydajność radiacyjna generowanych rodników,
- niezależność od mocy dawki w szerokim zakresie jej wartości.

Czułość radiacyjna materiału detektora określa też jego minimalny rozmiar (masę) gwarantujący wiarygodny odczyt dawki. Pożądaną ważną cechą jest to, aby naturalny sygnał EPR tła materiału dozymetrycznego (tzn. sygnał natywny z nienapromieniowanego detektora) nie maskował sygnału generowanego radiacyjnie.

Ogólnie w dozymetrii EPR wykorzystuje się materiały wyprodukowane sztucznie oraz materiały występujące naturalnie. Wśród tych pierwszych należy przede wszystkim wymienić krystaliczną alaninę, która wykazuje wysoką czułość na promieniowanie i stabilność rodników generowanych radiacyjnie. W alaninie rodnikiem, który jest głównie odpowiedzialny za generację sygnału dozymetrycznego jest $\text{CH}_3\text{C}^\bullet\text{HCOO}^-$ powstały wskutek rozerwania wiązania grupy aminowej z węglem α w cząsteczce alaniny [34]. Sygnał dozymetryczny w detektorach alaninowych utrzymuje się latami, jest mało wrażliwy na warunki środowiskowe z wyjątkiem ekspozycji na silne światło [35] i wysoką wilgotność powietrza [36]. Dozymetria alaninowa jest wiarygodną metodą dozymetryczną, uznaną i używaną przez takie instytucje jak IAEA czy NIST [37,38,39]. Wykazano również jej przydatność w dozymetrii medycznej [40,41,42,43] oraz dla pomiarów promieniowania o wysokim LET [44,45,46]. Z innych materiałów mających zastosowanie w dozymetrii EPR można wymienić cukier i szkło. Cukier został dostrzeżony jako potencjalny uniwersalny dozymetr dla ludności w przypadku wypadków radiacyjnych ze względu na powszechność występowania. Promieniowanie generuje w cukrze długo żyjące sygnały EPR, a minimalny poziom detekcji w cukrze oscyluje pomiędzy 5 cGy do 10 cGy [47,48]. Właściwości dozymetryczne ma również szkło komercyjne zarówno bezbarwne jak i barwione. Obecne w szkle żelazo jest w większości pod postacią jonów Fe^{2+} . Napromieniowanie indukuje powstawanie w szkle jonów Fe^{3+} , których sygnał widoczny jest w widmie mierzonej próbki szkła. Badania pokazały, że próbki szkła przezroczystego, brązowego i zielonego mogą być używane jako γ -dozymetry EPR wysokich dawek (do kilkudziesięciu kGy) do pomiarów dawek w procesach dezynfekcji, oczyszczania wody i sterylizacji żywności [49]. Trwają również badania nad wykorzystaniem w dozymetrii szkła z powszechnie stosowanych urządzeń elektronicznych takich jak tele-

fony komórkowe, zwłaszcza szkła z ciekłokrystalicznych wyświetlaczy LCD. Wykazano generację w tych szklach stabilnych sygnałów EPR umożliwiającą detekcję dawki na poziomie 1 Gy [50,51].

Szczególnie ważną dla dozymetrii powypadkowej jest możliwość pomiaru indukowanych radiacyjnie sygnałów EPR w napromieniowanych materiałach pochodzenia biologicznego. W większości tkanek biologicznych wygenerowane radiacyjnie wolne rodniki są nietrwałe i zanikają po kilku sekundach. W tkankach twardych, takich jak np. kości i szkliwo zębów, wygenerowane radiacyjnie wolne rodniki są niezwykle trwałe, a ich połowiczny okres zaniku in vitro jest długi, sięgający 10^9 lat w temperaturze pokojowej [8,52]. Szkliwo zębów może pełnić rolę dozymetru ponieważ promieniowanie jonizujące generuje w nim stabilne jonorodniki $\text{CO}_2^{\cdot-}$ powstające z węglanów znajdujących się w hydroksyapatycie, głównym składnikiem budulcowym szkliwa zębów. Są one źródłem charakterystycznego, asymetrycznego sygnału EPR, a dozymetria oparta jest na pomiarze intensywności zarejestrowanego sygnału [53]. Brak metabolizmu tkanki szkliwa lub wolny przebieg procesów przebudowy w kości zbitej umożliwiają pomiar sygnału EPR w szkliwie i kości i określenie indywidualnej lokalnej dawki pochłoniętego in vivo promieniowania nawet po upływie lat od napromieniowania. Przykładem może być retrospektywna dozymetria EPR w szkliwie przeprowadzona po prawie 40 latach od napromieniowania u osób ocalałych po wybuchach bomb atomowych w Hiroshimie i Nagasaki [54,55], a także u ludzi napromieniowanych w rezultacie wybuchu reaktora jądrowego w Czarnobylu, zarówno u mieszkańców tego obszaru, pracowników jak i osób, które pracowały przy usuwaniu skutków wybuchu [3,4]. Dozymetrię EPR w szkliwie wykorzystano również do określenia dawek u ludności zamieszkującej region dawnego rosyjskiego poligonu nuklearnego w okolicach Semipałatyńska w Kazachstanie [56,57]. Historia dozymetrii EPR opartej na szkliwie sięga 1963 roku, kiedy Cole i Silver zaobserwowali sygnały generowane radiacyjnie we fragmencie siekacza od 7 letniego dziecka. Autorzy zarejestrowali sygnały EPR przynajmniej trzech typów centrów paramagnetycznych [58]. Po raz pierwszy użycie szkliwa zębów jako dozymetru zaproponował w 1968 roku Brady i współpracownicy [59]. Wykazali oni, że sygnał radiacyjny EPR w szkliwie rośnie liniowo z dawką pochłoniętego promieniowania, a minimalna wykrywalna dawka metodą EPR to 1 Gy. Jedynym istotnym ograniczeniem stosowalno-

ści dozymetrii EPR ex vivo w szkliwie jest pozyskiwanie materiału badawczego wymagające ekstrakcji zęba lub części szkliwa [60]. Obecnie jednak trwają intensywne prace nad opracowaniem metod pomiaru EPR in vivo w zębach, jednak ich czułość wciąż jest o rząd wielkości niższa niż dla pomiarów metodą tradycyjną [61,62].

Ostatnio wznowiono badania nad wykorzystaniem paznokci jako materiału do określania dawki pochłoniętego promieniowania. W przypadku paznokci jednym z czynników ograniczających jest obecność artefaktów pochodzących od mechanicznych naprężeń powstających w trakcie pobierania materiału. Sygnały EPR generowane mechanicznie nakładają się na sygnał radiacyjny i zakłócają identyfikację sygnału dozymetrycznego. Dodatkowym utrudnieniem jest podobieństwo spektralne sygnału radiacyjnego do sygnałów tła. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi, minimalna dawka wykrywalna metodą dozymetrii EPR w paznokciach to 1-2 Gy [1].

Potencjalnie, jako naturalny dozymetr EPR mogą być wykorzystywane ludzkie włosy, w których promieniowanie generuje wolne rodniki w strukturze α – keratyny. Jednak silny sygnał tła, pochodzący od rodników melaninowych, o natężeniu zależnym od koloru włosów oraz niska wydajność radiacyjna rodników dają w konsekwencji niską czułość detekcji dawki na poziomie kilkudziesięciu Gy [32], co wyklucza praktyczne wykorzystanie włosów jako materiału dozymetrycznego w większości wypadków radiacyjnych. Dodatkowo, utrudnieniem jest zależność szybkości zaniku sygnału dozymetrycznego w ludzkich włosach od koloru włosów i ich wilgotności, wskutek czego pomiary EPR napromieniowanych włosów powinny rozpocząć się do 24 h po napromienowaniu [63].

W 1955 roku W. Gordy i inni zarejestrowali po raz pierwszy sygnał EPR w kości pochodzący od wygenerowanych radiacyjnie wolnych rodników. Sygnał ten zarejestrowany został w napromieniowanych kościach czaszki. Pierwszy pomiar wykonany był zaraz po napromienowaniu, kolejne po trzech tygodniach, co wykazało, że generowany radiacyjnie sygnał EPR w tkance kostnej jest stabilny w czasie [31].

4 Tkanka kostna jako dozymetr

Głównym składnikiem mineralnej części kości i szkliwa zębów jest hydroksyapatyt. Z powodu braku procesów metabolicznych w szkliwie, sygnał EPR rodników generowanych przez promieniowanie w szkliwie zębów jest stały przez cały okres życia człowieka, natomiast w kości w warunkach in vivo zachodzą procesy remodelingu, co może wpływać na zanik intensywności sygnału dozymetrycznego z upływem czasu po napromieniowaniu. Fragmenty tkanki kostnej usuwane z określonego miejsca mogą być wykorzystane do określenia punktowej dawki pochłoniętego promieniowania zaraz po napromieniowaniu, co może być bardzo przydatne w celu określenia wielkości napromieniowanego obszaru kiedy przebieg zdarzenia nie jest znany [33].

Sygnał EPR w kościach jest generowany przez każdy rodzaj promieniowania jonizującego: promieniowanie fotonowe, elektronowe jak również cząstki α i jony [64,65,66]. Obecnie wiele mówi się o bezpieczeństwie żywieniowym i kontroli dawki w żywności konserwowanej promieniowaniem jonizującym. Tkanka kostna wykorzystywana jest jako dozymetr promieniowania jonizującego [67] zgodnie z procedurami Europejskiej komisji w zakresie bezpieczeństwa żywienia w celu identyfikacji napromieniowanej żywności metodą spektroskopii EPR. Jest to analityczna metoda ustandaryzowana przez CEN (Europejski Komitet Normalizacyjny). Zgodnie z europejską procedurą PN-EN 1786 detekcje napromieniowanej żywności w Polsce prowadzi Instytut Chemii i Techniki Jądrowej (ICHTJ) w Warszawie [68].

Promieniowanie jonizujące generuje w kości asymetryczny sygnał RIS (Radiation Induced Signal). Wykazano liniową zależność jego amplitudy od dawki promieniowania w zakresie do co najmniej 200 Gy dla kości człowieka [69], do 15 kGy w deproteinizowanych kościach ludzkich, 200 Gy w kościach królika [70] i do 6-10 kGy w kościach kurczaków [71,72,73]. Sygnał ten pochodzi od tworzących się wolnych rodników $\text{CO}_2^{\bullet-}$ w strukturze hydroksyapatytu w części mineralnej kości [74].

Struktura rodników odpowiedzialnych za sygnał dozymetryczny RIS ma symetrię osiową o chaotycznym rozkładzie orientacji poszczególnych rodników w badanej próbce. Na niesparowany elektron związany w atomie oddziałują sąsiednie elektrony i wartość współczynnika rozszczepienia spektroskopowego g ulega zmianie pod wpływem

oddziaływania najbliższego otoczenia, zależnego od orientacji orbitali w zewnętrznym polu magnetycznym. W ogólności, w przypadku anizotropii oddziaływania między polem magnetycznym a niesparowanym elektronem, wprowadzić należy trzy wartości czynnika g tworzące macierz tensora g o rozmiarze 3×3 .

$$g = \begin{pmatrix} g_{xx} & g_{xy} & g_{xz} \\ g_{yx} & g_{yy} & g_{yz} \\ g_{zx} & g_{zy} & g_{zz} \end{pmatrix} \quad (10)$$

Tensor g jest symetryczny i po diagonalizacji zawiera trzy elementy leżące po przekątnej, odpowiadające współczynnikom g dla trzech ortogonalnych orientacji pola magnetycznego.

$$g = \begin{pmatrix} g_{xx} & 0 & 0 \\ 0 & g_{yy} & 0 \\ 0 & 0 & g_{zz} \end{pmatrix} \quad (11)$$

W przypadku sieci krystalicznej o symetrii osiowej, $g_{xx} = g_{yy}$, i wprowadza się oznaczenie $g_{\perp} = g_{yy} = g_{xx}$ dla kierunku pola prostopadłego i $g_{\parallel} = g_{zz}$ dla kierunku równoległego do osi symetrii układu. W polikrystalicznej próbce o chaotycznej orientacji kryształków statystycznie więcej kryształów ma oś symetrii skierowaną prostopadle niż równoległe do linii pola magnetycznego. Dlatego większa amplituda sygnału występuje dla wartości pola odpowiadającego wartości $g = g_{\perp}$, a mniejsza dla pola odpowiadającego wartości $g = g_{\parallel}$. W kształcie widma EPR takiej próbki (Rys. 6) zawarta jest informacja o wartościach g_{\perp} i g_{\parallel} [75].



Rys. 6. Widmo modelowe EPR centrum paramagnetycznego o symetrii osiowej (a) oraz (b) widmo eksperymentalne rodnika $\text{CO}_2^{\cdot -}$ [76].

Widmem natywnym nienapromieniowanej kości jest symetryczny sygnał (Rys.19) pochodzący od jej części organicznej [77,78], nazywany sygnałem tła (BG). Nakłada on się na widmo generowane radiacyjnie (RIS) i zakłóca tym samym pomiar sygnału dozymetrycznego – wymaga to zastosowania procedury separacji sygnałów RIS i BG dla celów dozymetrii promieniowania. Pomiar generowanego radiacyjnie sygnału EPR w kościach z powodzeniem wykorzystywany są w archeologii do datowania zarówno szczątków zwierzęcych jak i ludzkich [79,80]. Metoda EPR zastosowana została także w określaniu dawek pochłoniętego promieniowania w próbkach tkanki kostnej używanej do przeszczepów i poddawanych sterylizacji wysokimi dawkami promieniowania jonizującego. Kontrola dawki jaką zostały napromieniowane tkanki przeznaczone do przeszczepu ważna jest ze względu na zapewnienie efektywności niszczenia drobnoustrojów, prionów i wirusów potencjalnie się tam znajdujących [81].

4.1 Przykłady zastosowania dozymetrii EPR w kości w dozymetrii powypadkowej

Już Brady i inni [82] w 1968 r zasugerowali użycie techniki EPR przy określaniu dawek pochłoniętego promieniowania poprzez ponowne napromieniowanie zmineralizowanych tkanek od osób, które uległy wypadkom radiacyjnym. Metodę tą w ostatnich dekadach zastosowano już wielokrotnie w celu określenia dawek pochłoniętych przez ofiary w wypadkach radiacyjnych. Przykłady tych zastosowań to:

W lutym 1989 w San Salvador wydarzył się wypadek w przemysłowej placówce DELMED zajmującej się napromieniowywaniem plastikowych produktów medycznych w celu sterylizacji. Trzech pracowników zostało narażonych na znaczące dawki promieniowania. Wypadek ten spowodował u nich ciężkie objawy choroby popromiennej i zakończył się amputacją kończyn dolnych u dwóch z pracowników: u pacjenta A po 132 dniach, a u pacjenta B po 161 dniach. Dawkę pochłoniętego promieniowania określono metodą dozymetrii EPR poprzez dopromieniowanie uzyskanych fragmentów kostnych i ekstrapolację liniowej zależności amplitudy sygnału dozymetrycznego od dawki. Dawki pochłoniętego promieniowania określone metodą EPR wynosiły odpowiednio dla pacjenta A na wysokości kości udowej 11 ± 6 Gy, na wysokości piszczeli 32 ± 5 Gy. Dla pacjenta B na wysokości kości udowej 7 ± 3 Gy, na wysokości piszczeli 26 ± 6 Gy. Dawki oszacowane na podstawie stopnia i obszaru zniszczenia warstwy naskórka wynosiły u pacjenta A na wysokości kości udowej 10-15 Gy ,na wysokości piszczeli >30 Gy, u pacjenta B na wysokości kości udowej 3-15 Gy ,na wysokości piszczeli >30 Gy [83].

W 1991 roku nogi, ręce i głowa operatora akceleratora w Maryland, USA. znalazły się w obszarze wiązki promieniowania gdy napięcie żarnika źródła elektronów było wyłączone, ale z włączonym pełnym potencjałem przyspieszenia na terminalu wysokiego napięcia. Spowodowało to, że operator został wystawiony na działanie tzw. czarnego prądu elektronów. Trzy miesiące po wypadku palce rąk i nóg ofiary zostały amputowane. Dawki określone z próbek tkanki kostnej otrzymanej w wyniku amputacji z wykorzystaniem metody dozymetrii EPR metodą dawki dodanej zawierały się w zakresie 55-108 Gy i były zgodne z dawkami określonymi z wykorzystaniem dozymetrii ala-

ninowej i radiochromowego filmu dozymetrycznego podczas rekonstrukcji przebiegu wypadku [84].

W Polsce w Centrum Onkologicznym w Gdyni w 1999 roku zaistniało podejrzenie przedawkowania podczas radioterapii w leczeniu choroby Hodgkina na podstawie pojawienia się nekrozy tkanek w okolicy pachy prawej. Dawka zaplanowana wynosiła 32 Gy w 20 frakcjach po 1,6 Gy podawanych przez pięć dni w tygodniu. Podczas chirurgicznego zabiegu rekonstrukcji tkanek klatki piersiowej pobrany został fragment tkanki kostnej z żebra pierwszego prawego i w 2005 roku w określono w nim dawkę pochłoniętego promieniowania metodą metodą EPR. Otrzymany fragment kostny podzielony został na dwie części pierwszy otrzymał IChTJ (Instytut Chemii i Techniki Jądrowej) podzielił na cztery mniejsze fragmenty w celu określenia homogeniczności dawki. Zakres dawki w podzielonych przez IChTJ fragmentach zawierał się w zakresie 2-28 Gy. Drugi fragment kostny otrzymał IRSN (Institute of Radiological Protection and Nuclear Safety), który podzielił go na trzy fragmenty S1, S2, S3, w których dawkę określono odpowiednio $6,9 \pm 0,7$, $4,5 \pm 0,7$, $10,2 \pm 1,1$ [2]. Ocena dokładności dozymetrii EPR była trudna, gdyż pomiary wykonano kilka lat po radioterapii, a pojawienie się nekrozy w próbkach tkanki kostnej wg autorów tej pracy mogło wpłynąć na poziom mierzonego sygnału EPR. W lutym 2001 roku w Białostockim Centrum Onkologii pięć pacjentek z rakiem piersi podczas sesji radioterapii zostało napromieniowanych zbyt dużą dawką z powodu awarii przyspieszacza. Na przełomie wiosny/lata 2002 roku wszystkie pacjentki przeszły chirurgiczną rekonstrukcję ściany klatki piersiowej łącznie z transplantacją skóry w Instytucie Curie w Paryżu. Od trzech pacjentek podczas operacji zostały usunięte fragmenty żeber i wykorzystano je w celu pomiaru dawki promieniowania metodą EPR [2]. Pomiary EPR wykonały dwa laboratoria: francuskie (IRSN z Paryża) i polskie (IChTJ z Warszawy) uzyskując zbieżne wyniki. U jednej pacjentki z Białegostoku dawka oszacowana metodą EPR przez oba zespoły: 98 ± 10 Gy (IRSN) oraz 95 ± 6 Gy (INCT) zgadzała się z tą wyliczoną przez fizyków medycznych. U pozostałych dwóch pacjentek dawka określona metodą EPR była o 20-30 % niższa od obliczonej przez fizyków medycznych. Wg autorów pracy, różnica mogła wynikać z błędnego umiejscowienia usuniętego fragmentu tkanki kostnej na planie przestrzennego rozkładu dawki (w obszarze silnego gradientu dawki).

W czerwcu 2006 roku w Senegalu doszło do poważnego wypadku napromienienia kilku osób źródłem ^{192}Ir z przemysłowego systemu kontroli radiograficznej, opisanego przez Clairand'a i innych [85]. U jednego z pacjentów do rekonstrukcji dawki użyto dwóch fragmentów kostnych uzyskanych podczas biopsji. W pierwszym uzyskanym fragmencie dawkę określono metodą EPR na poziomie $53,5 \pm 3,7$ Gy, a w drugim $44,4 \pm 4,9$ Gy. U tego samego pacjenta również zrekonstruowano dawki w szkliwie zębów dwoma technikami: poprzez numeryczną symulację warunków napromieniania używając metody Monte Carlo (prawy ząb $3,3$ Gy) oraz metodą dozymetrii EPR (dolny prawy pierwszy ząb trzonowy $4,9 \pm 0,3$).

A. Kinoshita i inni [86] opisali przypadek technika, u którego po przypadkowym napromienianiu ^{60}Co w jednostce radioterapii po ok. 4 latach został amputowany palec trzeciej ręki. Metodą dozymetrii EPR określono dawkę w kości na poziomie $6,5 \pm 0,5$ Gy. U tego pacjenta również pobrano próbki krwi w celu określenia dawki metodą FISH (fluorescencyjna hybrydyzacja in situ) na podstawie częstości występowania translokacji w genomie oraz oszacowano prawdopodobną dawkę pochłoniętą na podstawie czasu ekspozycji. Próbki krwi pobrane zostały cztery lata po wypadku. Dawka pochłonięta została określona na poziomie $0,4 \pm 0,6$ Gy. Jednak procedury tej nie można uznać za w pełni adekwatną do dozymetrii EPR, która mierzy dawkę lokalną, a nie uśrednioną po całej objętości ciała. Po korekcji uwzględniającej efekt „rozcieńczenia” średniej dawki w limfocytach krążącej krwi oszacowana dawka na poziomie 20 ± 3 Gy. Symulacje obliczeniowe dały wartość $9,3$ Gy. Pomimo czasu jaki upłynął od wypadku do wykonanej analizy dozymetrycznej, sygnał w kości wygenerowany promieniowaniem jonizującym wciąż był wykrywalny metodą EPR. Zgodnie z danymi histologicznymi i kartą pacjenta, przepływ krwi w palcu był zaburzony co mogło spowolnić mechanizm przebudowy kości i umożliwiło tą analizę nawet cztery lata po wypadku. Wartość dawki uzyskana metodą EPR była najprawdopodobniej mniejsza niż rzeczywista pochłonięta dawka, jednak pozwalała na określenie minimalnej dawki pochłoniętej przez ofiarę.

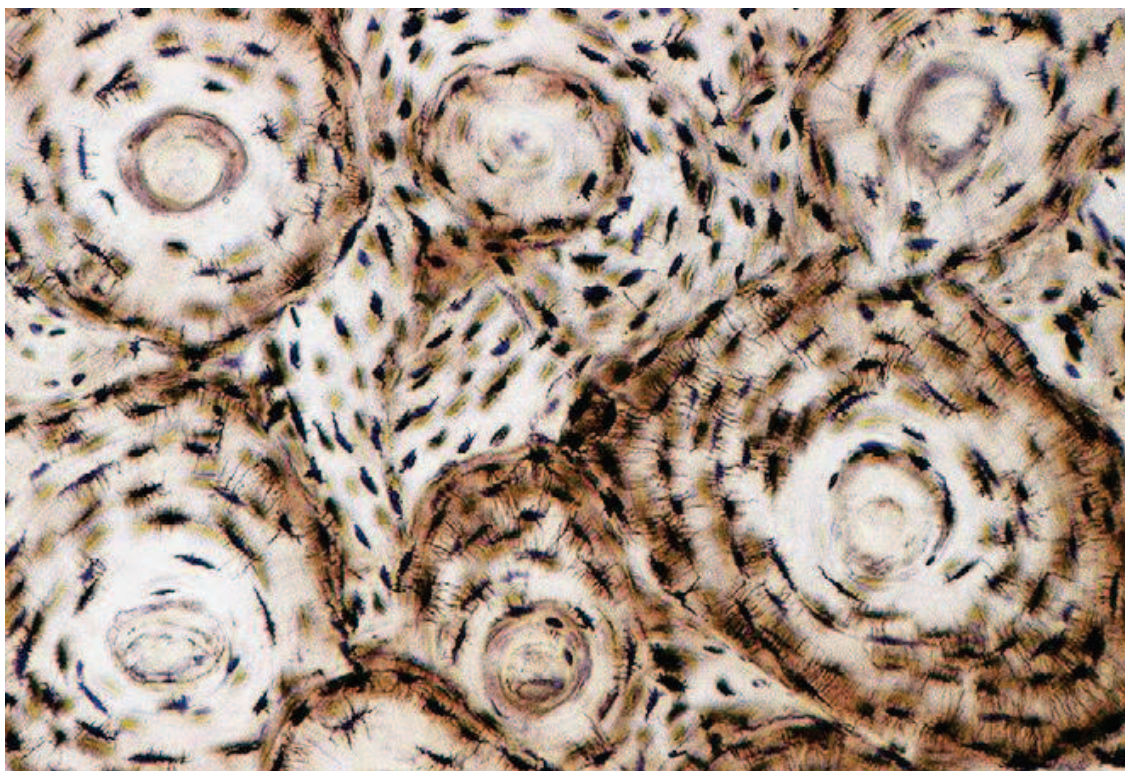
4.2 Budowa tkanki kostnej

Tkanka kostna jest typowym reprezentantem biominerałów. Jest tkanką unaczynioną i wysoce zmineralizowaną. Większość komórek wbudowana jest w zewnątrzkomórkową matriks zbudowaną z materiałów organicznych i nieorganicznych soli bogatych w wapń i fosfor. Jej struktura może być zbita o wysokiej gęstości lub gąbczasta z licznymi przestworami, gdzie pojedynczy element kostny stanowi tzw. beleczka kostna. Występowanie kości zbitej zwykle ogranicza się do części zewnętrznej dojrzałych kości, tzw. kory. Ma ona wielkie znaczenie w zapewnianiu wysokiej wytrzymałości mechanicznej struktur kostnych. Jej grubość i architektura jest zmienna w różnych kościach, w zależności od kształtu kości, pozycji i pełnionej funkcji. Kości są rezerwuarem metabolicznego wapnia. Zawarte jest w nich ok 99% wapnia oraz fosforanów całego ciała. Proporcje pomiędzy zawartością kości zbitej i gąbczastej różnią się w zależności od rodzaju kości. Mikroskopowo kość składa się z wyspecjalizowanych komórek: osteoblastów, osteocytów, osteoklastów oraz komponentów okostnej, endosteum i szpiku. W substancji podstawowej kości występują liczne włókna kolagenowe. W dojrzałej kości macryca jest delikatnie nawilżona i około 10-20% jej masy stanowi woda. Około 60-70% suchej masy kości stanowią nieorganiczne składniki mineralne. Kolagen stanowi około 30% suchej masy kości, reszta to niekolagenowe białka i węglowodany, głównie sprzężone jako glikoproteiny występujące w niewielkiej liczbie. Proporcje tych składników różnią się w zależności od wieku, lokalizacji i stanu metabolicznego kości.

