



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΚΗΣ

ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΙΟΝΤΙΖΟΥΣΑΣ
ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ
ΧΡΥΣΟΥ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μπαλανίκας Ευάγγελος

Επιβλέπων: Γεωργακίλας Αλέξανδρος

Αν. Καθηγητής Ε.Μ.Π

Αθήνα

2017

Περιεχομενα

Abstract	4
Περίληψη	5
Πίνακας Συνοτομογραφιών.....	6
Εισαγωγή.....	7
Βασικές έννοιες	10
Γραμμική Μεταβίβαση Ενέργειας (Linear Energy Transfer - LET)	10
Σκέδαση.....	10
Εκπομπή ακτινοβολίας – πέδηση.	10
Απορροφούμενη Δόση.....	11
Μορφές ακτινοβολιών	11
Εισαγωγή.....	11
Ιονίζουσα ακτινοβολία	12
Είδη ιοντιζουσών ακτινοβολιών	12
Νετρόνια.....	12
Αλληλεπίδραση νετρονίων.....	13
Ελαστική σκέδαση.....	13
Μη ελαστική σκέδαση.....	14
Σύλληψη νετρονίων	14
Φορτισμένα σωματίδια (άλφα και βήτα)	15
Εισαγωγή	15
Σωματία βήτα.....	16
Φωτόνια	17
Ακτίνες Χ και γ	17
Μηχανισμοί αλληλεπίδρασης φωτονίων Χ και γ με την ύλη	18
Σκέδαση Rayleigh	18
Σκέδαση Compton.....	19
Φωτοηλεκτρικό φαινόμενο.....	19
Δίδυμη γένεση.....	21
Αρχές ως προς την βιολογία του κυττάρου	21
Κύτταρο	21
DNA	22
Χρωματίνη	24
Χρωμοσώματα.....	24
Κυτταρικός κύκλος	25
Βιολογικά αποτελέσματα στο κύτταρο.....	25

Νανοσωματίδια και νανοτεχνολογια.....	27
Εισαγωγή.....	27
Ιστορική αναδρομή	28
Ιδιότητες.....	29
Οπτικές και ηλεκτρονικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων χρυσού.....	29
Νανοσωματίδια χρυσού στη βιολογική ύλη.....	30
Βιοσυμβατότητα και τοξικότητα.....	30
GNPs στην ακτινοθεραπεία (IR).....	31
Ιστορική αναδρομή	31
GNPs and radiosensitization mechanisms	32
Φυσικοί μηχανισμοί.....	33
Χημικοί μηχανισμοί.....	34
Βιολογικοί μηχανισμοί.....	36
Πειραματικό μέρος (Μέθοδοι και Υλικά)	38
Εισαγωγή.....	38
Κυτταρική καλλιέργεια και ανακαλλιέργια.....	38
Υλικά.....	38
Καρκινική σειρά κυττάρων PC3.....	38
Μέθοδος.....	39
Ανακαλλιέργια.....	39
Ακτινοβόληση κυττάρων.....	40
Πηγή γ-ακτινοβόλησης.....	40
(ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ).....	40
Πειραματική διαδικασία ακτινοβόλησης	41
Επεξεργασία μετά την ακτινοβόληση (Fixation).....	41
Σπάσιμο μεμβρανών και απελευθέρωση χρωμοσωμάτων	42
Στρώσιμο σε αντικειμενοφόρους (slides) και Μελέτη.....	43
Χρώση.....	43
Διαδικασία χορήγησης χρωστικής Trypan Blue και έλεγχος κυτταρικού θανάτου.....	43
Εισαγωγή.....	43
Μέθοδος.....	43
Μεσοπορώδεις δομές νανοσωματιδίων χρυσού	44
Gnp+MTA	44
Μελέτη επίδρασης ακτινοβολίας σε διάφορες δόσεις	46
Σκοπός.....	46
Αποτελέσματα μετρήσεων.....	47

Εκτίμηση ιδανικής συγκέντρωσης δομών νανοσωματιδίων χρυσού.....	51
Σκοπός.....	51
Διάλυμα stock και εισαγωγή των νανοσωματιδίων χρυσού στα κύτταρα.....	51
Εισαγωγή δομών νανοσωματιδίων στα κύτταρα	52
Αποτελέσματα.....	52
Μελέτη κυτταρικού θανάτου με τη χρήση trypan blue.....	54
Σκοπός.....	54
Αποτελέσματα.....	54
Ακτινοβολήση κυττάρων με νανοσωματίδια.....	58
Σκοπός.....	58
Αποτελέσματα μετρήσεων.....	58
Συμπεράσματα.....	66
Πίνακες.....	69
Πίνακας 2.....	69
Πίνακας 3.....	71
Πίνακας 4.....	74
Βιβλιογραφία	77

Abstract

Radiation therapy-based cancer treatment is the major modality of cancer treatment but there are various cases of serious side effects i.e. radiation toxicity in patients. As a necessity, strategies towards targeted cancer therapy have lately gained a considerable interest. In combination with ionizing radiation (IR) gold nanoparticles (GNPs), have shown to improve the effect of radiation treatment significantly in vitro and limited in vivo studies with animals. GNPs, as high-atomic number (Z) particles, possess the ability to absorb ionizing radiation and enhance the deposited dose within the targeted tumors (dose enhancement effect). In addition, they can be chemically modified to selectively target tumors, which render them suitable for future cancer treatments. In this study, this hypothesis of using GNPs as radiosensitizers has been examined.

Materials and Methods:

This study included human cancer prostate PC-3 cells irradiated with four different doses of γ -rays between 0.25 and 1 Gy with and without gold nanoparticles (GNPs). The PC-3 cells were cultured and prepared after radiation, using the standard protocols for cell culturing and G2-assay, for chromosomal break measurement by Ikaros karyotyping software. The GNPs that were used, were administered to the cells through the medium and left for uptake. After 24h, the samples were washed out with PBS buffer and irradiated in a Cobalt-60 (^{60}Co) γ -ray source in NCSR Demokritos facilities. The cellular death was also examined, following the Sigma Aldrich trypan blue standard protocol.

Results:

Experiments showed an increase in the chromosomal breaks from 14 to 20 percent, for the doses between 0.25 and 1Gy for the GNP-samples. The cellular death was also increased about 15 percent. The toxicity of GNPs was also tested with trypan blue by the use of non-irradiated cells with and without GNPs. It was demonstrated, that the ratio of dead to total cell number was the same for both types samples.

Conclusions:

Gold nanoparticles were proved to be a good alliance towards an optimized cancer cell treatment. Not only radiosensitivity but also the cell killing effect was increased, after the combination of GNP and IR. This demonstrates that by further research, gold nanoparticles can improve the efficiency of radiation, thus allowing lower doses to be given to patients by producing the same effect, thereby reducing adverse effects.

Περίληψη

Ο καρκίνος και οι παρενέργειες των θεραπειών του καρκίνου έχουν σοβαρές επιπτώσεις στη δημόσια υγεία στις μέρες μας. Ως αποτέλεσμα, στρατηγικές για τη στοχευμένη θεραπεία του καρκίνου έχουν αποκτήσει πρόσφατα σημαντικό ενδιαφέρον. Σε συνδυασμό με νανοσωματίδια χρυσού (Gold nanoparticles, GNPs) και της ιονίζουσας ακτινοβολίας (Ionizing Radiation, IR), έχει αποδειχθεί ότι βελτιώνεται σημαντικά η επίδραση ακτινοβολίας στην ακτινοθεραπεία (φαινόμενο ενίσχυσης δόσης). Τα GNP, ως σωματίδια με υψηλό Z, έχουν την ικανότητα να απορροφούν την ιονίζουσα ακτινοβολία και να ενισχύουν την εναποτιθέμενη δόση εντός των στοχευόμενων όγκων. Επιπλέον, μπορούν να τροποποιηθούν χημικά για να στοχεύσουν επιλεκτικά τους όγκους, γεγονός που τα καθιστά κατάλληλα για μελλοντικές θεραπείες κατά του καρκίνου. Στην παρούσα μελέτη, θα εξεταστεί αυτή η υπόθεση.

Υλικά και μέθοδοι:

Η μελέτη αυτή περιλαμβάνει καρκινικά κύτταρα προστάτη PC-3 ακτινοβολημένα σε τέσσερις διαφορετικές δόσεις γ-ακτινοβολίας μεταξύ 0,25 και 1 Gy με και χωρίς νανοσωματίδια χρυσού (GNP). Τα κύτταρα PC-3 καλλιεργήθηκαν και παρασκευάστηκαν μετά την ακτινοβολία, χρησιμοποιώντας τα πρότυπα πρωτόκολλα για καλλιέργεια κυττάρων και μεθόδου G2 assay, για την παρατήρηση χρωμοσωμικών θραυσμάτων με τη βοήθεια του λογισμικού καρυότυπων Ikaros. Τα GNP που χρησιμοποιήθηκαν, χορηγήθηκαν στα κύτταρα μέσω του θεραπευτικού υλικού και αφέθηκαν για πρόσληψη. Μετά από 24 ώρες τα δείγματα εκπλύθηκαν με PBS και ακτινοβολήθηκαν σε πηγή γ-ακτινοβολίας Κοβάλτιο-60 (^{60}Co) στις εγκαταστάσεις του ΕΚΕΦΕ 'Δημόκριτος'. Ο κυτταρικός θάνατος εξετάστηκε επίσης, ακολουθώντας το πρωτόκολλο της Sigma Aldrich για τη χρήση του δείκτη trypan blue.

Αποτελέσματα:

Τα πειράματα έδειξαν αύξηση των χρωμοσωμικών θραυσμάτων μεταξύ 14 και 20 τοις εκατό, για τις δόσεις μεταξύ 0,25 και 1 Gy. Ο κυτταρικός θάνατος αυξήθηκε επίσης γύρω στο 15%. Η τοξικότητα των GNPs εξετάστηκε επίσης με το trypan blue, χρησιμοποιώντας μη ακτινοβολημένα κύτταρα με και χωρίς GNPs. Αποδείχθηκε ότι η αναλογία νεκρών προς το συνολικό αριθμό κυττάρων ήταν περίπου η ίδια και για τα δύο δείγματα.

Συμπεράσματα:

Τα νανοσωματίδια χρυσού αποδείχθηκαν καλοί σύμμαχοι κατά των καρκινικών κυττάρων. Όχι μόνο η ραδιοευαισθησία, αλλά και το φαινόμενο θανάτωσης κυττάρων, αυξήθηκαν μετά τον συνδυασμό των GNP και της IR. Αυτό αποδεικνύει ότι με περαιτέρω έρευνα τα νανοσωματίδια χρυσού, μπορούν να βελτιώσουν την αποτελεσματικότητα της ακτινοβολίας, επιτρέποντας έτσι, τη χορήγηση χαμηλότερων δόσεων στους ασθενείς παράγοντας το ίδιο αποτέλεσμα, με αποτέλεσμα τη μείωση δυσμενών επιπτώσεων.

Πίνακας Συντομογραφιών

Συντομογραφίες		
Συντομογραφίες	Διεθνής Ορολογία	Ελληνική Ορολογία
GNPs	Gold Nanoparticles	Νανოსωματίδια Χρυσού
IR	Ionizing Radiation	Ιονίζουσα Ακτινοβολία
Z	Atomic Number	Ατομικός Αριθμός
SABR	Stereotactic Ablative Radiotherapy	Ραδιοθεραπεία Στερεοστατικής Αφαίρεσης
ROS	Reactive Oxygen Species	Δραστικές Μορφές Οξυγόνου
PTT	Photothermal Therapy	Φωτοθερμική Θεραπεία
NPs	Nanoparticles	Νανოსωματίδια
NIR	Non-Ionizing Radiation	μη Ιονίζουσα Ακτινοβολία
LET	Linear Energy Transfer	Γραμμική Μεταβίβαση Ενέργειας
D	absorbed Dose	απορροφημένη Δόση
DNA	Deoxyribonucleic Acid	Δε(σ)οξυριβονουκλεϊκό Οξύ
SSB	Single Strand Breaks	Μονόκλωνες Θραύσεις Αλυσίδας DNA
DSB	Double Strand Breaks	Διπλόκλωνες Θραύσεις Αλυσίδας DNA
Z/E	Atomic Number/ Energy	Ατομικός Αριθμός/Ενέργεια
Au	Gold	Χρυσός
LEE	Low Energy Electrons	Ηλεκτρονικά Χαμηλής Ενέργειας
PC-3	Prostate Cancer cell line	Κυτταρική Σειρά Καρκίνου του Προστάτη
LNCaP	Prostate Cancer cell line	Κυτταρική Σειρά Καρκίνου του Προστάτη
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium	Θρεπτικό Υλικό
FBS	Serum	Ορός
P.S	Penicillin Streptomycin	Ορός με Αντιβιοτικά Πενικιλίνης-Στρεπτομυκίνης
PBS	Phosphate Buffer Solution	Ρυθμιστικό Διάλυμα
Control	untreated Cells	Κύτταρα Ελέγχου
MTA	Mesoporous titanium coating material	Μεσοπορώδες Συγκροτήμα Νανოსωματιδίων TiO ₂
Au-MTA	Gold covered with MTA	Νανοςωματίδια Χρυσού με Επικάλυψη MTA
TEM	Transmission Electron Microscopy	Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης
Gy	gray	Μονάδα Μέτρησης της Απορροφούμενης Δόσης
HMA	Electromagnetic Radiation	Ηλεκτρομαγνητική Ακτινοβολία

Εισαγωγή

Ο καρκίνος αποτελεί σήμερα μια από τις κύριες αιτίες θανάτου παγκοσμίως και ένα σημαντικό δημόσιο ζήτημα υγείας, παρά τις προόδους που έχουν σημειωθεί για την έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία του. Το 2012, εκτιμήθηκαν 14,1 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις καρκίνου σε όλο τον κόσμο, 7,4 εκατομμύρια άνδρες και 6,7 εκατομμύρια γυναίκες[1]. Τα πιο πρόσφατα στοιχεία που δημοσίευσε η Αμερικανική Εταιρεία Καρκίνου επιβεβαιώνουν περαιτέρω την επικράτησή της, με 1.685.210 νέες περιπτώσεις καρκίνου και 595.690 θανάτους από καρκίνο που αναμένονταν να εμφανιστούν μόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες το 2016[2], ενώ 23.6 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις Καρκίνου αναμένονται κάθε χρόνο μέχρι το 2030[3].

Η Ιοντίζουσα ακτινοβολία (IR), παράλληλα με τη χημειοθεραπεία, αποτελεί μια κύρια μέθοδο για τη θεραπεία του καρκίνου μετά από χειρουργική επέμβαση που εφαρμόζεται σε περισσότερο από το 50% όλων των ασθενών με καρκίνο[4]. Παρά τις προόδους που σημειώθηκαν στην απεικόνιση ακτινοβολίας με την ανάπτυξη νέων μεθόδων όπως η ραδιοθεραπεία στερεοστατικής αφαίρεσης (SABR) και η ακτινοθεραπεία με καθοδηγούμενη εικόνα (IGRT), εξακολουθεί να αποτελεί μεγάλη πρόκληση που περιορίζει τη θεραπεία [5]. Έχουν δημοσιευθεί πολλές εργασίες για τη μοντελοποίηση, τον προγραμματισμό και την απελευθέρωση θεραπείας με IR, είτε μόνη της, είτε σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία. Σε όλες τις περιπτώσεις, ωστόσο, η επαγόμενη από ακτινοβολία τοξικότητα σε γειτονικούς υγιείς ιστούς αντιπροσωπεύει τον κύριο παράγοντα που περιορίζει τη δόση[6].

Μια στρατηγική για την αντιμετώπιση του θέματος της ραδιοτοξικότητας είναι η χρήση ραδιοευαισθητοποιητών που προσδίδουν πρόσθετα και συνεργατικά πλεονεκτήματα στο αποτέλεσμα της ακτινοβολίας. Με αυτόν τον τρόπο, χαμηλότερες δόσεις ακτινοβολίας μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εξάλειψη των όγκων με την ίδια αποτελεσματικότητα ή ακόμα καλύτερα, προκαλώντας ελάχιστη βλάβη στους περιβάλλοντες φυσιολογικούς ιστούς[7]. Μέχρι σήμερα έχουν αναπτυχθεί και εκτιμηθεί πληθώρα ραδιοευαισθητοποιητών με βάση διαφορετικά χαρακτηριστικά, όπως αύξηση της δόσης, παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) και αλλοίωση διαφόρων βιολογικών αποκρίσεων στην ακτινοβολία[8].

Οι μη-ιοντίζουσες πηγές ακτινοβολίας συμπεριλαμβανομένων των μικροκυμάτων, της ραδιοσυχνότητας και του υπερήχου χρησιμοποιούνται επίσης για τη θεραπεία του καρκίνου μέσω της παραγωγής θερμότητας [9]. Η φωτοθερμική θεραπεία (PTT) ή η μικροκυματική θεραπεία μπορεί να εξοντώσουν καρκινικά κύτταρα με στοχευμένη υπερθερμία ιστού που επάγεται από εσωτερικευμένους θεραπευτικούς παράγοντες με υψηλή απόδοση φωτοθερμικής μετατροπής υπό εξωτερική ακτινοβολία λέιζερ. Η PTT πρόσφατα προσέλκυσε σημαντική προσοχή λόγω της ελεγχόμενης θεραπευτικής της διαδικασίας, της υψηλής αποτελεσματικότητας εξάλειψης του όγκου και των ελάχιστων παρενεργειών σε μη καρκινικά κύτταρα [10]. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι τα μεταλλικά νανοσωματίδια (nanoparticles, NPs) μπορούν να δράσουν τόσο ως

ραδιοευαισθητοποιητές για τη θεραπεία με IR όσο και ως παράγοντες ΡΤΤ λόγω των μοναδικών οπτικών και ηλεκτρικών τους ιδιοτήτων. Συγκεκριμένα, τα νανοσωματίδια χρυσού έχουν προσελκύσει σημαντική προσοχή λόγω του υψηλού συντελεστή απορρόφησης, των μεταλλικών ιδιοτήτων και της βιοσυμβατότητας.

Πολλαπλές ανασκοπήσεις σχετικά με τα GNP και τις εφαρμογές τους στη στοχευμένη θεραπεία του καρκίνου και την ενίσχυση της επίδρασης της ακτινοβολίας (IR και NIR) έχουν δημοσιευθεί μέχρι σήμερα [11; 12]. Με αφορμή αυτά τα άρθρα, θα μελετηθεί στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής εργασίας η *in vitro* ενίσχυση της δόσης της ακτινοβολίας με τη χρήση νανοσωματιδίων χρυσού και θα σχολιασθούν τα πειραματικά αποτελέσματα που θα προκύψουν.

Κεφάλαιο Α

Θεωρητικό μέρος : Εισαγωγή στη θεωρία και σε βασικές έννοιες που χρειάζονται για την κατανόηση και τη λειτουργία των πειραμάτων

Βασικές έννοιες

Γραμμική Μεταβίβαση Ενέργειας (Linear Energy Transfer - LET)

Η ενέργεια που εναποτίθεται από την ακτινοβολία στην ύλη, ανά μονάδα μήκους διαδρομής, καλείται γραμμική μεταβίβαση ενέργειας LET και συνήθως μετράται σε eV ανά cm ή σε keV/μm[13]. Η LET προσπίπτοντος φορτισμένου σωματιδίου είναι ανάλογη του τετραγώνου του φορτίου του, και αντιστρόφως ανάλογη της κινητικής ενέργειας του σωματιδίου. Ουσιαστικά περιγράφει την πυκνότητα εναπόθεσης ενέργειας από την ακτινοβολία στην ύλη και καθορίζει, σε σημαντικό βαθμό, τις συνέπειες που θα υποστεί το βιολογικό υλικό. Μεγάλη LET έχουν τα βαριά φορτισμένα σωματίδια π.χ. α-σωματίδια, και αυτά προξενούν περισσότερες βλάβες στους ιστούς από όσο οι ακτινοβολίες μικρής LET, όπως τα ηλεκτρόνια και τα φωτόνια.

$$LET = -\frac{dE}{dx} \quad (1)$$

Σκέδαση

Με την έννοια σκέδαση περιγράφεται η αλλαγή της πορείας σωματιδίου ή φωτονίου, ως αποτέλεσμα αλληλεπίδρασής του με την ύλη. Κατά την ελαστική σκέδαση η αρχική κινητική ενέργεια όλων των εμπλεκόμενων σωματιδίων διατηρείται αμετάβλητη. Κατά την ανελαστική σκέδαση η κινητική ενέργεια όλων των σωματιδίων μετά την σύγκρουση είναι μικρότερη της αρχικής. Ενέργεια μπορεί να 'χαθεί' όπως για παράδειγμα για να παραχθεί ένα ζεύγος ιόντων. Όμως ακόμη και σε περιπτώσεις ιοντισμού, η σύγκρουση μπορεί να θεωρηθεί ελαστική, αν η ενέργεια σύνδεσης του ηλεκτρονίου που εγκαταλείπει το άτομο είναι πολύ μικρότερη της κινητικής ενέργειας του προσπίπτοντος σωματιδίου.

Εκπομπή ακτινοβολίας – πέδηση.

Προσπίπτοντα ηλεκτρόνια μπορούν να αλληλοεπιδράσουν ανελαστικά με (θετικούς) πυρήνες ατόμων. Η απώλεια της κινητικής τους ενέργειας εκπέμπεται ως Ιοντίζουσα ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία ακτίνων Χ. Η ακτινοβολία που εκπέμπεται από την επιβράδυνση των ηλεκτρονίων καλείται ακτινοβολία πέδησης (bremsstrahlung) και βρίσκει εφαρμογή στις λυχνίες παραγωγής ακτίνων Χ για την ακτινοδιαγνωστική απεικόνιση[13]. Όταν η κινητική ενέργεια των προσπιπτόντων ηλεκτρονίων είναι μικρή, τα φωτόνια πέδησης εκπέμπονται, σε μεγάλο ποσοστό, με γωνία μεταξύ των 60° και 90° σε σχέση με την κατεύθυνση πρόσπτωσης. Όσο μεγαλύτερη η κινητική ενέργεια των προσπιπτόντων ηλεκτρονίων, τόσο οι παραγόμενες ακτίνες Χ τείνουν να εγκαταλείπουν την ύλη με πορεία σχεδόν ευθύγραμμη προέκτασης της προσπίπτουσας. Η πιθανότητα εκπομπής ακτινοβολίας πέδησης ανά άτομο είναι ανάλογη του Z² του υλικού στο οποίο προσπίπτουν τα ηλεκτρόνια. Αν προσπέσουν στην ύλη βαρύτερα σωματίδια, η ενέργεια που θα εκπεμφθεί με τη μορφή ακτινοβολίας πέδησης είναι αντιστρόφως ανάλογη του τετραγώνου της μάζας των σωματιδίων.

Απορροφούμενη Δόση

Το φυσικό μέγεθος απορροφούμενη δόση D (absorbed dose) ορίζεται ως η ενέργεια E που εναποτίθεται από την Ιοντίζουσα ακτινοβολία στη μονάδα μάζας του υλικού m . Μονάδα μέτρησης της απορροφούμενης δόσης στο διεθνές σύστημα μονάδων είναι το gray (Gy) [13]. Ένα Gy ισούται με 1 J/kg . Μονάδα μέτρησης της απορροφούμενης δόσης κάποτε ήταν το rad (radiation absorbed dose). Ένα rad ισούται με $0,01 \text{ J/kg}$, δηλαδή $1 \text{ Gy} = 100 \text{ rads}$. $1 \text{ Gray} = 1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg} = 100 \text{ rad}$. Η απορροφούμενη δόση ενδιαφέρει, κυρίως, από την πλευρά των βιολογικών επιδράσεων της ακτινοβολίας.

Όταν μια έμμεσα Ιοντίζουσα ακτινοβολία (X , γ , νετρόνια) διαπερνά ένα υλικό μέσο, εναποθέτει ενέργεια στο μέσο με μια διαδικασία που αποτελείται από δύο περιπτώσεις: η ενέργεια που μεταφέρουν π.χ. τα φωτόνια, τρέπεται σε κινητική ενέργεια φορτισμένων σωματιδίων, τα φορτισμένα σωματίδια εναποθέτουν, με τη σειρά τους, την κινητική τους ενέργεια στο υλικό μέσο με ιοντισμούς και διεγέρσεις. Σε ορισμένες περιπτώσεις η ακτίνα δράσης των φορτισμένων σωματιδίων είναι αρκετά μεγάλη.

