



Gdański Uniwersytet Medyczny

Agnieszka Marciniak

*Zastosowanie spektroskopii EPR w retrospektywnej dozymetrii
promieniowania jonizującego w paznokciach*

Rozprawa doktorska

Praca została wykonana w Katedrze i Zakładzie Fizyki i Biofizyki
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Promotor: dr hab. Bartłomiej Ciesielski, prof. nadzw.

Gdańsk 2019

PODZIĘKOWANIA

Na powstanie i ostateczny kształt mojej pracy doktorskiej miało wpływ wiele osób, którym chciałabym w tym miejscu podziękować.

Pragnę serdecznie podziękować mojemu Promotorowi Panu prof. GUM dr hab. Bartłomiejowi Ciesielskiemu za życzliwość, zaangażowanie, przekazaną mi przez lata wiedzę oraz nieocenioną pomoc przy realizacji niniejszej pracy – niezliczone godziny konsultacji, otwartą dyskusję oraz swobodę i zaufanie w realizacji zadań badawczych.

Chciałabym również podziękować fizykom z Katedry i Kliniki Onkologii i Radioterapii GUM, w szczególności mgr Anicie Prawdzik-Dampc za owocną wieloletnią współpracę, cenną pomoc merytoryczną oraz wielkie serce.

Dziękuję także mgr Pawłowi Czajkowskiemu z Wojewódzkiego Centrum Onkologii Szpitala Morskiego w Gdyni za wieloletnią współpracę, dzielenie się swoim doświadczeniem klinicznym oraz zainteresowanie się problematyką mojej pracy doktorskiej.

Osobne podziękowania składam dr n. med. Agnieszce Piekarskiej za współpracę i kontakt z pacjentami, bez których nie byłaby możliwa realizacja tej pracy.

Niniejszą pracę dedykuję mojej mamie, bez której nie wydarzyłoby się nic

SPIS TREŚCI

WYKAZ ARTYKUŁÓW WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ ...	4
STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM.....	5
WPROWADZENIE	5
CELE PRACY.....	9
MATERIAŁY I METODY	10
OMÓWIENIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY	11
PODSUMOWANIE I WNIOSKI.....	15
SUMMARY IN ENGLISH.....	17
INTRODUCTION.....	17
THE AIMS OF THE DISSERTATION.....	20
MATERIALS AND METHODS	21
OVERVIEW OF ARTICLES INCLUDED IN THE DISSERTATION.....	22
SUMMARY AND CONCLUSIONS.....	26
WYKAZ CYTOWANEGO PIŚMIENNICTWA	28
PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ.....	31

WYKAZ ARTYKUŁÓW WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

1. **Marciniak A**, Ciesielski B, Prawdzik – Dampc A. *The effects of dose and water treatment on EPR signals in irradiated fingernails*. Radiation Protection Dosimetry. 2014; 162(1-2): 6-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25004939>
IF: 0.913, MNiSW: 20.000
2. **Marciniak A**, Ciesielski B. *EPR dosimetry in nails—A review*. Applied Spectroscopy Reviews. 2016; 51:1, 73-92.
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/05704928.2015.1101699>
IF: 4.254, MNiSW: 45.000
3. **Marciniak A**, Ciesielski B, Czajkowski P, Krefft K, Boguś P, Prawdzik – Dampc A, Lipniewicz J. *EPR dosimetry in nail samples irradiated in vivo during total body irradiation procedures*. Radiation Measurements. 2018; 116: 24-34.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350448717304675>
IF: 1.369, MNiSW: 30.000
4. **Marciniak A**, Ciesielski B, Juniewicz M, Prawdzik – Dampc A, Sawczak M. *The effect of sunlight and UV lamps on EPR signal in nails*. Radiation and Environmental Biophysics. 2019; 58(2):287-293.
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00411-019-00777-2>
IF: 1.527, MNiSW: 25.000

Sumaryczny wskaźnik Impact Factor: 8.063

Sumaryczna punktacja ministerstwa: 120.00

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

WPROWADZENIE

W Raporcie Bezpieczeństwa nr 4 opublikowanym w Wiedniu w 1998 roku przez Międzynarodową Agencję Energii Atomowej (ang. International Atomic Energy Agency, IAEA) [1] wypadek radiacyjny zdefiniowano jako niezamierzone lub nieoczekiwane zdarzenie występujące ze źródłem promieniowania lub podczas działań z wykorzystaniem promieniowania jonizującego, które może powodować znaczne narażenie ludzi i/lub straty materialne. Definicja ta obejmuje wypadki z reaktorów, źródeł przemysłowych i placówek medycznych. Chociaż wypadki radiologiczne w przemyśle, medycynie, badaniach naukowych mają bardziej ograniczony wpływ na środowisko, zdarzają się jednak znacznie częściej niż wypadki będące skutkiem awarii reaktora i częściej mogą mieć poważne konsekwencje zdrowotne dla ludzi.

Wpływ wypadków jądrowych był przedmiotem społecznej debaty od czasu skonstruowania pierwszych reaktorów jądrowych i stanowił kluczowy czynnik szerokiego społecznego zainteresowania obiektami jądrowymi i ich bezpieczeństwem. Wyrazem tego było ustanowienie w 1955 roku Komitetu Naukowego ONZ ds. Skutków Promieniowania Atomowego (ang. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, UNSCEAR). Obecnie głównym, najpowszechniejszym źródłem narażenia ludzi na dawki promieniowania jonizującego mogące mieć wpływ na ich zdrowie jest jego zastosowanie w medycynie [2, 3]. W latach 1991-1996 roczna liczba diagnostycznych badań medycznych na całym świecie wynosiła około 2,4 miliarda i wzrosła do ponad 3,6 miliarda w okresie 1997-2007 [4]. Niestety, mimo podjętych środków mających na celu zmniejszenie ryzyka wystąpienia wypadków radiacyjnych lub ograniczenie do minimum ilości odpadów radioaktywnych uwalnianych do środowiska, tak powszechne stosowanie promieniowania niesie za sobą ryzyko wystąpienia błędu ludzkiego lub awarii sprzętu i, w konsekwencji, niekontrolowanego narażenia pacjentów i ludności cywilnej na wysokie dawki promieniowania [2, 5]. W latach 1944-2003 na całym świecie odnotowano 426 poważnych wypadków radiacyjnych, w których uczestniczyło ponad 130 000 osób. Prawie 90% ekspozycji wynikało z awarii w Czarnobylu w 1986 roku [6].

Obserwowany w ostatnich dziesięcioleciach wzrost liczby osób narażonych na promieniowanie jonizujące w wyniku wypadków radiacyjnych, wraz z rosnącym niepokojem o utratę kontroli nad materiałami radioaktywnymi i ich wykorzystanie do ataków terrorystycznych, zwiększył potrzebę opracowania skutecznych narzędzi do retrospektywnej dozymetrii, która może zapewnić szybką i dokładną ocenę zaabsorbowanych dawek. Jest to szczególnie ważne w przypadku dozymetrii powypadkowej przypadkowych ofiar cywilnych, które zazwyczaj nie są wyposażone w osobiste dozymetry lub w sytuacji, gdy odczyty z osobistych dozymetrów są niewiarygodne z powodu uszkodzeń mechanicznych lub

przedawkowania, np. jak w przypadku osobistych dozymetrów personelu elektrowni jądrowej w Czarnobylu podczas katastrofy w kwietniu 1986 roku. W takich sytuacjach retrospektywna dozymetria u ludzi może być oparta wyłącznie na analizie fizycznych, chemicznych lub biologicznych skutków wywołanych u napromieniowanych osób.

Dawka na całe ciało powyżej 2 Gy może powodować klinicznie istotny ostry zespół popromienny (ang. Acute Radiation Syndrome, ARS) [6, 7]. Dlatego szybka i precyzyjna dozymetria retrospektywna jest kluczowa przy klasyfikacji i selekcji ofiar oraz przy podejmowaniu decyzji o procedurach medycznych i środkach bezpieczeństwa w wypadkach radiacyjnych zwiększając szansę na skuteczną pomoc ofiarom takich wypadków [6, 7, 8]. W 2005 r. podczas European Society for Blood and Marrow Transplantation określono jednolitą podstawę medycznego postępowania z ofiarami wypadków radiacyjnych. Podstawą tego konsensusu była analiza kliniczna napromieniowanych ofiar z 2001 r. "METREPOL" (ang. Medical Treatment Protocols for Radiation Accident) na podstawie danych od 800 ofiar z 70 wcześniejszych wypadków. Europejski protokół leczenia radiacyjnego w zakresie wypadków radiacyjnych (METREPOL) stosuje ocenę uszkodzeń hematologicznych (H), neurowaskularnych (N), skórnych (C) i przewodu pokarmowego (G) we wczesnym etapie po ekspozycji na promieniowanie [7, 9].

Spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego (ang. Electron Paramagnetic Resonance, EPR) ma duży potencjał jako jedna z dostępnych metod biodozymetrycznych do stosowania u ofiar takich incydentów [10-19]. Metoda EPR jest techniką komplementarną do metod dozymetrii biologicznej (cytogenetycznej lub opartej na objawach klinicznych). Oparta jest ona na pomiarze sygnałów EPR pochodzących od centrów paramagnetycznych (np. wolnych rodników) wygenerowanych w tkankach przez promieniowanie jonizujące – dotąd sygnały takie zaobserwowano w zębach (szkliwo, zębina), kościach, paznokciach i we włosach. Optymalizacja czułości i dokładności tej metody ma zasadnicze znaczenie dla jej praktycznych zastosowań w dozymetrii po wypadkach radiacyjnych, a także może być użyteczna do weryfikacji rzeczywistej dawki dostarczonej podczas procedur radioterapii. Badania przeprowadzone kilka dekad temu [17, 20] wykazały, że ekspozycja paznokci rąk i stóp oraz innych materiałów bogatych w keratynę (włosy, rogi, kopyta itp.) na promieniowanie jonizujące powoduje powstawanie wolnych rodników w tych materiałach, które były stabilne w ciągu stosunkowo długiego okresu (od kilku dni do wielu tygodni) i były źródłami sygnałów EPR. W porównaniu do kości i szkliwa zębów, których przydatność w dozymetrii EPR już wykazano w licznych publikacjach naukowych [12, 16, 21-24], sygnały EPR wywołane promieniowaniem w paznokciach są znacznie trudniejsze do zidentyfikowania, ze względu na spektralne podobieństwo do sygnałów EPR tła natywnego, mniejszą stabilność generowanych radiacyjnie rodników i ich podatność na wodę. Sygnały generowane we włosach, ze względu na ich niską wydajność radiacyjną, w zakresie dawek istotnych dla praktycznych zastosowań dozymetrycznych nie mogą być wykorzystane.