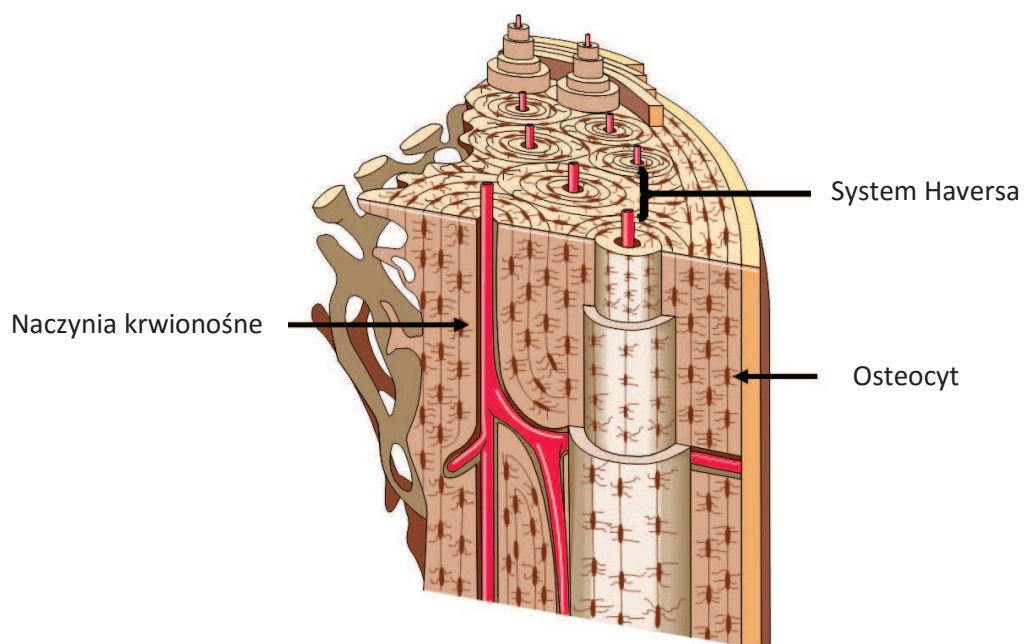
Minerałami kości są nieorganiczne składniki substancji międzykomórkowej tkanki kostnej. To one nadają twardość i sztywność kościom. Obecność wapnia i fosforu oraz wysoka gęstość kości są głównymi powodami, dla których kości są tak wyraźnie widoczne na zdjęciach rentgenowskich. Większość substancji mineralnych kości jest kwaso-rozpuszczalna i mogą one być usunięte przez chelatory wapnia takie jak cytryniany lub etylen diaminotetraoctowy (EDTA). Kość, mimo iż zachowuje swój kształt jest bardzo elastyczna. Część mineralna dojrzałych kości składa się głównie z kryształów hydroksyapatytu wraz z niewielką zawartością fosforanu wapnia. Hydroksyapatyt kości zawiera węglany i charakteryzuje się mniejszym stosunkiem zawartości wapnia do fosforu niż chemicznie czysty hydroksyapatyt ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Kryształy hydroksyapatytu

są małe, ale mają dużą powierzchnię i przybierają formę cienkich płytek lub struktur podobnych do liści, a ich wielkość dochodzi do 150 nm długości, 80 nm szerokości i 5 nm grubości. Zazwyczaj są one poukładane blisko siebie. Ich dłuższy bok leży wzdłuż biegnących obok włókien kolagenowych. Wąskie szczeliny pomiędzy kryształami zawierają związaną wodę i organiczne makrocząsteczki. Główne jony, które tworzą część mineralną kości to jony: wapnia, fosforu, jony węglanowe i grupy hydroksylowe. W mniejszej ilości występują cytryniany, magnez, sód, potas, fluor, chlorki, żelazo, cynk, miedź, aluminium, ołów, stront, krzem i bor. Koncentracja substancji mineralnych w młodych osteonach jest niska i rośnie wraz z ich dojrzewaniem i u osób dorosłych osiąga poziom od 70% do 80% masy tkanki kostnej [87].

Zbita tkanka kostna zbudowana jest z koncentrycznych blaszek wapnia i innych minerałów otaczających kanał Haversa zawierający naczynia krwionośne i nerwy. Okrężna struktura mikroskopowa tej tkanki przyczynia się do utworzenia w niej kolumn, które odpowiadają za wytrzymałość kości na naprężenia, tworzą one podstawową strukturę kości zbitej zwaną systemem Haversa [88]. Obraz mikroskopowy przekroju poprzecznego kości i schemat budowy mikrostruktury kości przedstawiają odpowiednio Rys. 7 i Rys.8.



Rys. 7 Widok kości w przekroju poprzecznym [87].



Rys. 8 Mikrostruktura kości- schemat budowy [89].

Szacuje się, że około 10 % masy dojrzałych zdrowych kości szkieletowych każdego roku ulega procesowi remodelingu. Stopień i prędkość przebudowy kości zależą od liczby osteonów, wieku kości, płci i stanu zdrowia [90].

5 Badania własne

Na badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej uzyskano zgodę nr NKBBN/502-499B/2012 Niezależnej Komisji Bioetycznej ds. Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym. Wszystkie badania próbek wykonane zostały w Katedrze i Zakładzie Fizyki i Biofizyki Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

5.1 Materiał i metody

Materiał badawczy:

- próbki nienapromieniowanej tkanki kostnej pochodziły z części korowej kości piszczeli 40 letniego mężczyzny ofiary wypadku samochodowego, w wyniku którego pacjentowi amputowano nogę. Do chwili rozpoczęcia badań fragmenty kości po amputacji przechowywane były w lodówce w 70 % roztworze etanolu przez około rok przed ich spreparowaniem do pomiarów EPR.
- próbki kości szczęki i żuchwy uzyskane od pacjentów po radioterapii wiązkami promieniowania obejmującymi obszar szczęki i żuchwy. Próbki te pobrano jako odpady medyczne po zabiegach ekstrakcji zębów wraz z usunięciem okolicznych fragmentów tkanki kostnej, wykonanych ze wskazań medycznych z powodów powikłań po radioterapii.

5.1.1 Przygotowanie próbek tkanki kostnej

Próbki do pomiarów EPR wycięto z większego fragmentu części korowej kości przy użyciu rotacyjnej piły diamentowej. Próbki miały kształt wydłużonego prostopadłościanu o grubości około 3 mm i od 6-19 mm wysokości (Rys. 9). Uzyskano 20 próbek nienapromieniowanej kości zbitej piszczelowej i 6 próbek z kości szczęki i żuchwy napromieniowanych podczas radioterapii. Wszystkie próbki przed rozpoczęciem doświadczeń zostały poddane suszeniu próżniowemu stosując dodatkowo tlenek wapnia jako czynnik suszący, po czym zmierzono ich widma EPR.

Próbki przechowywano w probówkach typu eppendorf w ciemnym i suchym miejscu w temperaturze pokojowej. W celu zaobserwowania wpływu warunków napromieniowania na generowany sygnał EPR, próbki pochodzące z kości piszczelowej napromieniowywane były na sucho lub zamoczone w wodzie. Jeżeli napromieniowanie odbywało się w wodzie, to próbki były umieszczane na co najmniej 24 godziny przed napromieniowaniem w temperaturze 6⁰ C w 1,5 ml probówkach typu eppendorf wypełnionych wodą. Podczas napromieniowania na mokro próbki znajdowały się w tych samych probówkach wypełnionych wodą w taki sposób, aby w probówce nie było pęcherzy powietrza. Po napromieniowaniu próbki były ponownie poddawane suszeniu próżniowemu przed wykonaniem pomiarów EPR. Podczas napromieniowywania na sucho próbki były umieszczone w woreczkach polietylenowych.



Rys. 9 Zdjęcie próbki tkanki kostnej zbitej na papierze milimetrowym.

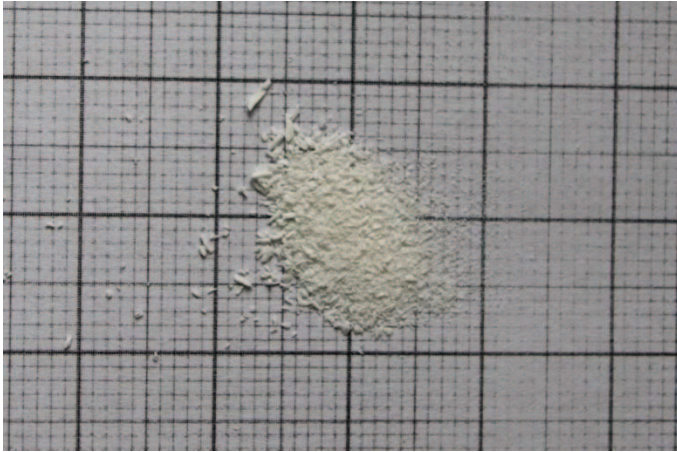
W celu określenia wpływu stopnia rozdrobnienia tkanki kostnej zarówno na sygnał EPR tła jak i na sygnał dozymetryczny, trzy próbki kości piszczelowej poddano krusze-

niu w agatowym mózdzierzu przed napromieniowaniem. Średnie rozmiary ziaren (Rys. 10) określono mierząc ich krawędzie na zdjęciach mikroskopowych, a następnie wykonano serię pomiarów sygnału EPR tych próbek w odstępach czasowych. Po ustabilizowaniu się sygnału w widmach próbek pokruszonych poddano je napromieniowaniu na mokro i na sucho, jak opisano powyżej.



Rys. 10 Zdjęcie pokruszonej próbki tkanki kostnej.

Dziesięć próbek z kości piszczelowej poddano hydrolizie zasadowej w celu usunięcia z nich części organicznej odpowiedzialnej za obecność sygnału tła. Aby określić wpływ hydrolizy zasadowej na redukcję masy próbki, natywny sygnał EPR tła i generowane sygnały dozymetryczne, próbki umieszczono w 2M KOH na 48 godzin w temperaturze 50⁰ C, co spowodowało rozpad próbek do drobnego granulatu. Następnie zgranulowane próbki wyflukano w wodzie poprzez kilkukrotne odwirowanie w wirówce laboratoryjnej, przepłukano w 80% roztworze etanolu i wysuszono próżniowo. Uzyskany drobnoziarnisty proszek przedstawia Rys. 11. Przed hydrolizą zmierzono widmo EPR wszystkich próbek w celu określenia wpływu hydrolizy na ich widmo EPR.



Rys. 11 Zdjęcie próbki tkanki kostnej po hydrolizie w 2M KOH.

Jedną z napromieniowanych próbek umieszczono w wodzie i przechowywano z lodówce mierząc przez okres jednego roku jej sygnał EPR w odstępach kilkumiesięcznych w celu zweryfikowania stabilności sygnału dozymetrycznego.

Między kolejnymi pomiarami EPR oraz napromieniowaniami próbki przechowywane były w stanie suchym, w temperaturze pokojowej, w ciemności, w probówkach typu eppendorf. Siedem próbek kości piszczelowej napromieniowano dwukrotnie. W pierwszym napromieniowaniu trzy próbki były zanurzone w wodzie, a cztery w stanie wysuszonym. Po napromieniowaniu wszystkie próbki mierzone były w regularnych odstępach czasu, aż do ustabilizowania się ich sygnałów EPR. Następnie próbki napromieniowano po raz drugi w odmiennych warunkach: próbki, które były po raz pierwszy napromieniowane na mokro po raz drugi zostały napromieniowane na sucho a próbki, które były napromieniowane po raz pierwszy na sucho zostały napromieniowane po raz drugi na mokro.

Napromieniowywanie próbek odbywało się w Katedrze i Klinice Onkologii i Radioterapii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Próbki napromieniowywane były promieniowaniem rentgenowskim o mocy 2 Gy/min przy użyciu przyspieszacza medycznego Clinac 2300 o napięciu 6 MV, w zakresie dawek od 5 Gy do 100 Gy (jednorazowo). W celu zapewnienia równowagi elektronowej podczas napromieniowywania próbki umieszczone były na głębokości maksymalnej dawki $d_{\max} = 1,5$ cm pod wodną matą żelową, na 5 cm macie żelowej leżącej na 10 cm warstwie plexi.

5.1.2 Pomiary EPR

Próbki kości zawsze były mierzone w temperaturze pokojowej w stanie suchym. Wszystkie pomiary EPR wykonane zostały na spektrometrze Bruker EMX 6/1 (Rys.12) wyposażonym w prostokątną wnękę rezonansową 4119HS W1/0430, pracującym w paśmie X o częstotliwości rezonansowej 9,85 GHz. Wnękę rezonansową został wyposażona w standard manganowy natężenia sygnału i pola magnetycznego w postaci jonów Mn^{2+} w proszku MgO. Standard umieszczony został w dolnej części wnęki rezonansowej w zatopionej kapilarze wsuniętej do trzpienia kwarcowego podtrzymującego od dołu rurkę pomiarową w ustalonej pozycji we wnęcie.



Rys. 12 Spektrometr Bruker EMX 6/1 wykorzystywany do pomiarów.

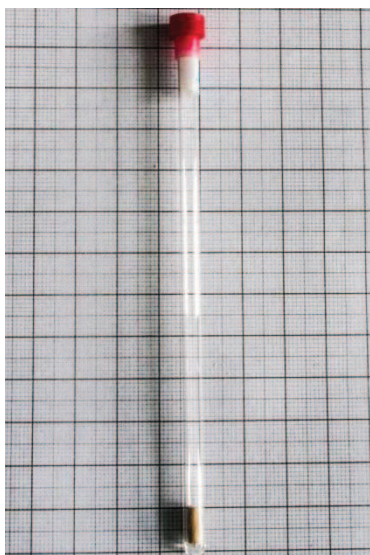
Do obsługi spektrometru używany był program WinEPR Acquisition wersja 4.33 dostarczony przez producenta spektrometru. Program zapewniał ustawienie parametrów pomiarów i ich monitorowanie, automatyczne dostrajanie wnęki rezonansowej oraz podgląd mierzonych widm. Tabela 1 przedstawia parametry spektrometru stosowane w pomiarach.

Tabela 1 Parametry pomiarów EPR.

Parametr	Wartość
Amplituda modulacji	0,3 mT
Moc mikrofalowa	5,14 mW
Stała czasowa	40,96 ms
Czas konwersji	40,96 ms
Liczba punktów	1024
Liczba uśrednianych skanów	10
Szerokość skanu	10 mT
Częstotliwość modulacji	100 kHz
Pole centralne	350,4 mT
Czas przemiatania	41,94 s

Do pomiarów zostały użyte kwarcowe rurki o średnicy wewnętrznej 4 mm, w których umieszczane były próbki w czasie pomiaru (Rys. 13). Przed wykonaniem pomiaru wysokość wypełnienia rurki pomiarowej próbką była mierzona suwmiarką w celu dodatkowego, poza normalizacją do masy, znormalizowania amplitudy sygnału EPR do wysokości wypełnienia wnęki rezonansowej. Pomiar jednej próbki wykonywany był w czterech pozycjach po obrotach rurki pomiarowej we wnęce spektrometru każdorazowo o ok 70° . Widma te uśredniano.

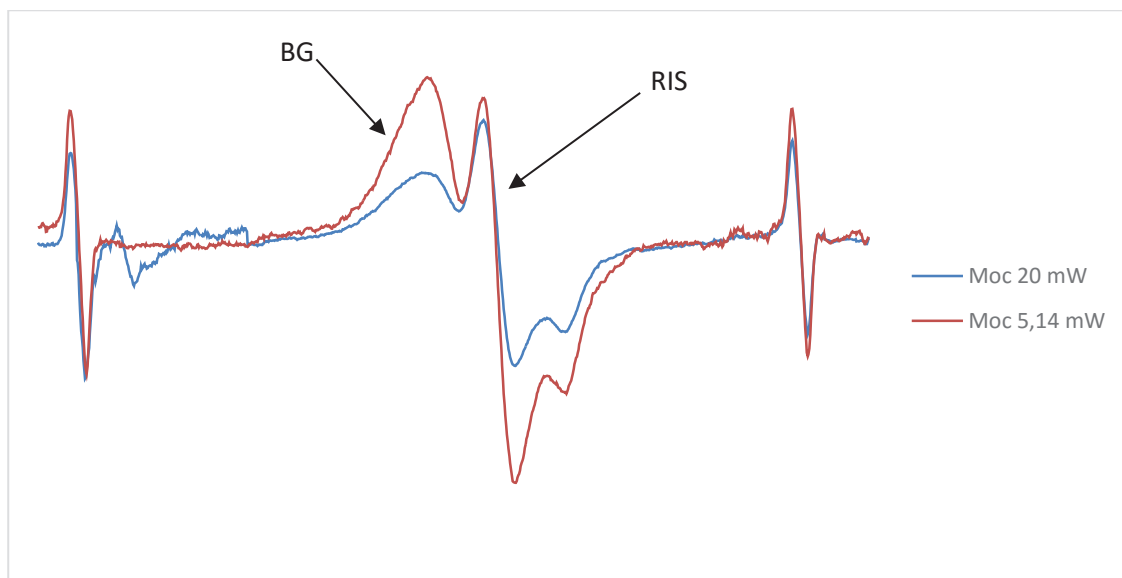
Widma EPR pustych rurek pomiarowych, po ich znormalizowaniu do linii standardu manganowego, były odejmowanej od widm uzyskanych po ich wypełnieniu próbkami i tylko takie sygnały były analizowane dalej.



Rys. 13 Rurka pomiarowa z próbką tkanki kostnej wewnątrz.

5.1.2.1 Wybór mocy mikrofalowej

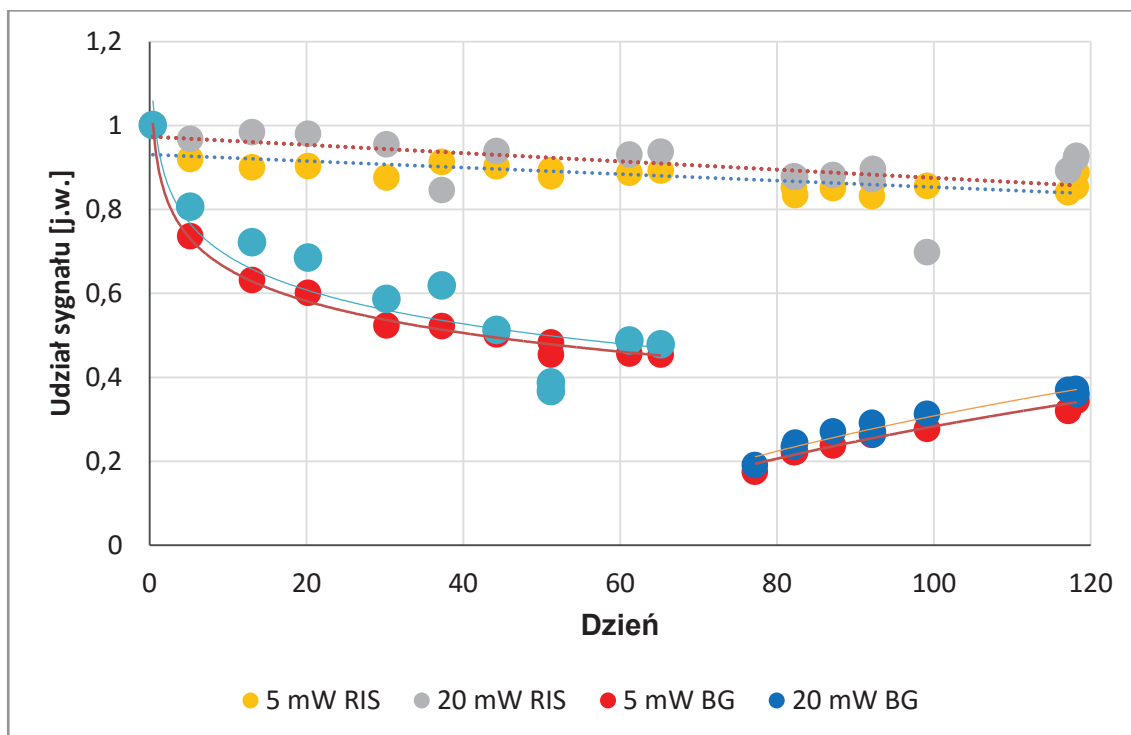
W metodologii spektroskopii EPR istotną rolę pełni odpowiedni dobór mocy mikrofalowej – przy braku nasycenia mikrofalowego wraz ze wzrostem mocy amplituda mierzonego sygnału wzrasta, jednak dla wysokich mocy często towarzyszy temu wzrost poziomu zakłóceń ze strony elektroniki toru mikrofalowego. Jeśli mierzony sygnał pochodzi od kilku rodników różniących się dynamiką nasycania mikrofalowego, pomiary przy wyższej mocy mikrofal mogą umożliwić lepsze wyodrębnienie poszczególnych składników spektralnych. Sytuacja taka ma miejsce w pomiarach EPR kości. Sygnał tła (BG) stanowiący zakłócenie sygnału dozymetrycznego RIS nasyca się dla niższej mocy mikrofalowej niż RIS, co przedstawia Rys.14.



Rys. 14 Widmo EPR próbki kości napromieniowanej dawką 100 Gy dla dwóch mocy mikrofalowych.

Tak więc można było oczekiwać, że wybór wyższej mocy mikrofalowej powinien korzystnie wpłynąć na dokładność pomiaru składnika RIS w napromieniowanych kościach.

W celu wyboru odpowiedniej mocy mikrofalowej do pomiarów EPR próbek przeprowadzono serię pomiarów dwóch próbek kości napromieniowanych dawką 100 Gy w czasie około sześciu miesięcy. Każdy pomiar był wykonywany dla dwóch mocy mikrofalowych 5,14 mW i 20 mW. Wyniki dla obu mocy porównano pod względem fluktuacji wartości udziału sygnału dozymetrycznego RIS i udziału sygnału tła BG w widmach EPR w odniesieniu do średniej tendencji ich zmian wyrażonych przez dopasowanie regresji liniowej (dla sygnału dozymetrycznego RIS w przedziale 13-118 dni) i dwóch krzywych wykładniczych $a_0 + a_1 \cdot \exp(-a_2 \cdot t)$ (jednej dla sygnału tła BG w przedziałach 0-65 dni i drugiej w przedziałach 77-118 dni) (Rys.15 i 16).



Rys. 15 Udziały sygnałów RIS i BG w widmie EPR próbki napromieniowanej dawką 100 Gy unormowane do ich wartości początkowych. Próbka została 65 dnia (strzałka) umieszczona na 5 dni w wodzie, co spowodowało ok. 2-krotny spadek sygnału BG.

Zaobserwowano znacząco większe fluktuacje natężeń sygnałów EPR mierzonych przy wyższej mocy mikrofalowej. Analizę ilościową różnic między wynikami dla obu mocy przeprowadzono obliczając sumy kwadratów odchyłeń poszczególnych wyników od dopasowanej funkcji oraz odchylenie standardowe. Dane te oraz obserwacje jakościowe dotyczące pracy spektrometru przedstawia Tabela 2. Dla uzyskanych danych przeprowadzono również analizę korelacji wyników dla obu mocy w programie Slide Write Plus wersja 7.01.

Tabela 2 Wyniki analizy wpływu mocy na udział sygnału BG i RIS.

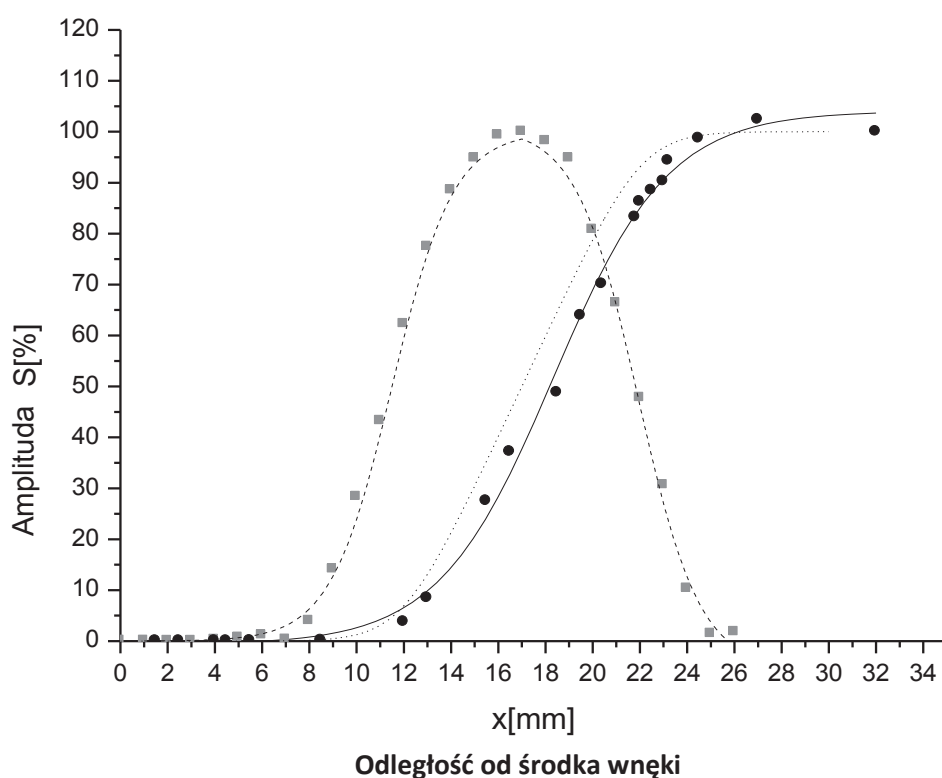
Parametr	Wartość			
	Dni 0-65		Dni 77-118	
Moc	20 mW		5,14 mW	
Suma kwadratów odchyłeń (RIS)	0,145		0,014	
Suma kwadratów odchyłeń (BG)	0,036	0,0009	0,009	0,0007
	Konieczność ręcznego dostrajania spektrometru		Automatyczne dostrajanie się spektrometru	
	Prąd diody poza zalecanym zakresem podczas trwania pomiaru		Stabilny prąd diody podczas pomiaru	
			Znacznie mniejsze szумы występujące podczas pomiaru w porównaniu do pomiaru dla mocy 20 mW	

Z przeprowadzonej analizy wywnioskowano, że różnice wartościach sygnału RIS i BG dla tych dwóch mocy są statystycznie nieistotne jednak dla mocy 20 mW występują większe wahania ich wartości w sensie odchylenia poszczególnych wartości od dopasowanej krzywej przedstawiającej trend w ewolucji czasowej obu sygnałów.

W oparciu o wyżej przedstawioną analizę porównawczą precyzji pomiarów wykonanych przy dwóch wartościach mocy mikrofalowych oraz uwzględniając fakt, że stosowanie niższych mocy (w zakresie 2-5 mW) dawało dobre wyniki w pomiarach takich samych rodników (CO_2^*) we wcześniejszych pracach dotyczących dozymetrii EPR w szklivie [91,92] podjęto decyzję o wyborze mocy 5,14 mW do dalszych pomiarów EPR dla wszystkich przedstawionych niniejszej pracy badań.