Μορφές ακτινοβολιών

Εισαγωγή

Ακτινοβολία είναι εκπομπή ενέργειας με τη μορφή κυμάτων ή σωματιδίων, η οποία μπορεί να διαδοθεί στο κενό και στην ύλη. Χωρίζεται σε δύο κυρίους τύπους, τις Ιοντίζουσες ακτινοβολίες (IR, ionizing radiation) και τις μη Ιοντίζουσες ακτινοβολίες (NIR, non-ionizing radiation).

Μη Ιοντίζουσες ακτινοβολίες (NIR) καλούμε συνήθως, την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία με μικρή σχετικά ενέργεια, όπως είναι η ορατή ακτινοβολία, η υπέρυθρη, η υπεριώδης (κατά το μεγαλύτερο μέρος), τα ραδιοκύματα, και σε σύγκριση με άλλες μορφές ακτινοβολίας (ακτίνες γάμμα ή ακτίνων X), οι NIR έχουν χαμηλότερες συχνότητες και κατά συνέπεια μεγαλύτερο μήκος κύματος[14]. Είναι ασθενέστερες και δεν είναι ικανές να προκαλέσουν ατομικό ή μοριακό ιονισμό, αλλά είναι ικανές να προκαλέσουν ηλεκτρικές, θερμικές ή χημικές επιδράσεις στα κύτταρα, άλλοτε ευεργετικές και άλλοτε επιβλαβείς για τη λειτουργία τους.

Ο ιοντισμός του ατόμου προκύπτει συνήθως με «βίαιη» απομάκρυνση ενός, ή περισσοτέρων ηλεκτρονίων, από τις ηλεκτρονιακές στιβάδες του ατόμου, με αποτέλεσμα την παραγωγή ιόντων και φωτονίων. Τα ιόντα και τα φωτόνια αυτά, οφείλονται αφενός στα ηλεκτρόνια που απομακρύνθηκαν από το άτομο και αφετέρου στην έλλειψη ηλεκτρονίων από τις κενές θέσεις που πραγματοποιήθηκαν στα άτομα που απέμειναν μετά την αλληλεπίδραση.

Για να μπορέσει να επιτευχθεί αυτό, απαιτείται ενέργεια η οποία προσδίδεται στο άτομο από κάποιο εξωτερικό αίτιο, π.χ. πρόσπτωση ακτινοβολίας ή κάποιο φορτισμένο σωματίδιο. Η ενέργεια αυτή, πρέπει προφανώς να είναι μεγαλύτερη από την ενέργεια σύνδεσης του ηλεκτρονίου στις στιβάδες του ατόμου[13]. Η τιμή

της ενέργειας σύνδεσης εξαρτάται από το ίδιο το άτομο και τη στιβάδα στην οποία είναι συνδεδεμένο το ηλεκτρόνιο.

Μεταξύ των αιτιών που μπορούν να προκαλέσουν ιοντισμό, όπως προαναφερθήκαμε, είναι και οι ακτινοβολίες υψηλής ενέργειας και αποκαλούνται Ιοντίζουσες ακτινοβολίες. Ιοντίζουσες ακτινοβολίες ονομάζουμε, λοιπόν τις ακτινοβολίες που έχουν αρκετά μεγάλη ενέργεια, ώστε να μπορούν να ιοντίσουν την ύλη. Χωρίζονται στις ηλεκτρομαγνητικές και τις σωματιδιακές και μπορούν να διεισδύουν στην ύλη. Αντίθετα με τις NIR, έχουν χαμηλότερα μήκη κύματος και υψηλότερες συχνότητες είναι πιο ισχυρές και πιο διεισδυτικές.

Ιοντίζουσα ακτινοβολία

Πιο συγκεκριμένα η Ιοντίζουσα ακτινοβολία μπορεί να μεταφέρει αρκετή ενέργεια για να απελευθερώσει ηλεκτρόνια από άτομα ή μόρια, προκαλώντας τους ιοντισμό. Αποτελείται από ενεργητικά υποατομικά σωματίδια, ιόντα ή άτομα που κινούνται με υψηλές ταχύτητες, και ηλεκτρομαγνητικά κύματα στο φάσμα των υψηλών ενεργειών. Είδη ιοντίζουσας ακτινοβολίας είναι οι ακτίνες-γ, οι ακτίνες Χ, καθώς και σωματίδια άλφα, βήτα και νετρόνια[13].

Οι κοσμικές ακτίνες και η διάσπαση των ραδιενεργών ισότοπων είναι οι κύριες πηγές φυσικής ιοντίζουσας ακτινοβολίας στη Γη, που πολλές φορές αναφέρονται και ως ακτινοβολία υποβάθρου.

Στο διάστημα, οι φυσικές εκπομπές θερμικής ακτινοβολίας από την ύλη σε εξαιρετικά υψηλές θερμοκρασίες, μπορεί να είναι Ιοντίζουσες. Η Ιοντίζουσα ακτινοβολία μπορεί να παραχθεί ακόμα και από την επιτάχυνση φορτισμένων σωματιδίων από φυσικά ηλεκτρομαγνητικά πεδία.

Μπορεί επίσης να δημιουργηθεί τεχνητά χρησιμοποιώντας σωλήνες ακτίνων Χ, επιταχυντές σωματιδίων και οποιαδήποτε από τις διάφορες μεθόδους που παράγουν τεχνητά ραδιοϊσότοπα. Εφαρμόζεται επικοινωνιακά σε ένα ευρύ φάσμα τομέων, όπως η ιατρική, η έρευνα, αλλά παρουσιάζει κίνδυνο για την υγεία, εάν δεν λαμβάνονται κατάλληλα μέτρα κατά της ανεπιθύμητης έκθεσης. Η έκθεση σε Ιοντίζουσα ακτινοβολία προκαλεί βλάβη σε ζωντανούς ιστούς, και μπορεί να οδηγήσει σε μεταλλάξεις, σε ασθένειες που οφείλονται στην ακτινοβολία, σε καρκίνο, και στο θάνατο[13].

Είδη ιοντίζουσών ακτινοβολιών

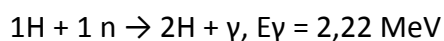
Νετρόνια

Τα ηλεκτρικά ουδέτερα σωματίδια που καλούνται νετρόνια, με μάζα περίπου ίση με τη μάζα του πρωτονίου, χρησιμοποιούνται και συναντώνται, σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών στην Ιατρική, την παραγωγή ενέργειας, τη βιομηχανία και την έρευνα. Όλο και μεγαλύτερη σημασία έχουν, τα νετρόνια που παράγονται από την αλληλεπίδραση της κοσμικής ακτινοβολίας με την ατμόσφαιρα. Τα νετρόνια αυτά αντιστοιχούν περίπου στο μισό της δόσης, που δέχεται ένας επιβάτης σε αεροσκάφος που πετά σε κανονικό ύψος.

Το ενεργειακό φάσμα των νετρονίων είναι πολύ ευρύ, με τιμές ενέργειας που καλύπτουν περισσότερο από 11 τάξεις μεγέθους. Ο κίνδυνος που σχετίζεται με την έκθεση σε ακτινοβολία νετρονίων, εξαρτάται έντονα από την ενέργειά τους. Ποικίλα δοσίμετρα και επιστημονικά όργανα χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της έκθεσης σε νετρόνια. Η απόκριση των ανιχνευτών εξαρτάται όμως, από την ενέργεια των νετρονίων[15]. Η ανησυχία σχετικά με την επαγγελματική έκθεση σε κοσμική ακτινοβολία του ιπτάμενου προσωπικού σε εμπορικά αεροπλάνα είναι ένα θέμα που προβληματίζει τη διεθνή επιστημονική κοινότητα. Τα φάσματα των νετρονίων κοσμικής προέλευσης έχουν χαρακτηριστικά παρόμοια με εκείνα που βρίσκονται σε περιβάλλον επιταχυντή υψηλής ενέργειας, με φάσματα πάνω από 20 MeV.

Νετρόνια μπορούν να αλληλεπιδρούν με πυρήνες, απελευθερώνοντας πολλές φορές φορτισμένα σωματίδια ή κομμάτια πυρήνων, τα οποία με τη σειρά τους, αν έχουν αρκετή κινητική ενέργεια, προκαλούν διεγέρσεις και ιοντισμούς της ύλης. Τα νετρόνια που αλληλεπιδρούν συνήθως με πυρήνες ατόμων μικρού ατομικού αριθμού, όπως για παράλληλα H, C, O, οι οποίοι αποκτούν αρκετή κινητική ενέργεια αρκετή, για να διεγείρουν και να ιοντίσουν γειτονικά άτομα[13; 15].

Σε βιολογικούς ιστούς, αλληλεπιδρούν πρωτίστως με το υδρογόνο του ύδατος, μιας και αυτό υπάρχει σε αφθονία λόγω του νερού στο σώμα μας, παράγοντας πρωτόνια με σημαντική κινητική ενέργεια. Η ακτινοβολία νετρονίων είναι πολύ διεισδυτική, όπως η γ-ακτινοβολία, και ιοντίζει την ύλη έμμεσα, μεταφέροντας την ενέργειά της σε συνήθως βαριά φορτισμένα σωματίδια. Τα νετρόνια μπορούν, επίσης, να συλληφθούν από πυρήνες ατόμων και να επανεκπεμφθούν ή να δημιουργήσουν διαφορετικό πυρήνα, οπότε η περίσσεια της ενέργειας θα εκπεμφθεί με τη μορφή ακτινοβολίας γ.



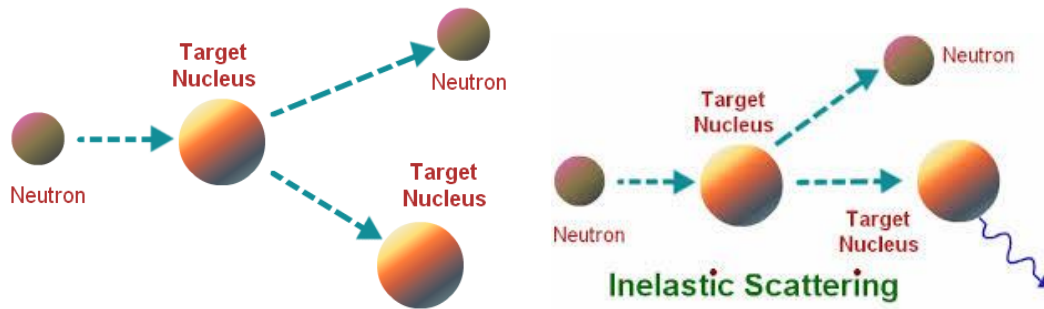
Αλληλεπίδραση νετρονίων

Όταν μια δέσμη νετρονίων εισέρχεται μέσα σε ένα υλικό, εξαιτίας της έλλειψης φορτίου, οι αλληλεπιδράσεις από τις δυνάμεις coulomb δεν ισχύουν, αλληλεπιδρούν με τα άτομα του υλικού μέσω κρούσεων, μέχρις ότου να μειωθεί η ενέργεια τους και να συλληφθούν από τους πυρήνες των ατόμων του υλικού. Επομένως, ανάλογα με την ενέργεια των νετρονίων και τη θερμοκρασία του υλικού, οι αλληλεπιδράσεις χωρίζονται ως εξής:

Ελαστική σκέδαση

Κατά την ελαστική σκέδαση (Εικ. 1) των νετρονίων, έχουμε ελαστικές συγκρούσεις μεταξύ πυρήνων και νετρονίων, τα οποία μεταφέρουν μέρος της κινητικής τους ενέργειας στους πυρήνες. Τότε μπορούν να συμβούν τα εξής γεγονότα α) πολλαπλές σκεδάσεις των νετρονίων μέχρι να χάσουν τόση ενέργεια όση χρειάζεται για να γίνει η σύλληψη τους από κάποιον από τους πυρήνες του

υλικού και β) ο πυρήνας να αποκτήσει τόση ενέργεια ώστε να αρχίσει να εκπέμπει ηλεκτρονια[13].



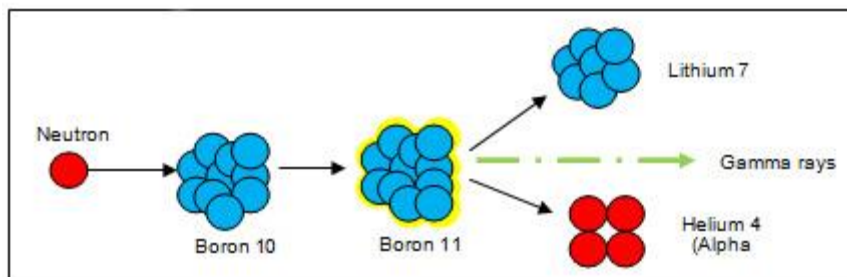
Εικ.1 Παραδείγματα ελαστικής και μη ελαστικής σκέδασης νετρονίων: στην αριστερή εικόνα βλέπουμε την ελαστική σκέδαση νετρονίων, όπου κάποιο νετρόνιο προσκρούει σε πυρήνα και σκεδάζεται ελαστικά, ενώ στη δεξιά βλέπουμε την περίπτωση μη ελαστική σκέδασης, όπου κάποιο νετρόνιο προσκρούει σε πυρήνα, σκεδάζεται και χάνει ένα ποσό της ενέργειας του, το οποίο οδηγεί σε δημιουργία φωτονίου [16].

Μη ελαστική σκέδαση

Το ποσό της κινητικής ενέργειας των νετρονίων μεταφέρεται στους πυρήνες που προσκρούουν, με αποτέλεσμα να έχουμε διέγερση του πυρήνα. Κατά την αποδιέγερση του πυρήνα έχουμε εκπομπή φωτονίων γ (Εικ. 1). Η διαδικασία αυτή συνεχίζεται μέχρι τα νετρόνια να συλληφθούν από κάποιον πυρήνα[13].

Σύλληψη νετρονίων

Κατά τη σύλληψη νετρονίων από τον πυρήνα του ατόμου του υλικού στόχου (Εικ.2) ένα επιβραδυμένο νετρόνιο, το οποίο βρίσκεται σε θερμική ισορροπία με το υλικό, προσκρούει στον πυρήνα και συλλαμβάνεται δημιουργώντας ένα νέο διεγερμένο πυρήνα. Στη συνέχεια ο πυρήνα αυτός εκπέμπει φωτόνια- γ με ενέργεια ίση με την ενέργεια σύνδεσης των νετρονίων του πυρήνα. Αν έχουμε κατά τη σύλληψη νετρονίου δημιουργία ασταθούς πυρήνα, τότε μπορεί να έχουμε επίσης και εκπομπή σωματιδίων α [13].



Εικ.2 Στην εικόνα αυτή βλέπουμε το αποτέλεσμα της σύλληψης νετρονίων και πιο συγκεκριμένα για το Βόριο 10 το οποίο συλλαμβάνει ένα νετρόνιο και δημιουργεί ασταθή πυρήνα, που με τη σειρά του διασπάται σε λίθιο 7, ένα σωματίο α και ένα φωτόνιο[17].

Φορτισμένα σωματίδια (άλφα και βήτα)

Εισαγωγή

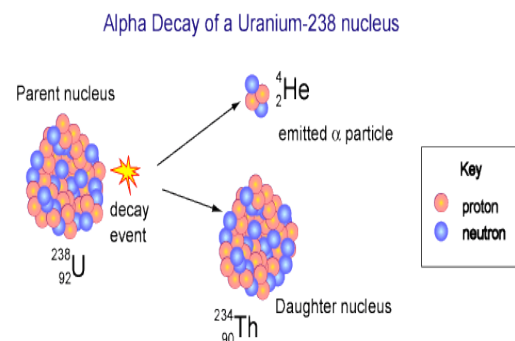
Σωματίδια που ιοντίζουν την ύλη, είναι είτε φορτισμένα όπως άλφα ${}^4_2\text{He}^{+2}$, πρωτόνια ${}^1_1\text{H}^+$, ηλεκτρόνια e^- ή β^- , ποζιτρόνια e^+ ή β^+ , είτε μη φορτισμένα, όπως τα νετρόνια n , για τα οποία αναφερθήκαμε και προηγουμένως. Η δε «συμπεριφορά» των βαρέων φορτισμένων σωματιδίων (άλφα) είναι (σε γενικές γραμμές) διαφορετική από τη «συμπεριφορά» των ελαφρά φορτισμένων σωματιδίων (ηλεκτρόνια, ποζιτρόνια). Η εναπόθεση της ενέργειας των σωματιδίων αυτών παρίσταται γραφικά από την καμπύλη Bragg[13; 14].

Όλα τα φορτισμένα σωματίδια που έχουν αρκετή κινητική ενέργεια, αλληλεπιδρούν με την ύλη μέσω ηλεκτρικών δυνάμεων Coulomb. Χάνουν όλη ή μέρος της κινητικής τους ενέργειας, προκαλούν διεγέρσεις ή ιοντισμούς της ύλης, αλληλοεπιδρώντας με τα ηλεκτρόνια των ατόμων του στόχου. Διέγερση είναι η μεταφορά μέρους της ενέργειας του προσπίπτοντος σωματιδίου σε ηλεκτρόνιο κάποιας στιβάδας του στόχου, με τέτοιο τρόπο ώστε το ηλεκτρόνιο αυτό να μεταπηδήσει σε εξωτερικότερη στιβάδα (μικρότερης ενέργειας). Κατά τη διέγερση, η ενέργεια που προσλαμβάνει το ηλεκτρόνιο του ατόμου δεν είναι μεγαλύτερη της ενέργειας σύνδεσης και γι' αυτό τον λόγο, το ηλεκτρόνιο δεν εγκαταλείπει το άτομο. Αμέσως μετά τη διέγερση, το ηλεκτρόνιο θα επιστρέψει σε εσωτερική στιβάδα εκπέμποντας την περίσσεια της ενέργειας με μορφή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας ή ηλεκτρονίου Auger. Το δεύτερο αυτό στάδιο καλείται αποδιέγερση.

Σωματίδια άλφα

Τα σωματίδια άλφα αποτελούνται από δύο πρωτόνια και δύο νετρόνια που συνδέονται μαζί σε ένα σωματίδιο και είναι παρόμοια με τον πυρήνα ηλίου. Εκπομπές σωματιδίων άλφα γενικά παράγονται κατά τη διαδικασία της άλφα διάσπασης. Εκπέμπονται από μερικά φυσικά ραδιενεργά υλικά (Εικ. 3), όπως το ουράνιο, το θόριο και το ράδιο, αλλά μπορούν επίσης να παραχθούν με άλλους τρόπους.

Σε κάθε φυσική, ή χημική, διεργασία το άθροισμα της μάζας και της ενέργειας των εμπλεκόμενων σωμάτων, πριν και μετά την εκπομπή, πρέπει να διατηρείται σταθερό (αρχή διατήρησης μάζας). Στην κλασική φυσική ο νόμος διατήρησης της μάζας είναι ξεχωριστός από το νόμο διατήρησης της ενέργειας, σε αντίθεση με την κβαντική φυσική και την σχετικότητα, όπου αυτές οι αρχές συνδέονται μέσω της σχέσης του Einstein[13; 14].



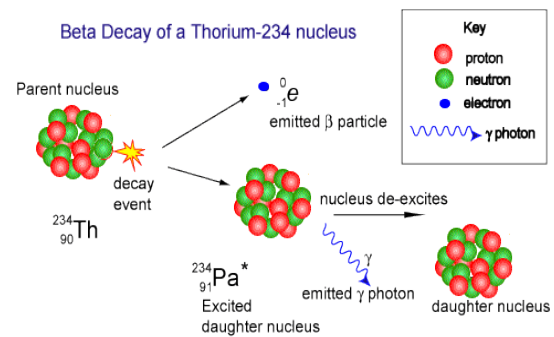
Εικ.3 Διάσπαση α πυρήνα ουρανίου ${}^{238}\text{U}$ σε πυρήνα Θορικού ${}^{234}\text{Th}$ με εκπομπή σωματίου α [18].

Οι πυρήνες ηλίου, που αποτελούν το 10-12% των κοσμικών ακτίνων, είναι συνήθως πολύ υψηλότερης ενέργειας από ότι εκείνοι που παράγονται με μεθόδους πυρηνικής διάσπασης, και είναι έτσι σε θέση να διασχίσουν το ανθρώπινο σώμα αλλά και πυκνή θωράκιση.

Το υψηλό LET, τους καθιστά χρήσιμους για την εξάλειψη επιφανειακών κακοηθών κυττάρων όπως για παράδειγμα κύτταρα λευχαιμίας ή μικρά συσσωματώματα κυττάρων. Χρησιμοποιούνται κυρίως στους επιφανειακούς όγκους γιατί, καθώς προσβάλλουν την ύλη επιβραδύνονται έντονα. Αλληλεπιδρούν με τα ισχυρά ηλεκτρομαγνητικά και βαρυτικά πεδία που περιβάλλουν τα άτομα, με αποτέλεσμα την άμεση απορρόφησή τους στα πρώτα κίολας πάχη του υλικού που συναντούν. Γι αυτό και η θωράκιση από τέτοια ακτινοβολία μπορεί να είναι μερικά εκατοστά κάποιου πάχους αέρα.

Σωματίδια βήτα

Η ακτινοβολία β είναι σωματιδιακή ακτινοβολία, η οποία εκπέμπεται από ραδιενεργούς πυρήνες ή επιταχυντές σωματιδίων. Τα σωματίδια β είναι ηλεκτρόνια ή ποζιτρόνια, με μικρή μάζα (7000 φορές περίπου ελαφρύτερη από αυτήν των σωματιδίων α) και φέρουν μικρό σχετικά ηλεκτρικό φορτίο (+1 ή -1, με τα θετικά ηλεκτρόνια να καλούνται ποζιτρόνια) [13; 19] .



Εικ.4 Διάσπαση β και εκπομπή ακτινοβολίας μέχρις ότου τη δημιουργία σταθερού πυρήνα [18].

Τα σωματίδια βήτα υψηλής ενέργειας μπορούν να παράγουν ακτίνες Χ, γνωστές ως «ακτινοβολία πέδησης» ή δευτερογενή ηλεκτρόνια, καθώς περνούν μέσω της ύλης. Και τα δύο αυτά είδη ακτινοβολίας μπορούν να προκαλέσουν έμμεση επίδραση ιοντισμού. Η ακτινοβολία πέδησης μπορεί να είναι ανησυχητική, όταν κατά την θωράκιση βήτα εκπομπών, η αλληλεπίδραση των σωματιδίων βήτα με το υλικό θωράκισης παράγει ακτινοβολία πέδησης. Αυτή η επίδραση είναι μεγαλύτερη σε υλικά υψηλών ατομικών αριθμών, οπότε για θωράκιση πηγών βήτα χρησιμοποιούνται υλικά με χαμηλούς ατομικούς αριθμούς, όπως το αλουμίνιο

Όταν λέμε πως υπάρχει ραδιενεργός μόλυνση, συχνά σημαίνει ότι υπάρχουν βήτα σωματίδια που εκπέμπονται από την επιφάνεια, τα οποία είναι ανιχνεύσιμα με έναν ανιχνευτή ακτινοβολίας. Όταν φέρεται κοντά στον βήτα εκπομπό, ο ανιχνευτής θα δείξει δραματική αύξηση σε ραδιενέργεια[13].

Τα β-σωματίδια μπορούν να αλληλεπιδρούν άμεσα σε μόρια κυττάρου ή έμμεσα σε μόρια νερού, προκαλούν ελεύθερες ρίζες από τη ραδιόλυση του νερού, με αποτέλεσμα τη θραύση των χημικών δεσμών. Η δημιουργία αυτών των ελεύθερων ριζών έχει ως αποτέλεσμα τη βλάβη του DNA στα κύτταρα, προκαλώντας θραύσεις μιας αλυσίδας (SSB) και DSB. Παραδείγματα ραδιονουκλιδίων που εκπέμπουν β-

σωματίδια είναι τα ^{131}I , ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{186}Re ή ^{188}Re [$t_{1/2} = 8,0 \text{ d}$, $2,7\text{d}$, $6,7\text{d}$, $3,7\text{d}$ και 17h αντίστοιχα] (Εικ.4) [19] .

Φωτόνια

Τα φωτόνια είναι ηλεκτρικά ουδέτερα, μπορούν να ιοντίζουν άτομα συνήθως απευθείας μέσω του φωτοηλεκτρικού φαινομένου και του φαινομένου Compton. Οποιαδήποτε από τις δύο αλληλεπιδράσεις, θα προκαλέσει την εκτίναξη ενός ηλεκτρονίου από ένα άτομο σε σχετικιστικές ταχύτητες, μετατρέποντας αυτό το ηλεκτρόνιο σε ένα σωματίδιο βήτα (δευτερεύον σωματίδιο βήτα), που θα ιοντίσει πολλά άλλα κοντινά άτομα. Δεδομένου ότι τα περισσότερα από τα επηρεαζόμενα άτομα ιοντίζονται άμεσα από τα δευτερεύοντα σωματίδια βήτα, τα φωτόνια αποτελούν έμμεση ιοντίζουσα ακτινοβολία[20; 21].