Widmo EPR nienapromieniowanych ścinków paznokci zawiera pięć składowych, które można przypisać do natywnych rodników w tkance paznokciowej oraz do centrów paramagnetycznych indukowanych przez naprężenia mechaniczne w matrycy paznokcia (wzdłuż krawędzi cięcia ścinków) poprzez rozerwanie wiązań disiarczkowych (S-S) w strukturze alfa keratyny. W skład sygnału EPR nienapromieniowanych próbek wchodzi:

1. MIS1 (ang. Mechanically Induced Signal) – anizotropowy szeroki dublet, najbardziej wyraźny w niskiej temperaturze (77 K). Jest bardzo intensywny natychmiast po obciążeniu paznokci; zanika po około 20-24 godzinach w temperaturze pokojowej [25] i jest eliminowany przez działanie wody [18, 26].
2. MIS2 – singlet spektralnie podobny do sygnału tła (ang. Background Signal, BKG) i składników sygnału generowanego radiacyjnie (ang. Radiation Induced Signal, RIS), jest eliminowany przez wodę. Natężenie MIS2 jest minimalne bezpośrednio po zwilżeniu próbki paznokcia, a następnie wzrasta około dwukrotnie w czasie od tygodnia do kilku miesięcy po zwilżeniu [27].
3. MIS3 – niestabilny dublet; w powietrzu o temperaturze pokojowej można go zaobserwować tylko w czasie około 1-2 godzin po obciążeniu i jest również eliminowany przez wodę [18].
4. MIS4 – obserwowany w paśmie Q; zidentyfikowany jako rodnik sulfinylowy (RSO°) [18].
5. BKG – natywny sygnał tła; singlet, bardzo podobny do składnika MIS2 oraz indukowanych promieniowaniem sygnałów RIS2 i RIS5. Jest określany jako pozostałość po całkowitym zaniku sygnału indukowanego mechanicznie (MIS) po traktowaniu ścinków paznokci wodą [27] i może być przypisany do stabilnych wolnych rodników występujących naturalnie w paznokciach. Charakteryzuje się stosunkowo wysoką stabilnością termiczną – nie zanotowano spadku jego intensywności w próbkach wygrzewanych przez 20 minut w 120°C [18].

Ilościowe określenie intensywności sygnału indukowanego promieniowaniem (RIS) jest podstawą do retrospektywnej dozymetrii EPR w paznokciach [27-30]. W zależności od dostarczonej dawki, stopnia uwodnienia paznokci lub ekspozycji próbek paznokci na wodę, sygnał RIS może być złożony z kilku komponentów. W zakresach dawek istotnych dla praktycznego zastosowania dozymetrii u ludzi (tj. do kilkudziesięciu grejów), dominującym składnikiem widmowym jest singlet, którego intensywność może być wykorzystywana do określenia pochłoniętej dawki.

Ostatnio opublikowane prace [18] wykazały obecność dwóch rodników o różnej wrażliwości na wodę – RIS2 i RIS5 – odpowiedzialnych za sygnał EPR indukowany promieniowaniem o niskich dawkach:

1. RIS2 – szybko zanikający w paznokciach pod wpływem wody. Amplituda tego sygnału mierzonego w paznokciach nie poddawanych działaniu wody wykazuje liniową zależność od dawki do co najmniej 125 Gy [31].
2. RIS5 – jest odporny na wodę, a zależność amplitudy jego sygnału EPR od dawki charakteryzuje się maksimum, które występuje w szerokim zakresie dawek od około 30 Gy [14, 18] do około 60 Gy [19, 32].

Charakterystyka spektralna sygnału RIS (kształt i szerokość linii, współczynnik g, dynamika nasycenia mikrofalami) jest podobna do charakterystyki natywnego sygnału tła paznokci. Jest to główną przeszkodą w ilościowej analizie sygnału RIS dla dawek w zakresie do kilkunastu grejów – istotnego w dozymetrii powypadkowej [25, 26, 28, 31], ponieważ dawki promieniowania w tym zakresie powodują poważne biologiczne deterministyczne

skutki w organizmie człowieka, których nasilenie można zredukować poprzez odpowiednią opiekę medyczną. Jednak łatwy i nieinwazyjny charakter pobierania próbek, w przeciwieństwie do dozymetrii w szkliwie lub kościach, jest dużą zaletą, która uzasadnia podjęcie wyzwania opracowania metody dozymetrii opartej na pomiarach EPR w paznokciach. Zweryfikowanie stosowalności takiej metody i ocena jej dokładności były głównymi celami przedstawionej pracy doktorskiej.

Niektóre dotychczasowe prace innych autorów [18, 30, 31] sugerowały, że ten cel jest realistyczny, a wiele ośrodków badawczych na świecie podjęło badania nad dozymetrią EPR w paznokciach. Jak dotąd opublikowano wyniki dozymetrii EPR w paznokciach w przypadku ofiar kilku wypadków radiacyjnych. Pomiaru Trompiera i in. [19] pozwoliły na przybliżone oszacowanie dawek pochłoniętych przez ofiary za pomocą dwóch metod. Jedna z tych metod opierała się na obserwacji, że jeden z rodników wytworzonych przez napromieniowanie (odporny na wodę rodnik RIS5) charakteryzuje się stosunkowo małą dawką nasycenia sygnału EPR – powyżej tej dawki krzywa zależności amplitudy sygnału od dawki stromo maleje. Drugą metodą pomiaru, zastosowaną przez Romanyukha i in. [14], jest bezpośredni odczyt dawki z uniwersalnej krzywej kalibracji amplitudy sygnału RIS względem dawki.

Dotychczas opublikowane wyniki badań na próbkach napromieniowanych *in vitro* [18] sugerowały duże dozymetryczne znaczenie metody opartej na RIS5, jednak ostateczne potwierdzenie jej wiarygodności wymagało badań z większą liczbą próbek od różnych dawców i weryfikacji uzyskanych wyników w różnych warunkach napromieniania (np. zależności wyników od wielkości dawki frakcyjnej i jej rozkładu w czasie) oraz dla różnych czasów ekspozycji próbek na wodę, co jest niezbędne do wyodrębnienia sygnału RIS5. Natomiast ocena wiarygodności i dokładności metody opartej na kalibracji sygnału RIS wymagała oceny wielkości międzypróbkowego rozrzutu czułości radiacyjnej, która podlega indywidualnym zmianom nie tylko w paznokciach pobranych od różnych dawców, ale także między paznokciami pochodzącymi z rąk i stóp od tego samego pacjenta.

W dotychczas opublikowanych pracach dotyczących dozymetrii EPR w paznokciach ogólnie przyjęto, że wrażliwość na promieniowanie (tj. efektywność generowania wolnych rodników przez promieniowanie) jest taka sama dla paznokci napromienionych w warunkach *in vivo*, jak dla próbek paznokci napromieniowanych *in vitro*. Zakładano również, że w warunkach, gdy okres między napromieniowaniem próbek a ich pomiarem EPR jest krótki, symulacja warunków *in vivo* może być, w pierwszym przybliżeniu, wykonana przez napromieniowanie próbek wcześniej zanurzonych w środowisku wodnym.

Ponadto, jak dotąd nie zostały opublikowane żadne wyniki badań dozymetrii EPR w paznokciach napromieniowanych *in vivo* w warunkach kontrolowanej ekspozycji na promieniowanie. Takie badania są konieczne dla ostatecznej weryfikacji stosowalności metody dozymetrycznej w wypadkach radiacyjnych, w których to napromieniowanie materiału dozymetrycznego zachodzi w warunkach *in vivo*.

CELE PRACY

Cel główny:

Głównym celem pracy było zweryfikowanie hipotezy o możliwości wiarygodnej dozymetrii promieniowania jonizującego u ofiar wypadków radiacyjnych za pomocą pomiarów EPR próbek paznokci napromieniowanych *in vivo* i określenie jej dokładności.

Cele szczegółowe:

1. Określenie warunków pomiaru dla dozymetrii metodą nasyceniową.

Hipotezą roboczą było założenie, że poprzez pomiar dawki odpowiadającej maksimum krzywej przedstawiającej zależność amplitudy EPR sygnału RIS5 od dawki można określić pochłoniętą dawkę, zgodnie z metodyką opisaną w literaturze [14, 18, 19]. Celem badań była weryfikacja tej hipotezy oraz sformułowanie optymalnej pod względem dokładności procedury pomiarowej, co wymagało wykorzystania próbek od różnych dawców oraz zbadania wpływu: (I) warunków napromieniowania (tj. wielkości dawek frakcyjnych i ich rozłożenia w czasie) oraz (II) ekspozycji próbek na wodę na uzyskiwane wyniki.

2. Weryfikacja stosowalności metody bezpośredniej kalibracji sygnału radiacyjnego RIS.

2a. Opracowanie metody analitycznej pozwalającej na zredukowanie niedokładności określania amplitud sygnałów RIS, wynikającej ze zróżnicowania długości krawędzi cięcia paznokci w stosunku do całkowitej masy próbki paznokci. Różnice te powodują w konsekwencji zróżnicowanie wielkości rejestrowanego sygnału MIS, będącego istotnym składnikiem nieradiacyjnego tła w widmach EPR napromieniowanych próbek.

2b. Ocena dokładności i wiarygodności metody określania dawki pochłoniętej na podstawie bezpośredniego jej odczytu z krzywej kalibracji sygnału RIS-dawka oraz zbadanie międzypróbkowego rozrzutu czułości radiacyjnej.