5.1.2.2 Mapowanie rozkładu czułości wnęki rezonansowej wzdłuż osi wnęki

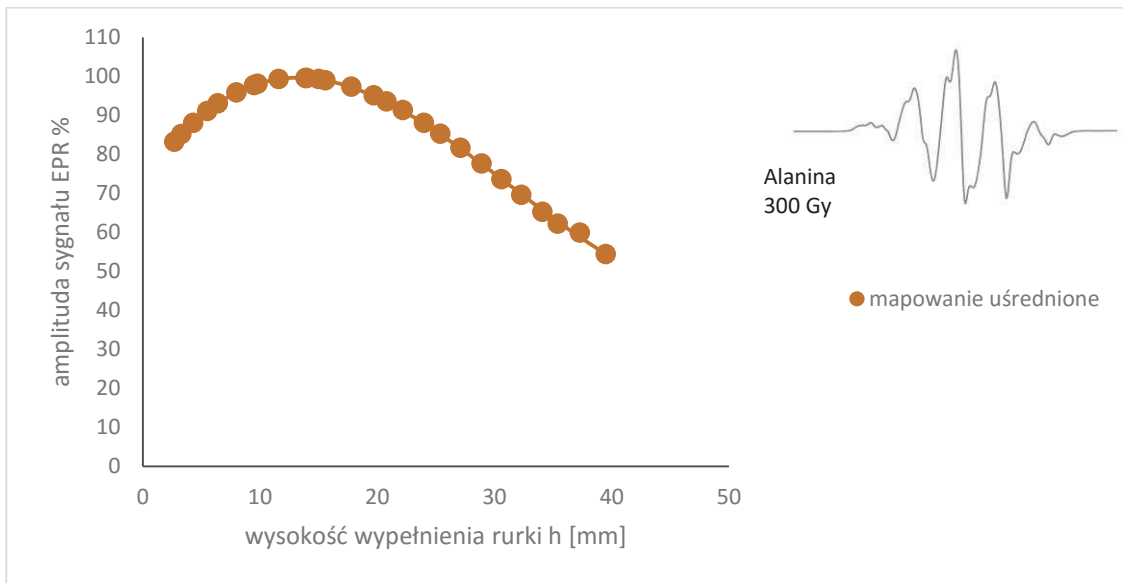
Prostopadłościennie wnęki rezonansowe spektrometrów EPR charakteryzują się niejednorodnym rozkładem czułości detekcji rezonansu wzdłuż swojej pionowej osi [93] z maksimum czułości w punkcie centralnym i zanikiem do zera przy dolnej i górnej jej krawędzi (Rys. 16).



Rys. 16 Zależność natężenia sygnału od wysokości wypełnienia rurki L-alaniną (linia ciągła): x - kierunek od dołu do góry wnęki, S - amplituda sygnału unormowana do jej maksymalnej wartości. Linia przerywaną oznaczono rozkład przestrzenny czułości wnęki dla próbki L-alaniny, linią kropkowaną całkę funkcji rozkładu czułości [94].

Wynika to z rozkładu składowej magnetycznej fali stojącej mikrofal we wnęcie oraz rozkładu modulującego pola magnetycznego wytworzonego przez cewki modulujące. Z tego powodu, dla dokładnego porównywania natężeń widm próbek o różnej długości oprócz normalizacji sygnału do masy w tej pracy zastosowano dodatkowo normalizację uwzględniającą wpływ geometrii próbki tj, jej długości i położenia we wnęcie. W celu określenia funkcji rozkładu czułości wzdłuż osi wnęki, wykonano mapowanie rozkładu

czułości poprzez serię pomiarów widm EPR dla polikrystalicznego proszku alaniny napromieniowanej dawką 300 Gy, dla różnych wysokości wypełnienia rurki pomiarowej. Amplitudę centralnej linii sygnału EPR alaniny znormalizowano do masy mierzonej próbki alaniny i przedstawiono zależność znormalizowanej do masy amplitudy od wysokości próbki we wnęce rezonansowej (Rys. 17). Eksperyment ten przeprowadzono trzykrotnie, a dane uśredniono.



Rys. 17 Wykres zależności amplitudy sygnału EPR alaniny (w górnym prawym rogu) od wysokości wypełnienia rurki pomiarowej alaniny napromieniowania dawką 300 Gy. Rysunek przedstawia uśrednione dane dla trzech pomiarów, unormowane do ich maksymalnej wartości. Zakres zmienności wysokości wypełnienia rurek (h) przez badane w pracy próbki kości był od 2,7 do 39,5 mm.

Na Rys. 17 amplitudę sygnału przedstawiono w odniesieniu do jej maksymalnej wartości. Po uśrednieniu danych z trzech pomiarów wyniki aproksymowano funkcją wielomianową:

$$f(h) = 0,00231h^3 - 0,218h^2 + 4,54h + 72,3 \quad (12)$$

gdzie:

h – oznacza wysokość próbki w rurce pomiarowej

Na podstawie powyższego wzoru widma EPR normalizowano względem wysokości wypełnienia wnęki przez dzielenie ich przez wartość funkcji f(h) dla konkretnych, zmierzonych dla każdej próbki wartości h. Powyższa procedura umożliwiła porównanie natężeń sygnałów EPR próbek o różnej wielkości.

5.1.3 Analiza widm

Ilościową analizę widm EPR przeprowadzono wg. następującego algorytmu:

1. Wypozyjonowanie widm względem osi pola magnetycznego (tj. pozycji linii widmowych standardu manganowego) i znormalizowanie ich amplitudy w odniesieniu do średniej amplitudy trzeciej i czwartej linii standardu Mn^{2+} .
2. Korekcja liniowa linii zerowej widma.
3. Odjęcie widma EPR pustej rurki pomiarowej.
4. Normalizacja do masy mierzonej próbki.
5. Normalizacja do wysokości wypełnienia rurki pomiarowej.

Sumarycznie, procedury normalizacji natężenia widm określa wzór:

$$S = \frac{1}{m \cdot f(h)} \left(\frac{\text{widmo zmierzone}}{A_{Mn}} - \frac{\text{widmo pustej rurki}}{A_{Mn}} \right) \quad (13)$$

gdzie:

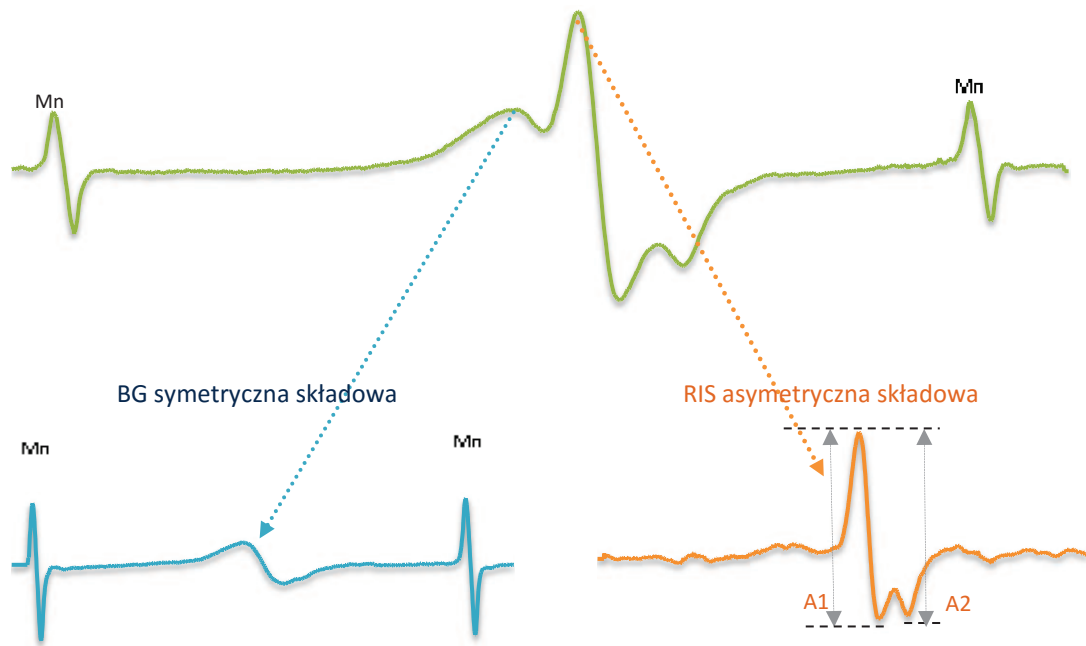
S – oznacza końcowe widmo poddane dalszej analizie ilościowej

A_{Mn} – średnia arytmetyczna amplitud trzeciej i czwartej linii standardu Mn^{2+} .

Widma EPR analizowano przy użyciu pakietu Microsoft Office w programie MS Excel 2010. Za pomocą funkcji Reglinp znormalizowane widma EPR były numerycznie rozkładane na dwie składowe przedstawiające udziały w mierzonym widmie asymetrycznego sygnału dozymetrycznego RIS i natywnego sygnału tła BG, zgodnie z ogólnym wzorem:

$$S = a_{RIS} \cdot RIS + a_{BG} \cdot BG + const \quad (14)$$

Widmo modelowe RIS otrzymano z pomiaru proszku kostnego powstałego po 24-godzinnej hydrolizie w 2 M KOH, napromieniowanego dawką 100 Gy. Hydroliza spowodowała usunięcie tła natywnego w sygnale EPR tej próbki. Widmo modelowe tła (BG) otrzymano przez pomiar EPR nienapromieniowanej próbki kości zbitej.

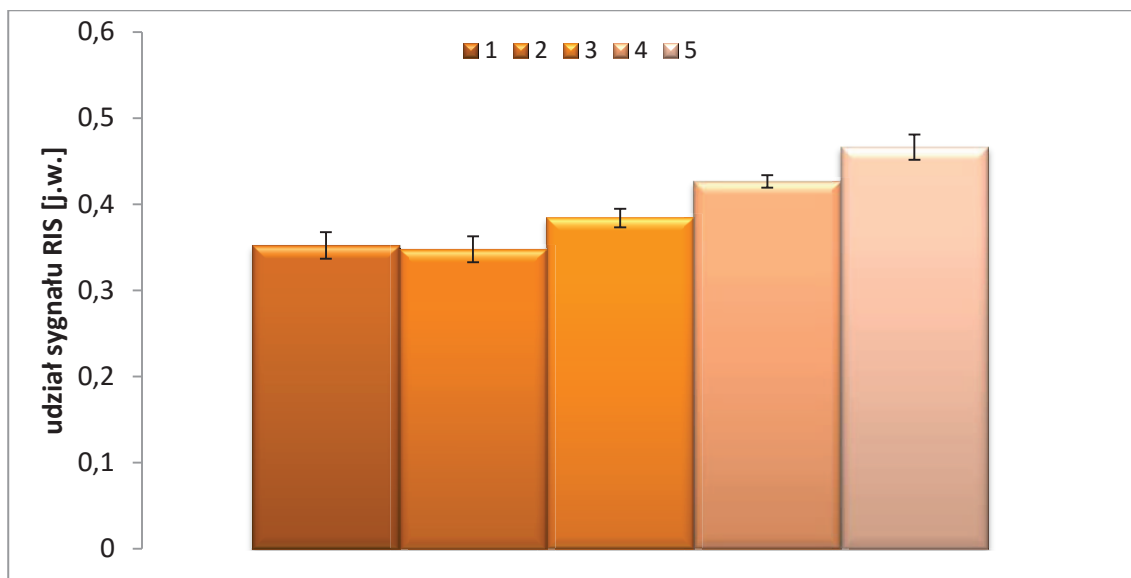


Rys. 18 Widma kości napromieniowanej dawką 100 Gy (u góry) oraz widma modelowe tła BG i sygnału dozymetrycznego RIS (na dole). Ostre linie oznaczone Mn w wysoko- i nisko-polowej części widm na tym rysunku oraz we wszystkich pozostałych widmach EPR przedstawionych w tej pracy pochodzą od standardu Mn^{2+} .

Miarą ilościową sygnału tła i sygnału radiacyjnego były wartości współczynników a_{RIS} i a_{BG} w równaniu (13). W kilku przypadkach (opisanych w części Wyniki) mierzono także amplitudy sygnału: amplitudę linii tła w próbce nienapromieniowanej, oraz w próbkach napromieniowanych amplitudy A1 i A2 sygnału RIS względem pierwszego i drugiego pików sygnału dozymetrycznego (Rys. 18).

5.1.4 Powtarzalność pomiarów EPR

W celu określenia powtarzalności pomiarów EPR przeprowadzono serię 16 pomiarów pięciu próbek napromieniowanych dawką 50 Gy. Wyniki obliczonych wartości średnich i odchylenia standardowego (SD) dla przeprowadzonych pomiarów przedstawiono w Tabeli 3 i na Rys. 19. Średnią wartość procentowego odchylenia standardowego z Tabeli 3 ($SD=3.3\%$) uznano jako reprezentatywną dla precyzji pomiaru sygnałów BG i RIS i nie przekracza ona wielkości symboli na rysunkach w tej pracy. Dokładność retrospektywnie wyznaczonej dawki w próbkach kości od pacjentów po radioterapii omówiono osobno w Rozdziale 7.4.4.2.



Rys. 19 Wykres słupkowy średnich wartości udziałów sygnału RIS w widmie EPR z serii pomiarów pięciu próbek z zaznaczonym odchyleniem standardowym.

Tabela 3 Wartości średnie udziału sygnału RIS i SD

Próbka nr	1	2	3	4	5
Średnia wartość udziału sygnału RIS	0,352	0,348	0,384	0,426	0,466
SD	0,015	0,015	0,011	0,007	0,015
SD(%)	4,3	4,3	2,9	1,6	3,2

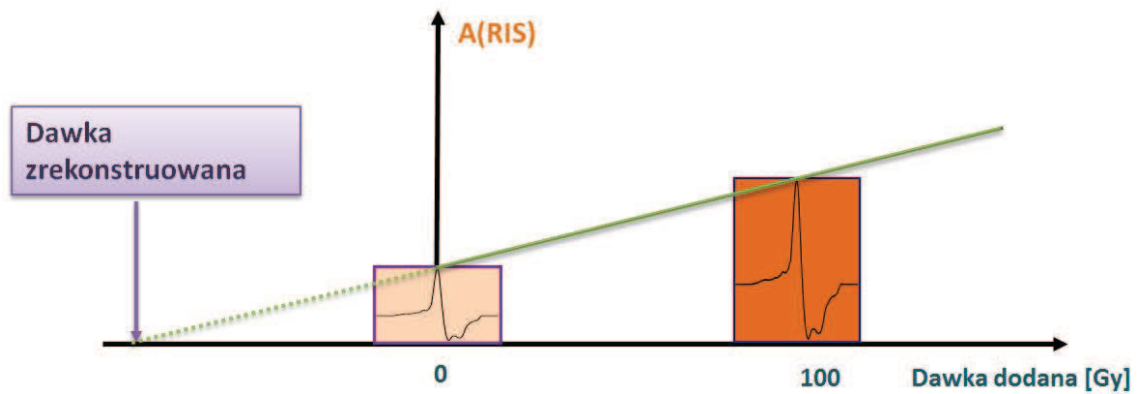
5.2 Procedura dozymetrii retrospektywnej dawek u pacjentów po radioterapii

Do rekonstrukcji dawek w próbkach tkanki kostnej pochodzących od pacjentów radioterapii użyto fragmentów tkanek kostnych uzyskanych w wyniku przeprowadzonego chirurgicznego leczenia. Tkanki kostne usunięte zostały tylko i wyłącznie w wyniku medycznych wskazań do usunięcia na podstawie decyzji lekarza prowadzącego. Decyzja o usunięciu fragmentów tkanki kostnej nie pozostawała w żadnym związku z przeprowadzonymi badaniami.

Uzyskano próbki tkanki kostnej od trzech pacjentów oznaczonych dalej jako P1, P2 i P3. Przed obróbką przygotowującą próbki do pomiarów EPR były one przechowywane w 70 % roztworze etanolu w lodówce. Do pomiarów użyto całych kawałków kości nie

rozkruszonych wcześniej, przyciętych diamentową piłą rotacyjną do rozmiaru około 2x7mm. Próbki te wysuszone próżniowo i zmierzono ich widma EPR. W każdej ze zmierzonych próbek w widmie EPR obecny był sygnał RIS wskazujący na to, że otrzymana próbka kostna wcześniej pochłonęła dawkę promieniowania jonizującego. Następnie próbki zostały umieszczone na 24 godziny w wypełnionych wodą probówkach typu eppendorf, po czym napromieniowano je dawką kalibracyjną 100 Gy. Po napromieniowaniu próbki zostały próżniowo wysuszone i zmierzono ponownie ich widma EPR.

Z uzyskanych wartości udziału sygnału RIS przed i po napromieniowaniu metodą liniowej ekstrapolacji zależności sygnału od dawki dodanej zrekonstruowano nieznaną dawkę przyjętego wcześniej promieniowania. Graficznie metodę tą przedstawia Rys. 20.



Rys. 20 Proces rekonstrukcji dawki poprzez ekstrapolację wartości sygnału RIS.

Zrekonstruowane dawki D_r obliczone były zgodnie z formułą:

$$D_r = D_{cal} \frac{RIS(r)}{RIS(r+D_{cal})-RIS(r)} \quad (15)$$

gdzie:

D_{cal} – 100 Gy – znana dodana dawka

$RIS(r)$ – wielkość sygnału dozymetrycznego zmierzonego przed dopromieniowaniem kości

$RIS(r+D_{cal})$ – wielkość sygnału dozymetrycznego zmierzonego po dopromieniowaniu kości.

Hayes'a i in. [95] wykazali, że w przypadku liniowej zależności pomiędzy wielkością sygnału RIS a dawką pochłoniętego promieniowania optymalnym rozkładem punktów pomiarowych w procedurze dozymetrii jest umiejscowienie ich w skrajnych rejonach analizowanego przedziału dawki, co uzasadnia poprawność zastosowanej w niniejszej pracy metody ekstrapolacji dwupunktowej, tj. opartej na pomiarach dla dwóch dawek.

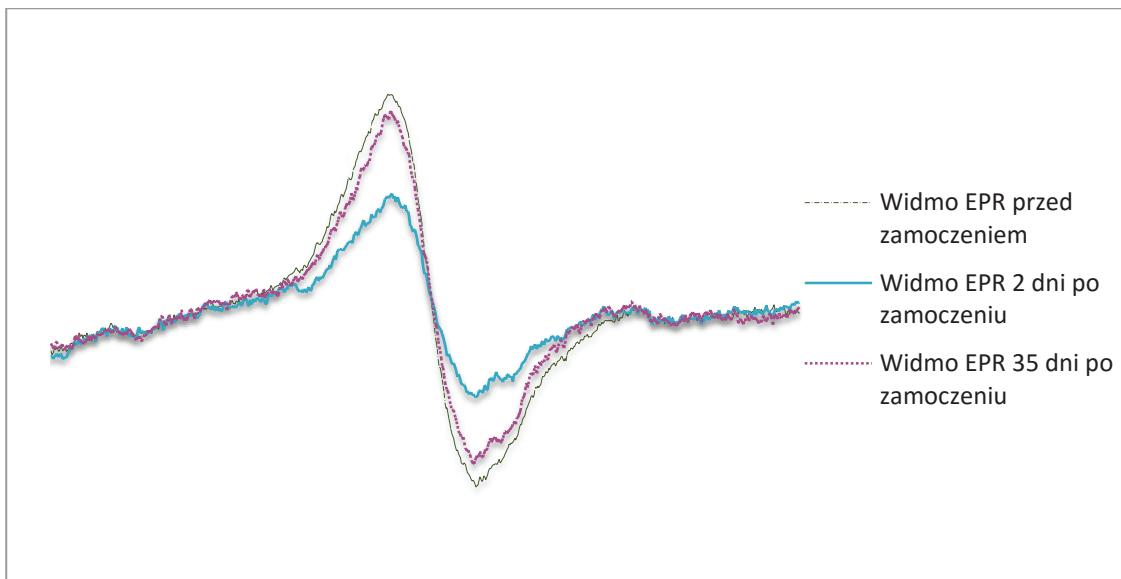
Wszystkie dawki przytaczane w niniejszej pracy, zarówno w badaniach wstępnych jak i dawki obliczane i mierzone u pacjentów po radioterapii są dawkami dla środowiska wodnego.

6 Wyniki

6.1 Sygnały EPR w nienapromieniowanej kości zbitej

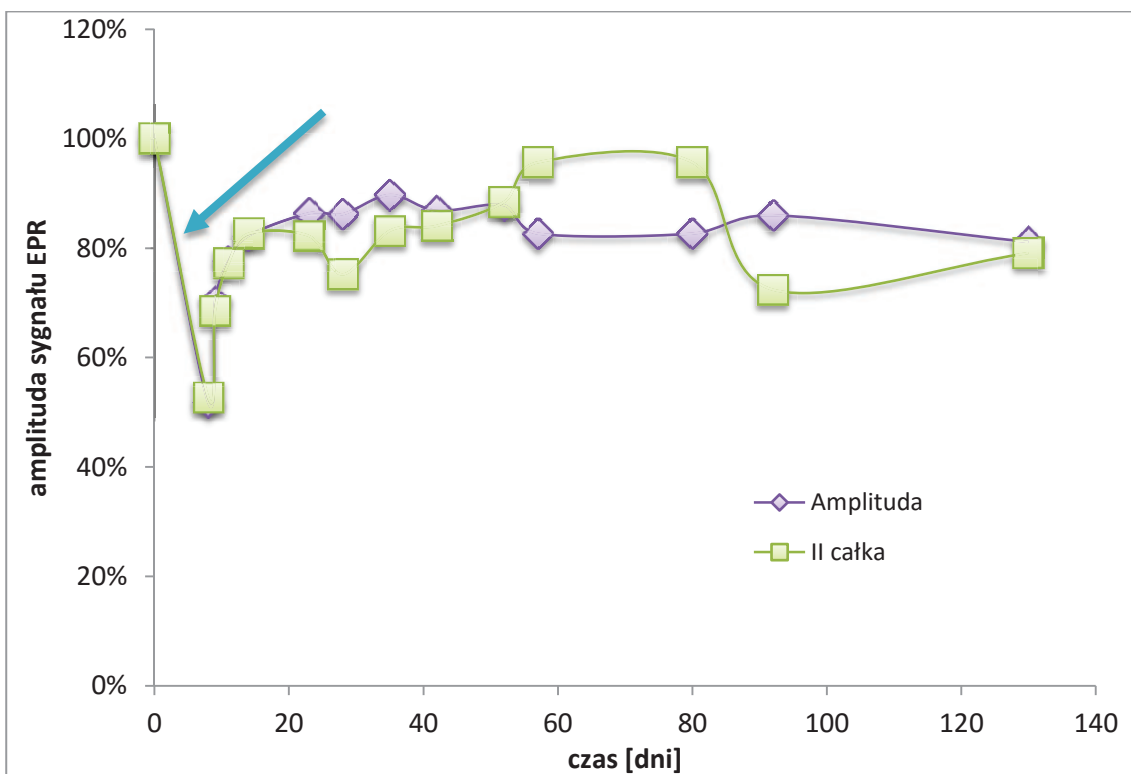
6.1.1 Wpływ wody na sygnał natywny

Widmo EPR nienapromieniowanej kości zbitej składa się z pojedynczej symetrycznej linii. Jest to natywny sygnał tła, dalej oznaczany w tej pracy jako BG, którego pochodzenie przypisuje się części organicznej tkanki kostnej. Szerokość linii widmowej sygnału tła w badanych próbkach wahała się w zakresie od 0,75 do 0,87 mT. Wpływ zamoczenia próbek w wodzie na sygnał tła przedstawia Rys. 21 - amplituda tego sygnału zmniejszała się o około 50 % po próżniowym wysuszeniu próbek umieszczonych na 24 godziny w wodzie w temperaturze 6⁰C.



Rys. 21 Zmiany w czasie sygnału EPR tła BG po umieszczeniu nienapromieniowanej próbki kostnej w wodzie.

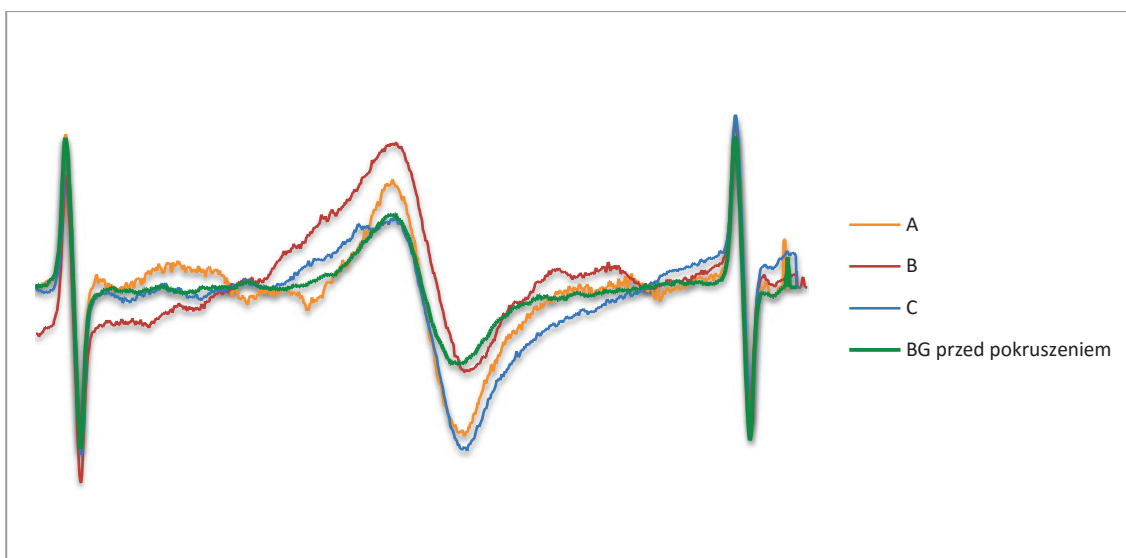
W wysuszonych próbkach sygnał ten wzrastał osiągając po około 50 dniach ok. 90% swojej początkowej wartości (tj. zmierzonej przed umieszczeniem próbki w wodzie). Na Rys. 22 przedstawiono zmiany sygnału tła w czasie w odniesieniu do sygnału zmierzonego przed zamoczeniem próbki.



Rys. 22. Zmiany amplitudy sygnału EPR i jego drugiej całki w czasie po 24 godzinnym moczeniu w wodzie. Strzałką zaznaczono moment zamoczenia próbki. Dane unormowano do 100% w chwili początkowej serii pomiarów. Dane unormowano do 100% w chwili początkowej serii pomiarów.

6.2 Wpływ kruszenia i wielkości ziaren na sygnał tła

Amplituda sygnału tła nienapromieniowanych próbek znacząco wzrosła po ich rozkruszeniu na małe kawałki. Rozkruszaniu poddano trzy próbki oznaczone A, B i C. Na Rys. 23 przedstawiono porównanie tła całego nienapromieniowanego kawałka kości z widmami rozkruszonych próbek.