Η ακτινοβολία φωτονίων ονομάζεται ακτίνες γάμμα εάν παράγεται από μια πυρηνική αντίδραση, από διάσπαση υποατομικών σωματιδίων, ή ραδιενεργό διάσπαση στο εσωτερικό του πυρήνα. Αλλιώς ονομάζεται ακτίνες Χ που παράγονται έξω από τον πυρήνα. Ο γενικός όρος «ακτινοβολία φωτονίων» επομένως χρησιμοποιείται για να περιγράψει και τις δύο[20; 21]. Οι σύγχρονες τεχνολογίες και ανακαλύψεις οδήγησαν σε μια επικάλυψη μεταξύ ενεργειών των ακτίνων Χ και των ακτίνων γάμμα.

Σε πολλούς τομείς έχουν την ίδια λειτουργία, διαφέροντας μόνο στην προέλευση της ακτινοβολίας. Στην αστρονομία, εντούτοις, όπου η προέλευση της ακτινοβολίας συχνά δεν είναι δυνατόν να προσδιοριστεί με αξιοπιστία, ο παλαιότερος συμβατικός διαχωρισμός έχει διατηρηθεί, με τις ακτίνες Χ να ορίζονται μεταξύ περίπου 120 eV και 120 keV και τις ακτίνες γάμμα ως οποιαδήποτε ενέργεια άνω των 100 έως 120 keV, ανεξάρτητα από την πηγή.

Ακτίνες Χ και γ

Η Ηλεκτρομαγνητική Ακτινοβολία (ΗΜΑ) δεν έχει μάζα, δε μεταφέρει ηλεκτρικό φορτίο, δεν επηρεάζεται από ηλεκτρικά ή μαγνητικά πεδία και έχει σταθερή ταχύτητα (μεταβάλλεται εν μέρει αν αλλάξει το υλικό μέσο). Επίσης διαδίδεται στο κενό και σε υλικά σώματα. Η πορεία της είναι ευθύγραμμη, μπορεί όμως να σκεδαστεί, όταν αλληλεπιδράσει με την ύλη. Η αλληλεπίδραση ΗΜΑ και ύλης γίνεται είτε μέσω απορρόφησης (εναπόθεση ενέργειας), είτε μέσω σκέδασης (αλλαγή πορείας). Χαρακτηρίζεται από το μήκος κύματος λ , τη συχνότητα ν και την ενέργεια E .

Η ακτινοβολία γ είναι ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία (φωτόνια) υψηλής ενέργειας, που συνοδεύει τις ραδιενεργές διασπάσεις των πυρήνων. Η διέλευση της μέσα από τα πλέγματα των ατόμων της ύλης, και η πιθανότητά της να αλληλεπιδράσει με τα ηλεκτρόνια, ή τους πυρήνες, των ατόμων είναι σχετικά μικρή. Συνεπώς είναι διεισδυτική ακτινοβολία χαμηλού LET και αποκόπτεται δύσκολα. Συνήθως, για την προστασία μας από αυτήν κατά τις ιατρικές και βιομηχανικές εφαρμογές, χρησιμοποιείται ασπίδα από μόλυβδο ή σκυρόδεμα, το πάχος της οποίας πρέπει να εξαρτάται από την ενέργεια και την ένταση της ακτινοβολίας.

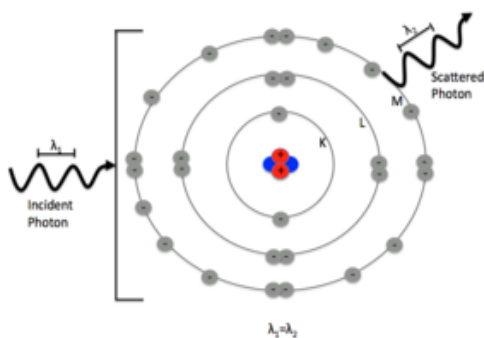
Η ακτινοβολία Χ είναι και αυτή ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία (φωτόνια) υψηλής ενέργειας, της ίδιας φύσης με την ακτινοβολία γ, αλλά διαφορετικής προέλευσης. Παράγεται στις ηλεκτρονιακές στιβάδες των ατόμων (χαρακτηριστική ακτινοβολία ατόμου) ή σε στόχους επιβράδυνσης ταχέως κινουμένων φορτισμένων σωματιδίων (ακτινοβολία πέδησης ή πέδησης) σε ειδικές για το σκοπό αυτό διατάξεις (λυχνίες ακτίνων-Χ, επιταχυντές σωματιδίων). Η ακτινοβολία Χ παρουσιάζει τις ίδιες βασικές φυσικές ιδιότητες με την ακτινοβολία γ, σε ό,τι αφορά στη διεισδυτικότητά της, παρόλο που συνήθως έχει μικρότερη ενέργεια. Εξασθένιση συμβαίνει με δύο μηχανισμούς: απορρόφηση και σκέδαση των πρωτογενών φωτονίων

Μηχανισμοί αλληλεπίδρασης φωτονίων Χ και γ με την ύλη

Τα φωτόνια, που προσπίπτουν στην ύλη, μπορεί να τη διαπεράσουν, να σκεδαστούν ή να απορροφηθούν. Υπάρχουν τέσσερις κύριοι μηχανισμοί αλληλεπίδρασης φωτονίων Χ και γ με την ύλη: σκέδαση Rayleigh, σκέδαση Compton, φωτοηλεκτρικό φαινόμενο και η δίδυμη γένεση [20; 21].

Σκέδαση Rayleigh

Κατά τη σκέδαση Rayleigh, το προσπίπτον φωτόνιο αλληλεπιδρά και διεγείρει όλο το άτομο, σε αντίθεση με τη σκέδαση Compton και το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο (απορρόφηση), όπου το φωτόνιο αλληλεπιδρά με συγκεκριμένο τροχιακό ηλεκτρόνιο, όπως θα συζητηθεί αναλυτικότερα στις επόμενες παραγράφους. Η σκέδαση αυτή επικρατεί στην ακτινοδιαγνωστική πολύ χαμηλών ενεργειών, όπως η μαστογραφία (15 με 30 keV). Κατά τη διάρκεια της σκέδασης Rayleigh, η ενέργεια του ηλεκτρικού πεδίου του προσπίπτοντος φωτονίου (ηλεκτρομαγνητικό κύμα) προκαλεί συντονισμένη ταλάντωση όλων των ηλεκτρονίων του σκεδάζοντος ατόμου (Εικ. 5)



Εικ.5 Φαινόμενο σκέδασης Rayleigh όπου το φωτόνιο προσκρούει και σκεπάζεται από το άτομο[22].

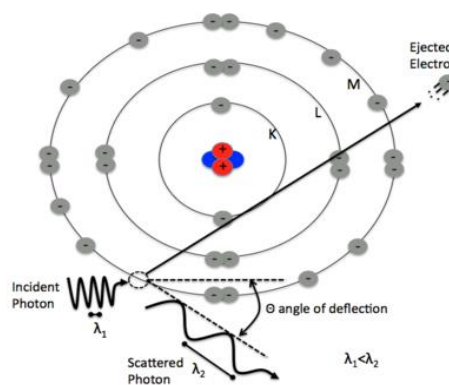
Το νέφος των ηλεκτρονίων αυτού του ατόμου αμέσως επανεκπέμπει την ενέργεια που προσωρινά απορρόφησε, με τη μορφή φωτονίου ίδιας ενέργειας με του προσπίπτοντος, αλλά με λίγο διαφορετική κατεύθυνση (το άνοιγμα της γωνίας είναι αντιστρόφως ανάλογο της προσπίπτουσας ενέργειας). Κατά τη σκέδαση Rayleigh δεν εκπέμπονται ηλεκτρόνια και δε συμβαίνει ιοντισμός. Στην ιατρική απεικόνιση, η σκέδαση Rayleigh υποβαθμίζει την ποιότητα εικόνας, αλλά, ευτυχώς, η πιθανότητα να συμβεί είναι μικρή (μικρότερη από 5%)[20] .

Σκέδαση Compton

Η σκέδαση Compton είναι μια μη ελαστική αλληλεπίδραση φωτονίων και ύλης, και κυριαρχεί στους τρόπους αλληλεπίδρασης φωτονίων με μαλακούς ιστούς στις ενέργειες που χρησιμοποιούνται στη διαγνωστική ακτινολογία. Η σκέδαση Compton έχει τις μεγαλύτερες πιθανότητες να συμβεί, όταν φωτόνια ενέργειας από 26 keV μέχρι και 30 MeV προσπίπτουν σε μαλακούς ιστούς. Εκεί, τα προσπίπτοντα φωτόνια αλληλεπιδρούν με τα εξωτερικότερα ηλεκτρόνια των ατόμων της ύλης.

Το ηλεκτρόνιο εγκαταλείπει το άτομο (ιοντισμός) και το αρχικό φωτόνιο σκεδάζεται (αλλαγή πορείας) με μειωμένη ενέργεια. Οι νόμοι διατήρησης της ορμής και της ενέργειας ισχύουν και η ενέργεια του προσπίπτοντος φωτονίου είναι ίση με το άθροισμα της ενέργειας του σκεδαζόμενου φωτονίου και της κινητικής ενέργειας του ηλεκτρονίου που απομακρύνεται (η ενέργεια σύνδεσης του ηλεκτρονίου θεωρείται συγκριτικά μικρή και δεν υπολογίζεται) [20] .

Η πιθανότητα σκέδασης Compton αυξάνεται όσο μεγαλώνει η ενέργεια του προσπίπτοντος φωτονίου, η οποία, βέβαια, πρέπει να είναι μεγαλύτερη από τη ενέργεια σύνδεσης του ηλεκτρονίου στο αντίστοιχο τροχιακό. Η πιθανότητα να συμβεί σκέδαση Compton εξαρτάται, επίσης, από την ηλεκτρονιακή πυκνότητα του υλικού (αριθμός ηλεκτρονίων του υλικού ανά μονάδα μάζας, επί την πυκνότητα του υλικού). Ο αριθμός ηλεκτρονίων ανά μονάδα μάζας για τα υλικά των ιστών είναι περίπου σταθερός, με εξαίρεση το υδρογόνο, που δεν περιέχει νετρόνια.



Εικ.6 Φαινόμενο Compton, το φωτόνιο σκεδάζεται με ηλεκτρόνιο της εξωτερικής στοιβάδας του ατόμου στόχου. Χάνει ενεργεί η οποία μετατρέπεται σε κινητική και είναι αρκετή για να «διώξει» το ηλεκτρόνιο (εκπομπή ηλεκτρονίων Compton) [22].

Φωτοηλεκτρικό φαινόμενο.

Κατά το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο, όλη η ενέργεια του προσπίπτοντος φωτονίου μεταφέρεται σε κάποιο ηλεκτρόνιο, το οποίο και εγκαταλείπει το άτομο του υλικού με κινητική ενέργεια ίση με την ενέργεια του φωτονίου μείον τη ενέργεια σύνδεσης που είχε το ηλεκτρόνιο στο άτομο (Εικ. 6).

Η κενή θέση του εκπεμπόμενου ηλεκτρονίου (μένει ιοντισμένο το άτομο) συμπληρώνεται από εξωτερικότερο ηλεκτρόνιο με μικρότερη βέβαια ενέργεια σύνδεσης. Η δεύτερη κενή θέση, με τη σειρά της, θα συμπληρωθεί με άλλο ακόμη εξωτερικότερο ηλεκτρόνιο κ.ο.κ. Οι μεταπτώσεις των ηλεκτρονίων συνοδεύονται από εκπομπή ενέργειας (τα εξωτερικότερα ηλεκτρόνια έχουν μικρότερη ενέργεια σύνδεσης από τα εσωτερικότερα) είτε με τη μορφή χαρακτηριστικής ακτινοβολίας

X, είτε με κινητική ενέργεια εκπεμπόμενων ηλεκτρονίων Auger. Η πιθανότητα εκπομπής χαρακτηριστικής ακτινοβολίας X μειώνεται όσο μικραίνει ο ατομικός αριθμός του υλικού και συνήθως δε συμβαίνει κατά την αλληλεπίδραση φωτονίων – μαλακών ιστών στις συνθήκες διαγνωστικής ακτινολογίας.

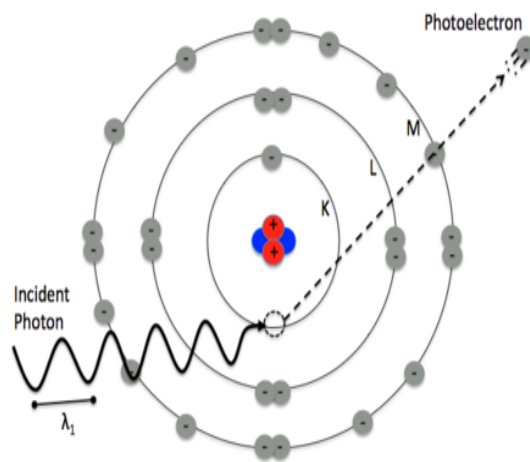
Η πιθανότητα φωτοηλεκτρικής απορρόφησης ανά μονάδα μάζας είναι ανάλογη του Z^3/E^3 , όπου Z ο ατομικός αριθμός του υλικού και E η ενέργεια του προσπίπτοντος φωτονίου[20; 21].

Το πλεονέκτημα της φωτοηλεκτρικής απορρόφησης στην απεικόνιση της ακτινοδιαγνωστικής είναι ότι δε δημιουργούνται δευτερογενή φωτόνια που θα μείωναν την ποιότητα της εικόνας. Το γεγονός πάντως ότι η πιθανότητα φωτοηλεκτρικού φαινομένου είναι αντιστρόφως ανάλογη της ενέργειας των φωτονίων στην τρίτη δύναμη, εξηγεί, εν μέρει, το ότι η αντίθεση (contrast) της εικόνας μειώνεται κατά την απεικόνιση, όταν χρησιμοποιούνται προσπίπτοντα φωτόνια μεγαλύτερης ενέργειας. Διπλασιασμός της ενέργειας των φωτονίων μειώνει οκτώ φορές την πιθανότητα να συμβεί φωτοηλεκτρική απορρόφηση.

Παρόλο που γενικά η πιθανότητα φωτοηλεκτρικού φαινομένου μειώνεται με αύξηση της ενέργειας των φωτονίων, υπάρχει μια εξαίρεση.

Για κάθε στοιχείο, ή υλικό, η γραφική παράσταση του μαζικού συντελεστή εξασθένησης (mass attenuation coefficient) ως συνάρτηση της ενέργειας των φωτονίων, παρουσιάζει σημεία ξαφνικής ασυνέχειας που καλούνται κορυφές απορρόφησης και οδηγούν τη γραφική παράσταση να λαμβάνει ένα πριονωτό σχήμα. Όπως ήδη αναφέρθηκε, ένα φωτόνιο δεν μπορεί να απορροφηθεί με φωτοηλεκτρικό φαινόμενο από ένα άτομο, αν η ενέργεια του φωτονίου είναι έστω λίγο μικρότερη από τη ενέργεια σύνδεσης του ηλεκτρονίου στο άτομο. Η ενέργεια του φωτονίου που αντιστοιχεί σε κορυφή απορρόφησης είναι ακριβώς ίση με τη ενέργεια σύνδεσης ηλεκτρονίου της συγκεκριμένης στιβάδας, ή υποστιβάδας, του υλικού, στο οποίο έγινε η πρόσπτωση.

Με τη σημερινή τεχνολογία, η φωτοηλεκτρική απορρόφηση επικρατεί στις περισσότερες εφαρμογές της απεικονιστικής διαγνωστικής ακτινολογίας (χαμηλής ενέργειας φωτόνια προσπίπτοντα σε υλικά υψηλού ατομικού αριθμού) (φθορίζουσες οθόνες, σκιαγραφικά υλικά, αλληλεπίδραση φωτονίων με οστά).



Εικ.7 Φωτοηλεκτρικό φαινόμενο, το φωτόνιο απορροφάτε από ηλεκτρόνιο κάποιας στιβάδας του ατόμου και το ιοντίζει (εκπομπή φωτοηλεκτρονίου) από την αναδιάταξη των ηλεκτρονίων εκπέμπονται φωτόνια [22].

Αντίθετα η σκέδαση Compton, στο ίδιο περιβάλλον, επικρατεί στην αλληλεπίδραση των ίδιων φωτονίων με μαλακούς ιστούς και αέρα[20].

Δίδυμη γένεση

Δίδυμη γένεση μπορεί να συμβεί μόνον εφόσον η ενέργεια του φωτονίου X ή γ είναι μεγαλύτερη από 1,022 MeV. Κατά το φαινόμενο αυτό, το φωτόνιο αλληλεπιδρά με το ηλεκτρικό πεδίο του πυρήνα ενός ατόμου και η ενέργειά του μετατρέπεται σε ένα ζεύγος σωματιδίων ενός ηλεκτρονίου και ενός ποζιτρονίου (δίδυμη γένεση). Το ισοδύναμο της μάζας ηρεμίας του ηλεκτρονίου (επομένως και του ποζιτρονίου) είναι 0,511 MeV. Η θετική διαφορά της ενέργειας του αρχικού φωτονίου από την τιμή $0,511 \times 2$ MeV θα αποδοθεί ως κινητική ενέργεια των δύο παραγόμενων σωματιδίων, τα οποία, με τη σειρά τους, την «ξοδεύουν» σε διεγέρσεις και ιοντισμούς των γειτονικών τους ατόμων.

Όταν το ποζιτρόνιο χάσει την ταχύτητά του, αλληλεπιδρά με ένα ηλεκτρόνιο που θα βρεθεί κοντά του, και η μάζα των δύο σωματιδίων μετατρέπεται σε ισοδύναμη με τους ενέργεια με τη μορφή δύο φωτονίων (εξαϋλωσης) 0,511 MeV το καθένα, που ξεκινούν από το σημείο της εξαϋλωσης με αντίθετες μεταξύ τους κατευθύνσεις[21]. Η δίδυμη γένεση δεν έχει πιθανότητες να συμβεί κατά την απεικόνιση στη διαγνωστική ακτινολογία, όπου οι ενέργειες των φωτονίων είναι σχετικά μικρές. [20] . Δίδυμη γένεση και εξαϋλωση ποζιτρονίου μετά από «σύγκρουση» με παρακείμενο ηλεκτρόνιο.

Συμπερασματικά, όλοι οι τρόποι αλληλεπίδρασης φωτονίων και ύλης συνεισφέρουν, ως ένα βαθμό, στην εξασθένηση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Στις χαμηλότερες ενέργειες των φωτονίων (< 26 keV) κυριαρχεί το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο, ακόμη και όταν ύλη είναι οι μαλακοί ιστοί. Αντίθετα, όταν τα φωτόνια έχουν μεγαλύτερη ενέργεια, στους μαλακούς ιστούς κυριαρχεί η σκέδαση Compton. Η σκέδαση Rayleigh συμβαίνει σε μικρό ποσοστό: 10% περίπου στη μαστογραφία και 5% στην ακτινογραφία θώρακος. Ο μηχανισμός της δίδυμης γένεσης δε συνεισφέρει στην εξασθένηση δέσμης φωτονίων ενεργειών, που χρησιμοποιούνται στην Ακτινοδιαγνωστική και την Πυρηνική Ιατρική. Η πιθανότητα να συμβεί απορρόφηση με Φωτοηλεκτρικό Φαινόμενο ή Φαινόμενο Compton ή Δίδυμη Γένεση, σε σχέση με τον ατομικό αριθμό του υλικού και την ενέργεια των προσπιπτόντων φωτονίων. Ο γραμμικός συντελεστής εξασθένησης είναι το άθροισμα των αντίστοιχων συντελεστών για κάθε ένα πιθανό μηχανισμό αλληλεπίδρασης: $\mu = \mu_{\text{Rayleigh}} + \mu_{\text{φφ}} + \mu_{\text{Compton}} + \mu_{\text{δίδυμης γένεσης}}$

Αρχές ως προς την βιολογία του κυττάρου

Κύτταρο

Το κύτταρο αποτελεί τη θεμελιώδη μονάδα της ζωής και μπορεί να οριστεί ως μια συστηματικά οργανωμένη ομάδα μορίων που βρίσκονται σε δυναμική αλληλεπίδραση. Τα κύτταρα περιέχουν μοριακά και βιοχημικά συστήματα υψηλού βαθμού οργάνωσης (Εικ. 8), τα οποία έχουν την ικανότητα να αποθηκεύουν

πληροφορίες, να τις αντιγράφουν και να τις μεταφράζουν. Για την επιτέλεση των λειτουργιών αυτών τα κύτταρα χρησιμοποιούν διάφορες ενεργειακές πηγές. Μπορούν να μετακινηθούν και έχουν την ικανότητα να μεταβάλουν τις εσωτερικές βιοχημικές αντιδράσεις τους για να προσαρμοστούν σε περιβαλλοντικές αλλαγές. Αναδιπλασιάζονται και μεταβιβάζουν στα νέα κύτταρα τις γενετικές πληροφορίες, τα μοριακά και βιοχημικά συστήματα τους[23]. Μεγάλο ρόλο στην ανάπτυξη της Βιολογίας Κυττάρου διαδραμάτισε η κυτταρική θεωρία. Η σύγχρονη κυτταρική θεωρία αναφέρει ότι:

- α. Όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί αποτελούνται από κύτταρα και κυτταρικά παράγωγα.
- β. Τα κύτταρα αποτελούν τις δομικές μονάδες της ζωής, δομούνται από τις ίδιες χημικές ενώσεις και εκδηλώνουν παρόμοιες μεταβολικές διεργασίες.
- γ. Η λειτουργία των οργανισμών είναι το αποτέλεσμα της συλλογικής δράσης και αλληλεπίδρασης των κυττάρων που τους αποτελούν.
- δ. Τα κύτταρα προκύπτουν από προϋπάρχοντα κύτταρα με διαίρεση.

Υπάρχουν αμέτρητες μορφές κυττάρων, τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους ανάλογα με το μέγεθος, το σχήμα και τη λειτουργία τους. Όμως, οι διαφορές αυτές εξαφανίζονται όταν δούμε δομή των κυττάρων και τα μόρια από τα οποία αποτελούνται. Το ανθρώπινο σώμα αποτελείται από μερικές εκατοντάδες κυτταρικούς τύπους, ενώ κάθε κυτταρικός τύπος αντιπροσωπεύεται από εκατομμύρια κύτταρα. Υπάρχουν νευρικά κύτταρα, μυϊκά κύτταρα, αδενικά κύτταρα, ερυθροκύτταρα και άλλα, ενώ για κάθε κυτταρικό τύπο υπάρχει και ένας, διαφορετικός κάθε φορά, αριθμός κυτταρικών υποτύπων.

Τα κύτταρα, όπως φαίνεται και από τα ονόματά τους, έχουν την τάση να ομαδοποιούνται σε όργανα ή συστήματα, τα οποία επιτελούν συγκεκριμένες λειτουργίες. Ο τρόπος με τον οποίον ομαδοποιούνται τα κύτταρα, πολύ συχνά, διαδραματίζει αποφασιστικό ρόλο στην έκφραση αυτών των λειτουργιών. Όλα τα γραμμωτά μυϊκά κύτταρα μοιάζουν μεταξύ τους και έχουν την ικανότητα να συσπώνται. Ο τρόπος με τον οποίον τα μυϊκά κύτταρα συνδέονται μεταξύ τους δημιουργεί τις εκατοντάδες των διαφορετικών μυών που βρίσκονται στο ανθρώπινο σώμα[23].