3. Weryfikacja zgodności wyników dozymetrii EPR w warunkach napromieniowania *in vivo* z dawkami wyznaczonymi przez komputerowy system planowania radioterapii.

Ocena zgodności dawek zmierzonych w paznokciach uzyskanych od pacjentów poddanych procedurze napromieniowania całego ciała (ang. Total Body Irradiation, TBI), napromieniowanych *in vivo* w warunkach kontrolowanej ekspozycji na promieniowanie, z dawkami z komputerowego systemu planowania radioterapii. Określenie stopnia takiej zgodności jest niezbędne do weryfikacji stosowalności dozymetrii EPR w rzeczywistych wypadkach radiacyjnych, kiedy napromieniowanie zachodzi w warunkach *in vivo*. Dodatkowym celem badań było również określenie istotnych czynników wpływających na rozbieżności uzyskanych wyników.

4. Określenie wpływu światła na sygnał EPR paznokci.

Ocena wpływu światła słonecznego i sztucznego (ultrafioletu oraz widzialnego z żarówek fluorescencyjnych) na sygnały EPR. Czynnikiem ten może mieć potencjalnie duży wpływ na dokładność dozymetrii EPR, ze względu na nieuniknioną ekspozycję paznokci na światło.

MATERIAŁY I METODY

Material badawczy

Badania wykonano przy użyciu próbek paznokci stanowiących ścinki uzyskane od 13 zdrowych wolontariuszy oraz od 7 pacjentów poddawanych procedurze napromieniowania całego ciała (TBI) przed przeszczepem szpiku kostnego. Próbki pozyskano zgodnie z procedurą zaakceptowaną przez komisję bioetyczną GUM (NKBBN/431-3/2016 oraz NKBBK/431-375/2017).

Pomiary EPR

Metoda pomiarowa opierała się na rejestracji sygnału (widm EPR) przy użyciu spektrometru Bruker EMX 6/1 (Bruker BioSpin), w paśmie X (9,85 GHz) w temperaturze pokojowej. Pomiar sygnału EPR odbywał się *ex post*, w ścinkach uzyskanych po obcięciu nienapromieniowanych i napromieniowanych uprzednio paznokci.

Napromieniowanie *ex vivo*

W celu badania zależności sygnałów EPR w próbkach paznokci i detektorach alaninowych od dawki, napromieniowano je promieniami X generowanymi przy napięciu 6 MVp (Clinac 2300CD, Varian) w Katedrze i Klinice Onkologii i Radioterapii Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku. Próbki napromieniowywano w warunkach równowagi elektronowej, dawki określano korzystając z danych dozymetrycznych przyspieszacza uzyskanych od fizyków medycznych na podstawie rutynowych pomiarów kontrolnych komorą jonizacyjną w fantomie wodnym.

Napromieniowanie *in vivo*

Paznokcie pacjentów zostały napromieniowane *in vivo* w warunkach kontrolowanej ekspozycji na dawkę w ramach procedur TBI. Napromieniowanie pacjentów zostało przeprowadzone w Zakładzie Fizyki Medycznej Wojewódzkiego Centrum Onkologii w Gdyni w czasie trzech dni w sześciu frakcjach (dwie frakcje dziennie) do całkowitej dawki ok. 16 Gy (6 pacjentów) i ok. 11 Gy (1 pacjent, cztery frakcje).

Wpływ światła

Badano wpływ ekspozycji ścinków paznokci na: (I) bezpośrednie światło słoneczne, (II) lampy UV – układ dwóch równoległych lamp CLEO Advantage 80W-R (Philips) o mocy 80 W każda, (III) lampę UV – typ wykorzystywaną w salonach kosmetycznych do utwardzania lakierów hybrydowych, Ultraviolet Radiant Lamp AP-111 (Alle Paznokcie) z 4 żarówkami o mocy 9 W każda oraz (IV) 6 żarówek fluorescencyjnych Duluxstar (OSRAM) o mocy 24 W każda emitujących światło widzialne bez składowej UV.

Analiza statystyczna

Numeryczna analiza widm EPR (uśrednianie skanów, filtrowanie, dopasowanie względem pola magnetycznego) i obliczenia dozymetryczne były przeprowadzone przy wykorzystaniu oprogramowania producenta spektrometru (Bruker) oraz programu Excel z pakietu Microsoft Office. Uzyskane wyniki zostały poddane analizie statystycznej (regresja liniowa, analiza korelacji, analiza dokładności wyników) z wykorzystaniem programu Matlab.

OMÓWIENIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY

1. Wpływ dawki i działania wody na sygnały EPR w napromieniowanych paznokciach.

Marciniak A, Ciesielski B, Prawdzik-Dampc A. *The effects of dose and water treatment on EPR signals in irradiated fingernails*. Radiation Protection Dosimetry. 2014; 162(1-2): 6-9.

Badania wpływu wody oraz promieniowania jonizującego na sygnały EPR w paznokciach zostały przeprowadzone na próbkach pobranych za pomocą nożyczek lub obcinacza od jednego ochotnika (kobieta w wieku 24 lat) bezpośrednio przed rozpoczęciem eksperymentów. W okresach między obcięciem paznokci i wszystkimi późniejszymi procedurami (pomiar EPR, napromieniowanie, ekspozycja na wodę) próbki przechowywano w szczelnie zamkniętych woreczkach polietylenowych w temperaturze pokojowej w ciemności. Próbki napromieniowano w warunkach równowagi elektronowej promieniowaniem X o napięciu 6 MVp (Clinac 2300CD, Varian) w Katedrze Onkologii i Radioterapii Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku.

Uzyskane wyniki wykazały znaczną zmianę w kształcie linii spektralnej i prawie sześciokrotny spadek intensywności widma EPR po traktowaniu wodą nienapromieniowanych świeżo obciętych ścinków paznokci (Rys. 1, 2). Zaobserwowano również zmianę kształtu i zmniejszenie się intensywności sygnału EPR w czasie pierwszej godziny po obcięciu paznokci. Pocięcie ich ścinków na mniejsze kawałki spowodowało wzrost amplitudy sygnału EPR, a następnie spadek wraz z upływem czasu (Rys. 2). Ten spadek sygnału można przypisać zanikowi składowej widmowej MIS3. Tym samym potwierdzono doniesienia literaturowe, że ekspozycja próbek na wodę zmniejsza amplitudę sygnału EPR poprzez eliminację jego składnika MIS2, który jest wrażliwy na wodę. Powtórne działanie wody nie wpływało znacząco na kształt sygnału ani na jego amplitudę, a suszenie próbek paznokci na powietrzu doprowadzało do wzrostu amplitudy widma EPR, aż do pełnego przywrócenia komponentu MIS2 po kilku godzinach. Udowodniono, że pocięcie paznokci na mniejsze kawałki powoduje znaczny wzrost intensywności sygnału EPR – w późniejszej pracy (w artykule nr 3) wykazano, że wzrost ten jest proporcjonalny do przyrostu długości linii cięcia.

Wpływ dawki promieniowania na amplitudę sygnału EPR zbadano w paznokciach moczonych przez 10 minut w wodzie po ich napromieniowaniu *in vitro*. Uzyskane zależności amplitudy sygnału od dawki, które odzwierciedlały zmiany stężenia indukowanych promieniowaniem rodników RIS5 (odpowiedzialnych za sygnał EPR w próbkach mierzonych po działaniu wody) po początkowym wzroście osiągnęły maksimum dla dawek w zakresie 40-60 Gy (Rys. 4).

Uzyskane wyniki wskazywały, że dawka nasycająca dla RIS5 może być zależna od sposobu frakcjonowania dawki, a więc nie może być unikalną właściwością danej próbki, a także, że nie może być charakterystyczną cechą wszystkich paznokci dawcy, jak sugerowały dotychczas opublikowane badania [18]. Stwierdzono, że ta indywidualna zmienność dawki nasycającej i jej zależność od warunków pomiaru (od sposobu frakcjonowania dawki tj. wielkości dawki frakcyjnej i upływu czasu pomiędzy kolejnymi dopromieniowaniami

i ekspozycjami na wodę), nawet w przypadku próbek pozyskanych od tego samego dawcy, mogą być potencjalnymi, kluczowymi przyczynami niedokładności dozymetrii opartej na metodzie nasyceniowej.

2. Dozymetria EPR w paznokciach – przegląd.

Marciniak A, Ciesielski B. *EPR dosimetry in nails—A review*. Applied Spectroscopy Reviews. 2016; 51:1, 73-92.

Biodozymetria elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) opiera się na ilościowej ocenie wpływu promieniowania na materiały biologiczne. Efekty te mają postać stabilnych wolnych rodników, których stężenie zależy od pochłoniętej dawki promieniowania. Omawiany artykuł stanowi krytyczny przegląd opublikowanych dotąd prac poświęconych pomiarom sygnałów EPR w nienapromieniowanych i napromieniowanych paznokciach. Omawia procedury pomiarowe i metody stosowane w celu powiązania cech ilościowych mierzonych widm EPR z zaabsorbowaną dawką.

Wstępna część tego artykułu zawiera podstawowe informacje na temat struktury i składu paznokci oraz zawiera krótki opis historii stosowania spektroskopii EPR w określaniu dawek zaabsorbowanych przez napromieniowane osoby, nie posiadające w czasie wypadku radiacyjnego osobistego dozymetru.

W głównej części artykułu przedstawiono charakterystykę obserwowanych w paznokciach sygnałów EPR: pochodzących z natywnych centrów paramagnetycznych (widma tła BG/BKG), generowanych przez mechaniczne cięcie paznokci (widma MIS) oraz wytwarzanych przez promieniowanie jonizujące (widma RIS). W artykule tym usystematyzowano niespójne dotąd nazewnictwo, a także przedstawiono czynniki determinujące wielkość i zmiany tych sygnałów, takie jak: mechaniczny stres spowodowany obciążeniem paznokcia, ekspozycja ścinków paznokci na wodę, wpływ stosowania lakierów do paznokci, wielkość dawki promieniowania czy moc mikrofal stosowana podczas pomiaru EPR. Przeanalizowano opisane w opublikowanych raportach praktyczne zastosowania dozymetrii EPR w paznokciach w rekonstrukcji dawek pochłoniętych przez ofiary trzech wypadków radiacyjnych [14, 19].