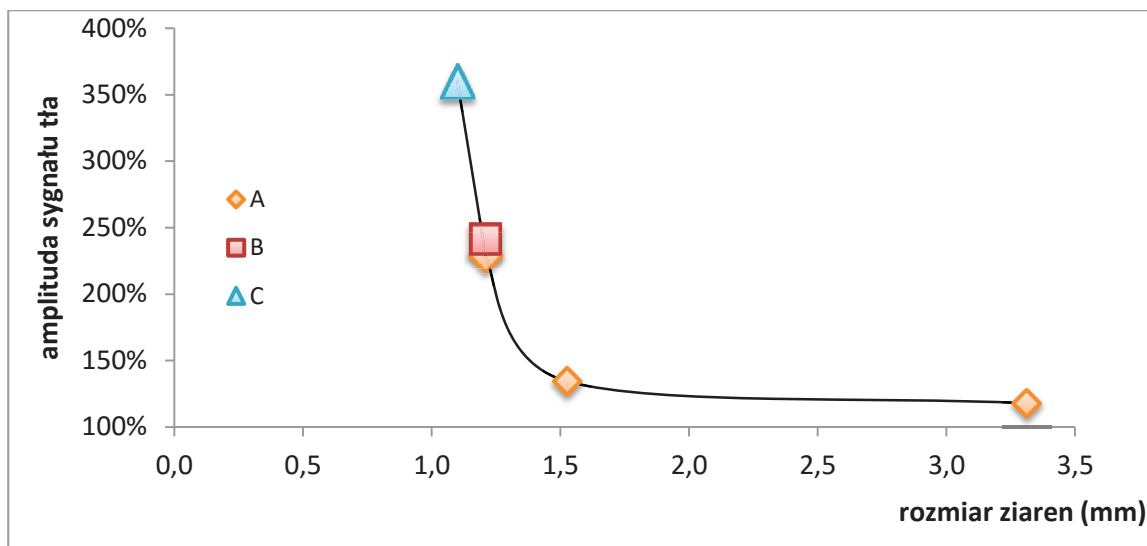
Rys. 23 Sygnały tła po rozkruszeniu próbki tkanki kostnej (A,B,C) i próbki A przed rozkruszeniem.

W Tabeli 4 przedstawiono procentowe zmiany amplitud sygnału tła w pokruszonych próbkach w odniesieniu do sygnału tła niepokruszonej próbki w zależności od wielkości ziaren po rozkruszeniu. Zależność amplitudy sygnału tła od wielkości ziaren dla próbek A, B i C przedstawia graficznie Rys. 24.

Tabela 4 Zależność znormalizowanej do masy amplitudy sygnału tła od stopnia rozdrobnienia próbki kości zbitej (przedstawione wyniki uzyskano z pomiarów wykonanych od 0,5 do 5 godzin po pokruszeniu).

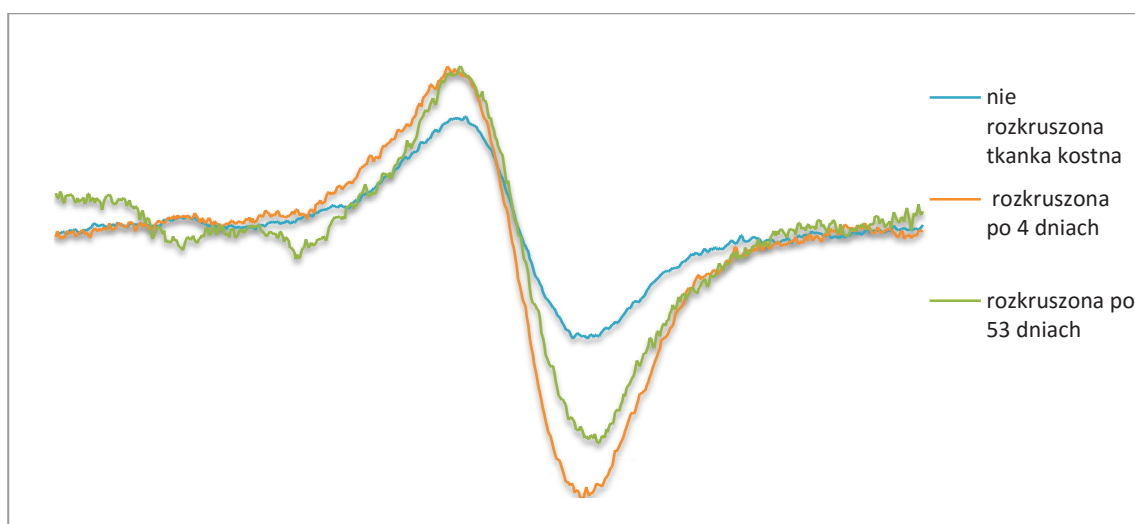
Próbka	Cała próbka tkanki kostnej	Rozmiar ziaren ¹ [mm]		
		2.9-1.6	1.3-0.8	1.1-0.5
A	100%	118%	134%	229%
B				241%
C				360%

¹ Rozmiar zdefiniowano jako pierwiastek z sumy kwadratów najdłuższego i najkrótszego wymiaru ziaren.

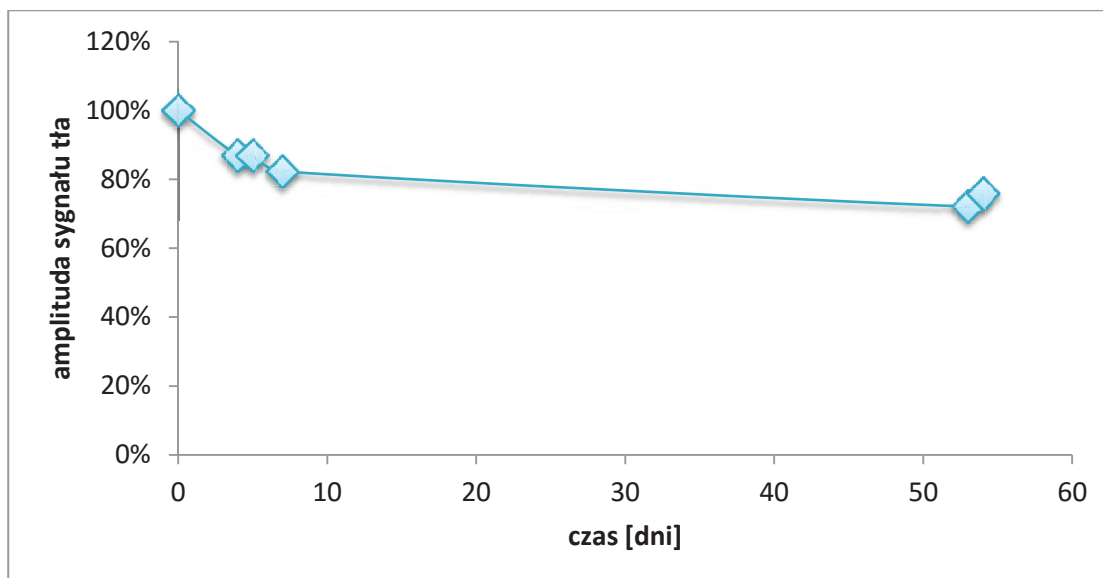


Rys. 24 Wpływ wielkości ziaren rozkruszonej kości na amplitudę sygnału tła w odniesieniu do amplitudy w próbce niepokruszonej.

Sygnał EPR tła w pokruszonych próbkach nie był stabilny i z czasem ulegał zanikowi, co przedstawiono na Rys. 25 i 26.



Rys. 25 Zmiany w czasie widma EPR sygnału tła po rozkruszeniu próbki A.



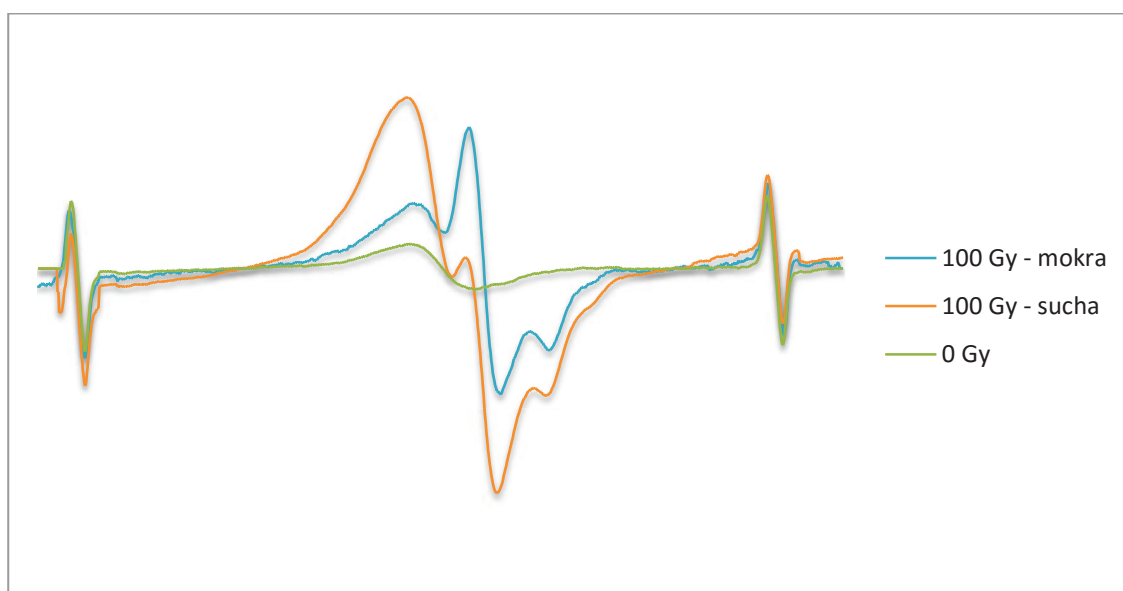
Rys. 26 Zmiany w czasie amplitudy sygnału EPR w pokruszonej próbce A w odniesieniu do amplitudy zmierzonej 0.5 godziny po pokruszeniu.

7 Sygnały EPR generowane radiacyjnie

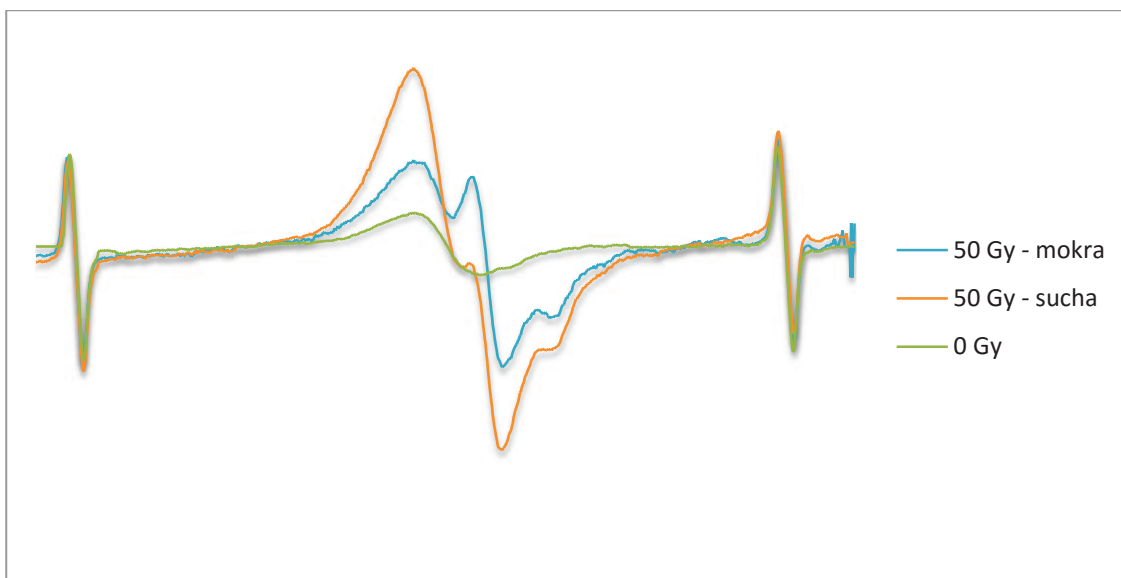
W badaniach wykazano generowanie przez promieniowanie jonizujące w tkance kostnej dwóch typów sygnału: asymetrycznego sygnału RIS rodników $\text{CO}_2^{\bullet-}$, oraz symetrycznego sygnału o podobnym kształcie jak sygnał tła natywnego (BG) w nienapromieniowanej kości. W celu sprawdzenia wpływu wody na generowane radiacyjnie sygnały, tj. dozymetryczny RIS i sygnał „tło-podobny” BG, siedem próbek zostało napromieniowanych dwukrotnie. Podczas pierwszego napromieniowywania cztery próbki zanurzone były w wodzie, a pozostałe napromieniowywano na sucho. Po napromieniowaniu wszystkie próbki mierzone były w regularnych odstępach czasowych, aż do ustabilizowania się sygnałów EPR. Następnie próbki napromieniowano po raz drugi w odmiennych warunkach, czyli próbki, które po raz pierwszy napromieniowano na mokro, po raz drugi zostały napromieniowane na sucho i odwrotnie.

7.1 Zmiany w czasie tło-podobnego sygnału generowanego radiacyjnie

W próbkach napromieniowanych na sucho natężenie wygenerowanego radiacyjnie tło-podobnego sygnału BG było kilka razy większe w porównaniu do natężenia tego sygnału wygenerowanego w próbkach napromieniowanych na mokro. Widma EPR próbek napromieniowanych dawką 100 Gy i 50 Gy w warunkach na sucho i na mokro oraz widmo EPR nienapromieniowanej próbki tkanki kostnej przedstawiono na Rys. 27 i 28. Pomiary EPR próbek napromieniowanych na sucho wykonano 2 godziny po napromieniowaniu, a próbki napromieniowanej na mokro 13 dni po napromieniowaniu.

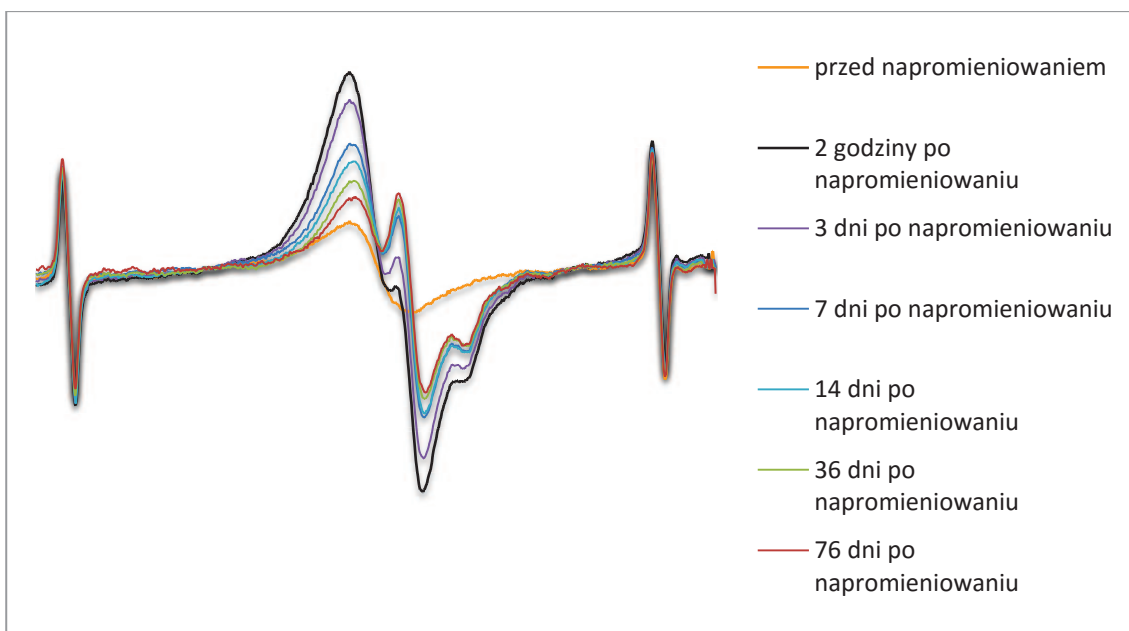


Rys. 27 Widma EPR próbek napromieniowanych na mokro i na sucho dawką 100 Gy, oraz widmo próbki nienapromieniowanej.



Rys. 28 Widma EPR próbek napromieniowanych na sucho i mokro dawką 50 Gy oraz widmo EPR próbki niepromieniowanej.

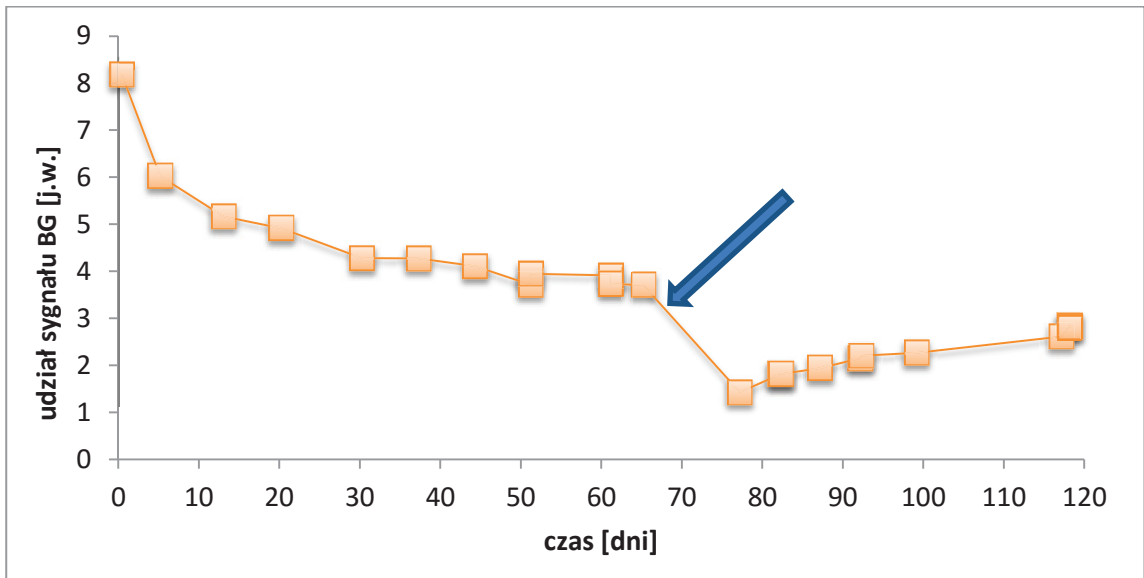
Amplituda sygnału tło-podobnego wygenerowanego radiacyjnie na sucho malała wraz z upływem czasu, co powodowało istotne zmiany w kształcie widma zachodzące zwłaszcza w pierwszych 4 tygodniach po napromieniowaniu (Rys. 29, Rys 30).



Rys. 29 Ewolucja w czasie widm EPR w próbce kości napromieniowanej na sucho dawką 50 Gy.

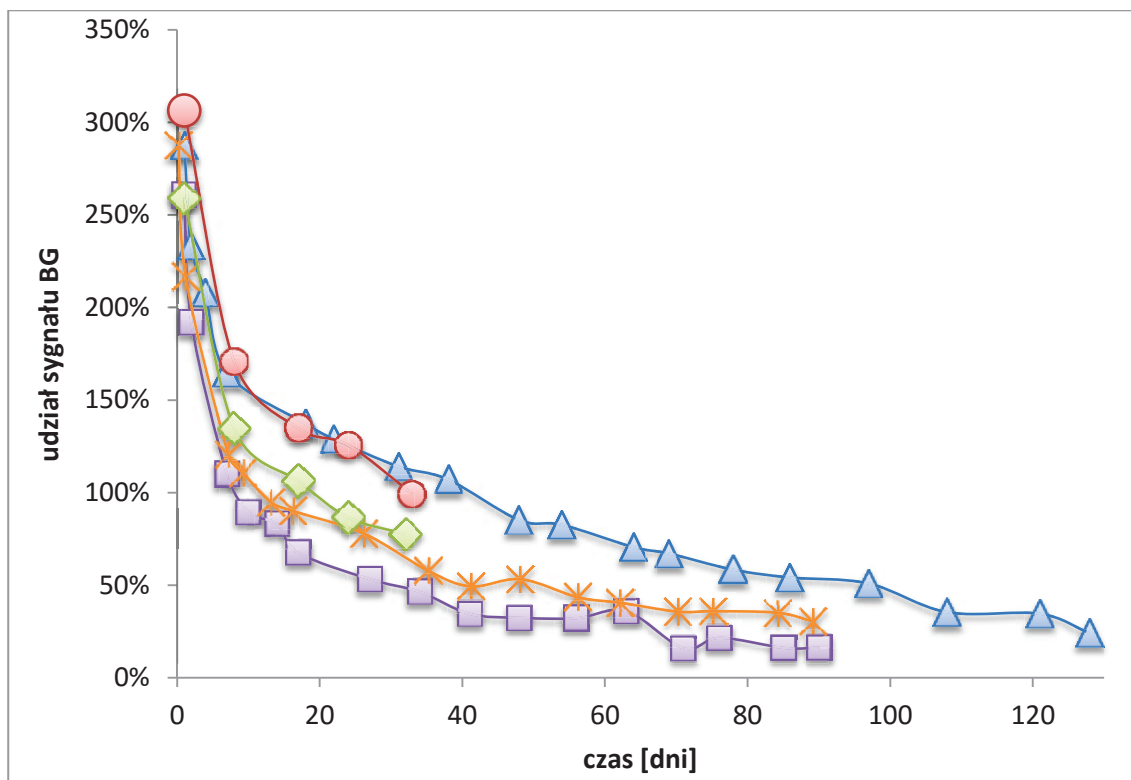
Udział sygnału BG w widmach spadał w czasie kilkudziesięciu dni po napromieniowaniu o co najmniej 70 % w stosunku do jego wartości zmierzonej zaraz po napromieniowa-

niu - na Rys. 31 przedstawiono wykres zmian w czasie udziału sygnału BG dla pięciu próbek napromieniowanych dawką 50 Gy w warunkach suchych.



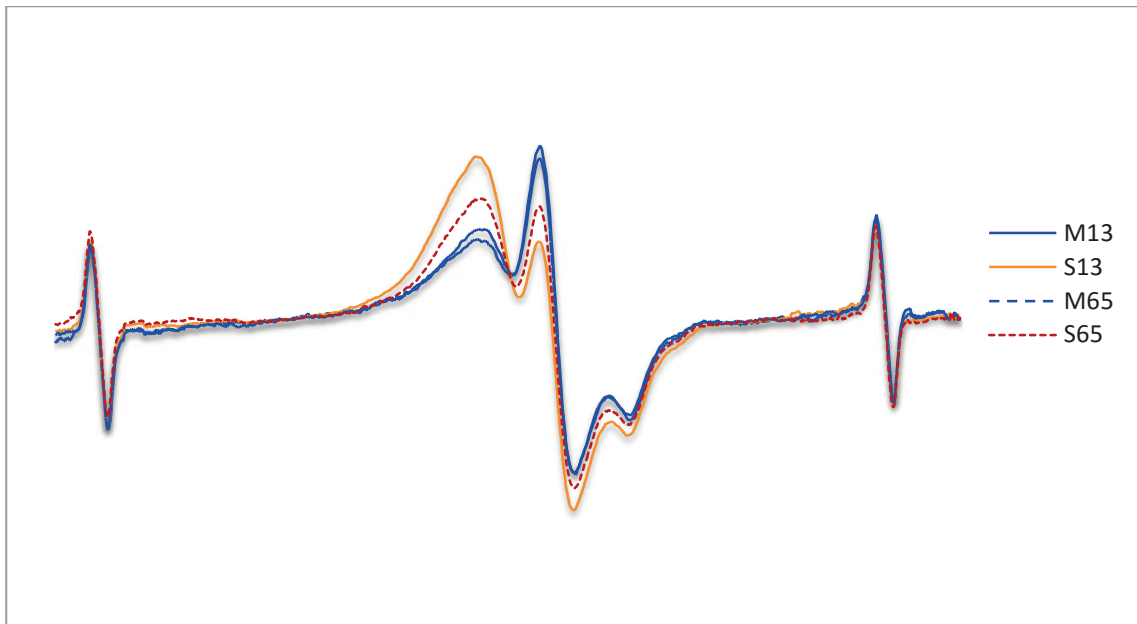
Rys. 30 Zmiany w czasie udziału sygnału BG w widmie EPR próbek napromieniowanych dawką 100 Gy na sucho . Między 65 a 70 dniem (strzałka) próbkę poddano działaniu wody.

Znaczny spadek widoczny na Rys. 30 w 65 dniu pomiaru spowodowany został umieszczeniem próbki na pięć dni w wodzie. Po wysuszeniu próżniowym w dniu 75 nastąpił stopniowy wzrost sygnału.



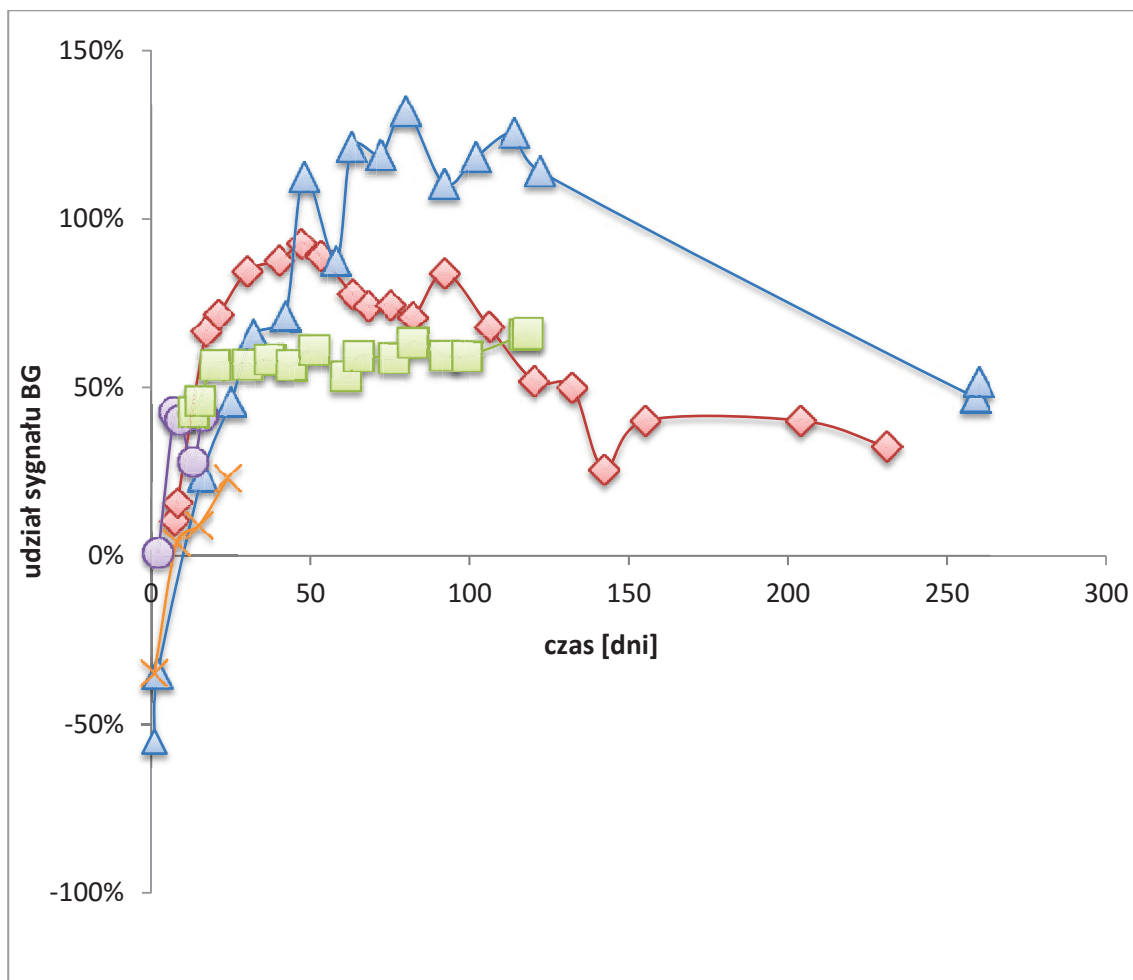
Rys. 31 Zmiany w czasie udziału sygnału BG w widmie EPR jako procentowa różnica pomiędzy sygnałem BG po napromieniowaniu „na sucho” pięciu próbek kości dawką 50 Gy a sygnałem tła zmierzonym przed ich napromieniowaniem.