DNA

Το DNA είναι το χημικό μόριο στο οποίο έχει αποτυπωθεί ο γενετικός κώδικας των έμβιων όντων. Το DNA είναι ένα μεγάλου μήκους, υπό μορφή διπλής έλικας,



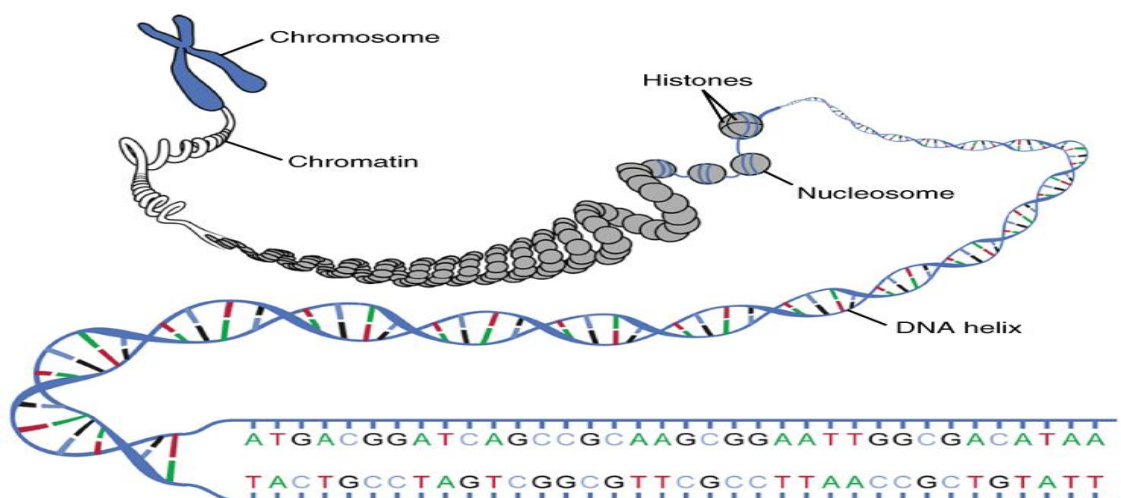
Εικ.8 Ευκαρυωτικό ζωικό κύτταρο και τα συστατικά του[23].

μεγαλομόριο πολυδεοξυριβοζονουκλεοτιδίων. Κάθε μόριο δεοξυριβοζονουκλεοτιδίου αποτελείται από τρία τμήματα: την αζωτούχο βάση (τύπου πουρίνης ή πυριμιδίνης), ένα σάκχαρο (δεσοξυριβόζη) και ένα φωσφορικό οξύ. Το DNA περιέχει 4 είδη αζωτούχων βάσεων: την αδενίνη (A) και τη γουανίνη (G) (πουρίνες διπλής αλυσίδας), τη θυμίνη (T) και την κυτοσίνη (C) (πυριμιδίνες απλής αλυσίδας).

Το 1953, ο J. Watson και ο F. Crick πρότειναν μια τρισδιάστατη δομή του DNA βασισμένη σε πρότυπα που ανέπτυξαν, ως αποτέλεσμα της ανάλυσης φασμάτων ακτίνων -X από ίνες DNA των M. Wilkins και R. Franklin. Σύμφωνα με το μοντέλο της "διπλής έλικας", το μόριο του DNA αποτελείται από δυο αντιπαράλληλους κλώνους που περιελίσσονται γύρω από έναν κοινό άξονα. Κάθε κλώνος του DNA αποτελείται από την εναλλαγή των τεσσάρων βάσεων, διαταγμένων με συγκεκριμένη σειρά κατά μήκος του κάθε κλώνου. Οι "οδηγίες" για την αναπαραγωγή των κυττάρων βρίσκονται κωδικοποιημένες στη διαδοχή των βάσεων, το αλφάβητο της ζωής! Δηλαδή η γενετική πληροφορία αποτελείται από "μηνύματα" γραμμένα στο αλφάβητο των 4 γραμμάτων: A C G T (σύμβολα των αζωτούχων βάσεων του DNA)[23] .

Μια σειρά μερικών χιλιάδων βάσεων αποτελεί ένα γονίδιο και κάθε μόριο DNA περιλαμβάνει χιλιάδες γονίδια. Ένα συγκεκριμένο γονίδιο καθορίζει την αντίστοιχη δομή μιας ειδικής πρωτεΐνης, ή τμήματος πρωτεΐνης. Πριν από τη διαίρεση ενός κυττάρου, η οποία θα οδηγήσει σε δυο θυγατρικά κύτταρα, τα μόρια του DNA του κυττάρου - γονέα διπλασιάζονται έτσι, ώστε τα θυγατρικά κύτταρα να έχουν από ένα πλήρες set γονιδίων. Δηλαδή τα μόρια του DNA αυτοαντιγράφονται. Κατά μέσο όρο υπάρχουν 1015 κύτταρα στο σώμα ενός ανθρώπου και, με μερικές εξαιρέσεις, το καθένα τους περιέχει ένα τέλειο αντίγραφο του DNA αυτού του ανθρώπου, ίδιο με αυτό του αρχικού κυττάρου της γονιμοποίησης.

Οι αζωτούχες βάσεις, ανάλογα με την σειρά αλληλουχίας τους σε τριάδες, κωδικοποιούν το μήνυμα για τη σύνθεση των αμινοξέων του κυττάρου στα ριβοσώματα. Εκεί τα αμινοξέα συνδυάζονται, με τη σειρά κατά την οποία μεταφέρθηκαν στο ριβόσωμα και συντίθενται έτσι οι διαφορετικές πρωτεΐνες.



Εικ.9 Από τους δυο κλώνους του DNA η διπλή έλικα και το «πακετάρισμα» της για την τελική δημιουργία των χρωμοσωμάτων.

Χρωματίνη

Η γενική δομή της χρωματίνης έχει βρεθεί ότι είναι παρόμοια σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα (Εικ. 9). Η διπλή έλικα του DNA ενός ανθρώπινου χρωμοσώματος, π.χ., αν τεντωθεί, θα διασχίζει τον πυρήνα αρκετές χιλιάδες φορές. Οι ιστόνες (ειδικές πρωτεΐνες που ενώνονται με το DNA) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία αναδίπλωσης του DNA, μ' ένα τέτοιο τρόπο έτσι ώστε το μόριο του DNA να είναι λειτουργικό και ταυτόχρονα να χωρά μέσα στις μικρές διαστάσεις του πυρήνα. Το DNA κάθε χρωμοσώματος πρέπει να αναδιπλωθεί και να συμπυκνωθεί αρκετά για να χωρέσει μέσα στον περιορισμένο χώρο που έχει στη διάθεσή του. Εκτός όμως από το θέμα χώρου, η διατήρηση του DNA μέσα στον πυρήνα των ευκαρυωτικών κυττάρων το προφυλάσσει από χημικές και μηχανικές βλάβες. Η διεργασία σχηματισμού της χρωματίνης γίνεται σε τρία στάδια ή επίπεδα οργάνωσης (Εικ.9):

α. Το πρώτο επίπεδο οργάνωσης είναι η περιέλιξη του DNA γύρω από ιστονικά σωματίδια (νουκλεοσώματα) τα οποία μοιάζουν με χάντρες κομπολογιού (Εικ.9). Ο βαθμός συμπύκνωσης του DNA είναι 6.

β. Στο δεύτερο επίπεδο οργάνωσης τα σωματίδια συσπειρώνονται και σχηματίζουν μια ελικοειδή δομή, η οποία σχηματίζει το ινίδιο 30nm. Ο βαθμός συμπύκνωσης του DNA είναι 40.

γ. Η τελική μορφή της χρωματίνης καθορίζεται από το τρίτο επίπεδο οργάνωσης, κατά το οποίο συμβαίνει η συμπύκνωση του ινιδίου 30nm. Ο βαθμός συμπύκνωσης είναι 1.000 - 2.000 στα μεσοφασικά χρωμοσώματα, ενώ στα χρωμοσώματα κατά την διαδικασία της μίτωσης ο βαθμός συμπύκνωσης είναι ≥ 10.000 [23].

Χρωμοσώματα

Κάθε μόριο DNA συμπυκνώνεται δημιουργώντας ένα ξεχωριστό χρωμόσωμα. Το σύνολο της γενετικής πληροφορίας που είναι αποθηκευμένο στα χρωμοσώματα ενός οργανισμού αποτελεί το γένωμα (ή γονιδίωμα) του οργανισμού αυτού. Το ανθρώπινο γένωμα περιέχει, 3×10^9 ζεύγη νουκλεοτιδίων, τα οποία είναι οργανωμένα σε 24 χρωμοσώματα (22 διαφορετικά αυτοσωμικά και 2 διαφορετικά φυλετικά χρωμοσώματα) και έτσι αποτελείται από 24 διαφορετικά μόρια DNA, καθένα από τα οποία περιέχει $50-250 \times 10^6$ ζεύγη νουκλεοτιδίων. Τα μόρια αυτά, όταν δεν είναι περιελιγμένα, έχουν μήκος 1,7-8.5 cm και μπορεί να σπάσουν ακόμη και από την πιο μικρή μηχανική δύναμη.

Έχει υπολογιστεί ότι στα κύτταρα των θηλαστικών απαιτείται ένα μόνο μικρό ποσοστό του γενώματος για τη ρύθμιση ή την κωδικοποίηση ουσιωδών πρωτεϊνών ή μορίων RNA. Αν και το γένωμα των κυττάρων θηλαστικών περιέχει αρκετό DNA (3×10^9 ζεύγη νουκλεοτιδίων) για να κωδικοποιήσει περίπου 3.000.000 πρωτεΐνες, εντούτοις σ' ένα κύτταρο δεν υπάρχουν περισσότερες από 60.000 ουσιώδεις πρωτεΐνες[23].

Κυτταρικός κύκλος

Η αναπαραγωγή των ευκαρυωτικών κυττάρων είναι μία κυκλική διαδικασία, στην οποία διακρίνονται δύο τουλάχιστον φάσεις, η φάση M (Μίτωση) και η φάση S (Σύνθεση), οι οποίες μπορούν να διαφοροποιηθούν με βάση τα βιοχημικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά τους. Το βιοχημικό χαρακτηριστικό της φάσης S είναι η αντιγραφή του πυρηνικού DNA και συνεπώς ο διπλασιασμός της γενετικής πληροφορίας. Κατά τη φάση M συμβαίνει η μίτωση, η διαίρεση δηλαδή των χρωμοσωμάτων των δυο αδελφών κυττάρων.

Στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους μπορούμε να διακρίνουμε ακόμα δύο φάσεις: τη G1, που είναι η φάση ανάμεσα στην M και S και τη φάση G2 ανάμεσα στην S και M(Εικ. 10).

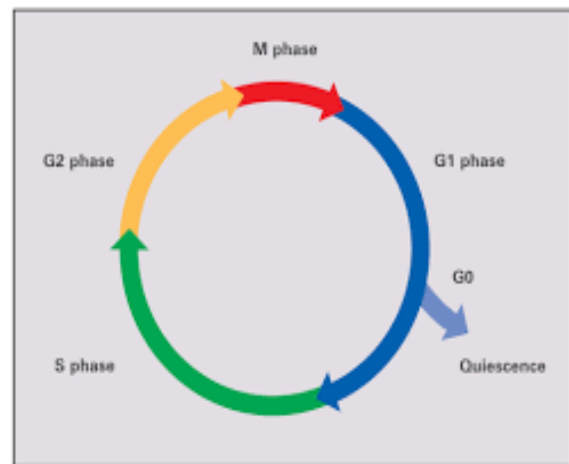
Η G1 ακολουθεί την M ενώ η G2 ακολουθεί την S. Επιπλέον, το κύτταρο μπορεί να μεταβεί από την G1 σε μία αδρανή φάση την G₀, από την οποία μπορεί να εξέλθει μέσω συγκεκριμένων σημάτων. Ένα από αυτά είναι οι αυξητικοί παράγοντες.

Τα ρυθμιστικά συστήματα του κυτταρικού κύκλου εξασφαλίζουν ότι οι διάφορες φάσεις ολοκληρώνονται σωστά και με σωστή αλληλουχία. Η είσοδος σε μια νέα φάση μπορεί να συμβεί μόνο εάν η προηγούμενη φάση έχει ολοκληρωθεί. Πολλοί από τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς είναι εσωτερικής φύσης και είναι ιδιόσυστατοι (δηλ. είναι λειτουργικοί σε κάθε κυτταρικό) [24] .

Ωστόσο, υπάρχουν και άλλοι ρυθμιστικοί μηχανισμοί που δεν είναι ενεργοί σε κάθε κυτταρικό κύκλο, αλλά ενεργοποιούνται όταν εμφανιστούν ανωμαλίες και είναι γνωστοί ως σημεία ελέγχου (checkpoints). Ένα παράδειγμα είναι το σημείο ελέγχου της καταστροφής του DNA. Είναι ένα βιοχημικό μονοπάτι που εντοπίζει την καταστροφή του DNA και δημιουργεί ένα σήμα που σταματάει το κύτταρο στη φάση G₁, S ή G₂ του κυτταρικού κύκλου [24].

Βιολογικά αποτελέσματα στο κύτταρο

Η Ιοντίζουσα ακτινοβολία θεωρείται επικίνδυνη, επειδή μεταφέρει μεγάλη ενέργεια, μεγαλύτερη από 10 eV, ικανή να εισχωρήσει στην ύλη, να διασπάσει βίαια χημικούς δεσμούς και να προκαλέσει βιολογικές βλάβες σε ζωντανούς οργανισμούς. Όταν η ακτινοβολία προκαλεί ιοντισμό σε ένα βιολογικό υλικό, π.χ. στο κυτταρόπλασμα ή στον πυρήνα ενός κυττάρου, το αποτέλεσμα είναι η ρήξη ενός χημικού δεσμού, δηλαδή η καταστροφή ενός μορίου, με σύνθητες επακόλουθο



Εικ.10 Οι διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου.

την παραγωγή δραστικών ελεύθερων ριζών, οι οποίες αναλύονται καλύτερα στην επόμενη παράγραφο[13; 25].

Η ρήξη των μοριακών δεσμών προκαλεί άμεση βιολογική βλάβη, διότι με την καταστρέφει κάποιο μόριο ωφέλιμο για τη ζωή ή τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου. Οι δραστικές ελεύθερες ρίζες που παράγονται από τη διάσπαση του μορίου, θα προκαλέσουν πρόσθετη, έμμεση βλάβη, καθώς «επιτεθούν» σε ωφέλιμα μόρια, θα τα καταστρέψουν και θα δημιουργήσουν άχρηστες ή βλαβερές για το κύτταρο χημικές ενώσεις.

Ιδιαίτερη σημασία για τη ζωή και την αναπαραγωγή του κυττάρου έχουν οι βλάβες εκείνες που προκαλούνται στο γενετικό του υλικό, διότι αυτές συνδέονται τόσο με τη μεταβίβαση κληρονομικών ανωμαλιών στους απογόνους, όσο και με τη διαδικασία της καρκινογένεσης. Ο άνθρωπος, κατά τη διάρκεια της ζωής του, δέχεται συνεχώς ενέργεια με τη μορφή ακτινοβολίας, τόσο από το φυσικό του περιβάλλον όσον και από τεχνητές πηγές. Η ακτινοβολία αυτή επιδρά πάνω του κατά τρόπο πολύπλοκο, άλλοτε ευεργετικό και άλλοτε βλαβερό, εξαρτώμενο από το είδος της, την έντασή της και την ενέργεια που μεταφέρει. Οι Ιοντίζουσες ακτινοβολίες προκαλούν προκαλούν ποικιλία βιολογικών αποτελεσμάτων στους έμβιους οργανισμούς [25].

Τα φορτισμένα σωματίδια α και β όπως είδαμε και στις προηγούμενες παραγράφους, προκαλούν διέγερση και ιοντισμό των μορίων της ύλης. Επειδή η εμβέλεια των σωματίων α στη βιολογική ύλη είναι μικρότερη από 1/10 mm, η πυκνότητα ιοντισμού στις μικρές αυτές διαστάσεις θα είναι πολύ μεγάλη. Η εμβέλεια των σωματίων β στη βιολογική ύλη είναι πολύ μεγαλύτερη (μερικά cm ανάλογα με την ενέργεια) και, επομένως, η πυκνότητα ιοντισμού που επιφέρουν, πολύ μικρότερη. Η Ιοντίζουσα ακτινοβολία αποτελεί έναν από τους πολλούς βλαπτικούς παράγοντες του περιβάλλοντος, καθώς, η ενέργεια που μεταφέρει, χαρακτηρίζεται από μια εξαιρετικά μεγάλη βλαπτική ικανότητα. Ειδικά ο ιοντισμός της οργανικής ύλης προκαλεί μεταβολές, έστω και παροδικές, στα άτομα και τα μόρια των χημικών ενώσεων, με αποτέλεσμα τη συνήθη εμφάνιση βλαβών στα κύτταρα -και κατά προέκταση στο σύνολο του οργανισμού-, οι οποίες, αν δεν επιδιορθωθούν, οδηγούν στην τροποποίηση των κυττάρων, στην αναστολή της αναπαραγωγικής τους ικανότητας, ή στη χειρότερη περίπτωση, στη θανάτωσή τους[13; 25].

Ο ευαίσθητος στόχος που προκαλεί την αυξημένη ευπάθεια της ζώσας ύλης στις Ιοντίζουσες ακτινοβολίες, είναι το DNA. Έτσι είναι σημαντικό να αναλύσουμε την αλληλεπίδραση ακτινοβολίας – βιολογικής ύλης μικροσκοπικά, δηλαδή σε κυτταρικό επίπεδο. Οι δύο επικρατέστερες παράλληλες θεωρίες για την ερμηνεία της δράσης της ιοντίζουσας ακτινοβολίας στο DNA είναι, είτε με άμεση δράση, όπου οι βλάβες μπορεί να προκληθούν απευθείας από την απορρόφηση της ακτινοβολίας, είτε με έμμεση δράση, κατά την οποία οι βλάβες οφείλονται στη δράση των ελεύθερων ριζών που παράγονται κατά το χημικό στάδιο.

Μικροσκοπικά, οι δραστικές ελεύθερες ρίζες, που δημιουργήθηκαν κατά το χημικό στάδιο, επιτίθενται στη φυσιολογική αλυσίδα του DNA και προκαλούν θραύσεις. Διακρίνουμε δύο κατηγορίες θραύσεως, το μονό σπάσιμο της έλικας (SSB, single strand break) και το διπλό σπάσιμο έλικας (DSB, Double strand break). Η βασικότερη εξ αυτών και μάλιστα οι βλάβες του τύπου DSB είναι αυτές που

σχετίζονται κατεξοχήν με το θάνατο του κυττάρου, καθώς είναι αυτές που συνήθως δεν επιδέχονται επιδιόρθωση[13; 25].

Κατηγορία ακτινοπροκλητών βλαβών είναι οι χρωμοσωμικές αλλοιώσεις. Πρόκειται για ορατές, με κατάλληλο μικροσκόπιο, αλλαγές στην κατασκευή ή τον αριθμό των χρωμοσωμάτων. Ένα μικρό κομμάτι χρωμοσώματος μπορεί να χαθεί (έλλειψη), να διπλασιαστεί στο αρχικό χρωμόσωμα (διπλασιασμός), να μεταφερθεί σε ένα σημείο ενός άλλου χρωμοσώματος (μετατόπιση) ή να αναστραφεί πάνω στο ίδιο του το χρωμόσωμα (αναστροφή). Το τελικό αποτέλεσμα είναι η δημιουργία ενός χρωμοσώματος με τροποποιημένες ιδιότητες.

Τα κύτταρα εμφανίζουν αρκετή αντοχή στις αλλοιώσεις των χρωμοσωμάτων. Σε ακτινοβολήσεις ατόμων παρατηρήθηκε ότι οι αλλοιώσεις αυτής της μορφής, άλλοτε διατηρούνται καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους (χωρίς παρατηρούμενες επιπτώσεις) και άλλοτε μεταφέρονται (με πολλές επόμενες κυτταρικές διαιρέσεις) στους απογόνους. Σπανιότερα, οι σοβαρότερες από αυτές καταλήγουν σε κυτταρικό θάνατο (δημιουργία κεντρωμάτων χωρίς κεντρομερίδιο, ακεντρικά θραύσματα, εμφάνιση μικροπυρήνων σε διπλοειδικά κύτταρα, κ.λπ.).

Συμπερασματικά, κατά την αλληλεπίδραση ιοντίζουσας ακτινοβολίας – βιολογικού συστήματος επέρχεται διέγερση και ιοντισμός των βιολογικών μορίων (άμεση δράση) και σχηματίζονται δραστικές ελεύθερες ρίζες (υδρόλυση). Οι ρίζες αυτές αντιδρούν έντονα με το DNA (έμμεση δράση). Το αποτέλεσμα είναι χημικές αλλαγές σε κυτταρικό επίπεδο. Το πιθανό βιολογικό αποτέλεσμα (σωματική ή/και γενετική επιβάρυνση) είναι επακόλουθο της μη έγκαιρης και σωστής επιδιόρθωσης της βλάβης και εξαρτάται από την ποσότητα και την ποιότητα της ακτινοβολίας που απορροφήθηκε. Στη συγκεκριμένη εργασία θα μελετήσουμε τις χρωμοσωμικές αλλοιώσεις που προξενήθηκαν από ακτινοβολία και πιο συγκεκριμένα τα θραύσματα χρωμοσωμάτων.

Νανοσωματίδια και νανοτεχνολογία

Εισαγωγή

Η νανοτεχνολογία περιγράφει τη δημιουργία δομών που αποκτούν νέες ιδιότητες λόγω του μικρού μεγέθους τους, το οποίο κυμαίνεται από 1 έως και 100 νανόμετρα. Τέτοια τεχνολογικά επεξεργασμένα νανοϋλικά μπορούν να παρέχουν μοναδικά πλεονεκτήματα σε διάφορους τομείς, με μεγάλο ενδιαφέρον να φαίνεται να υπάρχει στην ιατρική, για την θεραπεία, την διάγνωση και την απεικόνιση[26]. Τα μεταλλικά νανοσωματίδια (NPs) ποικίλλουν ευρέως με βάση τη χημική τους σύνθεση, όπου διακρίνονται στα ανόργανα ή σκληρά νανοσωματίδια και περιλαμβάνουν εκείνα που προέρχονται από μέταλλα (π.χ. χρυσό, ασήμι) ή ημιαγωγούς, καθώς επίσης και τα οργανικά ή μαλακά που περιλαμβάνουν κυρίως τα πολυμερή. Επίσης ανεξάρτητα από τη σύνθεσή τους οι ιδιότητες τους, είναι συνάρτηση διαφόρων άλλων μεγεθών, όπως μέγεθος, σχήμα, και η δομή[26].

Οι πρώτες νανοδομές που εμφανίζονται ιστορικά και διερευνώνται ενεργά ως υποστηρικτικές ουσίες για τη θεραπεία, καθώς και ως πολυλειτουργικά συστήματα χορήγησης φαρμάκων φαίνεται να είναι οι νανοδομές άνθρακα με κύριους πρωταγωνιστές το γραφένιο και τα φουλερένια 60[27]. Τέτοια συστήματα είναι

ιδιαίτερα χρήσιμα σαν μελλοντικές στρατηγικές για την καταπολέμηση και, τελικά, τη θεραπεία διάφορων ασθενειών όπως ο καρκίνος.

Οι τρέχουσες θεραπείες για τον καρκίνο περιλαμβάνουν την χειρουργική επέμβαση, την ακτινοθεραπεία και την χημειοθεραπεία. Αν και διεκδικούν ένα μεγάλο βαθμό επιτυχίας, οι προσεγγίσεις αυτές, σκοτώνουν επίσης και ένα ποσοστό υγιή κύτταρων.

Ιστορική αναδρομή

Η εφαρμογή του χρυσού στην ιατρική δεν είναι καινούργια. Η χρήση ενώσεων χρυσού στην ιατρική ονομάζεται χρυσοθεραπεία και η ιστορία της είναι μεγάλη και γνωστή. Η χρήση του χρυσού ως θεραπευτικού παράγοντα χρονολογείται από το 2500 π.Χ. στην παραδοσιακή κινεζική ιατρική για τη θεραπεία ασθενειών όπως η ευλογιά, τα δερματικά έλκη και η ιλαρά. Στην Ιαπωνία, λεπτά φύλλα χρυσού τοποθετούνταν σε τσάι, σάκε και φαγητό, καθώς οι εφαρμογές του χρυσού ήταν και θεωρούνταν χρήσιμες για την αντοχή σε βακτηριακές λοιμώξεις.

Το 1890, ο Robert Koch παρατήρησε ότι το κυανιούχο άλας χρυσού έχει βακτηριοστατικές ιδιότητες, έναντι του βακίλου του κονδύλου, γεγονός που οδήγησε στην εισαγωγή αυτής της θεραπευτικής προσέγγισης το 1920. Στις αρχές της δεκαετίας του '90, ο Jacques Forestier ανέφερε επίσης ότι η χρήση συμπλοκών χρυσού ήταν επωφελής για τη θεραπεία της αρθρίτιδας [28]. Εκείνη την εποχή πιστεύεται ότι ο βάκιλος του κονδύλου ήταν ο παράγοντας που προκαλεί ασθένεια για τη ρευματοειδή αρθρίτιδα.