W końcowej części artykułu przedyskutowano kluczowe czynniki ograniczające precyzyjne, ilościowe określenie wielkości sygnału dozymetrycznego (RIS), które jest niezbędne do dokładnej dozymetrii oraz perspektywy przyszłych badań w zakresie dozymetrii EPR w paznokciach, w szczególności dotyczących: stabilności RIS w warunkach *in vivo* oraz wpływ stanu paznokci podczas ich napromieniowania i pomiaru EPR (zawartość wody, naprężenia mechaniczne) na mierzone sygnały.

3. Dozymetria EPR w próbkach paznokci napromieniowanych *in vivo* podczas procedur napromieniania całego ciała.

Marciniak A, Ciesielski B, Czajkowski P, Krefft K, Boguś P, Prawdzik-Dampc A, Lipniewicz J. *EPR dosimetry in nail samples irradiated in vivo during total body irradiation procedures*, Radiation Measurements. 2018; 116: 24-34.

Dozymetria EPR w ścinkach paznokci została zaproponowana kilka lat temu jako nowa obiecująca technika oceny dawki pochłoniętej u ofiar wypadków radiacyjnych. Prace własne oraz innych badaczy prowadzone na ścinkach paznokci napromieniowanych *in vitro* wykazały wzrost amplitudy sygnału EPR w próbkach paznokci po ekspozycji na dawkę promieniowania do co najmniej kilkudziesięciu grejów, to jest w zakresie zainteresowania dozymetrii powypadkowej i ochrony radiologicznej. Prace te wykazały również znaczny zanik sygnałów indukowanych promieniowaniem (sygnałów RIS) pod wpływem działania wody na ścinki paznokci. Badacze z Francji i USA opublikowali prace przedstawiające zastosowanie dozymetrii EPR do określenia dawki u kilku osób narażonych na promieniowanie w wypadkach radiacyjnych [14, 19]. Mimo znacznego upływu czasu między wypadkiem a obcięciem paznokci (od ok. 3 tygodni do 2 miesięcy), ekspozycji paznokci na wodę przed ich obcięciem oraz oceny dawki wykorzystującej uniwersalną krzywą kalibracji utworzoną na podstawie pomiarów ścinków paznokci pochodzących od innego zdrowego dawcy [14], w pracach tych uzyskano, według autorów tych prac, przybliżoną zbieżność dawek zmierzonych metodą EPR z dawkami oszacowanymi na podstawie objawów klinicznych i obliczeń opartych na symulacji przebiegu tych wypadków. Jednak jak dotąd nie opublikowano żadnych badań paznokci napromieniowanych *in vivo* w warunkach dozymetrycznie kontrolowanej ekspozycji, co pozwoliłoby na bezpośrednie określenie dokładności zastosowanych metod dozymetrii EPR. Takie badania są niezbędne dla zweryfikowania wiarygodności nowo zaproponowanej metody dozymetrii EPR w paznokciach.

W tej pracy przedstawiono wyniki sygnałów EPR mierzonych w ścinkach paznokci przechowywanych w temperaturze pokojowej, pozyskanych od 7 pacjentów poddanych procedurze napromieniowania całego ciała (ang. Total Body Irradiation, TBI). Całkowite dawki podawane *in vivo* w sześciu frakcjach podczas 3 dni radioterapii (dla 1 pacjenta w czterech frakcjach) były w zakresie od ok. 11 Gy do ok. 16 Gy, zgodnie z danymi z komputerowego systemu planowania leczenia oraz wynikami równolegle przeprowadzonej dozymetrii alaninowej (Tab. 2). Sygnały EPR w napromieniowanych paznokciach zostały porównane z sygnałami mierzonymi w nienapromieniowanych próbkach paznokci pobranych przed TBI od tego samego pacjenta. Próbkki te były również wykorzystane do indywidualnej kalibracji sygnału EPR względem dawki po ich napromieniowaniu znanymi dawkami promieniowania X o energii 6 MVp. Uzyskane w ten sposób indywidualne krzywe kalibracji wykorzystano do określenia dawek w paznokciach pacjentów po TBI.

W badaniach tych zastosowano dwie metody rekonstrukcji dawek: jedną opartą na zindywidualizowanej kalibracji sygnału EPR indukowanego promieniowaniem (RIS), a drugą opartą na określeniu dawki maksymalnej odpowiedzi (ang. Dose of Maximum Response, DMR) sygnału RIS5.

W celu zredukowania wpływu różnic w wielkościach sygnału MIS (wynikających z różnych długości krawędzi cięcia ścinków) na sygnał EPR, opracowano metodę analityczną pozwalającą na unormowanie wartości mierzonych amplitud sygnałów do tej samej długości cięcia l_{ref} na podstawie pomiaru długości krawędzi cięcia (l) w poszczególnych próbkach i wyznaczeniu ilościowej zależności $MIS(l)$. Pozwoliło to zminimalizować potencjalne błędy wynikające z różnic w sygnale MIS między próbkami napromieniowanymi *in vivo* podczas TBI i *in vitro* (tj. dla celów kalibracji sygnału). Dawki zrekonstruowano na podstawie porównania uśrednionych amplitud w próbkach pobranych od pacjentów przed i po TBI, ze względu na duży rozrzut międzypróbkowy sygnałów EPR dla danego pacjenta – różnice amplitudy tła między próbkami od jednego dawcy sięgają kilkudziesięciu procent, co odpowiada wielkością sygnałowi RIS od dawki z zakresu od kilku do kilkunastu grejów (Rys. 5). Dawki zrekonstruowane metodą kalibracji RIS dla siedmiu napromieniowanych pacjentów wynosiły od -3,6 Gy do 22,2 Gy (Tab. 2). U wszystkich, z wyjątkiem jednego pacjenta, zrekonstruowane dawki były znacznie niższe niż rzeczywiste dawki obliczone przez komputerowy system planowania leczenia (w kilku przypadkach zmierzone dawki były ujemne), prawdopodobnie z powodu zaniku dozymetrycznego sygnału EPR spowodowanego kontaktem paznokci z wodą podczas codziennych czynności higieny osobistej pacjentów. Większą zgodność dawek zmierzonych i rzeczywistych uzyskano na podstawie pomiarów paznokci u stóp niż u rąk, co można przypisać różnicy między tymi dwoma typami próbek w narażeniu na wodę podczas codziennych zabiegów higienicznych pacjentów w okresie 3 dni, między pierwszą a ostatnią frakcją dawki. Stosunek czułości radiacyjnej próbek pochodzących ze stóp w stosunku do rąk wahał się między ok. 60% a ok. 130%, a różnice między paznokciami rąk od różnych dawców wynosiły od -30% do +60% wartości średniej (Rys. 4c).

Druga metoda, oparta na detekcji sygnału RIS5, nie pozwoliła na rekonstrukcję dawek TBI, głównie z powodu braku zaobserwowania nasycenia sygnału EPR dawką promieniowania (Rys. 8) – cecha ta była opisywana dotąd w literaturze, jako charakterystyczna dla rodnika RIS5. Dalsze badania nad metodą RIS5 przedstawione w tym artykule wykazały, że obserwowalność rodnika RIS5 można powiązać z geometrią próbek, tj. stosunkiem całkowitej długości (l) krawędzi cięcia do masy (m) ścinków paznokci. Efektu nasycenia dawką, charakterystycznego dla rodników RIS5, nie zaobserwowano dla próbek o relatywnie wysokim stosunku l/m wynoszącym powyżej 0,20 cm/mg (Rys. 11). Ponadto, badania wykazały jedynie ograniczoną odporność rodników RIS5 na wodę – poddanie próbek działaniu wody dłuższemu niż 10 minut spowodowało zmniejszenie intensywności RIS, aż do jego całkowitego zaniku dla 60 minut ekspozycji napromieniowanych ścinków na wodę (Rys. 12).

W podsumowaniu stwierdzono, że obie metody mają ograniczoną wiarygodność. Jedynie metoda bezpośredniej kalibracji może umożliwić, w warunkach braku kontaktu napromieniowanych paznokci z wodą, przed i po obcięciu, wykrycie efektu promieniowania w badanym zakresie dawek i bardzo przybliżone oszacowanie dawki w paznokciach napromieniowanych *in vivo*.

4. Wpływ światła słonecznego i lamp UV na sygnał EPR w paznokciach.

Marciniak A, Ciesielski B, Juniewicz M, Prawdzik-Dampc A, Sawczak M. *The effect of sunlight and UV lamps on EPR signal in nails*. Radiation and Environmental Biophysics. 2019; <https://doi.org/10.1007/s00411-019-00777-2>.

Celem badań opisanych w tej pracy była ocena wpływu ekspozycji ścinków paznokci na bezpośrednio światło słoneczne, światło lamp UV i żarówek fluorescencyjnych na natywne i indukowane promieniowaniem jonizującym sygnały EPR w paznokciach. Zebrano 17 próbek paznokci od 6 dawców (3 kobiet oraz 3 mężczyzn). Na podstawie przeprowadzonych pomiarów uzyskano zależności amplitudy sygnału EPR od fluencji światła. Pomiary wykonano dla próbek przechowywanych zarówno w warunkach pokojowych, jak i przechowywanych w zamrażarce.

Uzyskane wyniki wykazały, że nawet kilkuminutowa ekspozycja ścinków paznokci na światło słoneczne lub sztuczne światło zawierające składową UV generuje silny sygnał LIS (ang. Light Induced Signal) nakładający się na inne sygnały EPR w paznokciach: BKG, MIS oraz RIS (Rys. 2). Efekt ten zaobserwowano zarówno w próbkach nienapromieniowanych (Rys. 3a, 4a, 5a) jak i napromieniowanych promieniowaniem jonizującym przed ich ekspozycją na światło (Rys. 7a).

