

KIS DÓZISOKNÁL MEGFIGYELHETŐ HIPERSZENZITIVITÁSSAL ÉS INDUKÁLT SUGÁRREZISZTENCIÁVAL KAPCSOLATOS ADATOK GYŰJTÉSE ÉS KÖZZÉTÉTELE

Polgár Szabolcs^{1,2}

ORCID: [0000-0003-1133-3890](https://orcid.org/0000-0003-1133-3890)

Madas Balázs Gergely^{2,3}

ORCID: [0000-0002-0698-4982](https://orcid.org/0000-0002-0698-4982)

¹Eötvös Loránd Tudományegyetem, Fizika Doktori Iskola

²Energiatudományi Kutatóközpont, Környezetfizikai Laboratórium

³Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Fizikai Kémia
és Anyagtudományi Tanszék

Bevezetés és célkitűzés

Ha az ionizáló sugárzás hatását sejtszinten vizsgáljuk, akkor egy sejt-kultúra sugárérzékenységét a sejtek osztódási képességének változásával is jellemezhetjük. Ezekben a kísérletekben egy sejtet akkor tekintünk túlélőnek, ha a besugárzást követően legalább 5–6 osztódási cikluson keresztülmegegy, azaz létrehoz egy legalább 50 sejtből álló kolóniát.¹

Bizonyos sejt-kultúrák esetén megfigyelhető, hogy kis dózisu besugárzás esetén a túlélő sejtek hányada a dózis növekedésével kezdetben meredekebben csökken, azaz több sejt pusztul el, mint amennyit várnánk. Ezt nevezzük kis dózis hiperszenzitivitásnak. Egy adott dózisinál (jellemzően 0,2–0,8 Gy között) a túlélési görbe elér egy lokális minimumot, amelyet követően a túlélő sejtek aránya a dózis függvényében növekedni kezd egy lokális maximumig (indukált sugárrezisztencia). A jelenség érdekes, hiszen meglepő, hogy van olyan dózistartomány, ahol a sugárdózis növekedésével nő a sejtek túlélési valószínűsége.

Az utóbbi években azt vizsgáltuk, hogy az ionizáló sugárzás milyen módon okoz mutációkat, illetve az élő rendszerek milyen szövetszintű válaszokkal

tudják ezt a mutagén hatást csökkenteni.² Megmutattuk, hogy miközben az ionizáló sugárzás mutagén voltát szinte kizárólag a pontatlanul javított DNS-sérülések kialakulásával magyarázzák, a belélegzett radonleányelemek esetén ennél jelentősebb tényező, hogy a sugárzás által elpusztított sejtek pótlása többletosztódásokkal jár, amely a mutációk számának növekedéséhez vezet.³ Az ionizáló sugárzás tehát kétféleképpen okoz mutációkat: egyfelől növeli a DNS-sérülések számát, másfelől a sejtpusztító hatás révén többletosztódásokat vált ki a szövetben.

Ha az élő rendszer arra törekszik, hogy minimalizálja a mutációk számát, akkor az ionizáló sugárzás e két hatását egyszerre kell kezelnie. A két hatás kezelése azonban egymással ellentétes lépéseket követelhet. A DNS-sérülések miatt kialakuló mutációk számát azzal lehet csökkenteni, hogy elpusztulnak azok a sejtek, amelyekben sok mutagén sérülés van (apoptózis). A többletosztódások miatt kialakuló mutációk számát viszont éppen azzal lehet csökkenteni, ha minél több sejt életben marad, ehhez viszont a DNS-sérülések javításának intenzitását kell növelni. Ez alapján lehetséges, hogy a mutációk számának minimalizálásához különböző dózistartományokban (azaz különböző átlagos sérülésszámoknál) különböző stratégia tartozik.^{4,5}

A fentiek vizsgálatára elkészítettünk egy matematikai modellt, amelyben minden sejt információt továbbít a környezetében lévő sejtek felé arról, hogy hány mutagén DNS-sérülés keletkezett bennük. A sejtek akkor pusztulnak el, ha mutagén sérüléseik száma nagyobb mértékben haladja meg a környezeti átlagot, mint amennyi mutációval egy sejtosztódás jár. Ennek a folyamatnak az eredményeként a teljes sejtpopulációban a mutagén sérülések száma csökken.⁶

A matematikai modell teszteléséhez rendkívül fontos, hogy annak jóslatait kísérleti adatokkal vethessük össze. Az összehasonlítás annál értékesebb, minél több és minél jobb minőségű kísérleti adat áll rendelkezésre. Természetesen ezek az adatok más modellek validálására is alkalmazhatóak. Mivel nincsen olyan átfogó adatbázis, ahol a korábbi mérések adatai könnyen elérhetőek lennének, ezért a kutatók

jellemzően a saját kísérleti adataikat használják. Ugyanakkor a nyers adatok közzététele nem jellemző a tudományterületen.^{7,8}