Ακόμα, πολλοί ειδικοί θεωρούν ότι ο χρυσός αποτελεί έναν από τους πιο αποτελεσματικούς παράγοντες για τη μείωση της φλεγμονής στις αρθρώσεις, μειώνοντας έτσι τα συμπτώματα του πόνου και της ακαμψίας ρευματικής αρθρίτιδας[28].

Χάρη στην εκπομπή ακτινοβολίας του χρυσού δείχνεται η δυνατότητα στα επιχρυσωμένα stent να προσφέρουν καλύτερη ορατότητα κάτω από ακτίνες Χ, επιτρέπουν έτσι την ακριβή τοποθέτηση, εντός μεγάλων αρτηριών και φλεβών κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης. Το 2001, η Boston Scientific παρήγαγε το stent Nitroal, ένα από τα πρώτα επιχρυσωμένα στεντ. Η βιολογική αδράνεια του χρυσού βρέθηκε να είναι σημαντική σε αυτή την εφαρμογή και, σύμφωνα με τους Tanigawa τα επιχρυσωμένα στεντ έχουν βρεθεί ότι παράγουν τον ελάχιστο αριθμό μακροσκοπικών αλλαγών στον περιβάλλοντα ενδοαγγειακό ιστό [29].

Στις αρχές του 1955, ο ραδιενεργός χρυσός χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά για τη θεραπεία του καρκίνου. Η ομάδα του Wheeler ανέφερε ότι η χρήση του ^{198}Au στη θεραπεία του καρκίνου, εντός του όγκου που εγχύθηκε ^{198}Au παρέδωσε μεγάλη ποσότητα ιονίζουσας ακτινοβολίας εντός όγκων χωρίς σημαντική ακτινοβόληση στους περιβάλλοντες φυσιολογικούς ιστούς. Αυτή η θεραπεία ήταν πολύ αποτελεσματική για ασθενείς με περιτοναϊκές ή υπεζωκοτικές εκκρίσεις που προκλήθηκαν από κακοήγη νόσο. Επίσης, η εφαρμογή του ^{198}Au διατηρήθηκε σε ασθενείς με κακοήθεις όγκους που τείνουν να εξαπλωθούν μέσω του λεμφικού συστήματος ή είναι τοπικά επεμβατικοί [30].

Ιδιότητες

Τα νανοσωματίδια χρυσού έχουν χρησιμοποιηθεί για αιώνες από καλλιτέχνες λόγω των ζωντανών χρωμάτων που παράγονται από την αλληλεπίδρασή τους με το ορατό φως. Πιο πρόσφατα, αυτές οι μοναδικές οπτοηλεκτρονικές ιδιότητες έχουν ερευνηθεί και αξιοποιηθεί σε εφαρμογές υψηλής τεχνολογίας όπως οργανικές φωτοβολταϊκές, αισθητήρες και ανιχνευτές, θεραπευτικοί παράγοντες, χορήγηση φαρμάκων σε βιολογικές και ιατρικές εφαρμογές, ηλεκτρονικοί αγωγοί και καταλύτες. Οι οπτικές και ηλεκτρονικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων χρυσού μπορούν να ρυθμιστούν μεταβάλλοντας το μέγεθος, το σχήμα, την χημεία επιφανείας ή την κατάσταση συσσωμάτωσης.

Οπτικές και ηλεκτρονικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων χρυσού

Η αλληλεπίδραση των νανοσωματιδίων χρυσού με το φως επηρεάζεται έντονα από το περιβάλλον, το μέγεθος και τις φυσικές τους διαστάσεις. Για τα μικρά νανοσωματίδια χρυσού (~30nm), το φαινόμενο συντονισμού επιφανειακών πλάσμονίων προκαλεί απορρόφηση φωτός στο μπλε-πράσινο τμήμα του φάσματος (~450 nm), ενώ το κόκκινο φως (~700 nm) αντανακλάται, αποδίδοντας ένα πλούσιο κόκκινο χρώμα. Καθώς αυξάνεται το μέγεθος των σωματιδίων, το μήκος κύματος της απορρόφησης που σχετίζεται με το συντονισμό επιφανειακών πλάσμονίων μετατοπίζεται σε μακρύτερα, κόκκινα μήκη κύματος. Στη συνέχεια απορροφάται το κόκκινο φως και το μπλε φως αντανακλάται, αποδίδοντας διαλύματα με ανοιχτό μπλε ή μοβ χρώμα.

Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται επίσης όταν προστίθεται περίσσεια αλατιού στο χρυσό διάλυμα. Το επιφανειακό φορτίο του νανοσωματιδίου χρυσού γίνεται ουδέτερο, προκαλώντας τη συσσώρευση νανοσωματιδίων. Ως αποτέλεσμα, το χρώμα διαλύματος αλλάζει από κόκκινο σε μπλε. Για να ελαχιστοποιηθεί η συσσωμάτωση, η ευπροσάρμοστη επιφανειακή χημεία των νανοσωματιδίων χρυσού τους επιτρέπει να επικαλύπτονται με πολυμερή, μικρά μόρια και μόρια βιολογικής αναγνώρισης. Αυτή η επιφανειακή τροποποίηση επιτρέπει τα νανοσωματίδια χρυσού να χρησιμοποιηθούν εκτενώς σε χημικές, βιολογικές, μηχανικές και ιατρικές εφαρμογές.

Το εύρος των εφαρμογών για νανοσωματίδια χρυσού αυξάνεται με ταχύ ρυθμό και περιλαμβάνει:

Ηλεκτρονικά

Τα νανοσωματίδια χρυσού έχουν σχεδιαστεί για χρήση ως αγωγοί από εκτυπώσιμα μελάνια. Καθώς ο κόσμος των ηλεκτρονικών γίνεται μικρότερος, τα νανοσωματίδια είναι σημαντικά συστατικά στον σχεδιασμό των τσιπ. Τα νανοσωματίδια χρυσού νανοκλίμακα χρησιμοποιούνται για τη σύνδεση αντιστάσεων, αγωγών και άλλων στοιχείων ενός ηλεκτρονικού τσιπ.

Φωτοδυναμική θεραπεία

Τα νανοσωματίδια χρυσού που απορροφούν το IR (συμπεριλαμβανομένων των νανοκελύφων (nanoshells) και νανοράβδων (nanorods) από χρυσό) παράγουν θερμότητα όταν διεγείρονται από το laser σε μήκη κύματος από 700 έως 800 nm.

Αυτό επιτρέπει σε αυτά να εξαλείψουν τους στοχευμένους όγκους. Όταν εφαρμόζεται laser σε έναν όγκο που περιέχει νανοσωματίδια χρυσού, αυτά θερμαίνονται γρήγορα, σκοτώνοντας έτσι τα καρκινικά κύτταρα σε μια θεραπεία γνωστή και ως θεραπεία υπερθερμίας.

Παράδοση θεραπευτικού παράγοντα (drug delivery)

Οι θεραπευτικοί παράγοντες μπορούν επίσης να «τοποθετηθούν» στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων χρυσού. Η αναλογία μεγάλου εμβαδού επιφάνειας προς όγκο των νανοσωματιδίων χρυσού καθιστά δυνατή την επικάλυψη της επιφάνειας τους με εκατοντάδες μόρια (συμπεριλαμβανομένων των θεραπευτικών μέσων, των μέσων στόχευσης και των αντι- πολυμερή ρύπανσης).

Αισθητήρες

Νανοσωματίδια χρυσού χρησιμοποιούνται σε διάφορους αισθητήρες. Για παράδειγμα, ένας χρωματομετρικός αισθητήρας που βασίζεται σε νανοσωματίδια χρυσού μπορεί να προσδιορίσει εάν τα τρόφιμα είναι κατάλληλα για κατανάλωση. Άλλες μέθοδοι, όπως η επιφανειακή ενισχυμένη φασματοσκοπία Raman, εκμεταλλεύονται τα νανοσωματίδια χρυσού ως υποστρώματα για να επιτρέπουν τη μέτρηση των δονητικών ενεργειών των χημικών δεσμών. Αυτή η στρατηγική θα μπορούσε επίσης να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση πρωτεϊνών, ρύπων και άλλων μορίων χωρίς ετικέτα.

Διάγνωση

Τα νανοσωματίδια χρυσού χρησιμοποιούνται επίσης για ανίχνευση βιολογικών δεικτών στη διάγνωση καρδιακών παθήσεων, καρκίνων και μολυσματικών παραγόντων.

Κατάλυση

Χρησιμοποιούνται ως καταλύτες σε διάφορες χημικές αντιδράσεις. Η επιφάνεια ενός νανοσωματιδίου χρυσού μπορεί να χρησιμοποιηθεί για εκλεκτική οξείδωση ή σε ορισμένες περιπτώσεις η επιφάνεια μπορεί να μειώσει την αντίδραση (οξείδια του αζώτου). Χημικά νανοσωματίδια αναπτύσσονται για εφαρμογές κυψελών καυσίμου.[31]

Νανοσωματίδια χρυσού στη βιολογική ύλη

Βιοσυμβατότητα και τοξικότητα

Έχουν δημοσιευθεί πολυάριθμες μελέτες σχετικά με τις επιδράσεις του μεγέθους και του επιφανειακού φορτίου των GNPs στη βιοσυμβατότητα, την τοξικότητα, τη βιοδιανομή και τη διάρκεια ζωής τους στο αίμα. Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών είναι κάπως ασαφή, καθώς δεν υπάρχει ούτε ιδανικό μέγεθος ούτε επιφανειακό φορτίο για ένα GNP, που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για τη χορήγηση ενός χημικοθεραπευτικού παράγοντα ή για την ενίσχυση της

ευαισθητοποίησης κατά την ακτινοβολία. Η γενική συναίνεση για το μέγεθος είναι ότι τα GNPs των ενδιάμεσων μεγεθών (20 και 60 nm) έχουν μέγιστη πρόσληψη στα κυττάρων. Ωστόσο, έχουν αποδειχθεί ότι είναι προβληματικά, όταν πρόκειται για διείσδυση στον όγκο [12]. Ανεξάρτητα από την επιλεγμένη μέθοδο, η επιφανειακή επικάλυψη που εφαρμόζεται σε GNPs μπορεί επίσης να βελτιώσει το χρόνο που τα GNP παραμένουν στην κυκλοφορία του πλάσματος, καθώς και την κυτταρική τους πρόσληψη[26]. Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ευρέως ότι τα νανοσωματίδια πρέπει να «κρύβονται» από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή, προκειμένου να έχουν ακόμη την ευκαιρία να φτάσουν στο στόχο τους, αποφεύγοντας με αυτόν τον τρόπο την ανίχνευση και την καταστροφή τους. Για το λόγο αυτό, μικρές αλυσίδες υδρογονανθράκων, κυρίως πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG), χρησιμοποιούνται για επικάλυψη, προκειμένου να βελτιωθεί η βιοσυμβατότητα των GNPs και να αποφευχθεί ο σχηματισμός συσσωματωμάτων. Η πολυαιθυλενογλυκόλη τροποποιεί αποτελεσματικά τη φαρμακοκινητική μιας ποικιλίας φαρμάκων, συμπεριλαμβανομένων των GNPs και βελτιώνει δραματικά την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου μειώνοντας την κυτταροτοξικότητα και την ανοσογονικότητα, καθώς και αυξάνει το χρόνο κυκλοφορίας του πλάσματος και τη δυνατότητα στόχευσης κυττάρων όγκου[26].

Η εφαρμοζόμενη επικάλυψη επιτρέπει επίσης τον έλεγχο της επιφανειακής φόρτισης των NPs, καθώς αυτό έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει τον χρόνο ζωής τους και τη δυναμική κυτταρικής πρόσληψης[32]. Τέλος, η εφαρμοζόμενη επίστρωση μπορεί επίσης να επηρεάσει την τοξικότητα του GNP, η οποία δεν εξαρτάται μόνο από το μέγεθος, το επιφανειακό φορτίο και τη συγκέντρωση του GNP, όπως συζητήθηκε προηγουμένως εδώ. Έχουν δημοσιευθεί αρκετές ανασκοπήσεις σχετικά με τη βιοσυμβατότητα των GNPs, την νεφρική τους κάθαρση και τη μακροπρόθεσμη συσσώρευσή τους στους ιστούς, καθώς και με τον χειρισμό των GNPs με τρόπο ώστε να ασκούν το μέγιστο αποτέλεσμα, το οποίο μπορεί να επιτευχθεί κυρίως μέσω των εφαρμοζόμενων επικαλύψεων σε αυτούς [26].

GNPs στην ακτινοθεραπεία (IR)

Ιστορική αναδρομή

Για πρώτη φορά παρατηρείτε από τον Spiers [7] ότι τα στοιχεία υψηλού ατομικού αριθμού (Z), όπως το ιώδιο και το βάριο, δεν είναι μόνο χρήσιμα ως ιατρικοί παράγοντες απεικόνισης, αλλά έχουν επίσης υψηλότερους συντελεστές απορρόφησης ενέργειας σε σύγκριση με τους μαλακούς ιστούς. Ως εκ τούτου, η παρουσία τους σε κύτταρα-στόχο, μια περιοχή όγκου για παράδειγμα, θα πρέπει να αυξήσει την αποτελεσματική δόση που παρέχεται σε αυτήν την περιοχή, ανοίγοντας έτσι το δρόμο για τη χρήση στοιχείων High-Z σε ακτινοθεραπεία. Το ενδιαφέρον για αυτό το πεδίο έχει αυξηθεί σημαντικά την τελευταία δεκαετία, με ιδιαίτερη έμφαση στα GNPs, τα οποία είναι εξαιρετικοί απορροφητές ακτινοβολίας, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως [7].

Ένα από τα πρώτα πειράματα που διεξήχθησαν ήταν από τον Hainfeld, όπου αποδέχθηκε η δυνατότητα των GNPs ως ραδιοευαισθητοποιητές, επιδεικνύοντας ουσιαστικές βελτιώσεις στον έλεγχο του μεγέθους του όγκου σε ποντίκια που έλαβαν ακτινοθεραπεία λεπτά μετά τη χορήγηση των GNPs. Η μελέτη αυτή προκάλεσε περαιτέρω θεωρητική και πειραματική εργασία σχετικά με τις επιδράσεις ευαισθητοποίησης της ακτινοβολίας των GNPs, με πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Η ραδιοευαισθητοποίηση έχει αποδειχθεί για διάφορους τύπους ακτινοβολίας, συμπεριλαμβανομένων των φωτονίων keV από πηγές kilovoltage (kV), καθώς και φωτονίων megavoltage (MV), και των βαρέων φορτισμένων σωματιδίων.

Πειραματικές μελέτες που χρησιμοποίησαν GNPs διαφορετικού μεγέθους, σχήματος και επιφανειακών επικαλύψεων, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οδήγησαν σε αντικρουόμενα αποτελέσματα σχετικά με τις ραδιοευαισθητοποιητικές επιδράσεις των GNPs. Αυτές οι επιδράσεις φαίνεται επίσης να εξαρτώνται από το σύστημα ζωικού μοντέλου που μελετάται, με διαφορετικά αποτελέσματα μεταξύ των κυτταρικών σειρών *in vitro*[26].

GNPs and radiosensitization mechanisms

Κατά την έκθεση των βιολογικών συστημάτων σε ιονίζουσα ακτινοβολία, ενεργοποιείται μια πληθώρα μηχανισμών. Αυτοί οι μηχανισμοί μπορούν να διαχωριστούν στους φυσικούς, χημικούς, βιολογικούς και διαφέρουν στον χρόνο που απαιτείται για την απόκτηση των αποτελεσμάτων τους. Στον φυσικό μηχανισμό, η ιονίζουσα ακτινοβολία αλληλεπιδρά με βιομόρια, προκαλώντας ιονισμό και τη διέγερση αυτών, καθώς και τον σχηματισμό ελεύθερων ριζών. Το DNA μπορεί να θεωρηθεί ως ένας βασικός στόχος, ο οποίος θα καθορίσει εάν τα αποτελέσματα της ακτινοβολίας είναι επιτυχημένα ή όχι. Με την απορρόφηση επαρκούς ενέργειας, τα εκτοξευόμενα ηλεκτρόνια κινούνται περαιτέρω και συγκρούονται με τα επόμενα άτομα, προκαλώντας μια σειρά καταστάσεων ιονισμού. Στον χημικό μηχανισμό, οι ελεύθερες ρίζες και τα ηλεκτρόνια χαμηλής ενέργειας υφίστανται αντιδράσεις για την αποκατάσταση της ισορροπίας του κυτταρικού φορτίου. Τέλος, στον βιολογικό μηχανισμό ενεργοποιείται μια σειρά κυτταρικών διεργασιών για την αποκατάσταση βλαβών από ακτινοβολία.

Η «υπογραφή» της IR είναι ο σχηματισμός συσσωρευμένων και εντοπισμένων σημείων βλάβης του DNA, ειδικά στην περίπτωση της ακτινοβολίας σωματιδίων. Η σύνθετη βλάβη που προκαλείται από το IR συσχετίζεται συνήθως με την αποτυχία της επιδιόρθωσης του DNA που οδηγεί σε απόπτωση κυττάρων ή γενωμική αστάθεια.

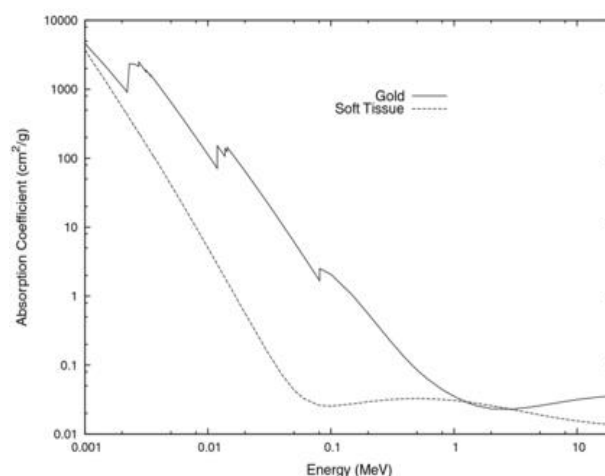
Αρχικά θεωρήθηκε ότι τα GNPs θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν αποκλειστικά για φυσική "ενίσχυση της δόσης" με τη χρήση ενισχυμένης φωτοηλεκτρικής απορρόφησης του Au και παραγωγής ενός μεγάλου αριθμού εντοπισμένων ηλεκτρονίων που βλάπτουν τα πάντα στην περιοχή τους. Ωστόσο, τόσο οι χημικοί όσο και οι βιολογικοί παράγοντες συμβάλλουν στη ραδιοευαισθητοποίηση, όπως αποδεικνύεται από πειραματικά δεδομένα που υποδεικνύουν τον ρόλο των GNP στη διαμόρφωση και των τριών μηχανισμών

αλληλεπιδράσεων ακτινοβολίας. Τα GNPs έχουν προταθεί ως καινοτόμα ραδιοευαισθητοποιητικά, κυρίως λόγω του ισχυρού φωτοηλεκτρικού συντελεστή απορρόφησης τους [26].

Φυσικοί μηχανισμοί

Η βασική ιδέα πίσω από την ανάπτυξη των GNPs ως ραδιοευαισθητοποιητών βασίζεται στις διαφορές στην απορροφητική ενέργεια μεταξύ χρυσού και μαλακών ιστών, καθώς ο χρυσός είναι στοιχείο με υψηλό Z (Εικ. 11), επιτρέποντας έτσι τη βελτίωση της φυσικής δόσης παρουσία του Au. Αυτή η ενίσχυση λειτουργεί καλύτερα για keV φωτόνια, αντί για MeV φωτόνια, και αποδείχθηκε για πρώτη φορά in vivo με τη χρήση 1,9 nm GNPs που εγχύθηκαν ενδοφλέβια σε ποντίκια που φέρουν υποδόριο μαστικό καρκίνωμα.

Τα φωτόνια αλληλεπιδρούν όπως είδαμε πιο πάνω με την ύλη, μέσω τεσσάρων κύριων διεργασιών: 1) παραγωγή ζεύγους, 2) σκέδαση Compton και 3) φωτοηλεκτρικό φαινόμενο, μέσω σκέδασης Rayleigh. Η παραγωγή ζεύγους συμβαίνει σε υψηλές ενέργειες φωτονίων, περίπου 1,22MeV, όπου η ενέργεια προσπίπτοντος φωτονίου υπερβαίνει το διπλάσιο της μάζας του ηλεκτρονίου, όμως σε τόσο μεγάλες ενέργειες ο χρυσός χάνει τις ευεργετικές ιδιότητες.[7]



Εικ.11 Διάγραμμα συντελεστή απορρόφησης σε συνάρτηση με την ενεργεία της ακτινοβολίας για μαλακό ιστό και τον χρυσό. [7]

Για τα φωτόνια άνω των 500 keV, παρατηρείται όπως είδαμε και πιο πάνω σκέδαση του Compton. Ένα φωτόνιο προσκρούει σε ένα ασθενώς δεσμευμένο ηλεκτρόνιο του ατόμου στόχου. Σε αυτή τη διαδικασία, μια ποσότητα ενέργειας μεταφέρεται από το φωτόνιο στο ηλεκτρόνιο και το ηλεκτρόνιο εκτοξεύεται από το άτομο. Η σκέδαση Compton έχει ως αποτέλεσμα την εκ νέου διέγερση και την παραγωγή περισσότερων ηλεκτρονίων Compton, οδηγώντας σε ένα επακόλουθο φωτοηλεκτρικό φαινόμενο. Η επίδραση του φαινομένου Compton είναι ανάλογη του ατομικού αριθμού Z.

Σε αντίθεση με τη σκέδαση Compton, το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο, είναι η κυρίαρχη διαδικασία αλληλεπίδρασης για φωτόνια με ενέργεια μεταξύ 10 και 500 keV. Ένα φωτόνιο απορροφάται από ένα δεσμευμένο ηλεκτρόνιο, οδηγώντας στην εκτόξευση ενός ηλεκτρονίου από το τροχιακό στο οποίο βρίσκεται. Με αποτέλεσμα να δημιουργείται μια κενή θέση σε στις στιβάδες K, L, ή M. Καθώς τα ηλεκτρόνια της εξωτερικής στιβάδας μετακινούνται για να γεμίσουν την κενή θέση, παράγονται φωτόνια χαμηλότερης ενέργειας (φθορισμού) και απελευθερώνεται ένας «καταρράκτης» δευτερογενών ηλεκτρονίων, τα ηλεκτρόνια Auger. Η διατομή ακτίνων X, η οποία αναφέρεται στην πιθανότητα ενός δεδομένου υλικού που

αλληλεπιδρά με την ακτινοβολία, εξαρτάται από τον ατομικό αριθμό (Z) του αλληλεπιδρώντος ατόμου. Για το φωτοηλεκτρικό αποτέλεσμα είναι ανάλογο Z^3 και γι' αυτό το λόγο τα GNPs αποτελούν έναν σημαντικό υποψήφιο για την αύξηση της ραδιοευαισθησίας.

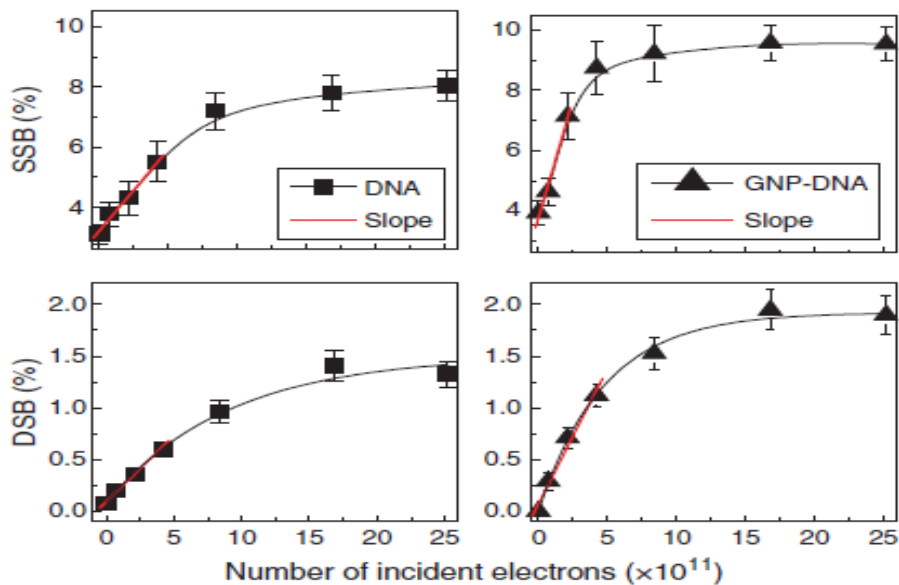
Έχει επίσης αποδειχθεί ότι τα ηλεκτρόνια χαμηλής ενέργειας διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην ενίσχυση της δόσης από τα GNPs (τα οποία αναλύονται λεπτομερώς αργότερα στο χειρόγραφο). Τα πειραματικά ευρήματα από διάφορες μελέτες, υποδηλώνουν ότι τα δευτερογενή ηλεκτρόνια χαμηλής ενέργειας που παράγονται από τα GNPs είναι το αποτέλεσμα της εντοπισμένης εναπόθεσης ενέργειας κοντά στο νανοσωματίδιο, οδηγώντας σε ενίσχυση της δόσης και ραδιοευαισθητοποίηση[7; 26].