Ekspozycja ścinków na światło fluorescencyjne bez składowej UV, w badanym zakresie fluencji światła fluorescencyjnego (do 240 kJ/m²), generowała sygnał EPR ze znacznie niższą wydajnością niż światło UV (Rys. 6a). Sygnał LIS indukowany światłem zanikał już po 10 minutach traktowania próbek wodą (Rys. 3b, 4b), ale nadal był widoczny w ciągu 3 miesięcy po oświetleniu próbek przechowywanych w powietrzu w temperaturze pokojowej bez wpływu wody (Rys. 4b) lub trzymany przez miesiąc w zamrażarce (Rys. 5b, 7b).

W artykule pokazano, że sygnał LIS może znacząco wpływać na wynik pomiaru indukowanego promieniowaniem jonizującym sygnału dozymetrycznego RIS oraz na sygnały tła w nienapromieniowanych paznokciach, a zatem może powodować znaczącą niedokładność w rekonstrukcji dawki pochłoniętej metodą EPR w paznokciach.

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy doktorskiej potwierdzają, że natężenie sygnału EPR obserwowanego w napromieniowanych paznokciach poza dawką promieniowania jest zależne od wielu innych czynników: wielkości naprężeń mechanicznych spowodowanych obciążeniem paznokci, ekspozycji paznokci na wodę oraz na światło. Przedstawione badania wskazują na istotne ograniczenia metody retrospektywnej dozymetrii EPR w paznokciach.

Badania paznokci napromieniowanych *in vivo* u pacjentów poddanych napromienowaniu całego ciała pozwoliły ocenić, w jakim stopniu wyniki EPR uzyskane dla próbek paznokci napromieniowanych *in vivo* w warunkach kontrolowanej ekspozycji

odpowiadają dawkom rzeczywistym z komputerowego systemu planowania radioterapii, co jest kluczową informacją dla zastosowań w dozymetrii powypadkowej.

Metoda bezpośrednio, zindywidualizowanej kalibracji amplitudy sygnału EPR, ze względu na podobieństwo sygnałów indukowanych promieniowaniem do sygnałów tła o amplitudzie zmiennej, zależnej od niekontrolowalnych w pełni czynników (mechaniczne naprężenia podczas cięcia, tło natywne, wilgotność), nie pozwala na wiarygodne wyselekcjonowanie unikalnego sygnału dozymetrycznego, co w konsekwencji powoduje dużą niepewność w mierzonej dawce. Średnio, zrekonstruowane dawki na podstawie pomiarów EPR stanowiły około 50% dawki dostarczonej, obliczonej przez komputerowy system planowania leczenia. Zaobserwowano znaczny rozrzut międzypróbkowy amplitudy sygnałów EPR tła pochodzących od różnych paznokci tego samego dawcy (kilkadziesiąt procent) oraz znaczący rozrzut czułości radiacyjnej próbek paznokci rąk pochodzących od różnych osób (-30% do +60% wartości średniej) oraz pomiędzy próbkami paznokci pozyskanymi z rąk i stóp danego pacjenta (ok. 60% do 130%). Ponadto, destruktywny wpływ wody na sygnał RIS, którego nie da się uniknąć w rzeczywistości (tj. w przypadkach ekspozycji na promieniowanie ludzi, którym wcześniej nie zalecano powstrzymywania się od kontaktu z wodą) powoduje, że w możliwych scenariuszach wypadków radiacyjnych metodą dozymetrii EPR w paznokciach można oszacować pochłoniętą dawkę jako znacznie niższą od pochłoniętej w rzeczywistości. Odwrotny skutek, tj. zawyżenie zmierzonej dawki może być spowodowane ekspozycją paznokci ofiary wypadku na światło zawierające składową UV.

W pracy wykazano, że metoda nasycenia sygnału RIS5 jest wysoce niewiarygodna, nawet dla przybliżonej oceny dawki, ze względu na trudności w dokładnym określeniu warunków eksperymentalnych pozwalających w sposób powtarzalny zaobserwować charakterystyczne nasycenie dawką sygnału RIS5. Obserwacja ta podważa hipotezę istnienia rodników RIS5 jako struktur fizycznie odmiennych od rodników RIS2. Zależność możliwości obserwacji sygnału RIS5 od takich czynników zakłócających, jak geometria ścinków (współczynnik l/m), czas trwania działania wody, wielkość zastosowanej dawki frakcyjnej i jej rozkład w czasie oraz długość przedziału czasu pomiędzy procedurami ekspozycji na wodę i kolejnymi dopromieniowaniami, nie pozwalają na obecnym etapie badań na stosowanie tej metody nie tylko dla dozymetrii, ale nawet dla wykazania faktu ekspozycji paznokci na wysokie dawki promieniowania w zakresie kilkudziesięciu grejów.

Ponadto badania wykazały, że już kilkuminutowa ekspozycja ścinków paznokci na bezpośrednio światło słoneczne oraz światło lamp zawierające składową UV generują silny sygnał LIS, który zaobserwowano zarówno dla próbek nienapromieniowanych, jak i napromieniowanych promieniowaniem jonizującym przed ich ekspozycją na światło. Sygnał ten utrzymuje się przynajmniej przez miesiąc – zarówno dla próbek przechowywanych w temperaturze pokojowej, jak i w zamrażarce.

SUMMARY IN ENGLISH

INTRODUCTION

In the Safety Report No. 4 published in Vienna in 1998 by the International Atomic Energy Agency (IAEA) [1] a radiation accident was defined as an unintentional or unexpected event occurring with a radiation source or during operations using ionizing radiation, which can cause significant human exposure and/or material damage. This definition includes accidents in nuclear reactors and industrial or medical facilities using ionizing radiations. Although radiological accidents in industry, medicine and research have rather limited impact on the environment, they happen much more often than accidents resulting from a reactor's failure and often may result in serious health consequences for people.

The impact of nuclear accidents on people has been the subject of public debate since the construction of the first nuclear reactors and has been a crucial factor in the widespread public interest in nuclear facilities and their safety. This interest was expressed by establishment in 1955 of the United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation (UNSCEAR). Nowadays, the main and the most common source of human exposures to doses of ionizing radiation that may affect their health, is its use in medicine [2, 3]. In the years between 1991 and 1996, the annual number of diagnostic medical tests around the world was about 2.4 billion and increased to over 3.6 billion in the period 1997-2007 [4]. Unfortunately, despite the measures taken to reduce the risk of radiation accidents or to minimize the amount of radioactive waste released into the environment, the widespread use of ionizing radiation still carries a risk of human errors or equipment failures and, consequently, can cause an uncontrolled exposure of civilians to high radiation doses [2, 5]. In 1944-2003, there were 426 serious radiation accidents worldwide, in which more than 130,000 people were involved. Almost 90% of these exposures resulted from the Chernobyl accident in 1986 [6].

The increase in number of people exposed to ionizing radiation in radiation accidents, observed in recent decades, is responsible for growing concern about the loss of control of radioactive materials and their potential use for terrorist attacks. This validates the need to develop effective retrospective dosimetry tools, that can provide rapid and accurate assessment of the absorbed doses. This is particularly important in the case of post-accident dosimetry of accidental civilian casualties, whose are usually not equipped with personal dosimeters or in a situation, where readings from personal dosimeters are unreliable due to mechanical damage or overdosing, e.g. as in the case of personal dosimeters of the Chernobyl nuclear power plant personnel during the disaster in April 1986. In such situations, retrospective dosimetry in humans can be based solely on the analysis of physical, chemical or biological effects induced in irradiated individuals.

Whole body doses in magnitudes over 2 Gy may cause clinically significant acute radiation syndrome (ARS) [6, 7]. Therefore, fast and precise retrospective dosimetry is crucial in classification and selection (triage) of the victims and in making decisions regarding medical procedures and safety measures, thus increasing the chance for effective assistance to victims of such accidents [6, 7, 8]. In 2005, the European Society for Blood and Marrow

Transplantation defined a unified basis for the medical treatment of victims of radiation accidents. The basis for this consensus was a clinical analysis of irradiated victims titled "METREPOL" (Medical Treatment Protocols for Radiation Accident), based on data from 800 victims from 70 previous accidents. This protocol uses the assessment of hematological (H), neurovascular (N), cutaneous (C) and gastrointestinal (G) injuries at an early stage after exposure to radiation [7, 9].

Electron Paramagnetic Resonance spectroscopy (EPR) has a great potential as one of the available biodosimetric methods applicable in victims of such incidents [10-19]. The EPR spectroscopy is a complementary technique to biological dosimetry (cytogenetic or based on clinical symptoms). It is based on the measurement of EPR signals coming from paramagnetic centers (e.g. free radicals) generated in tissues by ionizing radiation – until now, such signals have been observed in the teeth (enamel, dentin), bones, nails and hair. Optimizing sensitivity and accuracy of this method is essential for dosimetry after radiation accidents; this method also can be used to verify the actual dose delivered during radiotherapy procedures. Initial studies carried out several decades ago [17, 20] showed that the exposure of nails and other materials rich in keratin (hair, horns, hooves, etc.) to ionizing radiation caused formation of free radicals in those materials and were sources of EPR signals, which were stable over relatively long period (from several days to many weeks). Compared to bones and tooth enamel – biomaterials, which were already proved to be useful in EPR dosimetry in numerous scientific publications [12, 16, 21-24], EPR signals caused by radiation in nails are much more difficult to identify due to spectral similarity of radiation-induced signals to native EPR signals, lower stability of radicals generated by radiation and their susceptibility to water. Signals generated in the hair, due to their low radiation efficiency, in the range of doses important for practical dosimetric applications cannot be used.