A munka során létrehoztunk egy adatbázist, amely olyan túlélési görbék adatait tartalmazza, amelyekben megfigyelhető a kis dózis hiperszenzitivitás jelensége. Ezeket az adatokat kiegészítik a kísérlet jellemzőit leíró adatok, mint például a sejtvonala típusa, a sugárzás fajtája vagy a dózisteljesítmény, illetve a szerzők által illesztett modellek paraméterei és ezek bizonytalanságai is. Az adatbázis elkészítésénél és közzétételénél a FAIR elvekhez igazodtunk, amelyek szakterületünkön való megvalósulása kapcsán már két közleményünk is született.^{7,8} A létrehozott adatbázis összesen 101 túlélési görbe adatait (dózis, túlélési hányad, illetve ezek bizonytalansága) tartalmazza, melyhez 46 cikk adatait dolgoztuk fel.

Az adatgyűjtés módszere

A munkánk első lépése a megfelelő publikációk kiválasztása volt. Elsőként a Google Scholar felületét használtuk, a keresési címszavak a „low-dose hyper-radiosensitivity”, „low-dose hrs”, és „induced radiore-sistance” voltak, ezen kívül az így talált cikkek referenciáit is vizsgáltuk. A cikkeknek tartalmaznia kellett legalább egy hiper-radioszenzitivitást mutató ábrát. A munkánk során angol nyelven elérhető publikációkat dolgoztunk fel. Összesen 46 tudományos cikk került feldolgozásra az 1993 és 2021 közötti időszakból. Az utolsó keresést 2021. augusztus 2-án végeztük el.

A következő lépés a megfelelő ábrák kiválasztása és az adatok leolvasása volt. Ha ugyanazon az ábrán több adatsor is szerepelt, akkor fontos kiválasztási szempont volt, hogy ezek jól elkülöníthetők legyenek. Emellett csak olyan ábrát elemeztünk, amelyen jól leolvashatóak voltak:

- a tengelyek és a tengelyek beosztásai,
- a feliratok,
- az adatpontok és az adatpontokhoz tartozó bizonytalanságok.

Az adatok leolvasása kézzel történt a WebPlotDigitizer 4.2 (GNU Affero General Public License v3.0) és az OriginPro 2018 (Origin-Lab Corporation) programok felhasználásával. A leolvasás során az első lépés az x, illetve az y tengely meghatározása volt, majd a skála definiálása (lineáris vagy logaritmikus), majd két-két pont segítségével az egység hossz megadása. Ezek után az adatpontok összegyűjtése egyesével történt meg. Egy adatponthoz az elnyelt dózis nagyságát (Gray-ben megadva), a túlélési hányadot és a túlélési hányadhoz tartozó bizonytalanság nagyságát (alsó és felső érték) jegyeztük fel. A bizonytalanság közlése a különböző közleményekben nem egységes, így ezt kifejezhetjük a standard hibával, vagy a 90 vagy 95%-os konfidencia intervallummal is. Összesen 101 adatsort olvastunk le.

Az adatbázisban minden adatsornál az első oszlopban tüntettük fel, hogy melyik publikációból származik, rögzítve a címet, a szerzőket és a publikációhoz tartozó digitális objektumazonosítót (Digital Object Identifier, DOI), illetve azt is, hogy pontosan melyik ábráról történt a leolvasás.