Χημικοί μηχανισμοί

Τα GNPs εμπλέκονται στους «χημικούς μηχανισμούς» της ιοντίζουσας ακτινοβολίας μέσω αντιδράσεων με τις ελεύθερες ρίζες, η οποίες επιτρέπουν την δημιουργία παραγόντων που καταστρέφουν το DNA.

Ανάλογα με τον κυτταρικό εντοπισμό των GNPs, υπάρχουν δύο κύριοι χημικοί μηχανισμοί που ενεργοποιούνται κατά την έκθεση στην ακτινοβολία[33], οι οποίοι είναι: η ραδιοχημική ευαισθητοποίηση και αποδυνάμωση του DNA από την παραγωγή ελευθέρων ριζών και η αυξανόμενη ριζική κατάλυση από την επιφάνεια των GNPs. Ενώ οι δύο μηχανισμοί μπορούν να οδηγήσουν σε αυξημένη ραδιοευαισθητοποίηση, ο πρώτος μηχανισμός απαιτεί τον πυρηνικό εντοπισμό των GNPs και την δέσμευση τους στο DNA, αλλά η πλειονότητα των GNPs που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα περιορίζονται συνήθως στο κυτταρόπλασμα.

Παρόλα αυτά, και οι δύο διαδικασίες παρέχουν κρίσιμες πληροφορίες σχετικά με τη χημική ραδιοευαισθητοποίηση, οι οποίες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τον σχεδιασμό νανοσωματιδίων που θα μπορούσαν να επιτύχουν τη μέγιστη δυνατή αύξηση της δόσης. Ηλεκτρόνια με ενέργεια κάτω από το όριο ιονισμού (π.χ. 10 eV), τα οποία επίσης αναφέρονται ως ηλεκτρόνια χαμηλής ενέργειας (LEE), παίζουν σημαντικό ρόλο ως δευτερογενή ηλεκτρόνια για την ραδιοευαισθητοποίηση. Πιο συγκεκριμένα, δείχτηκε ότι τα ηλεκτρόνια σε αυτές τις ενέργειες δεν παράγουν σημαντικά δευτερεύοντα ηλεκτρόνια ώστε να προκαλέσουν άμεσα ζημιά και κατ' επέκταση αύξηση της ραδιοευαισθησίας, αλλά μπορούν να προκαλέσουν μεγάλη ζημιά στο DNA έμμεσα. Πιο συγκεκριμένα τα LEEs, τα οποία παράγουν βραχύβια αρνητικά ιόντα αποδυναμώνουν τους δεσμούς υδρογόνου στο DNA [34]. Έχει επίσης διαπιστωθεί, ότι οι αλλαγές ραδιοευαισθητοποίησης εξαρτώνται από το μέγεθος και το φορτίο των GNPs [10]. Ως αποτέλεσμα, η στενή δέσμευση των μικρών θετικά φορτισμένων GNPs (5 nm) στις φωσφορικές ομάδες του DNA θα μπορούσε να οδηγήσει σε σοβαρή βλάβη του DNA επιτρέποντας έτσι την πλήρη εκμετάλλευσή τους προς χημική ενίσχυση.



Εικ.12 Οι καμπύλες απόκρισης έκθεσης για SSB και DSB προκλήθηκαν από ηλεκτροπληξία 100eV σε DNA και DNA με GNP [34]

Όσον αφορά τον δεύτερο μηχανισμό, ένας αυξανόμενος αριθμός μελετών έχει αναφέρει ότι τα GNPs είναι ικανά να καταλύουν τις χημικές αντιδράσεις λόγω της ηλεκτρονικά ενεργής επιφάνειάς τους [35]. Συγκεκριμένα, τα μικρά GNPs μπορούν να παρουσιάσουν μεγάλη καταλυτική δραστηριότητα και μεταφορά ηλεκτρονίων από την επιφάνειά τους σε ομάδες O_2 , δημιουργώντας έτσι ελεύθερες ρίζες.

Ως αποτέλεσμα, η μεταβολή στην ηλεκτρονική διαμόρφωση των επιφανειακών ατόμων επιτρέπει την παραγωγή ριζών από την αντιδραστική επιφάνεια των GNPs. Η καταλυτική επιφανειακή δραστηριότητα έχει δείξει, ότι σε κυτταρικά συστήματα για 15 nm GNPs αυξάνουν τα κυτταροτοξικά αποτελέσματα και σε συνδυασμό με φωτοδυναμική θεραπεία, αυξάνουν την παραγωγή δραστικών οξειδωτικών ριζών (ROS) [36]. Η αυξημένη παραγωγή ROS έχει επίσης καταδειχθεί *in vitro* απουσία ακτινοβολίας.

Σε συνδυασμό με το IR, οι καταλυτικές ιδιότητες των GNPs ενισχύονται περαιτέρω με την αλληλεπίδραση με το εξαιρετικά δραστικό περιβάλλον λόγω της ακτινοβολίας ακτίνων X. Η ενίσχυση στην παραγωγή ROS αρχικά συσχετίστηκε με δευτερογενή εκπομπή ηλεκτρονίων και φωτονίων από GNPs, που προκαλούν ραδιόλυση νερού. Η αξιολόγηση της σχέσης μεταξύ μεγέθους σωματιδίων και παραγωγής ROS δείχνει ότι τα μικρότερα GNPs με μεγαλύτερη επιφάνεια, παράγουν αυξημένα επίπεδα ROS, επαληθεύοντας περαιτέρω τον καταλυτικό ρόλο της επιφάνειας του GNPs.

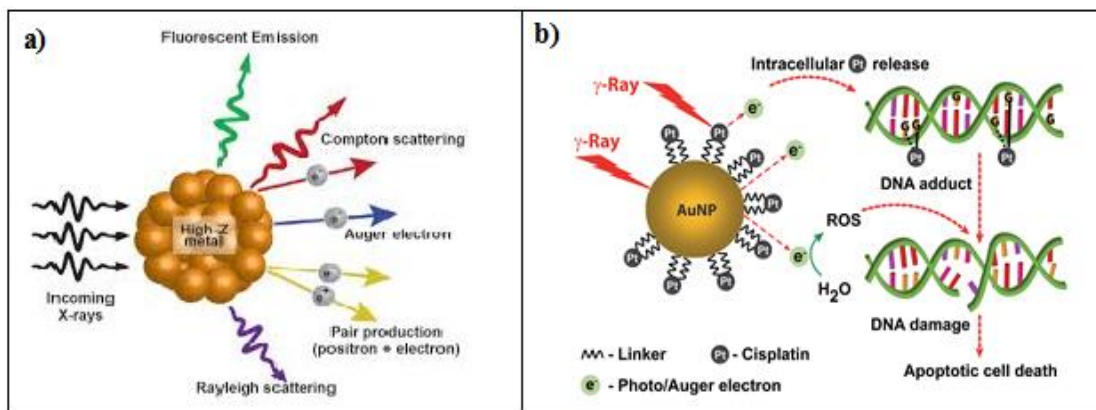
Η χημική αλληλεπίδραση των GNPs με κυτταρικά μακρομόρια θα μπορούσε ενδεχομένως να εξηγήσει τον μηχανισμό με τον οποίο τα GNPs προκαλούν οξειδωτικό στρες. Παρά το μεγάλο αριθμό στοιχείων που υποδηλώνουν το οξειδωτικό στρες να είναι ο κεντρικός μηχανισμός της ραδιοευαισθητοποίησης του GNPs, ένας μικρός αριθμός άρθρων υποδηλώνουν ότι τα GNPs δρουν ως αντιοξειδωτικά, υποδεικνύοντας και ότι η ενεργοποίηση της επιφάνειας παίζει σημαντικό ρόλο στην ομοιοστάση.

Βιολογικοί μηχανισμοί

Οι κύριοι μηχανισμοί που αναγνωρίστηκαν ως εμπλεκόμενοι στη βιολογική απόκριση των κυττάρων στη ραδιοευαισθητοποίηση του νανοσωματιδίου χρυσού είναι η παραγωγή ROS και αύξηση του οξειδωτικού στρες όπως είδαμε και πιο πάνω, το οποίο με τη σειρά του οδηγεί στην επαγωγή βλάβης του DNA.

Ο κύριος μηχανισμός του κυτταρικού θανάτου που προκαλείται από την ακτινοβολία είναι βλάβη του DNA, από ελεύθερες ρίζες κυρίως από OH^\cdot που σχηματίζεται λόγω της ραδιόλυσης του νερού. Οι ρίζες OH^\cdot όπως είδαμε και πιο πάνω αντιδρούν εύκολα με βιολογικά μόρια, συμπεριλαμβανομένου του κυτταρικού DNA, για την έναρξη της επαγόμενης από την ακτινοβολία απόπτωσης μέσω της δημιουργίας αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS). Τα ROS τυπικά περιλαμβάνουν τη ρίζα υπεροξειδίου (O_2^\cdot), το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και τη ρίζα υδροξυλίου (OH^\cdot) η οποία προκαλεί κυτταρική βλάβη συμπεριλαμβανομένης της οξείδωσης λιπιδίων, πρωτεϊνών και DNA που καταλήγει σε αποπτωτικό και νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο λόγω μιτοχονδριακής θραύσης.

Τα μεταλλικά νανοσωματίδια είναι γνωστό ότι προκαλούν την παραγωγή ROS που οδηγεί σε οξειδωτικό στρες ακόμα και με την απουσία ακτινοβολίας. Ειδικά τα GNP έχει αναφερθεί ότι επάγουν σημαντικά επίπεδα ROS που προκαλούν οξειδωτική βλάβη στο DNA σε συγκεντρώσεις που δεν μεταβάλλουν τη δραστηριότητα διάφορων μικροργανιδίων μέσα στο κύτταρο όπως τα μιτοχόνδρια. Υπάρχουν μερικά βιολογικά μοντέλα σχετικά με την αναλογία ενίσχυσης της δόσης ακτινοβολίας. Η επίδραση ενίσχυσης της δόσης, για τη θανάτωση των καρκινικών κυττάρων είναι συνήθως μικρότερη των 2 Gy και για GNP μεγέθους άνω των 2 nm με διάφορες επικαλύψεις. Η ευαισθητοποίηση σε τέτοια μοντέλα τοπικού αποτελέσματος εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την θέση του GNPs στα κύτταρα.[26] Σε γενικές γραμμές, η επιβίωση των κυττάρων μειώνεται, με την αυξημένη κυτταρική πρόσληψη των GNPs και όσο πλησιέστερα GNPs βρίσκονται στον πυρήνα των κυττάρων-στόχων, τόσο μεγαλύτερο είναι το αποτέλεσμα[26].



Εικ.13 α) Φυσικοί μηχανισμοί ενίσχυσης της ακτινοβολίας από τα νανοσωματίδια χρυσού Αλληλεπίδραση ακτινοβολίας με στοιχεία υψηλού Z (χρυσός) και παραγωγή δευτερογενών ηλεκτρονίων και φωτονίων. β) Χημικοί και βιολογικοί μηχανισμοί. Λειτουργία χημικών και βιολογικών μηχανισμών, δημιουργία βλαβών DNA με τελικό αποτέλεσμα καταστροφή του κυττάρου

Κεφάλαιο Β

Πειραματικό μέρος: Οι σειρές πειραμάτων που ακολούθησαν μετά την κατανόηση της θεωρίας περί νανοσωματιδίων χρυσού στην ακτινοθεραπεία και τα διάφορα αποτελέσματα που λάβαμε

Πειραματικό μέρος (Μέθοδοι και Υλικά)

Εισαγωγή

Κυτταρική καλλιέργεια και ανακαλλιέργεια

Σε αυτό το κομμάτι τις διπλωματικής εργασίας, θα αναλυθούν τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν και οι μέθοδοι, για την υλοποίηση των κυτταρικών καλλιεργειών, καθώς και η μέθοδος που ακολουθήθηκε.

Υλικά

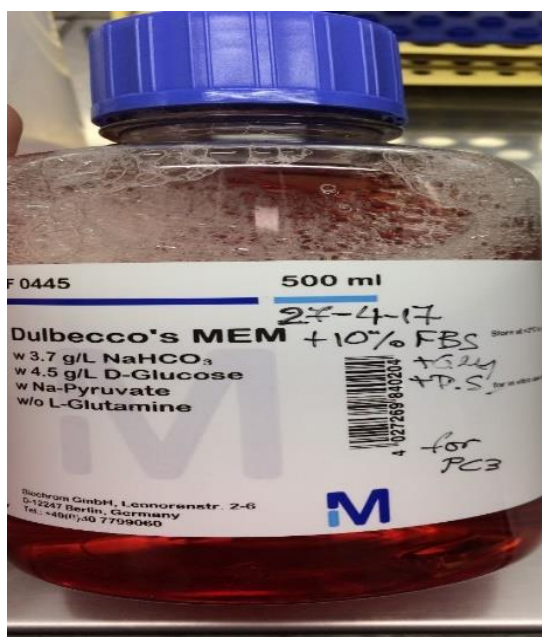
Καρκινική σειρά κυττάρων PC3

Ο καρκίνος του προστάτη (PC, prostate cancer) είναι η πιο κοινή κακοήθεια στους άνδρες και η δεύτερη κύρια αιτία θανάτων που σχετίζονται με τον καρκίνο. Η πλειοψηφία των καρκίνων του προστάτη ταξινομούνται ως αδενοκαρκινώματα που χαρακτηρίζονται από απουσία βασικών κυττάρων και ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό κακοήθων όγκων.

Επειδή ο καρκίνος του προστάτη είναι μια εξαιρετικά διαδεδομένη ασθένεια, έχει αποτελέσει το επίκεντρο σημαντικών ερευνητικών δραστηριοτήτων για πολλά χρόνια. Έχουν δημοσιευθεί πολυάριθμα άρθρα μελετώντας τον PC και χρησιμοποιώντας διάφορα μοντέλα, συμπεριλαμβανομένων καθιερωμένων κυτταρικών σειρών που προέρχονται από μεταστατικούς ανθρώπινους καρκίνους και μοντέλα ποντικών γενετικά τροποποιημένων PC. Μεταξύ αυτών των μοντέλων, οι κυτταρικές σειρές είχαν τη μακρύτερη ιστορία και χρησιμοποιήθηκαν ευρύτερα στις δημοσιεύσεις. Δύο από τις συχνότερα χρησιμοποιούμενες κυτταρικές σειρές είναι τα κύτταρα LNCaP και PC3, που προέρχονται από μεταστάσεις λεμφαδένων και οστών αντίστοιχα.

Για πολλά χρόνια, αυτές οι δύο κυτταρικές σειρές έχουν χρησιμοποιηθεί από τους ερευνητές για να αντιπροσωπεύουν διαφορετικά φάσματα του PC με LNCaP ως ήπιες μορφές και οι PC3 ως επιθετική μορφή του PC. Έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για να αντιπροσωπεύουν ανδρογόνου-εξαρτώμενους και ανθεκτικούς σε ευνουχισμό όγκους, αντιστοίχως.

Για τις κυτταρικές καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν: το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε είναι το Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Εικ. 11) το οποίο περιείχε 10% FBS, και ορό πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης (P.S), διάλυμα Phosphate Buffer Solution (PBS) περιεκτικότητας 10% κατ όγκο και τρυψίνη (trypsin)[37].



Εικ.14 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) το οποίο περιέχει 10% FBS, και ορό πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης (P.S),

Μέθοδος

Πρώτη καλλιέργεια

Για την πραγματοποίηση της κυτταρικής καλλιέργειας δράσαμε ως εξής: αφού πήραμε τη κυτταρική σειρά PC-3, από το υγρό άζωτο και περιμέναμε μέχρις ότου να ξεπαγώσουν τα κύτταρα, τα τοποθετήσαμε μέσα σε φλάσκα, με τη βοήθεια μιας πιπέτας και προσθέσαμε το θρεπτικό υλικό (5ml) . Στη συνέχεια τα τοποθετήσαμε μέσα στον κλίβανο που παρείχε σταθερή θερμοκρασία 37 °C, 5% CO₂ και κορεσμένη σε υδρατμούς ατμόσφαιρα και τα αφήσαμε να μεγαλώσουν για μια μέρα.

Ανακαλλιέργεια

Την επόμενη μέρα αφού τα κύτταρα έφτασαν σε ένα ικανοποιητικό επίπεδο αδειάσαμε το θρεπτικό υλικό και ξεπλύναμε με PBS (3 ml) δυο φορές , βάλαμε Τρυψίνη EDTA (0,7 ml), ώστε τα κύτταρα να ξεκολλήσουν από τον πάτο της φλάσκας και τα επανατοποθετήσαμε στον κλίβανο για 10-12 λεπτά. Αφού τα κύτταρα ξεκόλλησαν προσθέσαμε νέο θρεπτικό υλικό (7 ml).

Στη συνέχεια παίρνουμε μια νέα φλάσκα και βάζουμε 3ml θρεπτικού υλικού και έπειτα μεταφέρουμε 2ml (κύτταρα με θρεπτικό υλικό) από την πρώτη φλάσκα, έχοντας έτσι συνολικά 2 φλάσκες με νέο υλικό και κύτταρα από 5 ml η κάθε μια. Τέλος τις βάζουμε ξανά πίσω στον κλίβανο. Αξίζει βέβαια να προσθέσουμε ότι όλες αυτές οι διαδικασίες διαδραματίζονται μέσα σε στείρο χώρο καθώς και επαναλαμβάνονται κάθε δυο με τρεις ημέρες.

Ακτινοβόληση κυττάρων

Πηγή γ-ακτινοβόλησης

Η ακτινοβόληση των κυττάρων πραγματοποιείται μέσω μια πηγής κοβάλτιου (^{60}Co) GammaCell 220 Irradiator (Atomic Energy Ltd, Ottawa, Canada) σε θερμοκρασία δωματίου η οποία είναι θωρακισμένη από ένα παχύ στρώμα μόλυβδου (Pb). Ο ρυθμός δόσης ήτανGy/min.

(ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ)

Όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα η αρχική ενεργότητα της πηγής ήταν $R(0)=5470\text{ Ci}$ και η ημερομηνία κατασκευής της είναι Ιανουάριος του 1974, ο χρόνος ημιζωής του ^{60}Co είναι $t_{1/2}=5.27\text{ years}=1923\text{ days}$

Παραγωγίζοντας τον νομό των ραδιενεργών διασπάσεων

$$N(t) = N(0) \cdot e^{-\lambda t} \quad \text{με } \lambda = 1/\tau = \frac{t_{1/2}}{\ln 2} \text{ (σταθερα διασπασης)} \quad (2)$$

Προκύπτει εύκολα ο τύπος υπολογισμού της ενεργότητας

$$R(t) = \frac{dN(t)}{dt} = -N(0)\lambda \cdot e^{-\lambda t} = R(0) \cdot e^{-\lambda t} = R(0) \cdot e^{-t/\tau} \quad (3)$$

Επομένως ο ο τελικός τύπος για την ενεργότητα θα είναι

$$R(t) = R(0) \cdot e^{-t/\tau} \quad (4)$$

Για να μπορέσουμε να υπολογίσουμε την ενεργότητα της πηγής, μας μένει να προσμετρήσουμε το χρονικό διάστημα από τον Ιανουάριο του 1974 μέχρι 10 Μαρτίου του 2017, όπου πραγματοποιήθηκε το πρώτο πείραμα ακτινοβόλησης. Ο αριθμός των ημερών από την 1/1/1974 -10/3/2017 είναι $t=15774$

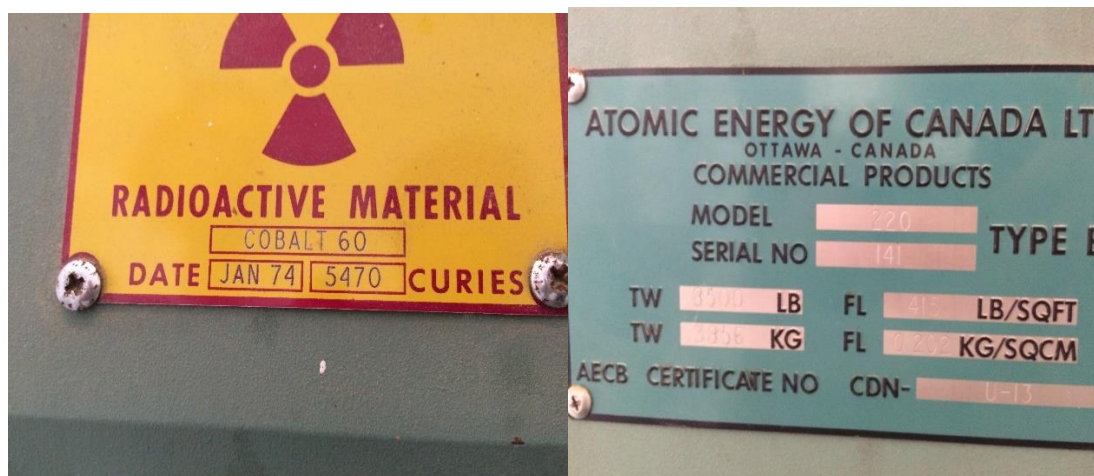
Έτσι η ενεργότητα της πηγής είναι

$$R = 5470 e^{-15774/(1923/\ln 2)} = 5470 \cdot 3.39 \cdot 10^{-3} \text{ Ci} \quad (5)$$

$$R = 18.56 \text{ Ci} \quad (6)$$

Μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι από την ημερομηνία κατασκευής η ενεργότητα του κοβάλτιου έχει πέσει δραματικά, κάτι που μάλιστα βοηθάει για ακτινοβόληση κυττάρων. Η μεγάλη ενεργότητα, χρειάζεται πολύ μικρούς χρόνους έκθεσης και επομένως θα παράγεται μεγαλύτερο σφάλμα στην δόση που λαμβάνουν τα κυτταρα.

Αν αναλογιστούμε, πως 1Gy αντιστοιχεί σε 6 min έκθεσης για R=18.56Ci τότε για την ενεργότητα 5470 Ci, το παραμικρό δευτερόλεπτο αυξάνει το σφάλμα.



Εικ.15: Στις παραπάνω εικόνες βλέπουμε τα στοιχεία της ραδιενεργής πηγής που χρησιμοποιήσαμε στα πειράματα για την ακτινοβόληση των κυττάρων με σημαντικότερα στοιχεία την ενεργότητα που είχε όταν φτιάχτηκε και την ημερομηνία κατασκευής της, καθώς και άλλες πληροφορίες όπως μέρος παραγωγής και το Serial Number τα οποία βέβαια δεν είναι ευδιάκριτα στην δεύτερη εικόνα.

Πειραματική διαδικασία ακτινοβόλησης

Τα κύτταρα τα οποία τα έχουμε ανακαλλιεργήσει την προηγούμενη ημέρα, τα τοποθετούμε στον θάλαμο ακτινοβόλησης. Σφραγίζουμε το θάλαμο και τα κατεβάζουμε στην πηγή κοβαλτίου με τη βοήθεια του χειριστηρίου. Η δόση που θα απορροφήσουν είναι ανάλογη του χρόνου που θα παραμείνουν τα κύτταρα μέσα στο θάλαμο (γνωρίζουμε ότι η δόση 1 Gy αντιστοιχεί σε 6 min μέσα στο θάλαμο). Έπειτα τα βγάζουμε και ξεκινάμε την επεξεργασία τους για να μπορέσουν να αναλυθούν. Σημαντικό επίσης είναι να έχουμε πάντα μαζί μας και μια φλάσκα με κύτταρα τα οποία δεν ακτινοβολούνται, αλλά παίζουν το ρόλο του δείγματος ελέγχου/αναφοράς (control). Το control δείγμα δεν μένει ποτέ στον κλίβανο καθώς θέλουμε να βρίσκεται στις ίδιες ακριβώς συνθήκες με τα δείγματα προς ακτινοβόληση.