Zaobserwowano dużo niższy (w niektórych próbkach ujemny) w porównaniu do próbek napromieniowanych na sucho, przyrost sygnału tło-podobnego w próbkach kości zanurzonych w wodzie podczas napromieniowywania (Rys. 32). Udział składnika BG po napromieniowaniu na mokro wzrastał w czasie. (Rys. 33).



Rys. 32 Porównanie sygnałów EPR w próbkach napromieniowanych dawką 100 Gy i na sucho (brązowe linie S13 i S65) i na „mokro” (niebieskie linie M13 i M65). Pomiar EPR po 13 dniach (linia ciągła) i 65 dniach (linia przerywana) od napromieniowania.

Na Rys. 33 przedstawiono zmiany udziału sygnału BG w widmie EPR po napromieniowaniu dla czterech próbek tkanki kostnej zanurzonych w wodzie podczas napromieniowywania. Dane przedstawiają procentowe zmiany różnic udziałów sygnału BG między próbką poddaną napromieniowaniu w wodzie i tą samą próbką przed napromieniowaniem.

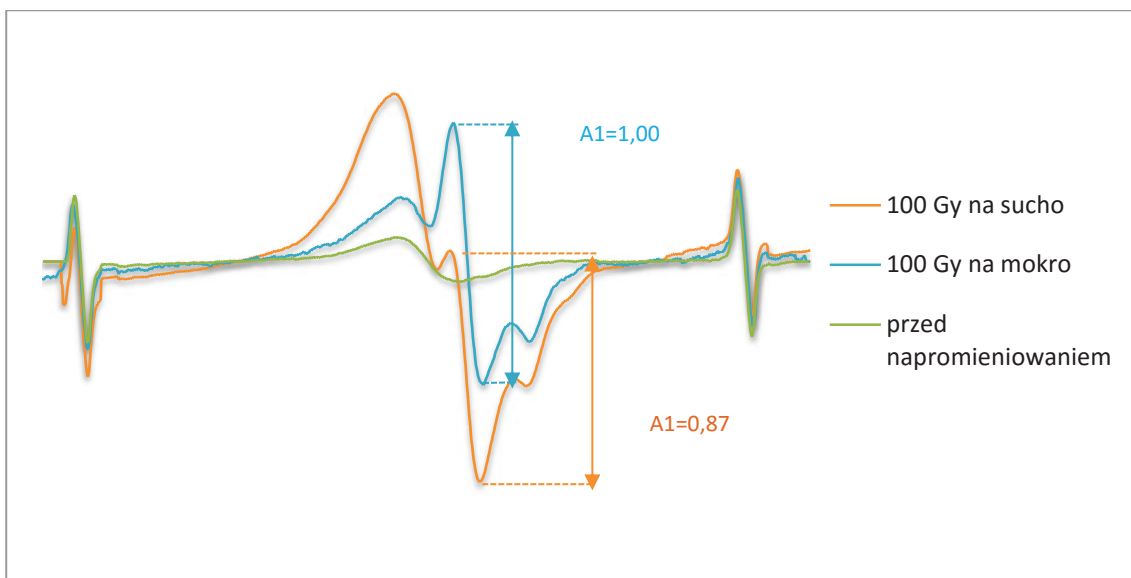


Rys. 33 Zmiany w czasie udziału sygnału BG w widmie EPR napromieniowanych próbek jako procentowa różnica pomiędzy jego wartością w próbkach napromieniowanych dawką 50 Gy w warunkach na mokro, a wartością zmierzonym przed napromieniowaniem próbek.

Wzrost udziału sygnału BG zarówno w próbkach napromieniowanych na mokro jak i w próbkach napromieniowanych na sucho nie wykazywał zależności od dawki promieniowania w zakresie od 50 do 100 Gy.

7.2 Zależność od czasu sygnału RIS w zależności od warunków napromieniowania.

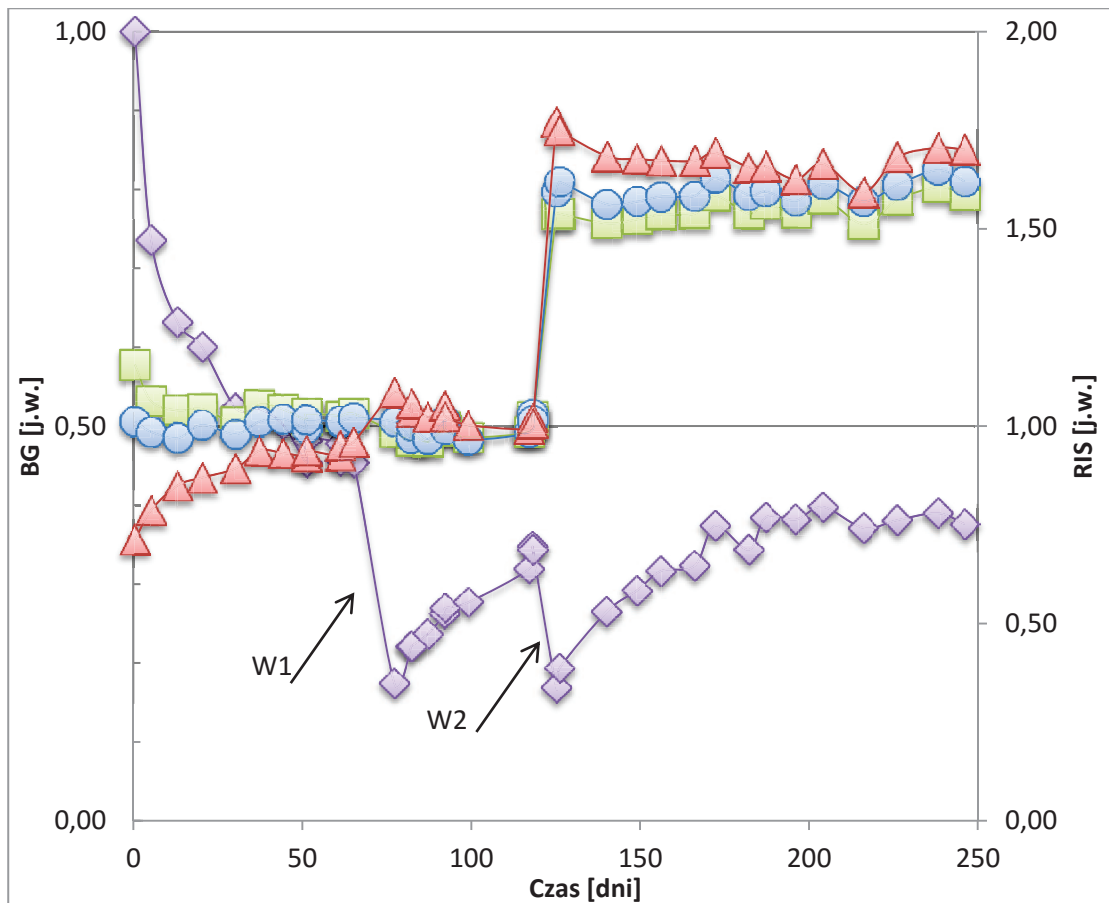
Na Rys. 34 przedstawiono widma EPR dwóch próbek kości napromieniowanych w warunkach na mokro i na sucho dawką 100 Gy. Pomiar sygnałów próbki napromieniowanej na sucho wykonano po około dwóch godzinach po napromieniowaniu, a próbki napromieniowanej na mokro po 24 h po napromieniowaniu (po jej uprzednim wysuszeniu).



Rys. 34 Widma EPR próbek tkanki kostnej napromieniowane próbek dawką 100 Gy w różnych warunkach.

Widoczna jest wyraźna różnica w amplitudzie A_1 sygnału dozymetrycznego RIS pomiędzy próbkami napromieniowanymi tą samą dawką ekspozycyjną w różnych warunkach. Różnica w amplitudach sygnałów wynosi ok. 13 %. Pomiary porównawcze obu tych próbek kontynuowano w regularnych odstępach czasu przez 118 dni.

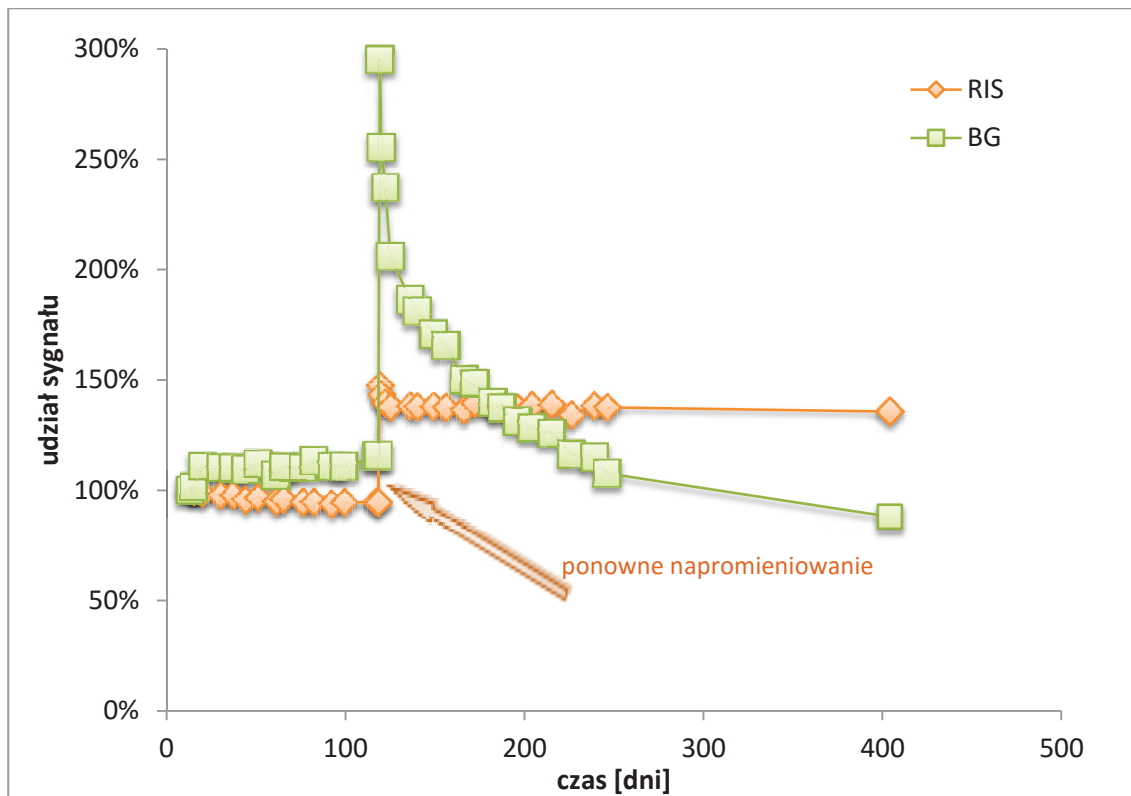
Po 118 dniach od pierwszego napromieniowania obie próbki poddano ponownemu napromieniowaniu – tym razem dawką 50 Gy w warunkach odwrotnych do pierwszego napromieniowania, czyli próbkę napromieniowaną poprzednio na sucho za drugim razem napromieniowano na mokro i odwrotnie. Po drugim napromieniowaniu próbki mierzone były przez okres 280 dni. Na Rys. 35 przedstawiono zależność w czasie sygnału RIS dla próbki po raz pierwszy napromieniowanej dawką 100 Gy na „sucho”, a po raz drugi dawką 50 Gy na „mokro”. Na wykresie tym umieszczono jednocześnie zmiany udziału sygnału BG w czasie. Dane przedstawiono w wartościach procentowych w odniesieniu do wartości udziałów zmierzonych podczas pierwszego pomiaru po pierwszym napromieniowaniu.



Rys. 35 Zmiany w czasie sygnałów RIS i BG w kości napromieniowanej 100 Gy w dniu 0 oraz napromieniowanej dawką 50 Gy w 118 dniu. Fioletowa linia z rombami przedstawia składnik BG - lewa oś rzędnych. Niebieska linia i kółka amplitudę A1, czerwona linia i trójkąty amplitudę A2, zielona linia i kwadraty pokazuje wartości składnika RIS - prawa oś rzędnych. Strzałka W1 oznacza zanurzenie próbki w wodzie w piątym dniu, strzałka W2 oznacza zanurzenie na jeden dzień w wodzie próbki przed dodatkowym napromieniowaniem dawką 50 Gy.

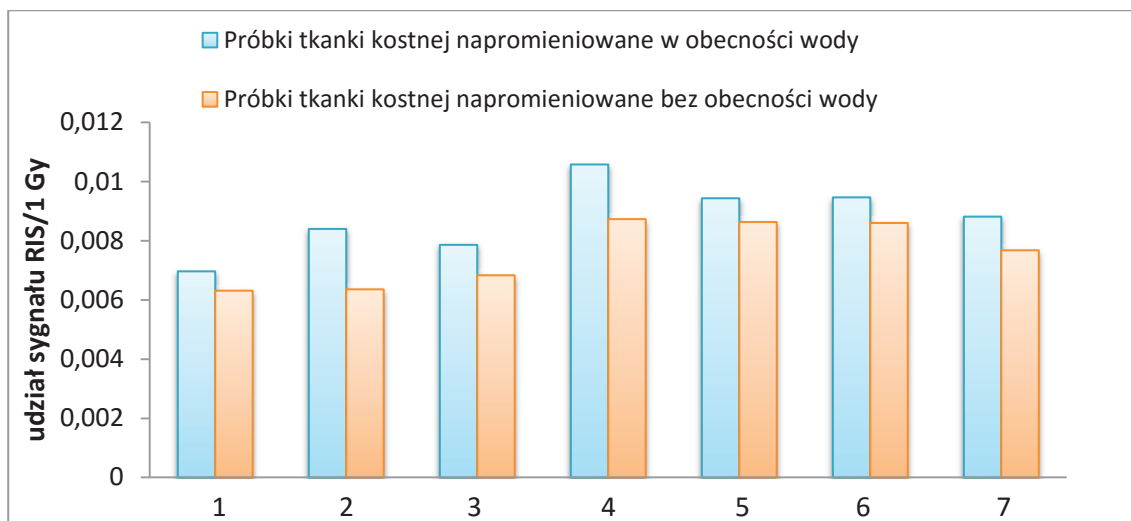
Na wykresie strzałkami oznaczono moment zanurzenia próbki w wodzie na pięć dni i drugie zanurzenie próbki w wodzie przed ponownym napromieniowaniem. Zaobserwowano wzrost amplitudy sygnału i udziału sygnału RIS o 57 % po ponownym napromieniowaniu próbki dawką 50 Gy.

Na Rys. 36 przedstawiono wykres zmian w czasie udziałów sygnału RIS i BG dla drugiej próbki napromieniowanej dwukrotnie, pierwszy raz dawką 100 Gy na mokro i drugi raz dawką 50 Gy na sucho. Dane przedstawiono w wartościach procentowych w odniesieniu do wartości udziałów zmierzonych podczas pierwszego pomiaru po pierwszym napromieniowaniu.



Rys. 36 Zmiany w czasie po napromieniowaniu udziałów sygnału RIS i BG w próbce napromieniowanej na mokro dawką 100 Gy w dniu 0 i dawką 50 Gy na sucho w dniu 118. Wartości unormowano do 100% dla pierwszego pomiaru.

Sekwencja dwukrotnego napromieniania próbki warunkach raz na sucho, drugi raz na mokro (lub odwrotnie) z minimum 90-cio dniowym odstępem czasowym pomiędzy napromienowaniami przeprowadzona została dla siedmiu próbek. Zmierzone sygnały RIS wygenerowane przez każdą z dwóch frakcji napromieniania znormalizowano do masy próbek i przeliczono na wydajności radiacyjne poprzez ich podzielenie przez wielkość dawki we frakcji. Porównano wartości wydajności radiacyjnej sygnału RIS, a dane zestawiono w postaci wykresu słupkowego i przedstawiono na Rys. 37.



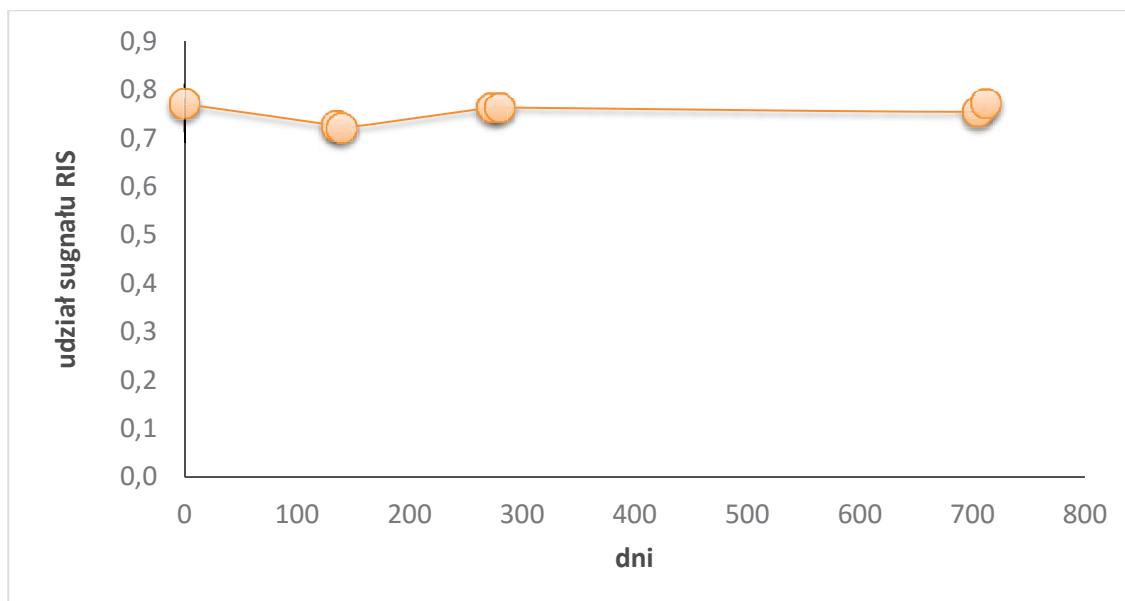
Rys. 37 Wydajności radiacyjne sygnału dozymetrycznego w próbkach napromieniowanych na sucho (brązowe słupki) i na mokro (niebieskie słupki).

Wydajności radiacyjne sygnału RIS podczas napromieniowania na mokro były większe od wydajności w tych samych próbkach napromieniowanych na sucho o od 8 % do 26%.

Wykonano również pomiary jednej próbki napromieniowanej dawką 50 Gy na mokro umieszczonej w wodzie przez dwa lata w temp 4⁰C w celu obserwacji czy sygnał dozymetryczny z czasem ulega zanikowi. Pomiary EPR próbki wykonano sześciokrotnie na przestrzeni dwóch lat. Wyniki udziału sygnału RIS przedstawiono w tabeli. 5 i przedstawiono na wykresie Rys. 38.

Tabela 5 Wartości udziału sygnału RIS w zależności od dnia pomiaru próbki

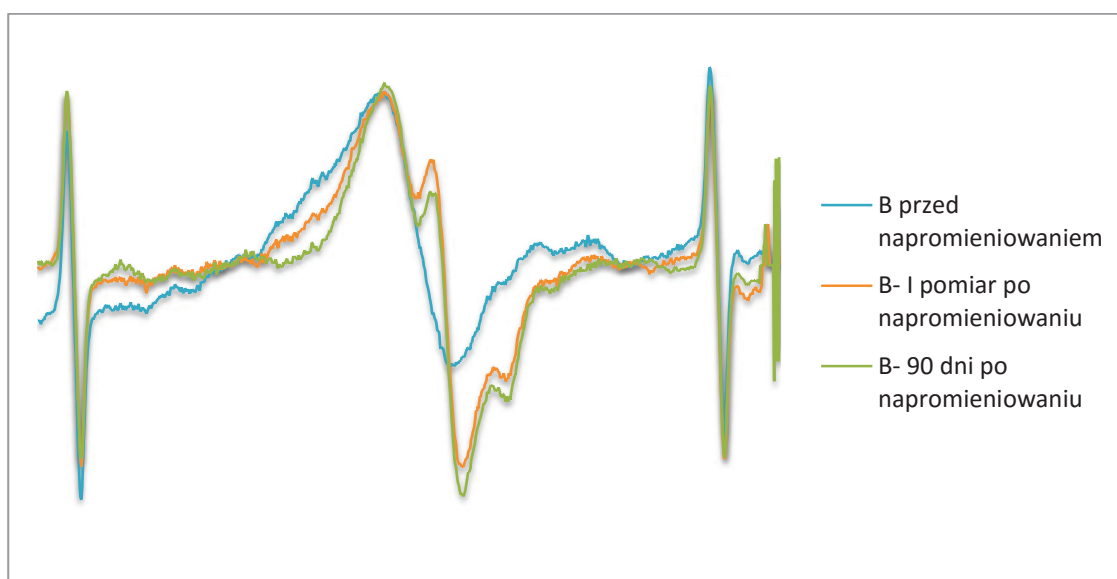
Dzień	Udział sygnału RIS
0	0,7710
135	0,7260
140	0,7210
273	0,7636
280	0,7637
705	0,7548
712	0,7722



Rys. 38 Zmiany sygnału RIS w czasie po napromieniowaniu.

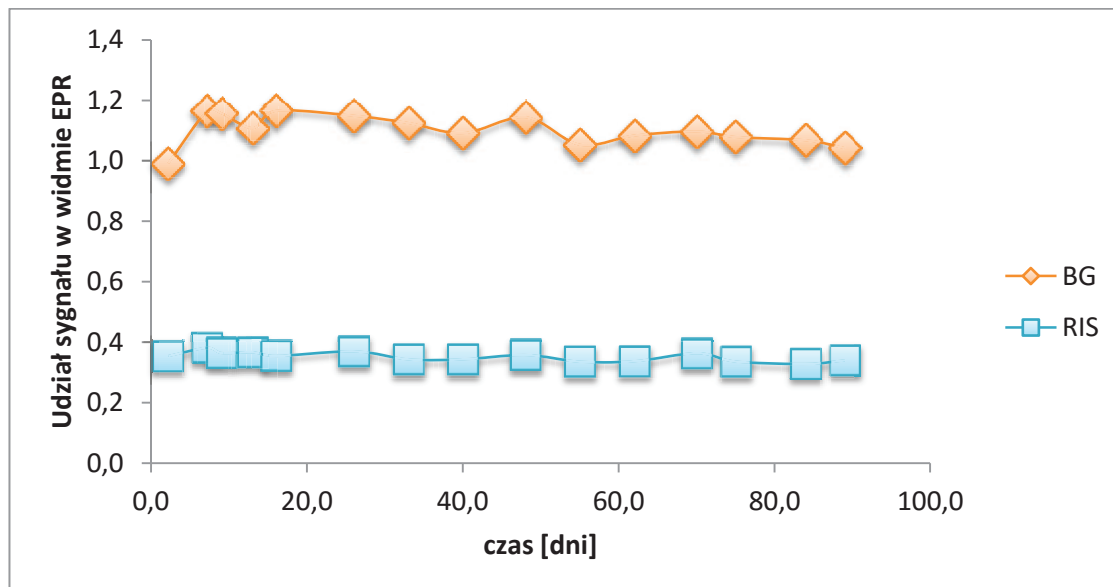
7.3 Sygnały radiacyjne w kości pokruszonej

Badano próbki B i C, których sygnały spowodowane kruszeniem omówiono w rozdziale 6.2. Sygnały EPR w rozkruszonych próbkach po ich napromieniowaniu dawką 50 Gy na mokro i ich zmiany w czasie przedstawiają odpowiednio Rys. 39 i Rys. 40. Zmiany w czasie sygnałów RIS i BG w tych próbkach napromieniowanych na sucho przedstawiają Rys. 41 i Rys. 42.



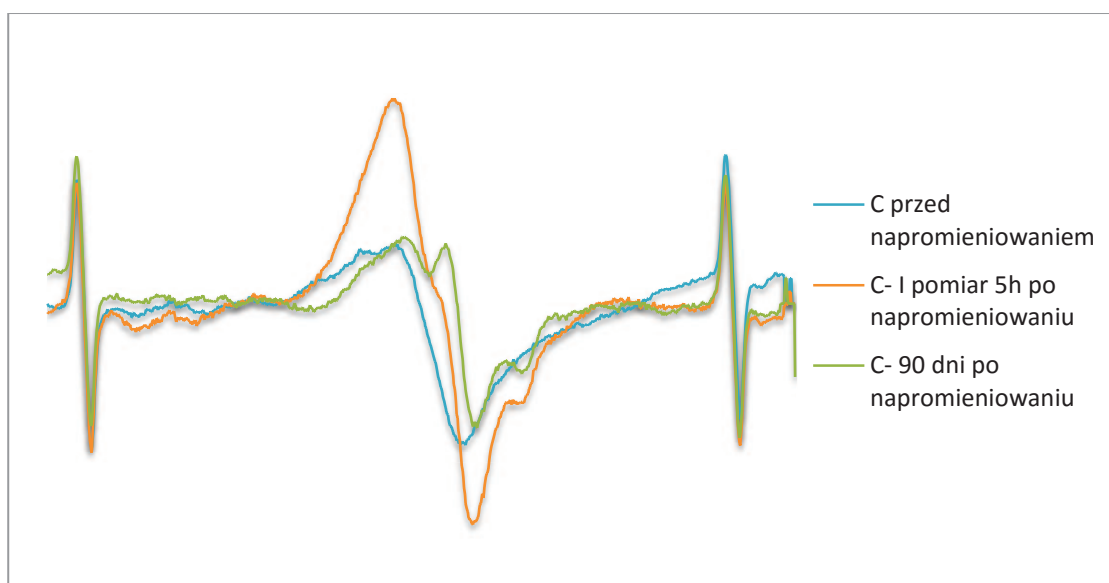
Rys. 39 Widma EPR pokruszonej próbki B po napromieniowaniu na mokro dawką 50 Gy.

Sygnal RIS w próbce napromieniowanej na mokro w czasie 90 dni spadł o ok 4%. Dla składnika BG zaobserwowano początkowy wzrost o około 20% po 7 dniach, po czym sygnał ten spadał osiągając po 90 dniach wielkość około 5% powyżej jego wartości przed napromieniowaniem.