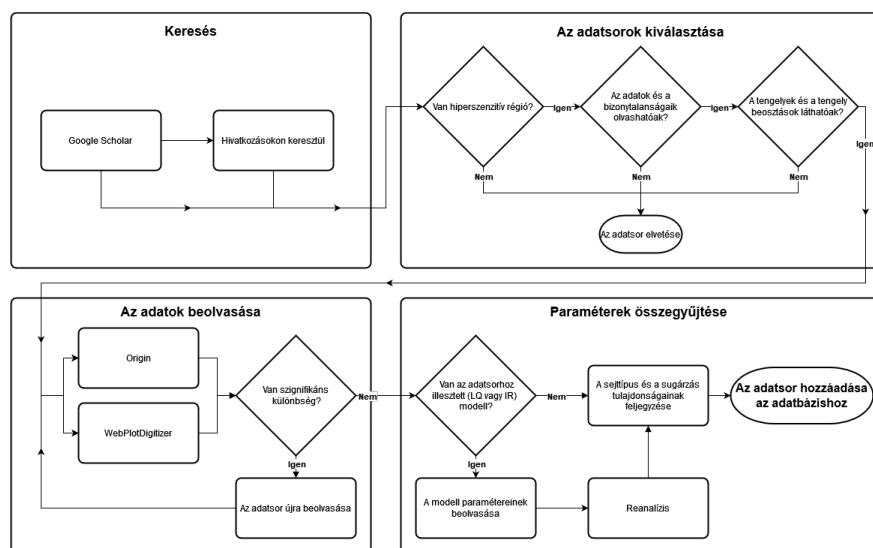
A feldolgozott cikkekben a sejtkultúrák túlélésének számolási módszerre nem volt azonos (történhetett számítógépes programok segítségével vagy azok nélkül), de egységesen azokat a sejteket tekintették túlélőnek, ahol a létrejött kolónia legalább 50 sejtből állt a vizsgálat idején. Három publikációban ugyan nem említették meg ezt, de a szerzők más közleményei alapján feltételezhetjük, hogy ugyanezt a meghatározást alkalmazták. A 'plating efficiency', azaz, hogy a nem besugárzott sejtek hány százaléka hoz létre legalább 50 sejtből álló kolóniát, általában nem volt megadva, de azt közölték, hogy a túlélési hányadot mindig a kontrollcsoport átlagos 'plating efficiency' értékére vonatkoztatva számolták ki.

A leolvasás pontosságát úgy ellenőriztük, hogy minden adatpontot kétszer, különböző programokat (WebPlotDigitizer 4.2 és az OriginPro 2018) alkalmazva olvastunk le. Amennyiben bármelyik adatpont túlélési hányad értékei esetén eltérést tapasztaltunk, azaz a leolvasott adatpontok között nagyobb eltérés volt mint 0,01, akkor egy újbóli,

harmadik leolvasást is elvégeztünk annak megállapítására, hogy hol követtük el a hibát. Az elnyelt dózisok esetén az eljárás hasonló volt, azzal a feltétellel kiegészítve, hogy az értékek 0,05 Gy egész számú többszöröse legyenek, mivel a gyakorlatban ilyen értékeken szokták a méréseket elvégezni.

A sejttypust, a sugárzás fajtáját és tulajdonságait is feljegyeztük. Ezen kívül, ha az eredeti cikkben a szerzők függvényt illesztettek az adatokra az LQ (linear-quadratic, magyarul lineáris-kvadratikus) vagy az IR (induced repair, magyarul indukált javítás) modell alapján, akkor a modell paramétereinek értékeit és ezek bizonytalanságait (szórás vagy 95%-os konfidencia intervallum) szintén feljegyeztük. Összesen 24 adatsornál adtak meg LQ paramétereket (két paraméter) és 59 adatsornál IR paramétereket (négy paraméter).

Az adatgyűjtés menetét az 1. ábrán foglaltuk össze.



1. ábra: Az adatgyűjtés menetének folyamatábrája

Az adatokat Excel táblázatban rögzítettük (Microsoft Excel 2016, Microsoft Corporation). A publikációk időrendi sorrendben helyezkednek el

egymás alatt: a legkorábban publikált cikk található legfelül és lefelé haladva található az újabb közlemények. Minden adatsornál feltüntettünk minden információt akkor is, ha ugyanabból a publikációból több leolvasás is történt, mivel így mindegyik egymástól függetlenül értelmezhető. Az első oszlopban található az adott adatsorhoz tartozó publikáció címe, szerzői, a DOI és a leolvasott ábra sorszáma. Ezt követi maga az adatsor (a túlélési hányad és a hozzá tartozó elnyelt dózis értékek), majd a következő oszlopokban az LQ, illetve IR paraméterek értékei ('X' karakterrel jelölve, ha az adott adatsorhoz nem adták meg az adott paramétert, illetve '-' jellel jelezve, ha az adott illesztésnél a paraméter nem értelmezhető). A két modell paraméterei egymás alatt helyezkednek el. Minden adatsor esetén a modellparaméterek utáni oszlopokban, jobboldalt található a vizsgált sejt kultúra típusa és mellette a besugárzás jellemzői.

Az LQ és IR paramétereket mi is meghatároztuk a nyers adatokra való illesztéssel, hogy teszteljük azok helyességét. Az illesztéshez az OriginPro 2018 (OriginLab Corporation) programot használtuk kiindulásként a Levenberg – Marquardt algoritmus alkalmazásával. Abban az esetben tekintettük az illesztésünket különbözőnek az eredetileg megadott értékektől, ha legalább egy paraméter esetén a két illesztés különbsége nagyobb volt, mint a bizonytalanságok összege.