The EPR spectrum of non-irradiated nail clippings contains five components that can be assigned to native radicals in the nail tissue and to paramagnetic centers induced by mechanical stresses in the nail matrix (along the cut edge) by disrupting disulfide bonds (S-S) in the keratin alpha structure. The EPR signal of non-irradiated samples includes:

1. MIS1 (Mechanically Induced Signal) – anisotropic broad doublet, the most pronounced at low temperature (77 K). It is very intense immediately after cutting the nails; it disappears after about 20-24 hours at room temperature [25] and is eliminated by water treatment [18, 26].
2. MIS2 – a singlet spectrally similar to the background signal (BKG) and to the components of signal generated by radiation (Radiation Induced Signal, RIS). It is eliminated by water. The MIS2 intensity is minimal immediately after humidification of a nail sample, and then increases in time about twice, during a week to a few months after the humidification [27].
3. MIS3 – an unstable doublet; in air at room temperature it can be observed only in about 1-2 hours after nails cutting and it is also eliminated by water [18].
4. MIS4 – a signal observed in the Q band; identified as a sulfinyl radical (RSO°) [18].
5. BKG – native background signal; singlet, very similar to the MIS2 component and to the radiation-induced RIS2 and RIS5 signals. It is referred to as the remnant after

a complete disappearance of mechanically induced signals (MIS) after treatment of nail clippings with water [27]. Its origin is assigned to stable free radicals naturally occurring in the nails. It is characterized by relatively high thermal stability – there was no decrease in its intensity in samples heated for 20 minutes at 120°C, according to the report of Trompier et al. [18].

The quantitative determination of intensity of the radiation-induced signal (RIS) is the basis for the retrospective EPR dosimetry in nails [27-30]. Depending on magnitude of the delivered dose, the degree of nail hydration or exposure of irradiated nail samples to water, the RIS signal can be composed of several components. In dose ranges relevant for practical dosimetry in humans (i.e. up to several dozens of greys), the dominant spectral component of RIS is the singlet. Its intensity can be used to determine the absorbed dose.

Recently published article [18] reports the presence of two radiation-induced radicals, with different sensitivity to water – RIS2 and RIS5, responsible for the EPR signal induced by low-dose radiation:

1. RIS2 – quickly fades in the nails after water treatment. The amplitude of this signal measured in untreated nails (not exposed to water) shows linear dose-dependence up to at least 125 Gy [31].
2. RIS5 – is resistant to water and the dependence of its amplitude on dose is characterized by a maximum, that occurs in a wide dose range – from about 30 Gy [14, 18] up to about 60 Gy [19, 32].

The spectral characteristics of the RIS signal (the shape and width of the spectral line, the g-factor, the dynamics of microwave saturation) are similar to the characteristics of the nail' native background signal (BKG). This is the main obstacle to the quantitative analysis of the RIS signal for doses from up to dozens of greys the range of interest in post-accident dosimetry [25, 26, 28, 31]. Radiation doses in this range cause serious biological deterministic effects in the human body and their severity can be reduced by adequate medical care. However, the easy and non-invasive nature of getting the nail samples, in contrast to dosimetry in enamel or bones, is a strong advantage, which justifies undertaking the challenge to develop a dosimetry method based on EPR measurements in nails. The verification of the applicability of such a method and the assessment of its accuracy were the main objectives of the presented dissertation.

Some previous works by other authors [18, 30, 31] suggested that this goal is realistic and many research centers around the world have undertaken research on EPR dosimetry in nails. So far, the results of EPR dosimetry in nails were published for victims of three radiation accidents. Measurements by Trompier et al. [19] allowed for approximate estimates of doses absorbed by the victims using two different methods. One of these methods was based on the observation, that one of the radicals generated by irradiation (the water resistant RIS5 radical) is characterized by relatively low saturation dose – above that dose the signal vs dose calibration curve steeply decreases. The second method of measurement, used by Romanyukha et al. [14], consisted in direct readout of the dose from a universal RIS vs dose calibration curve.

The previously published results on *in vitro* irradiated samples [18] suggested the importance of the RIS5-based method, however, the final confirmation of its reliability required testing with more samples from different donors and verification of results in different irradiation conditions (e.g. dependence of the results on dose fractionation) and for different times of the samples' exposure to water, which is the necessary procedure for isolation of the RIS5 signal. The assessment of reliability and accuracy of the second method, based on the calibration of magnitude of the RIS signal, required the assessment of the inter-sample spread of radiation sensitivity, which is subject to individual changes not only in the nails collected from different donors, but also between the nails from the hands and feet of the same patient.

In already published works regarding EPR dosimetry in the nails it was generally assumed, that the sensitivity to radiation (i.e. the radiation yield of free radicals) is the same for nails irradiated *in vivo*, as for *in vitro* irradiated nail samples. It was also assumed, that when the period between irradiation of the samples and their EPR measurement is short, a simulation of *in vivo* conditions can be, in the first approximation, performed by irradiating samples previously immersed in an aqueous medium.

In addition, so far no results have been published on EPR dosimetry in nails irradiated *in vivo*, under controlled exposure to radiation by another, reliable method. Such studies are necessary for final verification of the applicability of the dosimetric method in radiation accidents, in which irradiation of the dosimetric material occurs *in vivo*.

THE AIMS OF THE DISSERTATION

Main goal:

The main purpose of this work was verification of the hypothesis about the possibility of reliable dosimetry of ionizing radiation in victims of radiation accidents by means of EPR measurements of nail samples irradiated *in vivo* and determination of its accuracy.

Specific aims:

1. Determination of the measurement conditions for dosimetry using the saturation method.

The working hypothesis was the assumption, that by measuring the dose corresponding to the maximum of the curve representing the dependence of the EPR amplitude of the RIS5 signal vs the dose, the unknown dose (absorbed in an accident) can be determined according to the method described in the literature [14, 18, 19]. The aim of this study was to verify this hypothesis and formulate an optimal measurement procedure. Achieving this aim required analysis of samples from different donors and to investigate the impact of: (I) irradiation conditions (i.e. fractional dose quantities and their distribution over time) and (II) exposure of samples to water, on the obtained results.

2. Verification of applicability of the method of direct calibration of the RIS.

2a. Development of an analytical method that allows to reduce uncertainty in determination of amplitudes of the RIS signals, resulting from variations in the length of the cutting edge

of nail samples. These variations result in differences in intensity of the detected MIS signals, which are significant components of the EPR background signal.

2b. Assessment of accuracy and reliability of determining the absorbed dose on the basis of its direct reading from the calibration curve of the RIS-dose signal and the examination of the intersample scatter in radiation sensitivity.

3. Verification of accordance of doses measured by EPR in nails irradiated *in vivo* with doses determined by the computer treatment planning system.

Assessment of accordance between doses measured in nails obtained from patients undergoing TBI procedure, irradiated *in vivo* under controlled radiation exposure, with actual doses planned by computer radiation therapy planning system. Determining the degree of such accordance is necessary to verify the applicability of EPR dosimetry in real radiation accidents, when irradiation occurs *in vivo*. An additional objective of the research was determination of the relevant factors responsible for observed discrepancies between the measured and planned doses.

4. Determination of the effects of exposure of the nail clippings to light on their EPR signals.

The effect of sunlight and artificial light (ultraviolet and visible) on EPR signals. This factor can have a significant effect on accuracy of the EPR dosimetry due to unavoidable exposure of nails to light from various sources.

MATERIALS AND METHODS

Research material

The study was performed using nail samples obtained from 13 healthy volunteers and from 7 patients undergoing total body irradiation (TBI) procedure before bone marrow transplantation. The samples were obtained in accordance with the procedure accepted by the bioethical commission of Medical University of Gdańsk (NKBBN/431-3/2016 and NKBBK/431-375/2017).

EPR measurements

The method was based on registration EPR spectra of nail samples using a Bruker EMX 6/1 spectrometer (Bruker BioSpin), in the X band (9.85 GHz) at room temperature. The EPR signal was measured in the clippings obtained by cutting non-irradiated and irradiated nails.

***Ex vivo* irradiation**

In order to study the dependence of EPR signals in nail samples and alanine detectors on the dose, respective samples were irradiated with X-rays generated at 6 MVp (Clinac 2300CD, Varian) at the Department of Oncology and Radiotherapy of the Medical University of Gdańsk. The samples were irradiated under electron equilibrium conditions, the dose was determined using the dosimetric data of the accelerator obtained from medical physicists based on routine control measurements with ionization chambers in a water phantom.

***In vivo* irradiation**

Patients' nails were irradiated *in vivo* under controlled dose exposure during TBI procedures. Irradiation of the patients was carried out at the Department of Medical Physics, Oncology Centre of the PCK Marine Hospital in Gdynia during three consecutive days in six fractions (two fractions per day) to a total dose of about 16 Gy (6 patients) and about 11 Gy (1 patient, four fractions).

The effect of light

The effect of exposure of nail clippings to light was studied using: (I) direct sunlight, (II) UV lamps – two parallel CLEO Advantage 80W-R lamps system (Philips) at 80 W power, (III) UV lamp – the type used in beauty salons for hybrid varnish curing, Ultraviolet Radiant Lamp AP-111 (Alle Nails) with four 9 W bulbs and (IV) a lamp with six Duluxstar fluorescent bulbs (OSRAM) 24 W each, emitting visible light without any UV component.

Statistical analysis

The numerical analysis of the EPR spectra (averaging, filtering, adjusting with respect to the magnetic field) and dosimetry calculations were carried out using the spectrometer manufacturer's (Bruker) software and Excel from Microsoft Office. The obtained results were subjected to statistical analysis (linear regression, correlation analysis, calculations of uncertainties) using Matlab program.

OVERVIEW OF ARTICLES INCLUDED IN THE DISSERTATION

1. Marciniak A, Ciesielski B, Prawdzik-Dampc A. *The effects of dose and water treatment on EPR signals in irradiated fingernails*. *Radiation Protection Dosimetry*. 2014; 162(1-2): 6-9.

The research on the effect of water treatment and ionizing radiation on EPR signals in nails was performed using clippings cut with scissors or a nail clipper from nails of one volunteer (woman aged 24) just before the experiment began. In the periods between the nails trimming and all subsequent procedures (EPR measurements, irradiations and water exposures) the samples were stored in airtight polyethylene bags at room temperature in the dark. The samples were irradiated under electron equilibrium with X-ray radiation of 6 MVp (Clinac 2300CD, Varian) at the Department of Oncology and Radiotherapy at the Medical University of Gdańsk.