Επεξεργασία μετά την ακτινοβόληση (Fixation)

Μετά την ακτινοβόληση παίρνουμε τα κύτταρα και τα βάζουμε στον κλίβανο των 37°C για 20 με 30 λεπτά, ώστε να έρθουν σε κατάσταση ισορροπίας μετά τη διαταραχή που υπέστησαν από την ακτινοβολία και να φτάσει ένας «καλός» αριθμός κυττάρων στην μίτωση. Τα κύτταρα που τη στιγμή της ακτινοβόλησης ήταν στην μιτωτική φάση θα προχωρήσουν σε επόμενες φάσεις του κυτταρικού κύκλου τους. Με το πέρας των 20 min, τα βγάζουμε από τον κλίβανο και αδειάζουμε το θρεπτικό υλικό. Προσθέτουμε νέο θρεπτικό υλικό (5 ml) και colcemide σε αναλογία 1:100 δηλαδή στα 5 ml θρεπτικού υλικού βάζουμε 50μl colcemide. Το colcemide είναι ένα διάλυμα, το οποίο έχει την ιδιότητα να σταματάει και να διατηρεί τα

κύτταρα στη μιτωτική τους φάση. Αφού τελειώσουμε τοποθετούμε τα κύτταρα πάλι πίσω στον κλίβανο για ένα χρονικό διάστημα μέχρι να φτάσουν στην μίτωση. Το χρονικό διάστημα αυτό εξαρτάται από τα ίδια τα κύτταρα ή την κυτταρική σειρά που χρησιμοποιούμε. Για παράδειγμα τα PC-3 χρειάζονται ~3 ώρες μέσα στον κλίβανο μέχρι να έρθουν στην μίτωση.

Ένας εμπειρικός κανόνας για να καταλάβουμε αν τα κύτταρα είναι στη μίτωση είναι, ότι ξεκολλούν από τον πατώ της φλάσκας και αρχίζουν να επιπλέουν στο θρεπτικό υλικό και έτσι μπορούμε να τα παρατηρήσουμε με τη βοήθεια του μικροσκοπίου. Αυτό βέβαια δεν έχει τόσο μεγάλη ισχύ για τα PC-3, τα οποία έχουν την τάση να παραμένουν κολλημένα στον πυθμένα της φλάσκας.

Σπάσιμο μεμβρανών και απελευθέρωση χρωμοσωμάτων

Με το πέρας των τριών ωρών στον κλίβανο και αφού τα κύτταρα έχουν φτάσει πλέον στην μίτωση, τα βγάζουμε και τα τοποθετούμε στο θάλαμο αποστείρωσης. Στη συνέχεια απορροφούμε το προκείμενο διάλυμα και το βάζουμε μέσα σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες. Ξεπλένουμε με PBS (3 ml) τη φλάσκα και το προσθέτουμε κι αυτό στη φιάλη. Έπειτα αφού τα κύτταρα δεν έχουν ξεκολλήσει από τον πάτο της φλάσκας βάζουμε τρυψίνη (0,7ml) και βάζουμε τη φλάσκα ξανά στο κλίβανο για 10 min. Αφού ξεκολλήσουν τα κύτταρα τα παίρνουμε και αυτά με τη βοήθεια μιας πιπέτας και τα προσθέτουμε και αυτά μέσα στο προκείμενο.

Στη συνέχεια παίρνουμε τη φιάλη που περιέχει το θρεπτικό υλικό τα κύτταρα και το PBS και τα πάμε για φυγοκέντριση. Αφού τα τοποθετήσουμε στο μηχάνημα φυγοκέντρισης, τα ρυθμίζουμε να φυγοκεντριστούν για 1200-1250 rpm (στροφές/s) για 8 λεπτά. Παρατηρούμε ότι τα κύτταρα έχουν δημιουργήσει στο κάτω μέρος της φιάλης ένα λευκό ίζημα. Αδειάζουμε «μονοκόμματα» και μόνο μια φορά το προκείμενο διάλυμα, ώστε να ξεφορτωθούμε όσο το δυνατόν καλύτερα τα «πάντα» και να μείνουν μόνο τα κύτταρα μέσα στη φιάλη.

Κρατώντας τη φιάλη σταθερή, χτυπάμε με το χέρι με σταθερό ρυθμό το κάτω μέρος του γυάλινου σωλήνα ώστε να ξεκινήσει το ίζημα των κυττάρων σιγά σιγά να σπάει. Στη συνέχεια προσθέτουμε υπότονο διάλυμα KCl, αρχικά μερικές σταγόνες μέχρι που το ίζημα να ομογενοποιηθεί με το διάλυμα μας και έπειτα γεμίζουμε τη φιάλη μερί τα 10ml. Το υπότονο διάλυμα λόγω των ωσμωτικών πιέσεων προσροφάται από τα κύτταρα και σπανέ οι μεμβράνες, έχοντας έτσι την απελευθέρωση των πυρήνων. Στη συνέχεια ξανά φυγοκεντρούμε. Μετά την φυγοκέντριση επαναλαμβάνουμε ακριβώς την ίδια διαδικασία με μόνη διαφορά τώρα αντί για KCl χορηγούμε διάλειμμα FIXATIVE, το οποίο είναι προτιμητέο να φτιάχεται εκείνη τη στιγμή. Το FIXATIVE περιέχει σε αναλογία 3:1 μεθανόλη και καρβοξυλικό οξύ αντίστοιχα. Επαναλαμβάνουμε πάλι την ίδια ακριβώς διαδικασία άλλη μια φορά, έχοντας κάνει συνολικά 3 φυγοκεντρίσεις μια με KCl και δυο με FIXATIVE. Είναι σημαντικό να προσθέσουμε, ότι καθώς το FIXATIVE είναι τοξικό και δεν πρέπει να εισπνέεται κατά τη διάρκεια της χρήσης του, πρέπει να έχουμε τον εξαερισμό ανοιχτό

Στρώσιμο σε αντικειμενοφόρους (slides) και Μελέτη

Μετά την τελευταία φυγοκέντριση αδειάζουμε το προκείμενο διάλυμα χωρίς όμως να φύγει το ίζημα των κυττάρων. Σπάμε το ίζημα και αραιώνουμε με μερικές σταγόνες FIXATIVE .

Το στρώσιμο στις γυάλινες αντικειμενοφόρους (slides) γίνεται ως εξής: υγραίνοντας το πλακάκι με απιονισμένο νερό (ddH₂O), παίρνουμε με μια πιπέτα από τη φιάλη ~20 μl, τα οποία αντιστοιχούν σε μια σταγόνα και τα εναποθέτουμε πάνω στο slide. Είναι προτιμητέο κάθε slide να περιέχει 2 σταγόνες κυττάρων. Όταν πέσουν οι σταγόνες πάνω στην υγρή επιφάνια του γυάλινου τζαμιού, εκτοπίζουν το νερό και με ένα κομμάτι χαρτί το απορροφούμε, κάνοντας έτσι πιο εύκολη και ευδιάκριτη την ανάλυση, που θα γίνει μετά στο μικροσκόπιο. Αφού στρώσουμε τον απαιτούμενο αριθμό πλακιδίων τα αφήνουμε να στεγνώσουν.

Χρώση

Για τη χρώση φτιάχνουμε ένα διάλυμα με χρωστική (gimsa) και ρυθμιστικό διάλυμα pH (Sörensen), και τοποθετούμε μέσα σε αυτό τα πλακάκια για 10 min. Ξεπλένουμε και τα αφήνουμε να στεγνώσουν καλά. Μόλις στεγνώσουν μπορούμε να τοποθετήσουμε τις καλιπτρίδες, οι οποίες προσκαλούνται πάνω στα πλακάκια με τη βοήθεια μιας ρητίνης. Αφού στεγνώσουν είναι έτοιμα για ανάλυση.

Διαδικασία χορήγησης χρωστικής Trypan Blue και έλεγχος κυτταρικού θανάτου

Εισαγωγή

Το Trypan Blue είναι μία από τις διάφορες χρωστικές που συνιστώνται για χρήση σε διαδικασίες αποκλεισμού χρωστικών ουσιών για μέτρηση βιώσιμων κυττάρων. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην αρχή ότι τα ζωντανά (βιώσιμα) κύτταρα δεν απορροφούν συγκεκριμένες βαφές, ενώ τα νεκρά (μη βιώσιμα) κύτταρα επιτρέπουν τη διέλευση της ουσίας μέσω της διαταραγμένης μεμβράνης. Η χρώση διευκολύνει την απεικόνιση της μορφολογίας των κυττάρων.

Μέθοδος

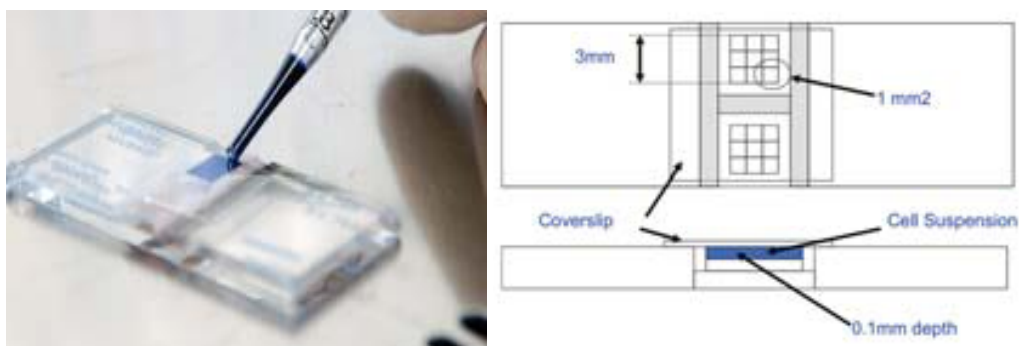
Παρασκευάζουμε ένα εναιώρημα κυττάρων με την ίδια διαδικασία, όπως κάνουμε και στην ανακαλλιέργεια, σηκώνοντας τα κύτταρα που θέλουμε να μελετήσουμε με τη βοήθεια της τρυψίνης. Μεταφέρουμε σε περιεκτικότητα 0,4% Trypan Blue ανά 0,5ml θρεπτικού υλικού σε δοκιμαστικό σωλήνα και αναμειγνύουμε καλά. Αφήνουμε να παραμείνει εκεί για 5 λεπτά.

Έπειτα με τη χρήση μιας πιπέτας ή άλλης κατάλληλης συσκευής για μεταφορά μικρής ποσότητας του μείγματος αιωρήματος κυττάρων-Trypan blue, τοποθετούμε σε αμφοτέρους τους θαλάμους του αιμοκυτταρομετρητή το μίγμα (Εικ. 12).

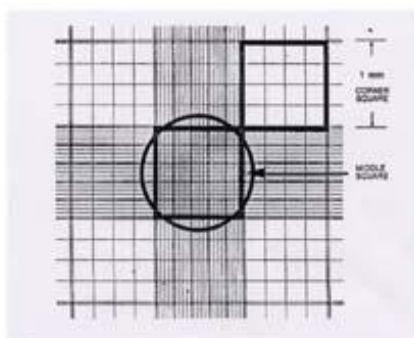
Αγγίζοντας προσεκτικά την άκρη του καλύμματος με το άκρο της πιπέτας και αφήνουμε κάθε θάλαμο να γεμίσει περίπου 5-10 μl παρατηρούμε από μικροσκόπιο.

Μετρήστε τον αριθμό των βιώσιμων (θεωρούμενων ως φωτεινά κύτταρα) και των μη βιώσιμων κυττάρων (χρώματος μπλε). Ιδανικά θα θέλαμε να πάρουμε μετρήσεις > 100 για να αυξηθεί η ακρίβεια του αριθμού των κυττάρων, καθώς όμως έπρεπε να εξετασθούν πολλά δείγματα και δεν πρέπει τα κύτταρα να είναι εκτεθειμένα στο trypan blue για μεγάλο χρονικό διάστημα παίρνουμε τριάντα μετρήσεις για το κάθε δείγμα. Υπολογίζουμε τη σχετική συγκέντρωση βιώσιμων και μη βιώσιμων κυττάρων και το ποσοστό βιώσιμων κυττάρων χρησιμοποιώντας την παρακάτω εξίσωση.

$$\text{Non-viable Cell Count} = \frac{\text{Number Dead Cells Counted}}{\text{Total number of cells}} \times 100 \quad (7)$$



Εικ.16α Στην αριστερή εικονομάχων βλέπουμε το αιμοκυτταρόμετρο και την εισαγωγή του μείγματος κυττάρων και trypan blue με τη βοήθεια μιας πιπέτας. Στη δεξιά εικόνα φαίνεται το σχεδιάγραμμα του αιμοκυτταρόμετρου



Εικ.16β Σχεδιάγραμμα του αιμοκυτταρόμετρου κατά την παρατήρηση από μικροσκόπιο. Μπορούμε να δούμε ότι υπάρχει ένας σταυρός ο οποίος χωρίζει τέσσερα τεταρτημόρια από δεκαέξι κουτάκια το καθένα. Σε κάθε τεταρτημόριο πραγματοποιούμε τις μετρήσεις μας.

Μεσοπορώδεις δομές νανοσωματιδίων χρυσού

Ghr+MTA

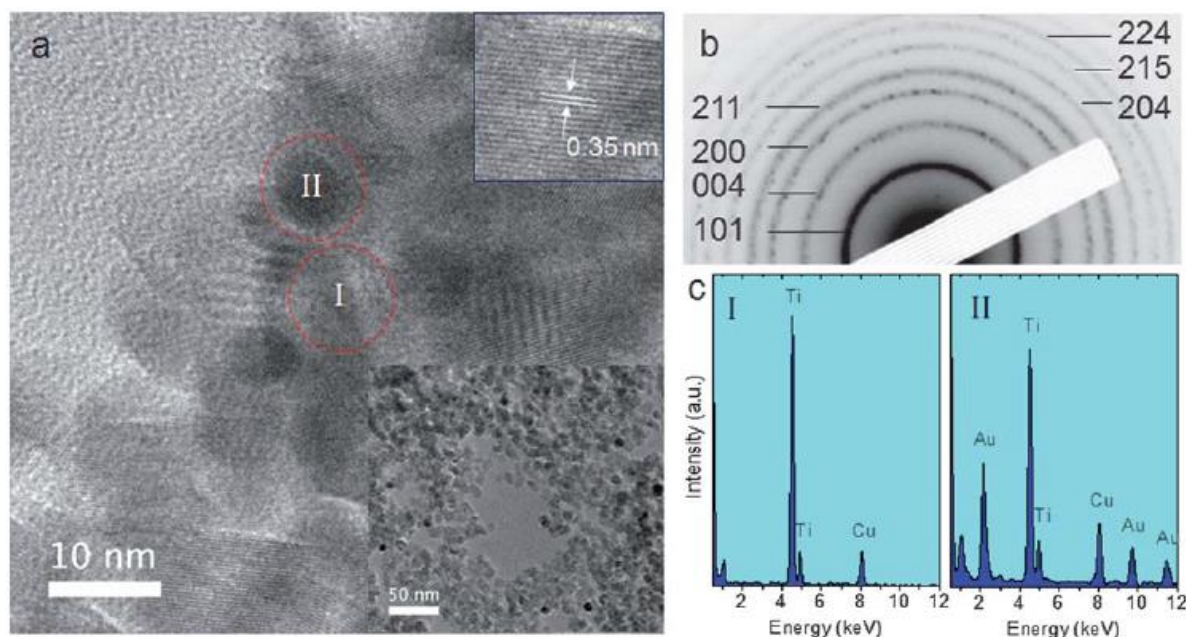
Στα συγκεκριμένα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν κάποιες καινοτόμες μεσοπορώδεις δομές με νανοσωματίδια χρυσού. Τα νανοσωματίδια χρυσού με μια

επικάλυψη από διοξείδιο του τιτάνιου (TiO_2) δηλ. τα Au-TiO_2 είναι ένα καταλυτικό σύστημα με εξαιρετικά υψηλή δραστηριότητα στην υδρογόνωση ή την οξείδωση αλκενίων, καρβονυλίων και νιτροενζύμων. Η αντιδραστικότητα αυτών των καταλυτών σχετίζεται με τη φύση της επικάλυψης από TiO_2 , καθώς και το μικρό μέγεθος των νανοσωματιδίων Au [36]. Πέραν των νανοσωματιδίων του χρυσού, η φύση του υποστρώματος και οι χημικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της επιφάνειας του χρυσού και της τιτανίας φαίνεται να έχουν σημαντική επίδραση σε διάφορες διαδικασίες.

Πρόσφατα, έχει αναφερθεί μια εύκολη μέθοδο δημιουργίας επικάλυψης με τη βοήθεια επιφανειοδραστικών ουσιών, για τη λήψη μεσοπορώδους συγκροτήματος νανοσωματιδίων TiO_2 (MTA) με ρυθμιζόμενο μέγεθος πόρων. Τα τοιχώματα των πόρων αυτών αποτελούνται από νανοσωματίδια TiO_2 και παρουσιάζουν ανώτερη καταλυτική απόδοση. Είναι σημαντικό ότι η ενίσχυση της καταλυτικής δραστηριότητας του MTA, το οποίο είναι αποτέλεσμα ενός συνδυασμού της πορώδους δομής, της μεγάλης επιφάνειας και της υψηλής κρυσταλλικότητας των νανοδομών TiO_2 . Αυτά τα αποτελέσματα οδηγούν στην εκμετάλλευση της επιφάνειας των πόρων του MTA, για τη δημιουργία ενός μοναδικού ξενιστή, για ευγενή μεταλλικά νανοσωματίδια

Τα πορώδη συγκροτήματα αυτής της μορφής μπορούν να συνδυάσουν τα πλεονεκτήματα, των δύο νανοσωματιδιακών ιδιοτήτων και των μεσοπορώδη δομών. Καθώς τα νανοσωματίδια χρυσού και TiO_2 μπορούν να προκαλέσουν διακεκριμένες ηλεκτρονικές και χημικές ιδιότητες, η μεσοπόρωση μπορεί να προσφέρει υψηλή συγκέντρωση επιφανειοδραστικών θέσεων την σύνδεση και την προώθηση της γρήγορης διάχυσης αντιδρώντων και προϊόντων κατά τη διάρκεια των καταλυτικών αντιδράσεων.

Παρουσιάζονται επίσης μεσοπορώδη συγκροτήματα νανοσωματιδίων TiO_2 με φορτίο Au ως υψηλής αποτελεσματικότητας καταλύτες για τον επιλεκτικό μετασχηματισμό στις αντίστοιχες αμίνες. Τα ληφθέντα υλικά (Au-MTA) διαθέτουν ένα συνεχές δίκτυο διασυνδεδεμένων χρυσών και TiO_2 (~ 8 nm μεγέθους σωματιδίων) νανοσωματίδια και παρουσιάζουν μεγάλη επιφάνεια και στενή κατανομή μεγέθους πόρου [38].



Εικ.17 (a) Εικόνες από ηλεκτρονική μικροσκοπία μετάδοση (TEM), που δείχνουν τα πορώδη σύνολα χρυσού και TiO₂ νανοσωματίδια (μπλε τετράγωνο: εικόνα σε πολύ υψηλή ανάλυση ενός απλού νανοσωματιδίου TiO₂), **(b)** το διάγραμμα περίθλασης ηλεκτρονίων **(c)** Διαγράμματα EDS (διαγράμματα χημικής σύστασης του προς μελέτη υλικού), τα φάσματα συλλέχθηκαν από μια λεπτή περιοχή (πλάτος ~ 10 nm) του πλαισίου για το μεσοπορώδες δείγμα Au-MTA 2% (οι κορυφές χαλκού προέρχονται από το δίκτυο χαλκού του TEM). Οι μαύρες σφαιρικές περιοχές που εμφανίζονται (εικόνα a περιοχή II)είναι τα νανοσωματίδια χρυσού. Οι κόκκινοι κύκλοι, στην εικόνα a, υποδεικνύουν τις περιοχές (I και II) στις οποίες αποκτήθηκαν τα δεδομένα ανάλυσης EDS.Κατασκευή

Μέθοδο εναπόθεσης-καταβύθισης πάνω από το δείγμα MTA. Τυπικά, ένα υδατικό διάλυμα Au(en)₃Cl₃ (5 mL) που αντιστοιχεί στο επιθυμητό φορτίο χρυσού ρυθμίστηκε σε pH 10 και με διάλυμα 1 M NaOH. Ακολούθως, 100 mg MTA προστίθεται στο διάλυμα χρυσού με αυστηρή ανάδευση επί 1 ώρα και η προκύπτουσα σκόνη ανακτάται με «φιλτράρισμα», ακολουθεί πλύση με νερό και ξήρανση σε 40 ° C υπό κενό. Σημειώνεται, ότι αυτή η συνθετική μέθοδος είναι απλή, υψηλής αναπαραγωγιμότητας και επομένως κατάλληλη για σύνθεση μεγάλης κλίμακας καταλυτών Au-MTA. Παρέχει μεγάλες ποσότητες Au-MTA (μεγαλύτερη από 1 g) με συνεπή αντιδραστικότητα.[38] Σημειώνεται πως σε αυτή τη διπλωματική εργασία χρησιμοποιούνται νανοσωματίδια περίπου 12 nm με επικάλυψη 7% MTA.

Μελέτη επίδρασης ακτινοβολίας σε διάφορες δόσεις

Σκοπός

Ο σκοπός του πειράματος αυτού είναι η μελέτη και η κατανόηση του βιολογικού αποτελέσματος, διαφόρων δόσεων ακτινοβολίας μεταξύ 0 και 1Gy και οι χάραξη της καμπύλης τους σε συνάρτηση με τη δόση. Το βιολογικό αποτέλεσμα της δόσης

προκύπτει με την καταμέτρηση των χρωμοσωμικών θραυσμάτων που εμφανίζονται μετά από κάθε ακτινοβολία

Από το πείραμα αυτό μπορούμε να δούμε και την γραμμικότητα που ακολουθούν ο αριθμός των θραυσμάτων σε συνάρτηση με την δόση της ακτινοβολίας.

Αποτελέσματα μετρήσεων

Είναι αναγκαίο να τονίσουμε ότι κάθε μέτρηση λήφθηκε μέσω του μικροσκοπίου. Ακολουθώντας λοιπόν τις παραπάνω διαδικασίες κυτταροκαλλιεργιών και επεξεργασίας μετά την ακτινοβολία δημιουργήσαμε για κάθε ακτινοβολία 6 διαφορετικά slide, στα οποία ήταν στρωμένα πάνω οι διάφοροι πυρήνες και τα χρωμοσώματα από κάθε μετάφαση. Κάθε μετάφαση αποτελεί και μια μέτρηση.

Σε κάθε μέτρηση μετράμε τόσο τον αριθμό των χρωμοσωμάτων όσο και τον αριθμό των θραυσμάτων. Για να έχουμε μια καλή στατιστική ως προς το μέσο όρο θραυσμάτων παίρνουμε περίπου 100 μετρήσεις για κάθε δόση ακτινοβολίας. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων φαίνονται στους πίνακες στο τέλος της εργασίας.

Όπως φαίνεται και στις παρακάτω εικόνες για μικρότερες δόσεις έχουμε μικρότερο αριθμό θραυσμάτων, ενώ καθώς αυξάνουμε τη δόση ο αριθμός των θραυσμάτων αυξάνεται κι αυτός. Ο μέσος όρος του αριθμού των θραυσμάτων προκύπτει από τον τύπο

$$\bar{X} = \sum_{i=1}^n \frac{X_i}{n} \quad (8)$$

και το σφάλμα της μέσης τιμής προκύπτει από τον τύπο

$$\delta\bar{X} = \sqrt{\frac{(\bar{X}-X_i)^2}{n(n-1)}} \quad (9)$$

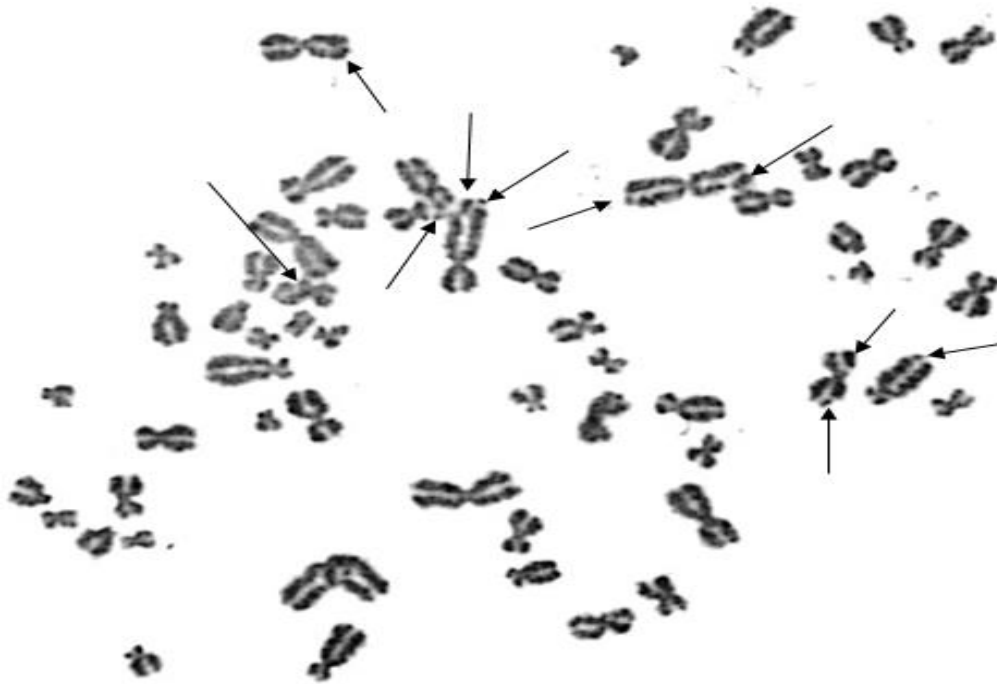
Για τις δόσεις 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1Gy η μέση τιμή των θραυσμάτων που προκύπτουν αντίστοιχα είναι: 0.64±0.09, 4.89±0.2 9.17±0.26 15.21±0.37 19.31±0.43.