Mivel az LQ modell nem veszi figyelembe a kis dózis hiperszenzitivitási régiót, ezért ebben az esetben a modellt csak a nagy dózistartományban található adatpontokra illesztettük, azaz olyan adatokra, ahol az elnyelt dózis értéke meghaladta az 1 Gy-t, de minden esetben legalább három adatpontra. Ha ez nem adott megfelelő eredményt, akkor az egész adatsorra illesztettük a függvényt. Az LQ modellnek két paramétere van: α és β , amelyekkel a függvény a következő alakot ölti:

$$SF = e^{-\alpha D - \beta D^2}$$

Ahol SF jelöli a túlélési hányadot. Az IR modell esetén ez az összefüggés az alábbiak szerint módosul:

$$SF = e^{-\alpha_r \left(1 + \left(\frac{\alpha_s}{\alpha_r} - 1 \right) e^{-\frac{D}{D_c}} \right) D - \beta D^2}$$

Ez azt jelenti, hogy az IR modell esetén egy négyparaméteres illesztést kell elvégezni, ami azt eredményezi, hogy nagyon erősen függ a paraméterek kezdeti értékeitől, hogy konvergál-e, illetve hová konvergál a függvény. Ezért annak érdekében, hogy megtaláljuk azt az illesztési módszert, ami visszaadja a cikkekben megadott értékeket, az alábbi protokollt használtuk. Minden esetben, ha az illesztett értékek közül legalább egyben szignifikáns különbség volt, akkor megpróbálkoztunk a következő lépéssel:

- 1) Az α_r és β paraméterek kezdeti értékeit az LQ modell illesztésből számoltuk ki (mivel ez a két paraméter megfelel az ott található α -nak és β -nak). Az α_s és D_c paraméterek kezdeti értékeit pedig 1 Gy^{-1} -nek és 1 Gy -nek hagytuk. Ezekkel a kezdeti értékekkel illesztettük a fenti függvényt, figyelembe véve a nyers adatok bizonytalanságát.
- 2) A kezdeti értékeket mind a négy paraméter esetén a cikkben megadottra állítottuk és így illesztettünk, figyelembe véve a nyers adatok bizonytalanságát.
- 3) A kezdeti értékeket az 1) lépésnek megfelelően választottuk meg, de az illesztést az adatok bizonytalanságának figyelembevétele nélkül végeztük el.
- 4) A kezdeti értékeket a 2) lépésnek megfelelően választottuk meg, de az illesztést az adatok bizonytalanságának figyelembevétele nélkül végeztük el.
- 5) A kezdeti értékeket a 2) lépésnek megfelelően választottuk meg, de a függvények logaritmusát illesztettük úgy, hogy az adatpontok esetén is a túlélési hányadok logaritmusával számoltunk a bizonytalanságok figyelembevétele nélkül.

- 6) A Levenberg – Marquardt algoritmus helyett az Orthogonális Távolságregressziós módszerrel illesztettük az előző öt lépésnek megfelelően, mindet végigpróbálva.
- 7) Végül az előző lépéseket követve egy paraméter rögzítésével próbáltunk illeszteni. Ennek a lépésnek az indoka, hogy három változóra könnyebben találja meg az optimumot a program, mivel kevesebb paramétert kell egyidejűleg illeszteni.
 - a) Ha a β paraméter negatív volt az LQ modell alapján, akkor ezt rögzítettük 0-ra.
 - b) Egyéb esetekben pedig az α_r paraméter értékét rögzítettük az LQ modellből kapott α értéknek megfelelően.

Az 59 esetből, ahol az IR illesztés adott volt, összesen három olyan adatsort találtunk, ahol az általunk végzett protokoll után legalább egy paraméter értéke szignifikánsan eltért a cikkben megadottétól. Valószínűsíthető, hogy ennek oka elírás lehetett az eredeti cikkben; az egyik esetben egy negatív előjel elhagyása.

Az adatok közzétételének módja

A létrejött adatbázist a STORE^{DB} (https://www.storedb.org/store_v3/) angol nyelvű repozitóriumban helyeztük el, ahol nyilvánosan elérhető. A repozitórium digitális objektumazonosítót rendel a projekthez, és az ahhoz tartozó adatsorokhoz is. A projekt a <https://doi.org/10.20348/STOREDB/1163> linken keresztül, az adatsorok pedig a <https://doi.org/10.20348/STOREDB/1163/1252> linken keresztül érhetőek el. Az adatbázis leírása a Scientific Data című folyóiratban jelent meg.⁹

A STORE^{DB} repozitóriumban való elhelyezés révén az adatok megfelelnek a FAIR elveknek. Az egyedi azonosítón keresztül megtalálhatóak (findable) és hozzáférhetőek (accessible). Mivel az adatmennyiség nem nagyon nagy, a feldolgozhatóságot (átjárhatóságot, interoperable) a táblázatos forma biztosítja. Az adatok újrafelhasználhatóak (reusable) a CC-Attribution ShareAlike licenc szerint.