The obtained results showed a significant change in the shape of the spectral line and almost six-fold decrease in the intensity of the EPR spectrum after water treatment of non-irradiated, freshly cut nail clippings (Figs. 1, 2). A change in the shape and a decrease in EPR signal intensity was observed during the first hour after cutting the nails. Subsequent cutting them down into smaller pieces resulted in an increase in the amplitude of their EPR signals followed by a gradual decrease in time (Fig. 2). This decrease in EPR signal intensity can be attributed to decay of the MIS3 spectral component. This observations were in accordance with other published articles reporting, that an exposure of samples to water reduces the amplitude of the EPR signal by eliminating its MIS2 component, which is sensitive to water.

Repeated water treatments did not affect significantly neither on the shape of the signal or its amplitude, and later drying of the nails samples in air led to full restoration of the MIS2 component after a few hours. It was proved, that cutting the nails into smaller pieces causes a significant increase in the intensity of the EPR signal – in later research (described in the article No. 3) it was shown, that this increase is proportional to the increase in the length of the cut edge.

The effect of radiation dose on amplitude of the EPR signal was examined in nails soaked for 10 minutes in water after *in vitro* irradiation. The obtained dose-response curves, which reflected changes in the concentration of radiation-induced RIS5 radicals (responsible for the EPR signal in measured after exposure of irradiated samples to water), after initial increase reached their maximum at doses in the range of 40-60 Gy (Fig. 4).

The obtained results indicated that saturation dose for the RIS5 signal can be dependent on dose fractionation, and thus it cannot be a unique property of a given sample, and also, that it cannot be a characteristic feature of all donor's nails, as other previously published research had suggested [18]. It was found, that this individual variation in the saturation dose and its dependence on the measurement conditions (i.e. dose rate, dose fractionation and time between subsequent irradiations and water exposures) even in samples obtained from the same donor, can be potential, crucial sources of inaccuracy in EPR dosimetry based on the saturation method.

2. Marciniak A, Ciesielski B. *EPR dosimetry in nails—A review. Applied Spectroscopy Reviews.* 2016; 51:1, 73-92.

The electron paramagnetic resonance (EPR) biodosimetry is based on a quantitative assessment of physicochemical radiation effects in biological materials. These effects have a form of stable free radicals having concentrations dependent on dose of the absorbed radiation. This article is a critical overview of articles published so far on measurements of EPR signals in non-irradiated and irradiated nails. The measurement procedures and methods used to relate the quantitative characteristics of the measured EPR spectra with the absorbed dose are discussed.

The introductory part of this article contains basic information about the structure and composition of nails and provides a brief description of history of applications of EPR spectroscopy in determining the doses absorbed by irradiated people, who did not have any personal dosimeters during radiation accidents.

The main part of this article presents the characteristics of EPR signals measured in nails: originating from native paramagnetic centers (BG/BKG background spectra), generated by mechanical cutting of nails (MIS spectra) and generated by ionizing radiation (RIS spectra). This article systematizes inconsistent nomenclature existing so far in the literature, and summarizes information on factors determining the intensity and changes of these signals, such as: mechanical stress caused by cutting the nail, exposure of nail clippers to water, effect of applying a nail polish, radiation dose, microwave power used during EPR measurement. Examples of practical applications of EPR dosimetry in nails in the reconstruction of doses

absorbed by victims of three radiation accidents described in published reports are also presented [14, 19].

The final part of this article discusses crucial factors limiting a precise, quantitative determination of the dosimetric signal (RIS), which is necessary for reliable dosimetry, in particular: the instability of RIS in *in vivo* conditions and the effect of physical condition of nails during their irradiation and EPR measurement (water content, mechanical stresses) on the measured signals.

3. Marciniak A, Ciesielski B, Czajkowski P, Krefft K, Boguś P, Prawdzik-Dampc A, Lipniewicz J. *EPR dosimetry in nail samples irradiated in vivo during total body irradiation procedures*, Radiation Measurements. 2018; 116: 24-34.

EPR dosimetry in nail clippings was proposed a few years ago as a new, potential technique for assessing the absorbed dose in victims of radiation accidents. Our preliminary work, as well as works of other authors conducted in *in vitro* irradiated nails, showed an increase in the amplitude of the EPR signal in nail samples after their exposure to radiation dose to at least several dozens of greys, i.e. in the scope of interest for post-accident dosimetry and for radiological protection. These works also showed a significant fading of the radiation-induced signal (RIS) after water treatment of nail samples. Researchers from France and the USA have published reports showing the use of EPR dosimetry to determine the dose in a few people exposed to radiation during accidents [14, 19]. Despite a considerable time lag between the accident and collection of the nail samples (from about 3 weeks to 2 months), unavoidable exposure of these nails to water after the accident and assessment of the doses using an universal calibration curve based on measurements of nail clippings from another donor [14], according to the authors, an approximate convergence was obtained between doses measured by the EPR method and the doses estimated from clinical symptoms and calculations based on simulations of these events. However, no studies of nails irradiated *in vivo* under dosimetrically controlled exposure have been published so far. Such studies are necessary to verify reliability of the newly proposed EPR dosimetry method in the nails and would allow for a more direct determination of accuracy of the used EPR dosimetry methods.

This paper presents the results of EPR signals measured in nail clippings stored after cut at room temperature, obtained from 7 patients undergoing total body irradiation procedures (TBI). The total doses were administered *in vivo* in six fractions during 3 consecutive days of radiotherapy (for 1 patient in four fractions) and were in the range from about 11 Gy to about 16 Gy, according to data from computer treatment planning system verified in parallel with alanine dosimetry (Tab. 2). EPR signals in the irradiated nails were compared with signals measured in non-irradiated nail samples taken before the TBI from the same patient. These samples were also used to individually calibrate their EPR signal against dose by their irradiation with known doses of 6 MVp X-rays. The individual calibration curves obtained in this way were used to determine the doses absorbed during TBI procedures.

In these studies, two methods of dose reconstruction were used: one based on individualized calibration of the radiation-induced EPR signal (RIS), and the second one based on the

determination of the dose of maximum response (DMR) of the RIS5 EPR signal. In order to reduce the effect of variations in the MIS component on the EPR signal (resulting from different length of the cut edges in the clippings), an analytical method was developed to normalize the amplitudes of the measured signals to the same cut length (l_{ref}) by measuring the cutting edge length (l) in individual samples and determining the quantitative dependence of MIS on the l parameter. This allowed to minimize potential errors due to differences in the MIS signals between samples irradiated *in vivo* during TBI and *in vitro* (i.e. for signal calibration purposes). Due to the relative large inter-sample scatter of EPR signals for a given patient with variations in the background signals being equivalent in magnitude to RIS induced by several grays (Fig. 5), the TBI doses were reconstructed on the basis of a comparison of averaged signal amplitudes in samples collected from patients before and after TBI. The doses reconstructed by the RIS calibration method for seven irradiated patients ranged from -3.6 Gy to 22.2 Gy (Table 2). For everyone, except for one patient, the reconstructed TBI doses were generally significantly lower, than the respective doses predicted in the nails by treatment planning system (in some cases the measured doses were negative), probably due to fading of the dosimetric EPR signals caused by contact of the nails with water during daily personal hygiene activities of the patients. A better accordance of the measured and the real doses was obtained in toenails than in fingernails. This result can be attributed to a difference between these two types of samples in water exposure in the regular everyday hygiene of the patients over the period of 3 days between the first and the last fraction of the TBI dose. The ratio of the radiation sensitivity of the foot samples to the hands varied between approximately from 60% and 130%, and the differences between the fingernails between the donors were -30% to +60% of the mean value (Fig. 4c).

The second method, based on detection of the DMR of the RIS5 signal, did not allow for reconstruction of the TBI doses mainly due to the lack of dose saturation of the measured EPR signals (Fig. 8) – described so far in literature, as a characteristic feature of the RIS5 radicals. Further research on the RIS5 method presented in this article showed, that the observability of the RIS5 radicals can be dependent on geometry of the samples, i.e. the ratio of the total length (l) of the cutting edge to the mass (m) of the nail clippings. The effect of dose saturation, characteristic to the RIS5 radicals, was not observed for samples with a relatively high (above 0.20 cm/mg) l/m ratio (Fig. 11). In addition, the presented results showed only a limited water resistance of the RIS5 radicals – water exposures longer than 10 minutes caused reduction of the RIS intensity, until its complete destruction for 60 minutes water treatments of the irradiated clippings (Fig. 12).

It is concluded that both examined methods are of limited reliability. Only the method of direct calibration can assure detection of the radiation exposure in the examined dose range restricted to conditions of minimized contact of irradiated nails with water, and can provide only very rough approximation of dose in nails irradiated *in vivo*.

4. Marciniak A, Ciesielski B, Juniewicz M, Prawdzik-Dampc A, Sawczak M. *The effect of sunlight and UV lamps on EPR signal in nails. Radiation and Environmental Biophysics.* 2019; <https://doi.org/10.1007/s00411-019-00777-2>.

The aim of the research described in this article was assessment of the effect of illumination of nails' clippings by direct sunlight, UV lamps and fluorescent bulbs on native and radiation-induced EPR signals in nails. Seventeen nail samples from 6 donors (3 women and 3 men) were collected. On the basis of this measurements, a dependence of the amplitude of the EPR signal vs the fluence of light was determined. The measurements were performed for samples stored in room conditions and in a freezer.

The obtained results showed, that even a few minutes of exposure of nail clippings to sunlight or to artificial light including a UV component generates a strong Light Induced Signal (LIS) overlapping with the other EPR signals in nails: BKG, MIS and RIS (Fig. 2). This effect was observed in both: non-irradiated samples (Figures 3a, 4a, 5a) and samples irradiated by ionizing radiation before their exposure to light (Fig. 7a).

An exposure of the clippings to fluorescent light without a UV component in the tested fluence range (up to 240 kJ/m²) generated a weak EPR signal with a distinctly lower yield than the UV light (Figure 6a). The light-induced signal (LIS) faded after 10 minutes of water treatment (Fig. 3b, 4b), but was still visible within 3 months after illumination in samples stored in air at room temperature without their exposure to water (Figure 4b) or kept for about a month in a freezer (Fig. 5b, 7b).