Rys. 40 Ewolucja w czasie sygnałów RIS i BG po napromieniowaniu próbki B na mokro..

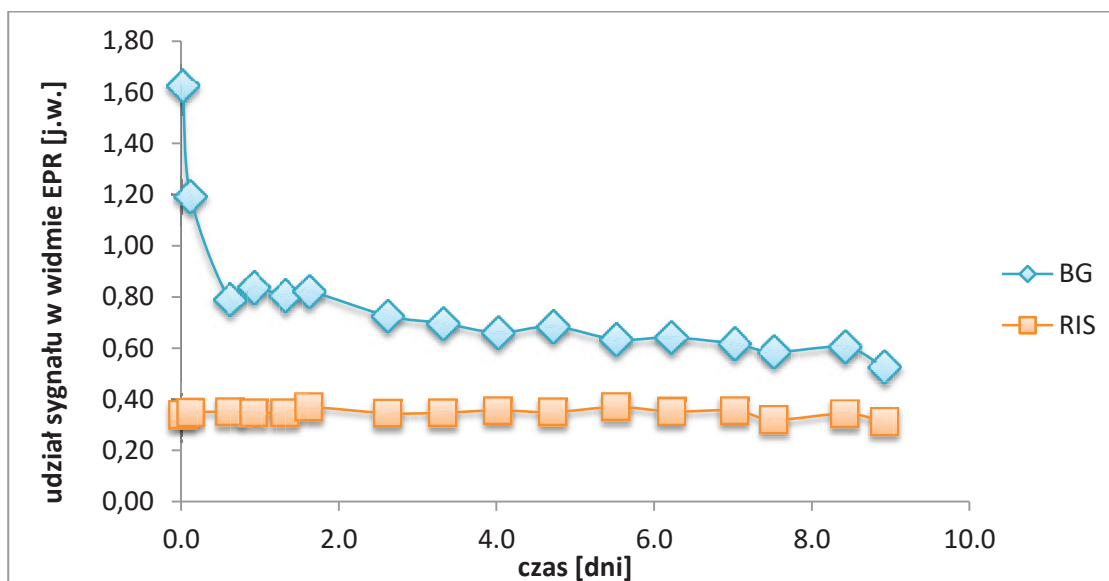
Na Rys. 41 przedstawiono widma EPR próbki C przed i po napromieniowaniu na sucho.



Rys. 41 Widma EPR pokruszonej próbki C po napromieniowaniu na sucho dawką 50 Gy.

Sygnal BG w próbce C po napromieniowaniu na sucho dawką 50 Gy wzrósł o 62,5 % po 5 godzinach po napromieniowaniu i zmalał po 90 dniach do około 50% swojej

początkowej wartości zmierzonej przed napromieniowaniem. Wygenerowany radiacyjnie sygnał RIS był stały w czasie w granicach dokładności pomiaru.



Rys. 42 Ewolucja w czasie sygnałów RIS i BG w napromieniowanej na sucho próbce C dawką 50 Gy.

7.4 Wpływ KOH na sygnały EPR tkance kostnej.

W porównaniu do szkliwa zębów, zawartość składników organicznych w kości jest znacznie wyższa, a co za tym idzie, również amplituda sygnału tła. Jej wielkość zależy od rodzaju kości (zbita, gąbczasta), stopnia jej zmineralizowania, ale we wszystkich badanych próbkach kości sygnał tła miał amplitudę porównywalną z sygnałem dozymetrycznym w zakresie przebadanych dawek. Z tego powodu uzasadnione było poszukiwanie sposobu zredukowania sygnału tła i tym samym jego wpływu na dokładność określenia wielkości sygnału RIS. Takim sposobem może być zasadowa hydroliza próbek, dzięki której można oczekiwać zmniejszenia sygnału tła wskutek usunięcia z próbek ich składników organicznych.

7.4.1 Redukcja masy próbek w wyniku hydrolizy kości w 2M KOH.

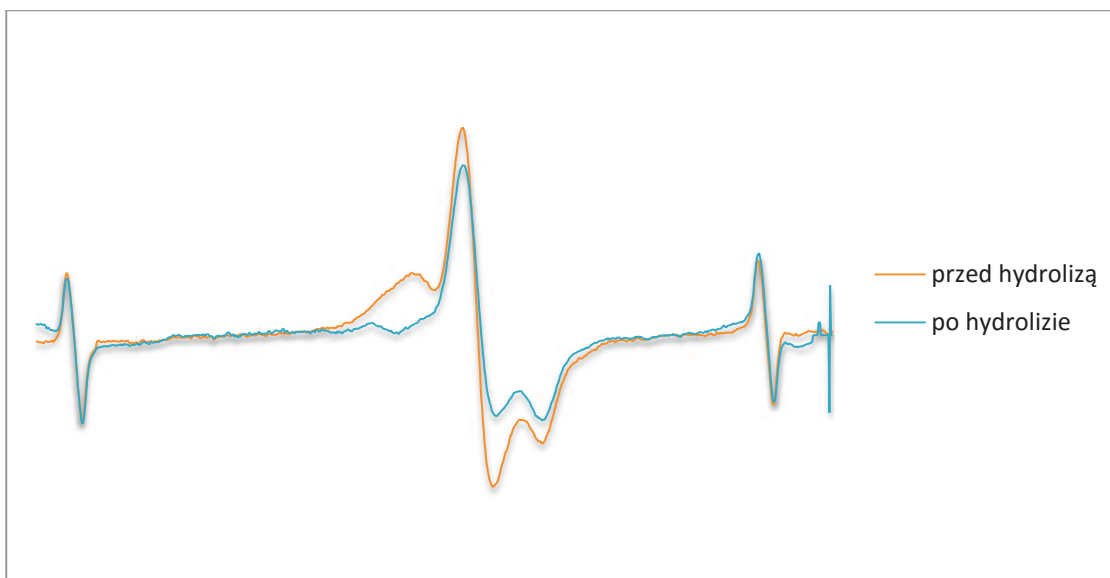
W celu określenia spowodowanych hydrolizą zmian w masie próbek, próbki zważono przed i po hydrolizie po ich dokładnym wyflukaniu, odwirowaniu i próżniowym wysuszeniu. Stopień redukcji masy w wyniku hydrolizy dla poszczególnych próbek przedstawiono w Tabeli 6.

Tabela 6. Redukcja masy próbek w wyniku ich hydrolizy w 2 M KOH.

Próbka	Masa przed hydrolizą [mg]	Masa po hydrolizie [mg]	Masa po hydrolizie [% masy początkowej]
K1	221,9	155,7	70,1
K2	166,5	125,6	75,4
K3	64,7	37,4	57,8
K4	154,4	101,8	65,9
K5	111,6	72,7	65,1
K6	115,2	74,6	64,8
K7	92,5	60,3	65,2
K8	94,6	62,2	65,8
K9	445,4	278,6	62,6
K10	735	446	60,7

7.4.2 Redukcja sygnału tła (BG) w wyniku hydrolizy napromieniowanych próbek kości w 2 M KOH.

Na Rys. 43 przedstawiono widma EPR próbki tkanki kostnej przed i po hydrolizie w 2 M KOH. Próbka została napromieniowana dawką 150 Gy przed hydrolizą.



Rys. 43. Wpływ hydrolizy próbki kości zbitej napromieniowanej dawką 150 Gy na jej widmo EPR.

W wyniku hydrolizy poza zanikiem składowej BG zaobserwowano redukcję sygnału RIS o około 30-75%. W Tabeli 7 przedstawiono procentową zmianę natężenia sygnału RIS w siedmiu próbkach po hydrolizie, w postaci współczynnika S utraty sygnału odpowiadającego procentowej utracie stężenia wygenerowanych radiacyjnie rodników CO^{2-} . Współczynnik S wyliczono uwzględniając zmianę mierzonego RIS w danej próbce oraz współczynnik k utraty jej masy po hydrolizie. Wartość współczynnika S obliczono ze wzoru:

$$S = 1 - \left[\frac{w_{\text{po KOH}}}{w_{\text{przed KOH}}} \right] * k \quad (16)$$

gdzie:

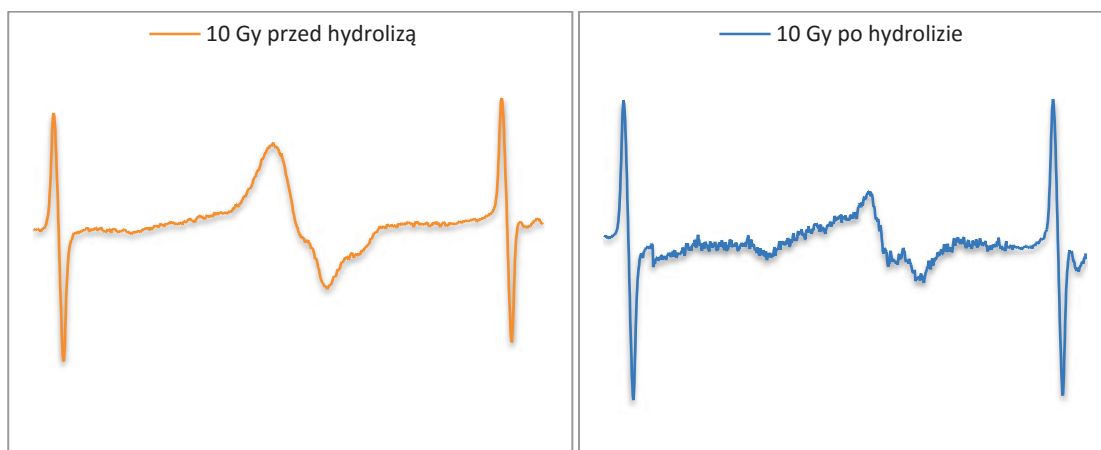
w – wydajność radiacyjna (wartość RIS na jednostkę masy próbki i jednostkę dawki)

$k = m_{\text{poKOH}}/m_{\text{przedKOH}}$ - współczynnik utraty masy tj. stosunek mas próbki po i przed hydrolizą.

Tabela 7. Zależność współczynnika utraty sygnału RIS od dawki napromieniowania.

Próbka	Spadek natężenia sygnału radiacyjnego S [%]	Dawka napromieniowania [Gy]
K1	33,9	150
K2	29,5	150
K4	75,3	5
K5	49,6	10
K6	39,8	20
K7	35,9	30
K8	40,5	50

Na Rys. 44 przedstawiono widma EPR próbki kości napromieniowanej dawką 10 Gy przed i po hydrolizie.



Rys. 44. Widma EPR próbki tkanki kostnej napromieniowanej dawką 10 Gy przed i po hydrolizie próbki w 2 M KOH.

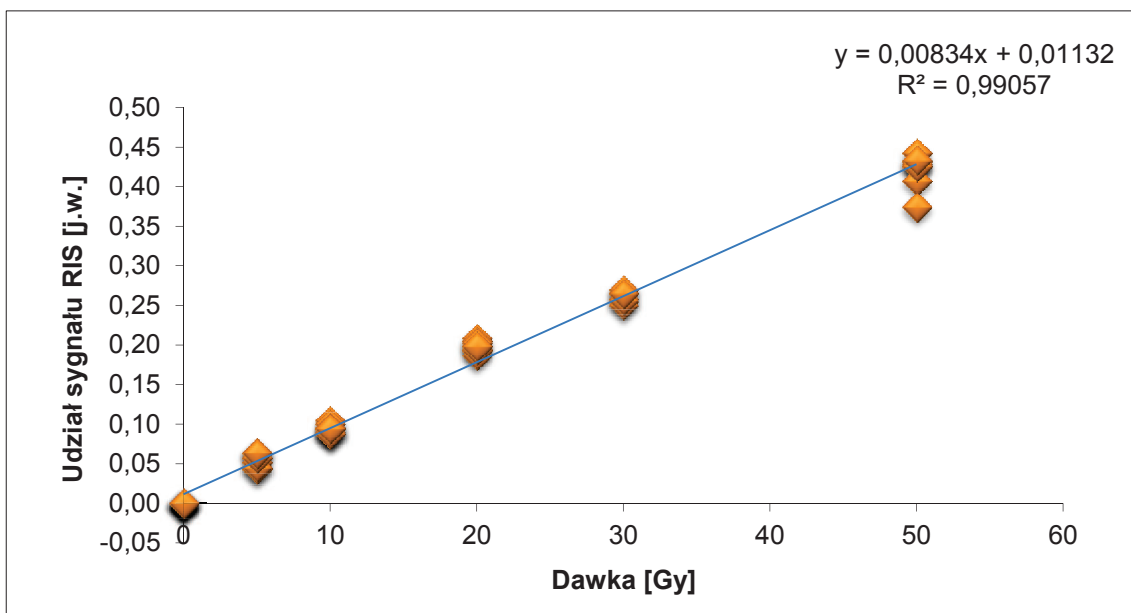
7.4.3 Zależność intensywności sygnału EPR od dawki pochłoniętego promieniowania.

W celu określenia zależności sygnału RIS od dawki pięć próbek napromieniowano na mokro różnymi dawkami podczas jednej sesji napromieniowywania. W Tabeli 9 przedstawiono uzyskane wartości udziału sygnału RIS w zależności od dawki.

Tabela 8. Wielkości sygnałów RIS w próbkach kości w zależności od dawki.

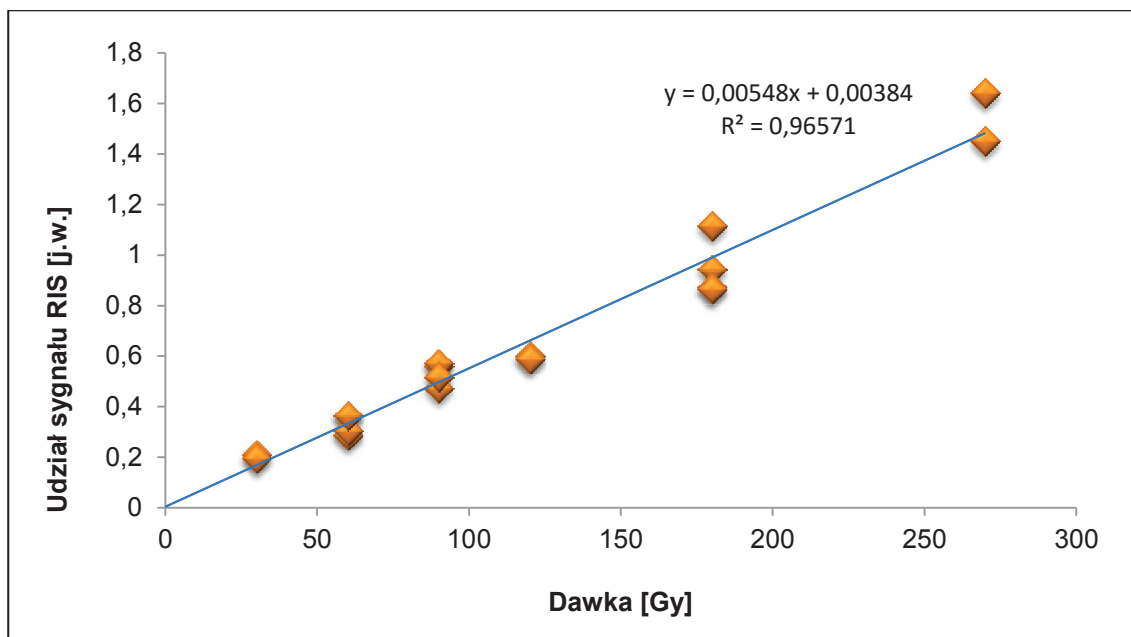
Próbka	Dawka [Gy]	Udział RIS
Kd1	5	0,055
Kd2	10	0,093
Kd3	20	0,198
Kd4	30	0,261
Kd5	50	0,421

Próbki zmierzono dziewięciokrotnie a uzyskane , wyniki przedstawiono na Rys. 45.



Rys. 45. Zależność od dawki wartości sygnału RIS w widmie EPR kości .

Zależność natężenia sygnału RIS dla sześciu innych próbek napromieniowanych w zakresie dawek 30-270 Gy przedstawia Rys. 46.



Rys. 46 Zależność wielkości udziałów sygnału RIS w widmie EPR w zależności do dawki pochłoniętego promieniowania w zakresie 30-270 Gy.

W oparciu o dane przedstawione na Rys. 45 wyznaczono wartości minimalnego poziomu detekcji (DL) oraz dawki krytycznej (CL) dla poziomu ufności 95% zdefiniowanych jako (95):

- minimalny poziom detekcji – minimalna, prawdziwa wartość wielkości mierzonej, którą można wykryć z prawdopodobieństwem 0.05 popełnienia błędu
- dawka krytyczna - minimalna zmierzona wartość, która wskazuje z prawdopodobieństwem co najmniej 0.95 na obecność fizycznego efektu (jest ona różna od zera z powodu obecności fluktuacji (szumu) wartości sygnału RIS w nienapromieniowanych próbkach)

Wykorzystując wzory wprowadzone przez Fattibene et al. (95) obliczono wartości minimalny limitu detekcji i DL=6.4 Gy oraz dawkę krytyczną CL=3.4 Gy, charakteryzujące ilościowo czułość zastosowanej metody pomiarowej.

7.4.4 Zastosowanie dozymetrii EPR do pomiaru dawki pochłoniętej in vivo.

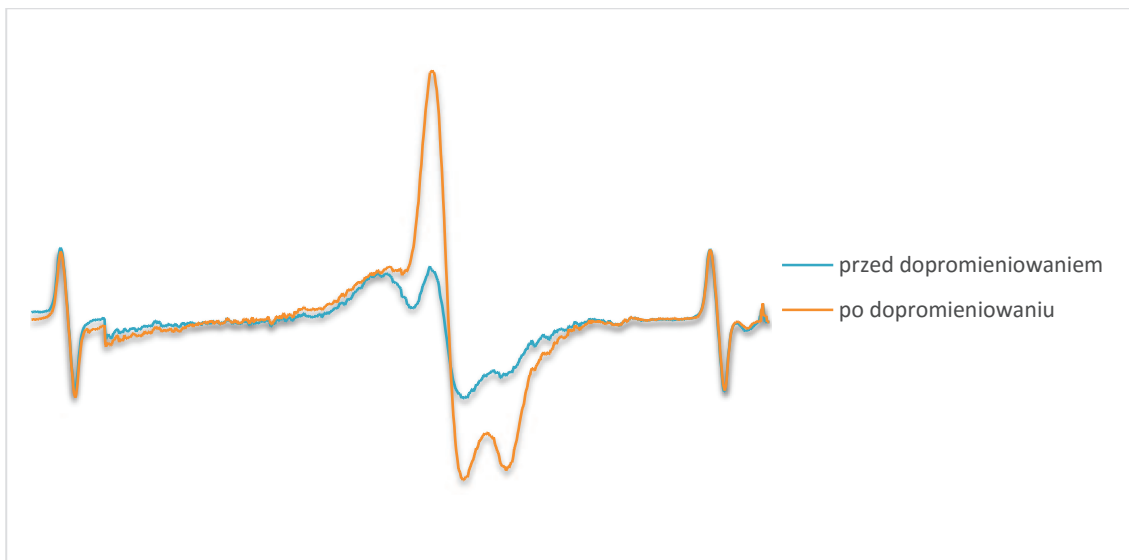
Przedstawione powyżej wyniki badań próbek kości napromieniowanych in vitro pozwoliły na stworzenie procedury pomiaru dawki pochłoniętej w warunkach in vivo i zweryfikowanie zgodności uzyskanych wyników dozymetrii EPR z dawkami obliczonymi przez komputerowe systemy planowania radioterapii (RTP – Radiotherapy Treatment Planning). W tym celu uzyskano fragmenty tkanki kostnej od pacjentów po radioterapii i metodą dawki dodanej określono wielkość pochłoniętego promieniowania w trakcie radioterapii. Dane te następnie porównano z dawkami określonymi przez fizyków medycznych w systemie RTP.

7.4.4.1 Wyniki dozymetrii retrospektywnej dawek pochłoniętych w czasie radioterapii.

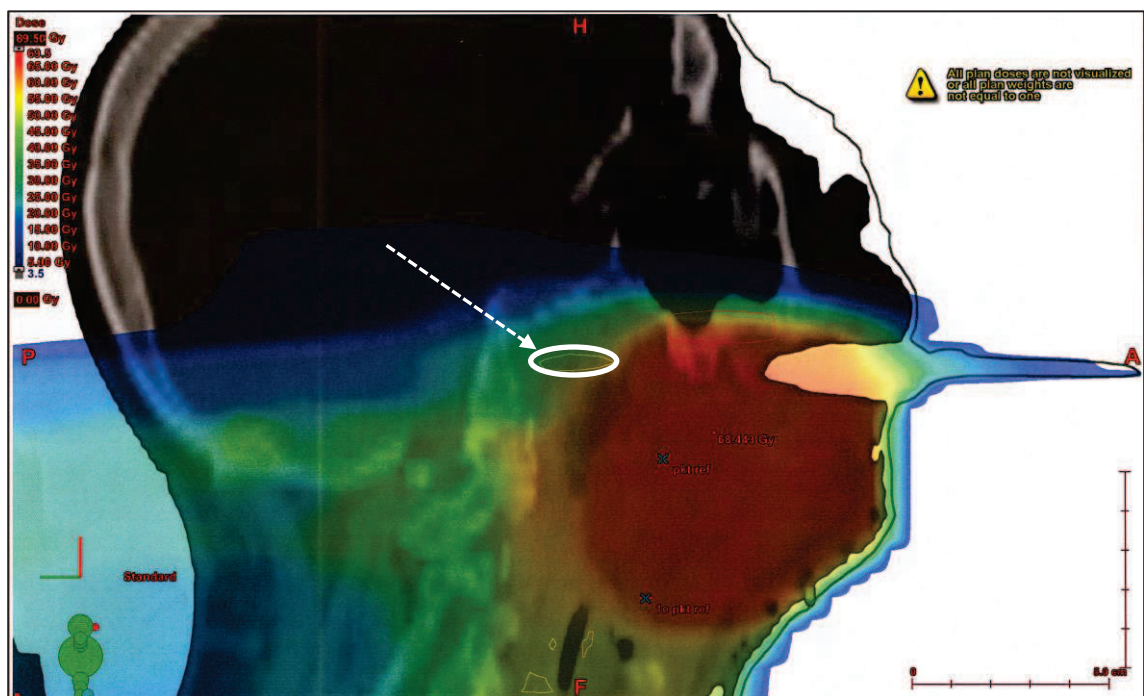
Pomiary przeprowadzono u trzech pacjentów Katedry i Kliniki Onkologii i Radioterapii GUMed napromieniowanych na okolice szyi i głowy.

● Pacjent P1

Próbka kości pochodziła z lewej strony kości szczękowej z okolicy zęba nr 27 (zgodnie z nomenklaturą stomatologiczną Światowej Federacji Dentystycznej FDI). Fragment kości usunięto chirurgicznie z powodu wydzielania się martwiczo tkanek spowodowanego radioterapią. Pacjent był leczony onkologicznie z powodu nowotworu okolicy szczęki. Według planu leczenia dawka całkowita obliczona przez fizyków medycznych w obszarze usuniętej kości wynosiła 45 Gy. Pacjenta napromieniowywano promieniowaniem X o maksymalnej energii 6 MeV. Na Rys. 47 przedstawiono sygnały EPR próbki kości napromieniowanej in vivo w trakcie radioterapii i po jej dopromieniowaniu in vitro dawką $D_{cal}=100$ Gy. Rozkład dawki promieniowania otrzymany z komputerowego planu leczenia pacjenta P1 przedstawia Rys. 48.



Rys. 47 Widmo EPR próbki kości pochodzącej od pacjenta P1, przed i po dopromieniowaniu dawką 100 Gy.

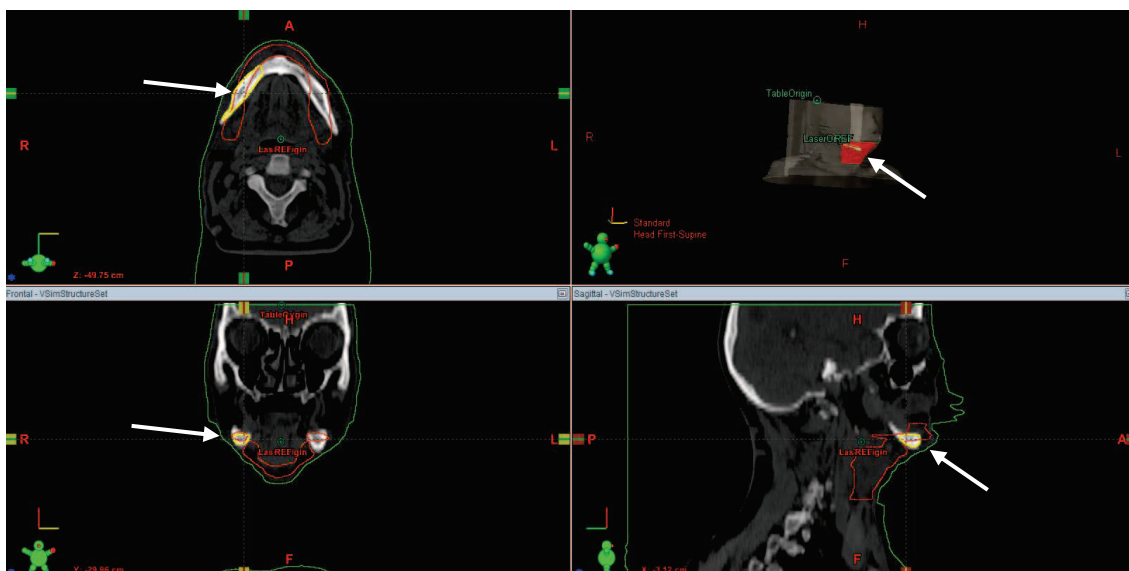


Rys. 48. Pole rozkładu dawki promieniowania u pacjenta P1. Strzałka wskazuje zaznaczone elipsą miejsce usunięcia fragmentu kości.

Po numerycznym rozkładzie widm z Rys. 47 określono wielkości sygnału RIS w każdym z nich i na podstawie wzoru (15) obliczono dawkę $D_r = (45.6 \pm 1.6)$ Gy pochłoniętą w czasie radioterapii. Usunięty fragment kości znajdował się na granicy napromieniowanego pola. Obszar zajmowany przez usunięty fragment kości znajduje się pomiędzy izodozami 40 i 65 Gy (Rys. 48). Dawka średnia obliczona przez RTP w tym obszarze wynosiła $(45,0 \pm 1.8)$ Gy.

● Pacjent P2

Próbka tkanki kostnej od pacjenta P2 pochodziła z usuniętego fragmentu żuchwy po prawej stronie w przednim odcinku w okolicy zęba trzeciego i czwartego (nr 43 i nr 44). Pacjentowi usunięto ten fragment kości z powodu naciekającego żuchwę guza wargi. Miejsce napromieniowania podczas leczenia radiacyjnego obejmowało wargi i nadgnykowe węzły chłonne. Pacjenta napromieniowywano promieniowaniem X o maksymalnej energii 6 MeV. Dawka przyjętego promieniowania obliczona na podstawie planu leczenia w miejscu usuniętego fragmentu kostnego wynosiła 28,7 Gy. Na Rys. 49 przedstawiono obrazy wygenerowane przed RTP z wrysowaną żuchwą po stronie prawej i obszarem napromieniania.