Összefoglalás

Az adatbázis létrehozásának célja a hiper-radioszenzitivitást mutató különböző sejttenyészeteket és sugárzásokat felhasználó publikált tudományos munkák kísérleti eredményeinek összegyűjtése volt.

Összesen 46 közleményből 101 kísérlet eredményét dolgoztuk fel és gyűjtöttük össze. Az adatbázis magja a publikációkból kinyert kísérletek eredményei: a vizsgált dózis nagysága a hozzá tartozó sejttúlélési aránnyal és ennek bizonytalanságával, feltüntetve a vizsgált sejtkulturát és a besugárzási paramétereket. Amennyiben a szerzők készítették függvényillesztést az eredményeikre, akkor a függvény paramétereit és azok hibáit szintén rögzítettük. Az adatbázis tartalmazza továbbá a feldolgozott cikkek címét, szerzőit, a DOI-t, illetve a leolvasáshoz használt ábra sorszámát.

Az adatbázisban összegyűjtött adatsorok, reményeink szerint, a kis dózis hiperszenzitivitás témakörében jól használhatók lesznek modellek validálására, illetve a sokféle sejt-kultúra, és a különböző besugárzások miatt rendkívül sokszínű kísérletek eredményeként jó összehasonlítási alapok lehetnek az újabb kísérleti eredmények értelmezése esetén.

A létrejött adatbázist a STORE^{DB} (https://www.storedb.org/store_v3/) angol nyelvű repozitóriumban helyeztük el.

Köszönetnyilvánítás

A kutatást támogatta a Hungarian Research Data Alliance és a Magyar Tudományos Akadémia Könyvtár és Információs Központja (21-61), az Euratom 2019–2020. évi kutatási és képzési programja (900009, RadoNorm), a Magyar Tudományos Akadémia Bolyai János Kutatási Ösztöndíja (MBG, bo-37-2021) és az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-21-5 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programja a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból (MBG, ÚNKP-21-5-BME-387).

Felhasznált irodalom

- 1 Franken, N. A. P., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J. & van Bree, C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat. Protoc.* **1**, 2315–2319 (2006), <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>.
- 2 Madas, B. G. Radon induced hyperplasia: effective adaptation reducing the local doses in the bronchial epithelium. *J. Radiol. Prot.* **36**, 653–666 (2016), <https://doi.org/10.1088/0952-4746/36/3/653>.
- 3 Madas, B. G. & Balásházy, I. Mutation induction by inhaled radon progeny modeled at the tissue level. *Radiat. Environ. Biophys.* **50**, 553–570 (2011), <https://doi.org/10.1007/s00411-011-0382-9>.
- 4 Madas, B. G., Hanusovszky, L. & Drozsdik, E. Kis dózis, nagy érzékenység: a sugárvédelmi szabályozás alapfeltevése és a sejtek hiperszenzitivitása. *Magy. Tud.* **177**, 62–67 (2016).
- 5 Madas, B. G. & Drozsdik, E. J. Computational modelling of low dose hyper-radiosensitivity applying the principle of minimizing mutation rate. *Radiat. Prot. Dosimetry* **183**, 147–150 (2019), <https://doi.org/10.1093/rpd/ncy227>.
- 6 Polgár, Sz. Comparison of mathematical models of low-dose hyper-radiosensitivity and induced radioresistance based on experimental data. (Eötvös Loránd Tudományegyetem, 2019).
- 7 Madas, B. *et al.* FAIRing the radiation science commons. *BIOWeb Conf.* **14**, 08002 (2019), <https://doi.org/10.1051/bioconf/20191408002>.
- 8 Madas, B. G. & Schofield, P. N. Survey on data management in radiation protection research. *Radiat. Prot. Dosimetry* **183**, 233–236 (2019), <https://doi.org/10.1093/rpd/ncy250>.
- 9 Polgár, Sz., Schofield, P. N. & Madas, B. G. Datasets of *in vitro* clonogenic assays showing low dose hyper-radiosensitivity and induced radioresistance. *Sci. Data* **9**, 555 (2022), <https://doi.org/10.1038/s41597-022-01653-3>.