This article shows, that the LIS signal can significantly affect the measured amplitudes of the RIS as well as the background signals in non-irradiated nails, and thus can cause significant errors in the reconstruction of the absorbed dose by EPR dosimetry in nails.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

The research performed for this doctoral thesis confirms, that intensity of the EPR signal observed in irradiated nails, apart from the radiation dose is dependent on several other factors, e.g.: the degree of mechanical stress caused by cutting the nails, an exposure of nails to water and light. The presented studies indicate the existence of significant limitations of the EPR retrospective dosimetry in nails.

The study of nails irradiated *in vivo* in patients who underwent total body irradiation allowed to assess compatibility of results of the EPR dosimetry in nails irradiated *in vivo* with real doses determined by computerized radiotherapy planning system.

The method of direct, individualized calibration of the amplitude of the EPR signal, due to similarity of the signals induced by radiation to the background signals of variable amplitude, depending on uncontrollable factors (mechanical stress during cutting, native background, humidity), does not allow for a reliable separation of the unique dosimetric signal, which leads to large uncertainties in the measured dose.

On average, the doses reconstructed by EPR measurements accounted for only about 50% of the delivered dose. In addition, a significant scatter of the background signals from different nails of the same donor (within several dozen percent) and the large variations in radiation sensitivities of nail samples from different donors (from -30% to + 60% of the mean value) and between the nail samples obtained from the hands and feet of a given patient

(from about 60% to 130%) was observed. The destructive influence of water on the dosimetric RIS signal, which cannot be avoided in reality (i.e. in cases of exposure to radiation of people who previously were not recommended to refrain from contact with water), can cause, that in real scenarios of radiation accidents the application of EPR dosimetry in nails may lead to significant underestimation the absorbed doses. The opposite effect, i.e. an overestimation of the real dose may be due to exposure of the victim's nails to light containing a UV component.

The RIS5 saturation method was proved as highly unreliable, even for approximate dose assessment, due to difficulties in determination of the necessary experimental conditions for reproducible observation of the dose-saturation behavior, characteristic to RIS5 radicals. This observation undermines the hypothesis of the very existence of the RIS5 radicals as structures physically distinct from the RIS2 radicals. The dependence of the possibility of observing the RIS5 signal on such disturbing factors, as the cut geometry (the l/m parameter), duration of the water treatments, the magnitude of applied fractional doses and their distribution in time, duration of the time lag between water exposure and subsequent irradiation, at the current stage of research does not allow for the use of this method not only for quantitative dosimetry, but even for proving the nails' exposure to doses of several dozen greys.

In addition, our studies have shown that a few minutes exposure of nail clippings to direct sunlight or artificial light including a UV component generate a strong LIS signal, which was observed both for non-irradiated samples and for samples irradiated with ionizing radiation before their exposure to light. This signal lasted for at least one month – either in the samples stored at room temperature or in the freezer.

WYKAZ CYTOWANEGO PIŚMIENICTWA

1. International Atomic Energy Agency. Planning the medical response to radiological accidents [online]. Safety Reports Series No. 4. Vienna: IAEA; 1998. [dostęp 27 luty 2019]. Dostępny w: https://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/Pub1055_web.pdf
2. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. Sources and effects of ionizing radiation. Vol. 1: Sources [online]. Report to the General Assembly, 2000. [dostęp 27 luty 2019]. Dostępny w: http://www.unscear.org/docs/publications/2000/UNSCEAR_2000_Report_Vol.I.pdf
3. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. Scientific Report: summary of low-dose radiation effects on health [online]. W: Report of the United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation 2010. New York: United Nations, 2011: 4–14. [dostęp 27 luty 2019]. Dostępny w: http://www.unscear.org/docs/publications/2010/UNSCEAR_2010_Report.pdf
4. World Health Organization. Scientific background [online]. W: Communicating radiation risks in paediatric imaging: information to support healthcare discussions about benefit and risk. Geneva: WHO, 2016: 11–27. [dostęp 27 luty 2019]. Dostępny w: http://www.who.int/iris/bitstream/10665/205033/1/9789241510349_eng.pdf
5. Wójcik A, Stephan G, Sommer S, i in. Dozymetria biologiczna do rekonstrukcji dawek pochłoniętych w wypadkach radiacyjnych w radioterapii [online]. Raporty IChTJ, Seria A 2002; 1: 327-332. [dostęp 27 luty 2019]. Dostępny w: http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/_Public/33/070/33070648.pdf
6. DiCarlo AL, Maher C, Hick JL, i in. Radiation injury after a nuclear detonation: medical consequences and the need for scarce resources allocation. Disaster Med Public Health Prep. 2011; 5 (Suppl 1): S32-44.
7. López M, Martín M. Medical management of the acute radiation syndrome. Rep Pract Oncol Radiother. 2011; 16(4): 138-146.
8. Oughton D, Albani V, Barquinero F, i in. Recommendations and procedures for preparedness and health surveillance of populations affected by a radiation accident. SHAMISEN, Nuclear Emergency Situations Improvement of Medical and Health Surveillance. 2017.
9. Fliedner TM, Powles R, Sirohi B, i in. Radiologic and nuclear events: the METREPOL severity of effect grading system. Blood. 2008; 111(12): 5757-5758.
10. Ciesielski B. EPR biodosimetry: fundamentals, applications and perspectives. Curr. Top. Biophys. 2010; 33(Suppl B): 7-8.
11. He X, Gui J, Matthews TP, i in. Advances towards using finger/toenail dosimetry to triage a large population after potential exposure to ionizing radiation. Radiat. Meas. 2011; 46(9): 882-887.
12. Ikeya M, Miyajima J, Okajima S. ESR dosimetry for atomic bomb survivors using shell buttons and tooth enamel. Jpn. J. Appl. Phys. 1984; 23: 697-699.
13. Ivannikov AI, Gaillard-Lecanu E, Trompier F, i in. Dose reconstruction by EPR spectroscopy of tooth enamel: application to the population of Zaborie Village exposed to high radioactive contamination after the Chernobyl accident. Health Phys. 2004; 86(2): 121-134.

14. Romanyukha A, Trompier F, Reyes RA, i. in. Electron paramagnetic resonance radiation dose assessment in fingernails of the victim exposed to high dose as result of an accident. *Radiat. Environ. Biophys.* 2014; 53(4):755-762.
15. Simon SL, Bailiff I, Bouville A, i. in. BiodosEPR 2006 Consensus Committee report on biodosimetric methods to evaluate radiation doses at long times after exposure. *Radiat. Meas.* 2007; 42(6-7): 948-971.
16. Skvortsov VG, Ivannikov AI, Stepanenko VF, i. in. Application of EPR retrospective dosimetry for large-scale accidental situation. *Appl. Radiat. Isot.* 2000; 52(5): 1275-1282.
17. Symons MC, Chandra H, Wyatt J. Electron paramagnetic resonance spectra of irradiated fingernails: a possible measure of accidental exposure. *Radiat. Prot. Dosim.* 1995; 58: 11-15.
18. Trompier F, Romanyukha A, Reyes RA, i. in. State of the art in nail dosimetry: free radicals identification and reaction mechanisms. *Radiat. Environ. Biophys.* 2014; 53(2): 291-303.
19. Trompier F, Queinnec F, Bey E, i. in. EPR Retrospective Dosimetry with Fingernails: Report on First Application Cases. *Health. Phys.* 2014; 106(6): 798-805.
20. Dalgarno BG, McClymont JD. Evaluation of ESR as a radiation accident dosimetry technique. *Appl. Radiat. Isot.* 1989; 40: 1013-1020.
21. Ciesielski B, Krefft K, Penkowski M, i. in. Effects of water treatment and sample granularity on radiation sensitivity and stability of EPR signals in X-ray irradiated bone samples. *Radiat. Protect. Dosim.* 2014; 159(1-4): 141-148.
22. Fattibene P, Callens F. EPR dosimetry with tooth enamel: A review. *Appl. Radiat. Isot.* 2010; 68(11): 2033-2116.
23. Kinoshita A, Calcina CSG, Sakamoto-Hojo ET, i. in. ESR and FISH dose estimation in an accidental case of partial body irradiation with gamma radiation. *Adv. ESR Appl.* 2002; 18: 211-213.
24. Krefft K, Drogoszewska B, Kaminska J, i. in. Application of EPR dosimetry in bone for ex vivo measurements of doses in radiotherapy patients. *Radiat. Protect. Dosim.* 2014; 162(1-2): 38-42.
25. Romanyukha A, Reyes RA, Trompier F, i. in. Fingernail dosimetry: Current status and perspectives. *Health. Phys.* 2010; 98(2): 296-300.
26. Reyes RA, Romanyukha A, Trompier F, i. in. Electron paramagnetic resonance in human fingernails: the sponge model implication. *Radiat. Environ. Biophys.* 2008; 47(4): 515-526.
27. Reyes RA, Trompier F, Romanyukha A. Study of the stability of signals after irradiation of fingernail samples. *Health. Phys.* 2012; 103(2): 175-180.
28. Black PJ, Swarts SG. Ex vivo analysis of irradiated fingernails: chemical yields and properties of radiation-induced and mechanically-induced radicals. *Health. Phys.* 2010; 98(2): 301-308.
29. Reyes RA, Romanyukha A, Olsen C, i. in. Electron paramagnetic resonance in irradiated fingernails: variability of dose dependence and possibilities of initial dose assessment. *Radiat. Environ. Biophys.* 2009; 48(3): 295-310.
30. Wilcox DE, He X, Gui J, i. in. Dosimetry based on EPR spectral analysis of fingernail clippings. *Health. Phys.* 2010; 98(2): 309-317.
31. Trompier F, Romanyukha A, Kornak L, i. in. Electron paramagnetic resonance radiation dosimetry in fingernails. *Radiat. Meas.* 2009; 44(1): 6-10.

32. Marciniak A, Ciesielski B, Prawdzik-Dampc A. The effects of dose and water treatment on EPR signals in irradiated fingernails. *Radiat. Protect. Dosim.* 2014; 162(1-2): 6-9.

PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