Rys. 49 Obrazy z planu leczenia pacjenta z zaznaczonym na żółto fragmentem żuchwy i obszarem napromieniania. Położenie usuniętego fragmentu kości wskazują strzałki.

Wartość dawki zmierzonej metodą EPR w usuniętym fragmencie kości wynosiła (28.0 ± 1.0) Gy.

● Pacjent P3

Próbka od pacjenta P3 pochodziła kości szczękowej z okolicy zębów nr. 4 i 6. Zabieg chirurgicznego usunięcia fragmentu kości przeprowadzono z powodu wystąpienia martwicy popromiennej tkanek. U pacjenta P3 radioterapia została zastosowana jako leczenia paliatywne. Do napromieniowania użyto promieniowania X o maksymalnej 6 MeV. Pacjent odbył trzy tury radioterapii. W pierwszej turze otrzymał 40 Gy promieniowania w 20 frakcjach po 2 Gy. W drugiej turze otrzymał 26 Gy w 13 frakcjach po 2 Gy. W trzeciej turze otrzymał 4 Gy w dwóch frakcjach po 2 Gy. Łączna dawka promieniowania w badanym fragmencie wyniosła $70,0 \pm 2,8$ Gy. Dawka zmierzona metodą EPR wyniosła $61,4 \pm 2,3$ Gy. Dawki zaplanowane w leczeniu radioterapeutycznym porównano z dawkami zmierzonymi przedstawiono Tabeli 9.

Tabela 9. Dawki zrekonstruowane metodą EPR w porównaniu do dawek TPS (Treatment Planning System). Niepewności pomiarowe obliczone wg. wzoru (20) podano w nawiasach.

Pacjent	EPR – Dawka zrekonstruowana [Gy]	TPS – dawka zaplanowana [Gy]
P 1	45,6 (1,6)	45,0 (1,8)
P 2	28,0 (1,0)	28,7 (1,2)
P 3	61,4 (2,3)	70,0 (2,8)

Tabela 10 przedstawia porównanie wartości czułości radiacyjnej dla trzech badanych próbek.

Tabela 10. Porównanie czułości radiacyjnej zmierzonych próbek kości. Podane wartości są względne, niepewności pomiarowe podano w nawiasach.

Pacjent	Czułość radiacyjna/j.u.
P 1	99 (3)
P 2	93 (3)
P 3	98 (3)

7.4.4.2 Analiza niepewności pomiarowych

Niepewności zrekonstruowanych dawek podano w Tabeli 9 jako łączne. Niepewność względna dawki kalibracyjnej wynosiła 1,5% i określona została na podstawie danych z rutynowych pomiarów dozymetrycznych przyspieszacza i dokładności dostarczenia dawki w radioterapii.

Niepewność zmierzonych udziałów składnika RIS została wyznaczona na podstawie powtarzalności wartości sygnału dozymetrycznego RIS zmierzonych czterokrotnie w kolejnych dniach. Powtarzalność mierzonego RIS zawierała się w zakresie od 0,3% do 3%, w zależności od intensywności mierzonego widma. Należy podkreślić, że indywidualna kalibracja czułości radiacyjnej próbek (czyli stosowanie metody dawki dodanej) i normalizacji widm EPR do amplitud linii standardu Mn^{2+} , redukuje potencjalne niepewności wynikające z różnic w czułości radiacyjnej próbek jak również z wahań w czułości rejestracji sygnału EPR.

Błędy pomiarowe wyznaczonych dawek na podstawie pomiarów EPR składają się z niepewności pomiarowych złożonych.

Całkowity względny błąd pomiaru dawki, wynikający ze wzoru (15), przedstawić można za pomocą wzoru:

$$\frac{\Delta D}{D} = \sqrt{\left(\frac{\Delta D_{cal}}{D_{cal}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta F}{F}\right)^2} \quad (17)$$

gdzie F oznacza funkcję mierzonych wartości RIS przed i po dopromieniowaniu przedstawioną wzorem:

$$F(RIS(r), RIS(r + D_{cal})) = \frac{RIS(r)}{RIS(r + D_{cal}) - RIS(r)} \quad (18)$$

Niepewność względną wyznaczania funkcji F zmiennych $RIS(r)$ i $RIS(r + D_{cal})$ można przedstawić wzorem (19):

$$\left(\frac{\Delta F}{F}\right) = \sqrt{\left|\frac{\partial F}{\partial RIS(r)} \cdot \Delta RIS(r)\right|^2 + \left|\frac{\partial F}{\partial RIS(r + D_{cal})} \cdot \Delta RIS(r + D_{cal})\right|^2} \quad (19)$$

Po podstawieniu pochodnych cząstkowych funkcji F ostateczny wzór na całkowitą niepewność względną dawki przyjmuje postać:

$$\left(\frac{\Delta D}{D}\right) = \sqrt{\frac{(\Delta RIS(r+D_{cal}))^2 + \left(\frac{RIS(r+D_{cal})}{RIS(r)}\right)^2 \cdot \Delta RIS(r)^2}{(RIS(r+D_{cal}) - RIS(r))^2} + \left(\frac{\Delta D_{cal}}{D_{cal}}\right)^2} \quad (20)$$

Wielkość dawki dodanej D_{cal} (kalibracyjnej) wybrana została na podstawie symulacji zależności całkowitej niepewności dawki zmierzonej danej wzorem (20) od wartości dawki kalibracyjnej. Symulacja ta pokazała, że znaczące zmniejszenie niepewności wraz ze wzrostem dawki dodanej zachodzi tylko do ok. 100 Gy, a powyżej tej wartości niepewność całkowita pozostaje na poziomie ok 3.5% dla badanego zakresu mierzonych dawek (od 20 do 80 Gy). Niepewność względna dawki kalibracyjnej wynosiła $\Delta D_{cal}/D_{cal} = 1,5\%$ i określona została na podstawie danych z rutynowych pomiarów dozymetrycznych przyspieszacza i dokładności dostarczenia dawki w radioterapii.

8 Dyskusja

8.1 Wpływ parametrów mocy mikrofalowej na rejestrowane sygnały EPR

Przeprowadzone na przestrzeni 4 miesięcy pomiary sygnałów RIS i BG w napromieniowanej próbce, których wyniki przedstawiono na Rys. 14 i 15 oraz Tabeli 2 pokazują, że precyzja pomiarów przy użyciu mocy mikrofalowej 5,14 mW jest znacząco wyższa w stosunku do pomiarów wykonanych dla mocy 20 mW. W pomiarach EPR próbek dla mocy 5,14 mW uzyskano znacznie mniejsze odchylenia wyników indywidualnych pomiarów od krzywej dopasowania odzwierciedlającej tendencję zmian w czasie sygnałów BG i RIS. Dodatkowo, częstokroć procedura automatycznego strojenia spektrometru dla mocy 20 mW nie wystarczała, prąd detektora często wychodził poza zalecany optymalny zakres i konieczne było ręczne dostrajanie wnęki spektrometru, co wydłużało czas trwania pomiarów. Przy wyższej mocy mikrofalowej obserwowano też zmniejszenie stosunku sygnału do szumu w rejestrowanych widmach. Przedstawione wyżej argumenty wpłynęły na wybór mocy mikrofalowa 5,14 mW jako optymalnej dla pomiarów w dalszej części pracy.

8.2 Wpływ wody na amplitudę sygnałów EPR

Wahania natężenia sygnału natywnego BG w widmie EPR nienapromieniowanej próbki kości przedstawione na Rys. 21 i 22 sugerują występowanie odwracalnego procesu zachodzącego w strukturze kości korowej. Stężenie centrów paramagnetycznych odpowiedzialnych za sygnał BG zmniejsza się pod wpływem umieszczenia próbek w wodzie, a następnie, po ich wysuszeniu i przetrzymywaniu w zamkniętych pojemnikach w normalnych warunkach laboratoryjnych bez dostępu światła, szybko wzrasta w czasie 2-3 tygodni. Podobny wpływ wody jak i upływu czasu po wysuszeniu próbek na sygnały EPR zaobserwowali w próbkach paznokci Reyes i inni [96], którzy wyjaśniali ten efekt modelem „gąbki”: przypisują oni spadek intensywności sygnałów EPR w moczonych w wodzie próbkach paznokci redukcji przez wodę wytworzonych naprężeń mechanicznych w strukturze keratynowej paznokci i przywracania pierwotnego stanu w stałej strukturze keratyny paznokci. Z kolei wzrost sygnału EPR w wysuszonych paznokciach tłumaczono przez rosnące naprężenia mechaniczne i odkształcenia sprężyste w strukturze keratyny. W przypadku kości, pomimo różnicy w składzie i strukturze w porównaniu do paznokci, hipoteza tłumacząca zanik lub generację defektów paramagnetycznych w kości redukowaniem lub narastaniem w niej naprężeń mechanicznych zależnych od obecności wody wydaje się być bardzo prawdopodobna. Zaobserwowany wzrost sygnału tła BG wraz z schnięciem próbek sugeruje, że co najmniej część natywnego sygnału tła w próbkach kości (mierzonych w stanie wysuszonym, co jest konieczne dla wykonania pomiarów EPR w paśmie X lub Q) może być związana z rodnikami generowanymi w kości przez naprężenia, mechaniczny stres i odkształcenia wynikające z procesu schnięcia. Prawdopodobne jest również, że występujące między różnymi próbkami różnice w skali czasowej i wielkości wzrostu ich sygnału BG mogą być uzależnione od warunków (np. prędkości) suszenia i wilgotności powietrza w czasie przechowywania próbek, jak również od zawartości w nich niemineralnych składników. Podobne efekty obserwowane dla amplitudy i podwójnej całki (Rys. 22) pokazują, że zmiany w amplitudzie nie są artefaktami powiązanymi, na przykład z ewentualnymi subtelnymi zmianami w kształcie linii widma wpływającymi na amplitudę, ale odzwierciedlają rzeczywiste zmiany w stężeniu centrów paramagnetycznych.

8.3 Wpływ kruszenia i wielkości ziaren na sygnały EPR

Zaobserwowane efekty mechanicznej generacji rodników w kości przedstawione na Rys. 23, 24, 25 i w Tabeli 4, dla których kształt widma EPR podobny jest do kształtu sygnału tła natywnego BG w kości, są podobne do wpływu kruszenia szkliwa zębów na jego sygnał EPR, opisanego przez Sholom'a i innych [97], a także przez Polyakova i innych [98]. Zaobserwowali oni znaczący wzrost sygnału EPR po pokruszeniu szkliwa w ziarna o rozmiarach krawędzi poniżej 250 μm . Informacji o stabilności wygenerowanego mechanicznie sygnału w szkliwie nie podano w tych artykułach. W przypadku kości badanych w tej pracy, wygenerowany mechanicznie, zwiększony sygnał EPR nie był stabilny w czasie i uległ zmniejszeniu o około 30% po 50 dniach po pokruszeniu (Rys. 26).

8.4 Wpływ warunków napromieniowania na sygnały EPR generowane radiacyjnie

Napromieniowanie próbek kości promieniowaniem jonizującym powodowało generację asymetrycznego sygnału RIS używanego w dozymetrii EPR jako miara pochłoniętej dawki (Rys.18). Sygnał ten pochodzi od rodników $\text{CO}_2^{\bullet-}$, pochodzących z hydroksyapatytowej części kości. Sygnał dozymetryczny RIS generowany jest zarówno podczas napromieniowania próbek na sucho jak i na mokro (Rys. 27, 28). Napromieniowanie powoduje również powstanie innego sygnału EPR, spektralnie podobnego do natywnego sygnału tła. W próbkach mierzonych krótko (w przeciągu tygodnia) po napromieniowaniu efekt generacji tego „tło-podobnego” sygnału jest znacznie większy przy napromieniowaniu na sucho niż w rezultacie napromieniowywania próbek zanurzonych w wodzie.

Wielkość generowanego radiacyjnie sygnału „tło-podobnego” zarówno podczas napromieniowywania na sucho jak i na mokro nie zależała od dawki w badanym zakresie dawek (50-100 Gy). Wskazuje to na to, że dawka nasycenia dla „tło-podobnego” sygnału radiacyjnego leży poniżej 50 Gy. Mimo dużego zróżnicowania między poszczególnymi próbkami co do wielkości generowanego radiacyjnie sygnału „tło-podobnego”,

zależność jego wielkości oraz zmian w czasie od warunków napromieniowania (na sucho lub na mokro) we wszystkich próbkach była podobna (Rys. 29, 30, 31). Po napromieniowaniu na mokro stwierdzono wyraźny wzrost intensywności sygnału BG w czasie pierwszych 5-7 tygodni (Rys. 33), z największym tempem wzrostu w czasie pierwszych 3 tygodni (Rys.33). W próbkach napromieniowanych na sucho największy spadek udziału sygnału BG w widmie EPR próbek występował w okresie 30 dni od napromieniowania (Rys.31). Spadek intensywności sygnału BG jest wolniejszy w czasie od 30 do 120 dni po napromieniowaniu kiedy to stabilizuje się na poziomie od 15 do 35% powyżej jego wartości przed napromieniowaniem. Na tym etapie badań nie było możliwe jednoznaczne zróznicowanie symetrycznego sygnału EPR w badanych próbkach na natywny sygnał tła pochodzące od części organicznej kości, wygenerowany mechanicznymi naprężeniami w kości wysuszonej i te wygenerowane promieniowaniem.

Pomiary zmian sygnałów EPR w czasie w próbkach przetrzymywanych w suchych warunkach przedstawione na Rys. 35 pokazują, że udział sygnału RIS i amplituda A1 w próbkach napromieniowanych na sucho spada o około 5-10% w czasie dwóch tygodni po napromieniowaniu, następnie ulega stabilizacji, a kilkudniowe zanurzenie próbek w wodzie nie ma wpływu na wielkość sygnału RIS i amplitudę A1. Zaobserwowany spadek sygnału RIS w pierwszych dniach po napromieniowaniu jest istotnie mniejszy niż ten zaobserwowany przez Onori'ego i innych [72] w kościach kurczaków, gdzie wynosił on 25% w stosunku do początkowej wartości zmierzonej po napromieniowaniu. Jednakże autorzy przeprowadzali swoje badania na sproszkowanych kościach kurczaków i napromieniowanych dużo wyższymi dawkami (5 kGy) niż te, których efekty badano w tej pracy. Zmiany amplitudy A2 w próbce napromieniowanej na sucho mają odmienny charakter (Rys. 18) - zaobserwowano 25-30% wzrost amplitudy sygnału A2 w czasie 3-4 tygodni od napromieniowania. Wzrost ten spowodowany był faktem nakładania się na sygnał RIS wygenerowanego promieniowaniem i malejącego w czasie symetrycznego sygnału „tło-podobnego” (Rys 35). Jest on szczególnie silny w widmie próbki kości napromieniowanej na sucho w pierwszych kilkunastu dniach po napromieniowaniu. Powoduje to przedstawione powyżej różnice między zmianami w czasie amplitudy A2, amplitudy A1 i udziału sygnału RIS w widmie. Z tego powodu użycie amplitudy A2 w pomiarach dozymetrycznych może być obarczone błędem systematycznym ze względu na wpływ sygnału BG na mierzoną amplitudę A2. W konsekwencji

może to prowadzić do zaobserwowania nieliniowej odpowiedzi amplitudy A2 na dawkę w napromieniowanej kości, jeśli pomiary rozłożone są w czasie kilku dni w pierwszych 3-4 tygodniach po napromieniowaniu, gdy następują znaczne zmiany w natężeniu symetrycznego tło-podobnego sygnału próbek, tj. spadek jego natężenia w próbkach napromieniowanych na sucho, wzrost w próbkach napromieniowanych na mokro. Efektem tego mogą być błędy systematyczne w określaniu pochłoniętej dawki promieniowania w retrospektywnej dozymetrii EPR jeżeli obliczenia będą się opierać pomiarach amplitudy A2. Biorąc pod uwagę wpływ zmieniającego się sygnału tła na amplitudy A1 i przede wszystkim na amplitudę A2 sygnału dozymetrycznego oraz trudności w ich dokładnym określeniu w próbkach napromieniowanych niskimi dawkami (np. jak pokazują to widma próbki napromieniowanej na sucho na Rys. 34 i próbki przed hydrolizą na Rys. 44) dokładna dozymetria EPR w kości powinna być oparta na numerycznym rozkładzie widm na składowe RIS i BG.

Maksymalne różnice w czułości radiacyjnej sygnału dozymetrycznego w badanych próbkach kości wynosiła $\pm 18\%$ w stosunku do wartości średniej (Rys. 37). Należy podkreślić, że wszystkie badane próbki uzyskano z jednego większego fragmentu kości, a pomimo tego rozrzut czułości radiacyjnej był duży. Może być to związane z różnicami w stopniu zmineralizowania pomiędzy badanymi fragmentami kości. Obserwacja ta wskazuje na istotną potrzebę indywidualnej kalibracji czułości radiacyjnej próbek metodą dawki dodanej w celu poprawy dokładności w retrospektywnej dozymetrii EPR. Na Rys. 37 przedstawiono również różnice w czułości radiacyjnej poszczególnych próbek dla warunków napromieniowania na mokro i na sucho. Czułość radiacyjna próbek napromieniowanych na mokro była znacząco (o 8-20%) wyższa w stosunku do próbek napromieniowanych na sucho. Tak duże różnice nie mogą być przypisane potencjalnym artefaktom wynikającym z różnic w pochłoniętych dawkach w warunkach napromieniowania na sucho i na mokro - rozkład dawki wzdłuż osi wiązki dla promieniowania X 6 MVp, ma relatywnie szerokie maksimum na głębokości 1,5 cm i przesunięcie pozycji próbek w osi wiązki nawet o ± 5 mm nie może spowodować większej niż 1% różnicy w dawce pochłoniętej. Jeśli dalsze badania próbek kości od innych dawców potwierdzą zaobserwowaną tutaj wyższą czułość radiacyjną w warunkach napromieniowania na mokro, to efekt ten powinien być wzięty pod uwagę w kalibracji dawek w retrospektywnej dozymetrii EPR w kości. Dodatkowym istotnym argumentem za napromienio-

wanym kalibracyjnym próbek kości na mokro jest fakt, że napromieniowanie kości in vivo zawsze odbywa się w środowisku wodnym. Jeszcze jednym, istotnym praktycznym argumentem przemawiającym za dopromieniowywaniem próbek kości na mokro jest zaobserwowany w tej pracy efekt znacznej redukcji sygnału tła przez wodę zawartą w próbce i tym samym znaczące zmniejszenie jego wpływu na określenie wielkości sygnału dozymetrycznego. Ma to szczególnie ważne znaczenie przy określaniu niskich dawek promieniowania, gdy mierzone widma EPR kości są zdominowane przez sygnał tła. Stwierdzono również stabilność w czasie co najmniej dwóch lat sygnału RIS w próbce kości przechowywanej w wodzie w temperaturze 4⁰C (Rys. 38). Fakt ten wskazuje na możliwość wiarygodnego oszacowania dawki pochłoniętego promieniowania w próbkach kości nie podlegających remodelingowi po dłuższym, kilkuletnim okresie czasu od wystąpienia ekspozycji na promieniowanie jonizujące.

Po napromieniowaniu próbek poddanych wcześniej rozkruszeniu nie obserwuje się znaczącego wzrostu natywnego sygnału tła podczas napromieniowywania na mokro (Rys. 39), natomiast po napromieniowaniu na sucho rozkruszonej próbki kości sygnał tła wzrasta (Rys. 41). Generowany radiacyjnie sygnał tłopodobny podlega znaczącemu zanikowi z upływem czasu, podobnie jak w próbkach niepokruszonych.

8.5 Wpływ hydrolizy kości w 2M KOH na rejestrowane sygnały

EPR

Hydroliza próbek kości w 2M roztworze KOH powodowała około 30% utratę masy tkanki kostnej (Tabela 6). Wielkość utraconej masy tkanki kostnej odpowiada w przybliżeniu zawartości macierzy organicznej w kości korowej. Usunięciu części organicznej kości towarzyszy eliminacja natywnego sygnału tła z widma EPR kości (Rys. 43). Podobny efekt redukcji tła w szkliwie po jego hydrolizie w nasyconym roztworze KOH w opisał Romanyukha i inni [99]. Szkliwo zębów zawiera 95-97% hydroksypatytu a pozostałość to materiał organiczny odpowiedzialny za występowanie sygnału natywnego tła w widmie EPR szkliwa. Przed hydrolizą napromieniowanych próbek szkliwa autorzy obserwowali sygnały EPR: natywny sygnał tła i sygnał dozymetryczny, natomiast po hydrolizie tylko sygnał dozymetryczny. Podobnie widmo EPR napromieniowanej i zhydro-

lizowanej próbki kostnej zawiera tylko sygnał RIS (Rys. 43 i Rys. 44). Taki sam efekt zaobserwowany została przez G. Strzelczak i innych [74], którzy deproteinizację kości przeprowadzili w etylenodiaminie. W wyniku napromieniowania zdeproteinizowanej kości dawką 7 kGy zarejestrowali sygnał rodników o symetrii osiowej, który nie zawierał żadnych dodatkowych struktur. Mimo, iż po hydrolizie sygnał RIS nie jest już maskowany przez natywny sygnał tła, to jednak w wyniku hydrolizy utracono około 35-40% intensywności sygnału radiacyjnego (Tabela 7) przypisanemu rodnikowi CO_2^- . Przedstawione tutaj wyniki wskazują na to, że redukcja natywnego sygnału tła poprzez hydrolizę zasadową kości może być przydatna w zwiększeniu czułości retrospektywnej dozymetrii, zwłaszcza w rejonie niskich dawek (Rys. 44). Zastosowanie tej techniki wymaga jednak dalszych prac badawczych uściślających uzyskane tutaj wstępne informacje o stopniu zaniku sygnału dozymetrycznego pod wpływem oddziaływania roztworów hydrolizujących lub deproteinizujących. Wieser inni [100] po hydrolizie w dietylenotriaminie fragmentu kości wołowej napromieniowanej dawką 10 Gy zaobserwowali całkowite usunięcie sygnału tła, bez utraty sygnału RIS pochodzącego od hydroksypatyty. Dalszych badań wymaga również ocena sygnału generowanego radiacyjnie pochodzącego od części organicznej kości, badanego przez W. Stachowicza i innych [101]. Autorzy zarejestrowali sygnał (symetryczny dublet) generowany radiacyjnie w kolagenie kostnym, jak również kości zbitej po napromieniowaniu próbek w warunkach próżni. Sygnał ten zanikał całkowicie w przeciągu 5- 10 dni po napromieniowaniu. W badaniach przedstawionych w niniejszej pracy nie obserwowano podobnego sygnału w żadnej z próbek kości. Badania własne i innych wskazują na potrzebę przeprowadzenia dalszych prac w celu poprawy czułości dozymetrii w rejonie niskich dawek z wykorzystaniem innych środków hydrolizujących kość w celu usunięcia sygnałów pochodzących od komponenty organicznej kości.

8.6 Zależność intensywności sygnału EPR od dawki pochłoniętego promieniowania.

W niniejszej pracy uzyskano liniową zależność sygnału RIS od dawki w zakresie 5 - 270 Gy. Istnieje również wiele doniesień o istnieniu liniowej zależności intensywności sygnału RIS od dawki dla tkanki kostnej. Badania takie przeprowadziła również Kinoshita i inni [102] w kościach królika wykazując liniowość sygnału RIS od dawki w zakresie 0-200 Gy, natomiast Onori i inni [72] wykazali liniowość sygnału radiacyjnego w kościach kurczaków w zakresie od 1 do 9 kGy.

Wyniki te potwierdzają zaobserwowaną w niniejszej pracy i założoną w pomiarach dawek u pacjentów po radioterapii liniową zależność sygnału dozymetrycznego od dawki w zakresie do 270 Gy (Rys. 45 i 46).

8.7 Zastosowanie metody dozymetrii EPR w kościach w pomiarach ex vivo dawki promieniowania u pacjentów po radioterapii

Wyniki dozymetrii EPR ex vivo przedstawione w Tabeli 9 pokazują zgodność dawek zmierzonych metodą EPR z dawkami zaplanowanymi przez systemy TPS u pacjentów onkologicznych poddanych radioterapii. Próbkę kości od pacjenta P1 pobrano po trzech miesiącach od zakończenia radioterapii, a od pacjenta P2 próbki pobrano po sześciu miesiącach po zakończeniu radioterapii. Zgodność dawek zaplanowanych z dawkami zmierzonymi pozwala wnioskować, że pomimo tego, że próbki te nie były pobrane niezwłocznie po zakończeniu napromieniowania, potencjalne procesy fizjologicznej przebudowy kości nie wpłynęły znacząco na koncentrację rodników $\text{CO}_2^{\bullet-}$ wygenerowanych radiacyjnie w strukturze hydroksyapatytu badanych fragmentów kostnych. Obserwacja ta jest zgodna z wynikami uzyskanymi przez Trompier'a i innych [2]. Autorzy ci zrekonstruowali dawki pochłoniętego promieniowania we fragmentach kości usuniętych z ciał pacjentów po upływie prawie roku od napromieniowania dawkami w zakresie 70-100 Gy – wyniki dozymetrii EPR w tych przypadkach również zgodne były z

dawkami obliczonymi na podstawie danych otrzymanych z obliczeń przeprowadzonych przez fizyków medycznych. Dawka wyznaczona metodą retrospektywnej dozymetrii EPR dla pacjenta P3 była o ok 12% niższa w stosunku do dawki zaplanowanej przez TPS. Różnicę tą można przypisać temu, że czas jaki upłynął od dnia zakończenia radioterapii do momentu usunięcia fragmentu kości był u tego pacjenta znacząco dłuższy niż w przypadku do pacjentów P1 i P2 i wynosił sześć lat. Mogło to wpłynąć na zmniejszenie ilości wygenerowanych radiacyjnie centrów CO_2^* w rezultacie procesów przebudowy kości. Przyszłe badania efektów związanych z fizjologicznymi procesami przebudowy kości mogą być istotne dla poprawy dokładności rekonstrukcji dawki metodą EPR. Określenie tempa zaniku generowanych radiacyjnie rodników wskutek przebudowy kości i wpływu na to tempo możliwej martwicy tkanek spowodowanej promieniowaniem wymaga szerszych oddzielnych badań.

Różnica w wartościach indywidualnych czułości radiacyjnych próbek w trzech próbkach kości od pacjentów radioterapii wynosiła wartość 6% (Tabela 10). Jednakże różnice czułości w próbkach od jednego dawcy, przedstawione na Rys. 37, były znacznie większe sięgając 34%. Dlatego tak niski (6%) rozrzut czułości radiacyjnej między próbkami od pacjentów P1-P3 nie może być reprezentatywny dla zmienności międzyosobniczej tego parametru. Wskazuje to na konieczność indywidualnej kalibracji dawki dla dokładnej dozymetrii EPR w kościach. Kiedy odstęp czasu pomiędzy napromienianiem a pobraniem próbek kości jest krótki w porównaniu do czasu fizjologicznej przebudowy tkanki kostnej jedyna możliwa, aczkolwiek przybliżona symulacja warunków napromieniania in vivo może być uzyskana poprzez napromienianie próbek w środowisku wodnym [77].

9 Podsumowanie

Uzyskane wyniki pokazują możliwość zastosowania dozymetrii EPR w kościach w wypadkach radiacyjnych jak również w określaniu ex post dawek pochłoniętego promieniowania u pacjentów radioterapii. Wybór parametrów pracy spektrometru EPR stanowi istotny czynnik dla dokładności rejestracji widm. Przeprowadzane badania pozwoliły na określenie warunków procedury dozymetrycznej (parametrów pracy

spektrometru, sposobu napromieniowywania próbek i analizy ilościowej widm EPR) optymalnych dla określania dawki. Przeprowadzone pomiary pokazały, że napromieniowywanie kalibracyjne próbek w wodzie, symulujące napromieniowywanie in vivo, znacząco zmniejsza generację przez promieniowanie sygnału tło-podobnego nakładającego się na sygnał dozymetryczny RIS. Rozkruszanie próbek tkanki kostnej wpływa na zwiększenie amplitudy sygnału tła, co może przyczyniać się do zmniejszenia dokładności pomiaru sygnału RIS. Wykazano, że zasadowa hydroliza próbek kości może być pomocna w eliminacji sygnału tła i może poprawić czułość detekcji sygnału dozymetrycznego w zakresie niskich dawek. Jednak towarzyszący eliminacji tła zanik części rodników generowanych radiacyjnie sugeruje konieczność kontynuacji tych badań w celu zminimalizowania wpływu utraty części sygnału RIS na dokładność dozymetrii. Wyniki uzyskane w tej pracy wykazały także liniową zależność natężenia sygnału RIS od dawki w zakresie do 270 Gy. Przeprowadzone badania pozwoliły na opracowanie metody dozymetrii EPR, która została wykorzystana do retrospektywnego pomiaru dawek promieniowania rentgenowskiego pochłoniętego przez pacjentów w czasie radioterapii, dając zgodność dawek zmierzonych w próbkach kości z dawkami zaplanowanymi przez plany leczenia radiacyjnego. Należy przeprowadzić dalsze badania dotyczące redukcji wpływu tła poprzez usunięcie części organicznej kości przy użyciu innych substancji chemicznych. Dodatkowo dalszych badań wymaga stwierdzenie trwałości sygnału RIS w warunkach in vivo w czasie jaki upłynął od ekspozycji na promieniowanie jonizujące. Zmniejszenie rozmiaru próbek wykorzystywanych przy pomiarach dozymetrycznych, co umożliwiłoby pobieranie mniejszych próbek tkanki kostnej od pacjentów np. metodą biopsji igłowej, wymaga dalszych badań EPR w paśmie Q, które pozwala na pomiary kilkukrotnie mniejszych próbek przy zachowaniu wysokiej czułości pomiaru.

10 Piśmiennictwo

- 1 A. Romanyukhaa, F. Trompier, B. LeBlanca, C. Calasb, I. Clairandb, C.A. Mitchella, James G. Smirniotopoulousa, H.M. Swartzc. EPR dosimetry in chemically treated fingernails. *Radiat. Prot. Dosimetry*, 42, 6-7 (2007), 1110-1113.
- 2 F. Trompier, J. Sadlo, J. Michalik, W. Stachowicz, A. Mazal, I. Clairand, J. Rostkowska, W. Bulski, A. Kulakowski, J. Slusznia, S. Gozdz, A. Wojcik. EPR dosimetry for actual and suspected overexposures during radiotherapy treatments in Poland. *Radiat. Meas.*, 42 (2007), 1025-1028.
- 3 V. Chumak, I. Likhtarev, S. Sholom, R. Meckbach, V. Krjuchkov. Chernobyl experience in field of retrospective dosimetry: reconstructions of doses to the population and liquidators involved in the accident. *Radiat. prot. dos.*, 77 (1998), 91-95.
- 4 G. N. Souchkevitch, A. I. Tsyb. *Health Consequences of the Chernobyl Accident*. World Health Organization, Geneva, 1996.
- 5 K. Hirose. 2011 Fukushima Dai-ichi nuclear power plant accident: summary of regional radioactive deposition monitoring results. *Journal of Environmental Radioactivity*, 111 (2012), 13-17.
- 6 S.L. Simon, I. Bailiff, A. Bouville, P. Fattibene, R. A. Kleinerman, D. C. Lloyd, S. W. S. Mckeeyere, A. Romanyukha, A. V. Sevan'kaev, J. D. Tucker, A. Wieser. Biodose EPR -2006 consensus committee report on biodosimetric methods to evaluate radiation doses at long times after exposures. *Radiat. Meas.*, 42 (2007), 948-971.
- 7 G. A. Alexander, H. M. Swartz, S. A. Amundson, W. F. Blakely, B. Buddemeier, B. Galles, N. Dajniak, R. E. Goans, R. B. Hayes, P. C. Lowry, M. A. Noska, P. Okunieff, A. L. Salner, D. A. Schauer, F. Trompier, K. W. Turteltaub, P. Voisin, et al. Biodos EPR - 2006 Meeting: Acute dosimetry consensus committee recommendations on biodosimetry applications in events involving uses of radiation by terrorists and radiation accidents. *Radiat. Meas.*, 42 (2007), 972-996.
- 8 M. Janiak, A. Wójcik. *Medycyna zagrożeń i urazów radiacyjnych*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2005.
- 9 N. Nakamura, C. Miyazawa, S. Sawada, M. Akiyama, A. Awa. A close correlation between electron spin resonance (ESR) dosimetry from tooth enamel and cytogenetic dosimetry from lymphocytes of Hiroshima atomic-bomb survivors. *International Journal of Radiation Biology*, 73, 6 (1998), 619-627.
- 10 A. Leonard, J. Rueff, GB. Gerber, ED. Leonard. Usefulness and limits of biological dosimetry based on cytogenetic methods. *Radiation Protection Dosimetry*, 115, 1-4 (2005), 448-454.

- 11 MM. Pinto, NF. Santos, A. Amaral. Current status of biodosimetry based on standard cytogenetic methods. *Radiat Environ Biophys*, 49, 4 (2010), 567-581.
- 12 H.E. Johns, J.R. Cunningham. *The Physics of Radiology*. Charles C Thomas, Illinois, 1983.
- 13 S. Mackiewicz. Promieniowanie rozproszone i jego rola w badaniach radiograficznych. (Popów 2010).
- 14 J. Pluta. *Materiały wykładowe, Wydział Fizyki Politechniki Warszawskiej*. Warszawa.
- 15 H.M. Swartz, H. Halpern. *Biological Magnetic Resonance*. Berliner Plenum Press, New York, 1998.
- 16 E. Zavoisky. Spin-magnetic resonance in paramagnetics. *J. Phys USSR*, 9 (1945), 211-245.
- 17 K. Zawada. Zastosowanie spektroskopii EPR w farmacji i medycynie. *Farm. Pol.*, 3 (2009).
- 18 J. Amesz, A. J. Hoff. *Time-resolved electron paramagnetic resonance spectroscopy-principles and applications*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 1996.
- 19 Z. Kęcki. *Podstawy spektroskopii molekularnej*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1992.
- 20 G.R. Eaton, S.S. Eaton, D.P. Barr, R.T. Weber. *Quantitative EPR*. Springer Wien New York, Verlag/Wien, 2010.
- 21 J.E. Wertz, J.R. Bolton. *Electron Spin Resonance Elementary theory and practical applications*. McGraw-Hill, Inc, USA, 1972.
- 22 J. McMurry. *Chemia Organiczna*. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2007.
- 23 P. W. Atkins. *Chemia Fizyczna*. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2002.
- 24 A. Zabłocka, M. Janusz. Dwa oblicza wolnych rodników tlenowych. *Postepy Hig Med Dosw.*, 62 (2008), 118-124.
- 25 M. Valko, C.J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160, 1 (2006), 1-40.
- 26 B. Halliwell, J.M.C Gutteridge. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods in Enzymology*, 186 (1990), 1-85.
- 27 J. Kulbacka, J. Saczko, A. Chwiłkowska. Stres oksydacyjny w procesach uszkodzenia komórek. *Pol. Merk. Lek* (2009).

- 28 H.M. Swartz, J.R. Bolton, D.C. Borg. *Biological Applications of Electron Spin Resonance*. John Wiley & Sons Inc, Canada, 1972.
- 29 J. Nowak, B. Nedoszytko, M. Woźniak, E. Syta, K. Siedlecka. The role of cholesterol in microdomain structure of erythrocytes, lymphocytes and granulocytes membranes in psoriasis : a spin label study. *J. Invest. Dermatol.*, 126 (2006).
- 30 J. Nowak, B. Nedoszytko. Badania strukturalne błon komórkowych erytrocytów, limfocytów i granulocytów u chorych z łuszczycą z wykorzystaniem metody znakowania spinowego. *Ann. Acad. Med. Gedan.*, 35 (2005), 139-147.
- 31 W. Gordy, W.B. Ard, H. Shields. Microwave spectroscopy of biological substances. Paramagnetic resonance in X- irradiated amino acids and Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 41, 11 (XI 1955), 983-996.
- 32 R. Kudynski, J. Kudynska, H.A. Buckmaster. The decay constant for irradiated human hair using EPR spectroscopy. *Appl. Radiat. Isot*, 45, 6 (VI 1994), 645-650.
- 33 F. Trompier, C. Assinet, A. Wieser, C. De Angelis, D. Viscomi, P. Fattibene. Radiation-induced signals analysed by EPR spectrometry applied to fortuitous dosimetry. *Ann Ist Super Sanità*, 45, 3 (2009), 287-296.
- 34 E. Sagstuen, E.O. Hole, S. R. Haugedal, W. H. Nelson. Alanine radicals: Structure determinations by EPR and ENDOR of single crystals X-irradiated at 295K. *J. Phys. Chem A*, 101, 50 (1997), 9763-9772.
- 35 B. Ciesielski, M. Tyszkowska, A. Grudniewska, M. Penkowski, K. Shultka, Z. Pelmel-Stuglik. The effect of dose on light sensitivity of radicals in alanine EPR dosimeters. *Spectrochim. Acta A*, 69, 5 (2008), 1405-1415.
- 36 O. F. Sleptchonok, V. Nagy, M.F. Desrosiers. Advancements in accuracy of the alanine dosimetry system. Part 1. The effects of environmental humidity. *Radiat. Phys. Chem.*, 57, 2 (2000), 115-133.
- 37 K. Mehta, R. Girzikowsky. Alanine-ESR dosimetry for radiotherapy IAEA experience. *Appl. Radiat. Isot.*, 47, 11 - 12 (1996), 1189-1191.
- 38 H.P. Nette, S. Onori, P. Fattibene, D. Regulla, A. Wieser. Coordinated research efforts for establishing an international radiotherapy dose intercomparison service based on the alanine/ESR system. *Appl. Radiat. Isot*, 44, 1-2 (1993), 7-11.
- 39 D. Nichiporov, V. Kostjuchenko, J.M. Puhl, D.L. Bensen, M.F. Desrosiers, C.E. Dick, W.L. Mclaughlin, T. Kojima, B.M. Coursey, S. Zink. Investigation of applicability of alanine and radiochromic detectors to dosimetry of proton clinical beams. *Appl. Radiat. Isot.*, 46, 12 (1995), 1355-1362.

- 40 W. W. Bradshaw, D. G. Cadena, Jr., G. W. Crawford, and H. A. W. Spetzler. The Use of Alanine as a Solid Dosimeter. *Radiation Research*, 17, 1 (1962), 11-21.
- 41 J. Helt-Hansen, F. Rosendal, I. M. Kofoed, C. E. Andersen. Medical reference dosimetry using EPR measurements of alanine: Development of an improved method for clinical dose levels. *Acta Oncologica*, 48, 2 (2009), 216-222.
- 42 C. De Angelis, S. Onori, E. Petetti, A. Piermattei, L. Azario. Alanine/EPR dosimetry in brachytherapy. *Phys. Med. Biol.*, 5, 44 (1999), 1181-1191.
- 43 B. Ciesielski, L.E. Reinstein, L. Wielopolski. Measurement of clinical photon and electron beam dose distribution by EPR spectroscopy. *Polish J. Med. Phys. & Eng.*, 5, 2 (1996), 1181-1191.
- 44 J.W. Hansen, K.J. Olsen, M. Wille. The Alanine Radiation Detector for High and Low-LET Dosimetry. *Radiat. Prot. Dosimetry*, 19, 1 (1987), 43-47.
- 45 B. Ciesielski, Z. Stuglik, L. Wieloposki, I Zvara. The effect of high- linear energy transfer ions on the electron paramagnetic resonance signal induced in alanine. *Radiat. Res.*, 150, 4 (1998), 469-474.
- 46 K. Gall, M. Desrosiers, D. Bensen, C. Serago. Alanine EPR dosimeter response in proton therapy beams. *Appl. Radiat. Isot.*, 47, 11/12 (1996), 1197-1199.
- 47 P. Fattibene, T.L. Duckworth, M. F. Desrosiers. Critical evaluation of the sugar-EPR dosimetry system. *Appl. Radiat. Isot.*, 47, 11 (1996), 1375-1379.
- 48 T. Nakajima, T. Otsuki. Dosimetry for radiation emergencies: Radiation-induced free radicals in sugar of various countries and the effect of pulverizing on the ESR signal. *Appl. Radiat. Isot.*, 41, 4 (1991), 359-365.
- 49 M. I. Teixeira, G. M. Ferraz, L. V. E. Caldas. EPR dosimetry using commercial glasses for high gamma doses. *Appl. Radiat. Isotopes*, 62, 2 (2005), 365-370.
- 50 F. Trompier, S. Della Monaca, P Fattibene, I Clairand. EPR dosimetry of glass substrate of mobile phone LCDs. *Radiat. Meas.*, 46, 9 (2011), 827-831.
- 51 P.Fattibene, F. Trompier, A. Wieser, M. Brai, B. Ciesielski, C. De Angelis, S. Della Monaca, T. Garcia, H. Gustafsson, E. Olag Hole, M. Juniewicz, K. Krefft, A. Longo, P. Leveque, E. Lund, et al. EPR dosimetry intercomparison using smart phone touch screen glass. *Radiat. Environ. Biophys.*, 53, 2 (2014), 311-320.
- 52 H. P. Schwarcz. ESR studies of tooth enamel. *Nucl. Tracks.*, 10 (1985), 865-867.
- 53 E. A. Ignatiev, A. A. Romanyukhal, A. A. Koshita, A. Wieser. Selective Saturation Method for EPR dosimetry with tooth enamel. *Appl. Radiat. Isot.*, 47, 3 (1996), 333-337.

- 54 J. Tatsumi-Miyajima. ESR dosimetry for atomic bomb survivors and radiologic technologists. *Nuclear Instruments and Methods*, 257, 2 (VII 1987), 417-422.
- 55 M. Ikeya, J. Miyajima, S. Okajima. ESR dosimetry for atomic bomb survivors using shell buttons and tooth enamel. *Jap. J. Appl. Phys. Part 2.*, 23, 9 (1984), 697-699.
- 56 M. Hoshi, S. Toyoda, A. Ivannikov, K. Zhumadilov, A. Fukumura, K. Apsalikov, Zh. S. Zhumadilov, S. Bayankin, V. Chumak, B. Ciesielski, V. De Coste, S. Endo, P. Fattibene, D. Ivanov, C. A. Mitchell, S. Onori, M. Penkowski, S. P. Pivovarov, et al. Interlaboratory comparison of tooth enamel dosimetry on Semipalatinsk region. Part 1: General view. *Radiat. Meas.*, 42, 6/7 (2007), 1005-1014.
- 57 A. Ivannikov, S. Toyoda, M. Hoshi, K. Zhumadilov, A. Fukumura, K. Apsalikov, Zh. S. Zhumadilov, S. Bayankin, V. Chumak, B. Ciesielski, V. De Coste, S. Endo, P. Fattibene, D. Ivanov, C. A. Mitchell, M. Nalapko, S. Onori, M. Penkowski, S. Pivovarov, et al. Interlaboratory comparison of tooth enamel dosimetry of Semipalatinsk region. Part 2: effects of spectrum processing. *Radiat. Meas.*, 42, 6/7 (2007), 1015-1020.
- 58 C. Cole, A.H. Silver. Production of hydrogen atoms in teeth by x-irradiation. *Nature*, 200 (XI 1963), 700-701.
- 59 J. M. Brady, N. O. Aarestad, H. M. Swartz. In vivo dosimetry by electron spin resonance spectroscopy. *Health Phys.*, 15, 1 (1968), 43-47.
- 60 P. Fattibene, F. Callens. EPR dosimetry with tooth enamel: A review. *Appl. Radiat. Isot.*, 68 (V 2010), 2033-2116.
- 61 B.B. Williams, R. Dong, M. Kmiec, G. Burke, E. Demidenko, D. Gladstone, R.J. Nicolalde, A. Sucheta, P. Lesniewski, H.M. Swartz. Development of in vivo tooth EPR for individual radiation dose estimation and screening. *Health Physics*, 98, 2 (2010).
- 62 J.D. Pollock, B.B. Williams, J.W. Sidabras, O. Grinberg, I. Salikhov, P. Lesniewski, M. Kmiec, H.M. Swartz. Surface loop resonator design for in vivo EPR tooth dosimetry using finite element analysis. *Health Physics*, 98, 2 (2010).
- 63 S. Colak, T. Obzey. An ESR study on biological dosimeters: Human hair. *Radiat. Meas.*, 46, 5 (2011), 465-472.
- 64 Z. Stuglik, J. Michalik, W. Stachowicz, K. Ostrowski, I. Zvara, A.A. Dziedzic-Goclawska. Bone powder exposed to the action of C12 and Mg25 on beams as investigated by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Appl. Radiat. Isot.*, 45, 12 (XII 1994), 1181-1187.
- 65 J. F. Copeland, K. P. Gall, S. Y. Lee, G. E. Chabot. Proton dosimetry in bone using electron spin resonance. *Appl. Radiat. Isot.*, 47, 11-12 (1996), 1533-1538.

- 66 L.M. de Oliveira, E.F. de Jesus, A.M. Rossi, R.T. Lopes, L.N. Rodrigues, R.A. Barbosa. Energy Dependence of EPR Signal in Synthetic and Biological Hydroxyapatite Irradiated with Photons. *Radiat. Prot. Dosimetry*, 84, 1-4 (1999), 511-514.
- 67 W. Stachowicz, G. Strzelczak-Burlinska, J. Michalik, A. Wojtowicz, A. Dziedzic-Gocławska, K. Ostrowski. Application of electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy for control of irradiated food. *Science of Food and Agriculture*, 58, 3 (1992), 407-415.
- 68 Normalizacyjny, Europejski Komitet. *Procedura EN 1786, Foodstuffs- Detection of irradiated food containing bone- Method by ESR spectroscopy*. 2012.
- 69 W. Stachowicz, J. Michalik, A. Gocławska- Dziedzic, K. Ostrowski. Evaluation of absorbed dose of gamma and X-ray radiation using bone tissue as a dosimeter. *Nukleonika*, 19, 9 (1974), 845-850.
- 70 A. Kinoshita, F.J.H.N. Braga, C.F.O. Graeff, O. Braffa. ESR dosimetry of 89-Sr and 153-Sm in bone. *Appl. Radiat. Isot.*, 54, 2 (2001), 269-274.
- 71 M. Polat, M. Korkmaz, B. Dulkan, O. Korkmaz. Detection of irradiated chicken and dosimetric properties of drumstick bones. *Radiat. Phys. Chem*, 49, 3 (1997), 363-369.
- 72 S. Onori, M. Pantaloni, S. Baccaro, P.G. Fuochi. Influencing factors on ESR bone dosimetry. *Appl. Radiat. Isot.*, 47, 11-12 (1996), 1637-1640.
- 73 M. F. Desrosiers. Estimation of the absorbed dose radiation processed food-2. Test of the EPR response function by an exponential fitting analysis. *Appl. Radiat. Isot.*, 42, 7 (1991), 617-619.
- 74 G. Strzelczak, J. Sadło, M. Danilczuk, W. Stachowicz, F. Callens, G. Vanhaelewyn, E. Goovaerts, J. Michalik. Multifrequency electron paramagnetic resonance study on deproteinized human bone. *Spectrochimica Acta Part*, 67 (2007), 1206-1209.
- 75 M. Pawłowski. Procedury wyznaczania parametrów anizotropowego czynnika g dla centrów paramagnetycznych o spinie $S = \frac{1}{2}$ zlokalizowanych w sieci krystalicznej. *Materiały Elektroniczne RCIN*, 39, 4 (2011), 31-38.
- 76 M. Miyake, K. J. Liu, T. M. Walczak, H. M. Swartz. In vivo EPR dosimetry of accidental exposures to radiation: experimental results indicating the feasibility of practical use in human subjects. *Appl. Radiat. Isot*, 52, 5 (2000), 1031-1038.
- 77 B. Ciesielski, K. Krefft, J. Kamińska, B. Drogoszewska. The effect of water and sample granularity on radiation sensitivity and stability of EPR signals in X-ray irradiated bone samples. *Radiat. Prot. Dosim.*, 1599, 1-4 (2014), 141-148.

- 78 K. Krefft, B. Drogoszewska, J. Kaminska, M. Juniewicz, G. Wołąkiewicz, I. Jakacka, B. Ciesielski. Application of EPR dosimetry in bone for ex vivo measurements of doses in radiotherapy patients. *Radiat. Prot. Dosimetry*, 162, 1-2 (2014), 38-42.
- 79 J. Sadło, J. Michalik, W. Stachowicz, G. Strzelczak, A. Dziedzic-Goćławska, K. Ostrowski. EPR study on biominerals as materials for retrospective dosimetry. *Nukleonika*, 51 (2006), 95-100.
- 80 W. J. Rink. Electron spin resonance (ESR) dating and ESR applications in quaternary science and archeometry. *Radiat. Meas.*, 27, 5-6 (1997), 950-1025.
- 81 A. Dziedzic-Goćławska, A. Kamiński, I. Uhrynowska-Tyszkiewicz, W. Stachowicz. Irradiation as a safety procedure in tissue banking. *Cell and Tissue Banking*, 6, 3 (2005), 201-219.
- 82 J. Brady, N. Aarestad, H. Swartz. In vivo dosimetry by electron spin resonance spectroscopy. *Health Phys.*, 15, 1 (VII 1968), 43-47.
- 83 M. F. Desrosiers. In vivo assessment of radiation exposures. *Health Phys.*, 61, 6 (XII 1991), 859-861.
- 84 D. A. Schauer, M. F. Desrosiers, P. Kuppusamy, J. L. Zweier. Radiation Dosimetry of an Accidental Overexposure using EPR Spectrometry and Imaging of Human Bone. *Appl. Radiat. Isot.*, 46, 11 (1996), 1345-1350.
- 85 I. Clairand, C. Huet, F. Trompier, J.-F. Bottollier-Depois. Physical dosimetric reconstruction of a radiological accident due to gammagraphy equipment that occurred in Dakar and Abidjan in summer 2006. *Radiat. Meas.*, 46, 2-6 (2008), 698-703.
- 86 A. Kinoshita, C. S. Guzman Calcina, E. T. Sakamoto-Hojo, L. M. Comparato, C. Picon, O. Baffa. ESR and FISH Dose Estimation in an Accidental Case of Partial Body Irradiation with Gamma Radiation. *Adv. ESP App.*, 18 (2002), 211-213.
- 87 R. Drake, A. Wayne Vogl, A.W.M Mitchell. *Gray's Anatomy*. Churchill Livingstone, 2008.
- 88 P.H. Raven, G.B. Johnson. *Biology*. McGraw-Hill, 2002.
- 89 *LifeArt, Super Anatomy Collection*. Baltimore, 1998.
- 90 W. Sawicki, J. Malejczyk. *Histologia*. PZWL, Warszawa, 2012.
- 91 V. Chumak, B. Ciesielski, S. Sholom, K. Schultka. Lessons of the 3rd international intercomparison on EPR dosimetry with teeth: similarities and differences of two successful techniques. *Radiat. Prot. Dosim.*, 120, 1-4 (2006), 197-201.

- 92 B. Ciesielski, J. Kamińska, K. Emerich. Analysis of various modifications in spectra analysis on accuracy of dose reconstruction in EPR dosimetry in tooth enamel. *Radiat. Meas.*, 46, 9 (2011), 783-788.
- 93 N. D. Yordanov, B. Mladenova, P. Petkov. Studies on the uncertainties in quantitative EPR estimations due to the construction of the cavities used. *Analytica Chimica Acta*, 453, 1 (2002), 155-162.
- 94 A. Karaszewska. *Określenie dawki promieniowania jonizującego u pacjentów po radioterapii na podstawie pomiaru sygnału elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) w szkliwie zębów*. Praca magisterska, Uniwersytet Gdański, Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki, 2005.
- 95 R.B. Hayes, E.H. Haskell, G.H. Kenner. A mathematical approach to optimal selection of dose values in the additive dose method of EPR dosimetry. *Radiat. Meas.*, 27, 2 (1997), 315-323.
- 96 R. A. Reyes, A. Romanyukha, F. Trompier, C. A. Mitchell, I. Clairand, T. De • L. A. Benevides, H. M. Swartz. Electron paramagnetic resonance in human fingernails: the sponge model implication. *Radiat. Environ. Biophys.*, 47, 4 (2008), 515-526.
- 97 S. V. Sholom, E. H. Haskell. Influence of crushing and additive irradiation procedures on EPR dosimetry of tooth enamel. *Radiat. Meas.*, 299, 1 (1998), 105-111.
- 98 V. I. Polyakov, E. Haskell, G. Kenner, G. Huett, R. Hayes. Effect of mechanically induced background signal on EPR dosimetry of tooth enamel. *Radiat. Meas.*, 24, 3 (1995), 249-254.
- 99 A. A. Romanyukha, M. F. Desrosiers, D. F. Regulla. Current issues on EPR dose reconstruction in tooth enamel. *Appl. Radiat. Isot.*, 52, 5 (2000), 1265-1273.
- 100 A. Wleser, E. Haskell, G. Kenner, F. Bruenger. EPR Dosimetry of bone gains accuracy by isolation of calcified tissue. *Appl. Radiat. Isot.*, 45, 4 (1994), 525-526.
- 101 W. Stachowicz, J. Michalik, J. Sadło, K. Ostrowski, A. Dziedzic-Goćławska. *Badania doświadczalne w bankowaniu tkanek*. ICHTJ, Warszawa, 2004.
- 102 A. Kinoshita, F. J.H.N. Braga, C. F.O. Graeff, O. Baffa. ESR signal growth of a rabbit bone as function of added dose from amplitude. *Appl. Radiat. Isot.*, 54, 2 (2001), 269-274.