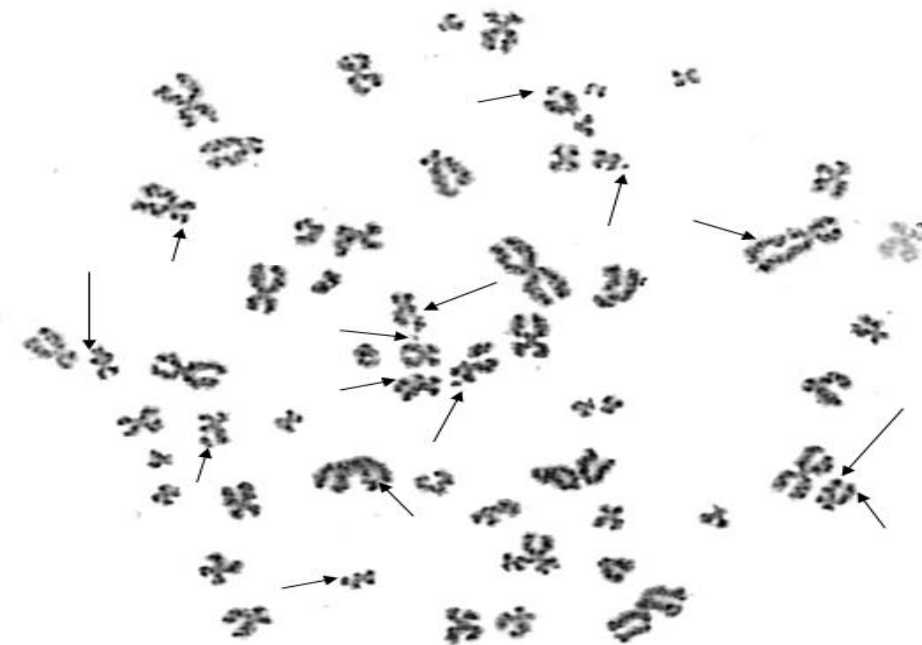
Εικ.18 Τυπική μετάφαση από το μικροσκόπιο, για κύτταρα PC-3 μη ακτινοβολημένα (control) μετά από επεξεργασία κλασικής μεθόδου βιοδοσιμετρίας για την καταμέτρηση χρωμοσωμικών αλλοιώσεων και πιο συγκεκριμένα θραυσμάτων. Στη συγκεκριμένη εικόνα καταγράφονται 58 χρωμοσώματα και 1 θραύσμα.



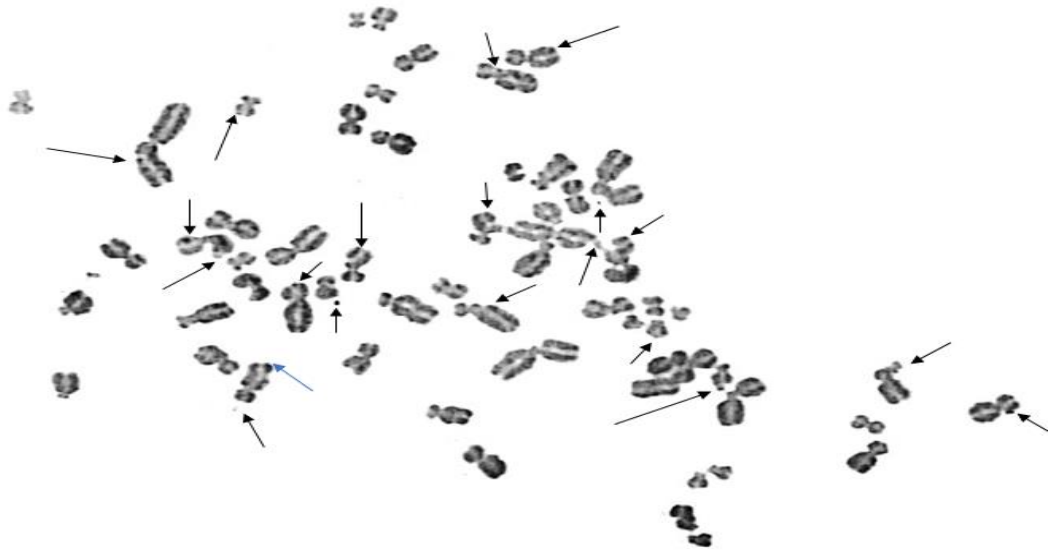
Εικ.19 Τυπική μετάφαση από το μικροσκόπιο, για κύτταρα PC-3 ακτινοβολημένα με δόση 0,25Gy μετά από επεξεργασία κλασικής μεθόδου βιοδοσιμετρίας για την καταμέτρηση χρωμοσωμικών αλλοιώσεων και πιο συγκεκριμένα θραυσμάτων. Στη συγκεκριμένη εικόνα καταγράφονται 55 χρωμοσώματα και 5 θραύσματα.



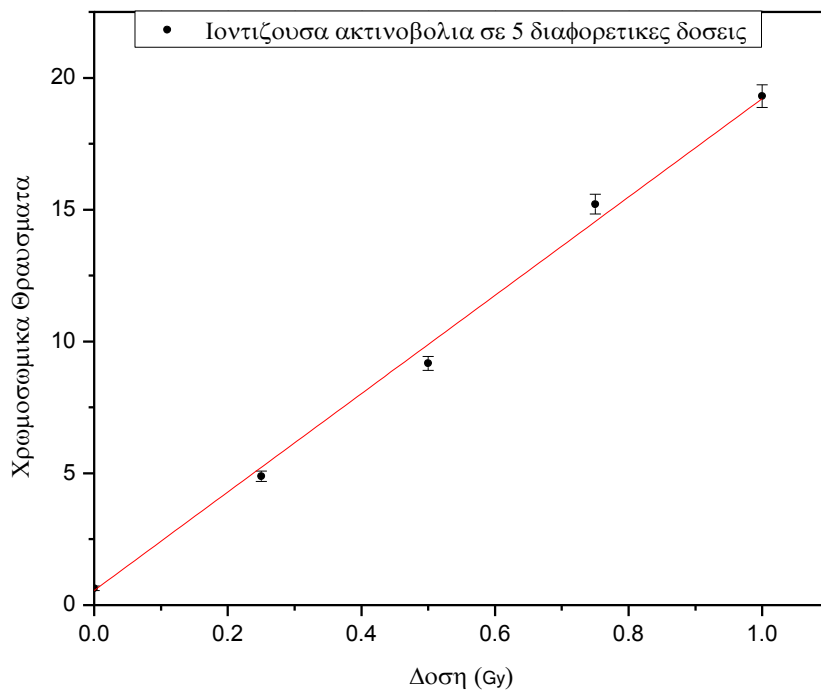
Εικ.20 τυπική μετάφαση από το μικροσκόπιο, για κύτταρα PC-3 ακτινοβολημένα με δόση 0,5Gy μετά από επεξεργασία κλασικής μεθόδου βιοδοσιμετρίας για την καταμέτρηση χρωμοσωμικών αλλοιώσεων και πιο συγκεκριμένα θραυσμάτων. Στη συγκεκριμένη εικόνα καταγράφονται 57 χρωμοσώματα και 7 θραύσματα.



Εικ.21 τυπική μετάφαση από το μικροσκόπιο, για κύτταρα PC-3 ακτινοβολημένα με δόση 0,75Gy μετά από επεξεργασία κλασικής μεθόδου βιοδοσιμετρίας για την καταμέτρηση χρωμοσωμικών αλλοιώσεων και πιο συγκεκριμένα θραυσμάτων. Στη συγκεκριμένη εικόνα καταγράφονται 59 χρωμοσώματα και 14 θραύσματα.



Εικ.22 τυπική μετάφαση από το μικροσκόπιο, για κύτταρα PC-3 ακτινοβλημένα με δόση 1Gy μετά από επεξεργασία κλασικής μεθόδου βιοδοσιμετρίας για την καταμέτρηση χρωμοσωμικών αλλοιώσεων και πιο συγκεκριμένα θραυσμάτων. Στη συγκεκριμένη εικόνα καταγράφονται 59 χρωμοσώματα και 20 θραύσματα.



Εικ.23 Πειραματική καμπύλη των χρωμοσωμικών αλλοιώσεων σε συνάρτηση με την δόση της ακτινοβολίας για το πείραμα 27/4/17 η καμπύλη πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα OriginLab. Τα σημεία που εμφανίζονται στην καμπύλη προέρχονται από τις μέσες τιμές των θραυσμάτων για κάθε δόση. Η ευθεία που περνάει ανάμεσα από τα σημεία είναι η βέλτιστη ευθεία που περνάει από τα πειραματικά σημεία η οποία είναι της μορφής $y=ax+b$ με γ : ο αριθμός των θραυσμάτων και x : η δόση ($\gamma=18.66x\pm 0.56$).

Εκτίμηση ιδανικής συγκέντρωσης δομών νανοσωματιδίων χρυσού

Σκοπός

Ο σκοπός του πειράματος αυτού η δημιουργία stock διαλύματος δομών νανοσωματιδίων και η εισαγωγή τους στα καρκινικά κύτταρα PC-3 για τον προσδιορισμό «ιδανικής» συγκέντρωσης νανοσωματιδίων χρυσού. Θα παρατηρηθεί επίσης μετά από την εισαγωγή τους στα καρκινικά κύτταρα το βιολογικό αποτέλεσμα για δόση ακτινοβολίας 0,5Gy και θα γίνει μια πρώτη νύξη για στη θεωρητική τοποθέτηση περί αύξηση της ακτινοευαισθησίας των κυττάρων.

Διάλυμα stock και εισαγωγή των νανοσωματιδίων χρυσού στα κύτταρα

Στην συγκεκριμένη εργασία ο όρος stock (Εικ. 19) διάλυμα προσδιορίζει το διάλυμα των νανοσωματιδίων που έχει δημιουργηθεί για την λήψη διαφόρων συγκεντρώσεων. Πιο συγκεκριμένα, καθώς τα νανοσωματίδια χρυσού που μας δόθηκαν από τον Καθ. Λυκάκη Ιωάννη (Τμήμα Χημείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης), βρίσκονταν σε μορφή σκόνης και οι συγκεντρώσεις που χρειαζόμασταν είναι μερικά $\mu\text{g}/\text{ml}$ διαλύματος κυττάρων χρειαζόνταν η δημιουργία stock διαλύματος.

Σε διακριβωμένη ζυγαριά στο εργαστήριο υγειοφυσικής Ραδιοβιολογίας και κυτταρογενετική του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος μετά από βαθμονόμηση (calibration) της ζυγαριάς, προσμετρήσαμε 10mg νανοσωματιδίων χρυσού και τα εισήγαμε σε 1 ml θρεπτικού υλικού.

Έχοντας λοιπόν το πρώτο διάλυμα A (10mg/ml) και με την απλή μέθοδο των τριών φτιάχνουμε διάλυμα B θρεπτικού υλικού με GNP συγκέντρωσης 1mg/ml, προσθέτοντας 0.1ml A μέσα σε 0,9ml καθαρό θρεπτικό υλικό. Τα διαλύματα αυτά φαίνονται στην διπλανή εικόνα.



Εικ.24 Διαλύματα νανοσωματιδίων μέσα σε θρεπτικό υλικό σε συγκεντρώσει 10mg/ml (χρώματος γκρι) και 1mg/ml (χρώματος μοβ).

Καθώς εμείς χριζόμαστε για τα πειράματα μας συγκεντρώσεις $\mu\text{g}/\text{ml}$ πάλι με απλή μέθοδο των τριών προσδιορίζεται πως:

1 mg αντιστοιχεί σε 1ml

10 μg αντιστοιχούν σε 10 μl

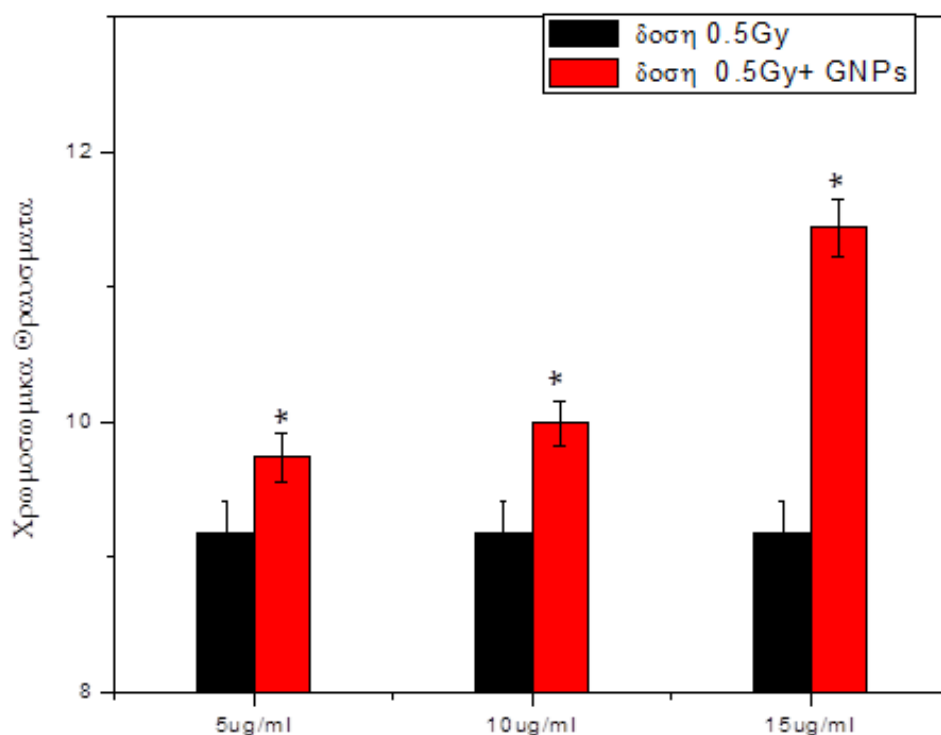
Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήσαμε στα πειράματα μας ήταν 5 ,10 και 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Άρα για συγκέντρωση 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ χριζόμαστε 10 μl διαλύματος B όμοια σκεπτόμαστε και για τις άλλες συγκεντρώσεις.

Εισαγωγή δομών νανοσωματιδίων στα κύτταρα

Μια μέρα πριν από την ακτινοβόληση και μετά από ανακαλλιέργια των κυττάρων αφήνουμε τα κύτταρα να κατακαθίσουν στον πάτο της φλάσκας για ~3 ώρες και στην συνέχεια προσθέτουμε τα νανοσωματίδια χρυσού και τα αφήνουμε για ~24 ώρες, ώστε να γίνει η πρόσληψη τους από τα κύτταρα μέσω φαγοκύτωσης. Ο λόγος που θέλουμε τα νανοσωματίδια να κατακαθίσουν στον πάτο της φλάσκας είναι γιατί ο χρυσός είναι βαρύτερος από τα κύτταρα με αποτέλεσμα να κατά κάθεται πρώτος, επομένως για να έχουμε καλύτερη πρόσληψη επιθυμούμε ο χρυσός να πάει πρώτα πάνω στα κύτταρα. Αφού περάσουν οι 24 ώρες και πριν από οποιαδήποτε διεργασία αδειάζουμε το θρεπτικό υλικό μετά νανοσωματίδια και ξεπλένουμε αρκετές φορές τα κύτταρα με PBS ώστε να διώξουμε την περίσσια των GNPs που έμειναν εκτός κυττάρων.

Αποτελέσματα

Ακολουθώντας ξανά τις διαδικασίες κυτταροκαλλιιεργιών και επεξεργασίας μετά την ακτινοβολία δημιουργήσαμε για κάθε συγκέντρωση 6 διαφορετικά slide στα οποία ήταν στρωμένα πάνω οι διάφοροι πυρήνες και τα χρωμοσώματα από κάθε μετάφαση. Σε κάθε μέτρηση μετράμε ξανά, τόσο των αριθμό των χρωμοσωμάτων όσο και των αριθμό των θραυσμάτων. Τα αριθμητικά αποτελέσματα των μετρήσεων φαίνονται στους πίνακες στο τέλος της εργασίας.



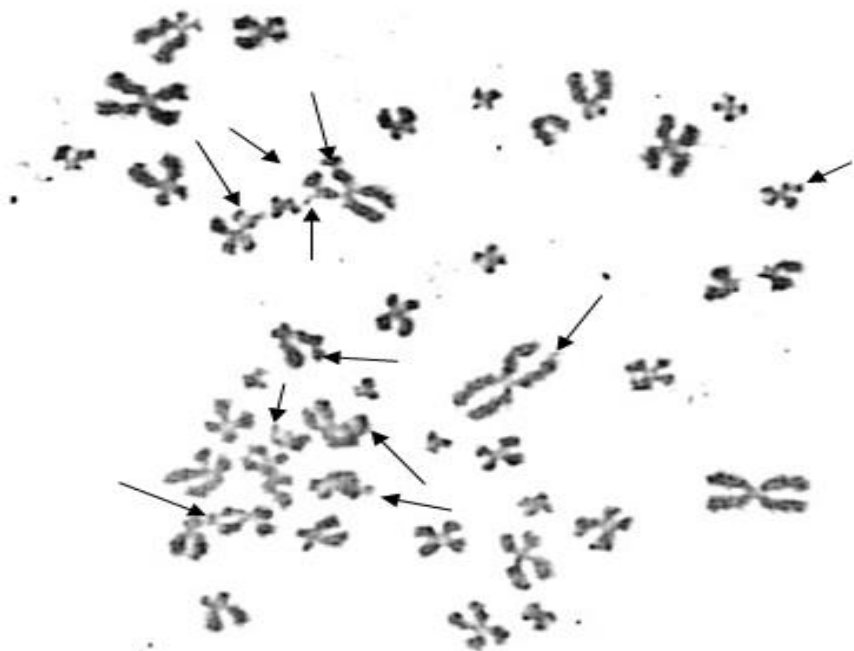
Εικ.25 Στο παραπάνω Ιστόγραμμα μπορούμε εύκολα να παρατηρήσουμε τις διαφορές μεταξύ των αλλοιώσεων, που είχαμε μόνο με ακτινοβόληση 0,5 Gy (στήλες χρώματος κόκκινο) και με ακτινοβόληση + νανοσωματίδια (μαύρες στήλες). Ο άξονας X μας δίνει την συγκέντρωση ενώ ο άξονας Y των αριθμό των αλλοιώσεων.

Από το ιστόγραμμα μπορούμε να δούμε πως για τις συγκεντρώσεις 5,10,15 μg/ml οι μέσες τιμές θραυσμάτων είναι 9.74, 9.82, και 11.44 θραύσματα. Οι αύξηση της ραδιοευαισθησίας λοιπόν για τις παραπάνω συγκεντρώσεις ανέρχεται στα 6.2%, 8.90%, 23%. Τα ποσοστά αυτά προκύπτουν από τον τύπο:

$$\text{Ποσοστό \%} = \frac{|9.17-x|}{9.17} \cdot 100 \quad (10)$$

με 9,17 τη μέση τιμή των θραυσμάτων για δόση 0,5Gy του πειράματος 1 και x η μέση τιμή των θραυσμάτων για τις διάφορες συγκεντρώσεις.

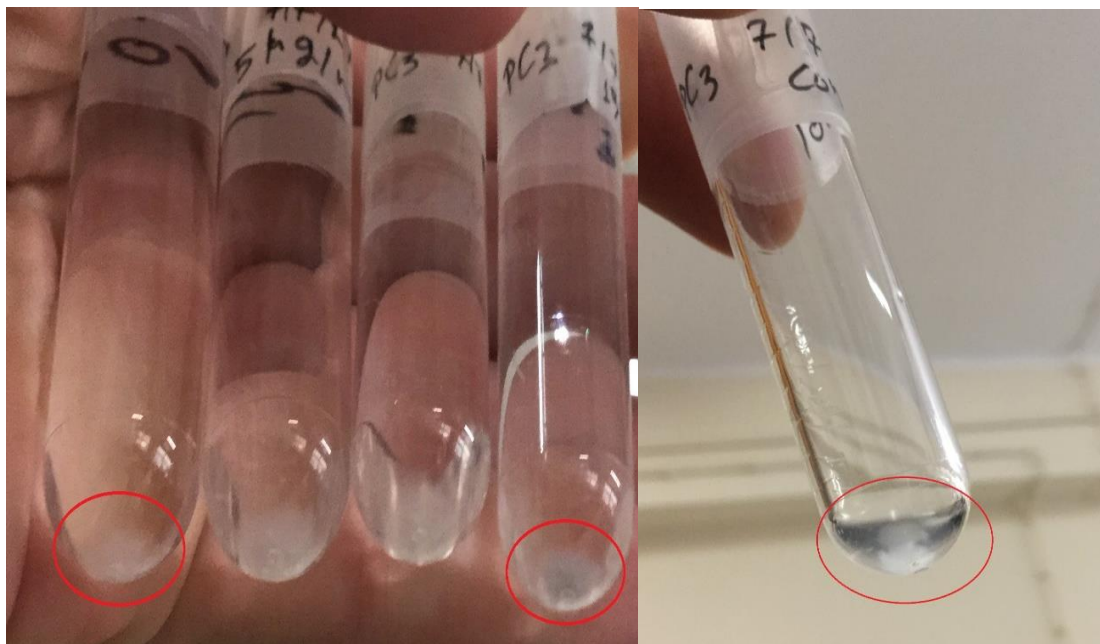
Από τα παραπάνω αποτελέσματα πιο ιδανική συγκέντρωση φαίνεται να είναι η μεγαλύτερη 15μg/ml. Οι παραπάνω συγκεντρώσεις επιβεβαιώνονται και από τη βιβλιογραφία ως επιλέξιμες και μη τοξικές συγκεντρώσεις νανοσωματιδίων για την συγκεκριμένη κυτταρική σειρά [39; 40]



Εικ.26 τυπική μετάφαση από το μικροσκόπιο, για κύτταρα PC-3 ακτινοβολημένα με δόση 0,5Gy σε συνδυασμό με 15μg/ml νανοσωματίδια χρυσού, μετά από επεξεργασία κλασικής μεθόδου βιοδοσιμετρίας για την καταμέτρηση χρωμοσωμικών αλλοιώσεων και πιο συγκεκριμένα θραυσμάτων. Στη συγκεκριμένη εικόνα καταγράφονται 42 χρωμοσώματα και 11 θραύσματα.

Μια παρατήρηση που έγινε κατά την επεξεργασία των κυττάρων μετά την ακτινοβολήση ήταν η εξής: δεδομένου ότι τα κύτταρα είχαν ξεπλυθεί αρκετές φορές με PBS πριν ακτινοβοληθούν και πρακτικά η περίσσια GNPs έχει φύγει. Κατά το fixation στις τελευταίες φυγοκεντρίσεις, όπου στην ουσία έχουμε το σπάσιμο των μεμβρανών, το ίζημα των κυττάρων από εκεί που θα έπρεπε να είναι άσπρο (Εικ. 22 πρώτη φιάλη), εμφάνιζε γκρι χρώμα (Εικ. 22 τέταρτη φιάλη), που είναι μια πρώτη ένδειξη, ότι τα GNPs είχαν πιθανότατα εισέλθει στα κύτταρα και το γκρι, οφείλεται

στο τιτάνιο που είχαν ως coating. Το control ήταν άσπρο όπως το περιμέναμε. Το συμπέρασμα αυτό φαίνεται καλύτερα στην παρακάτω εικόνα.



Εικ.27 Γυάλινες φιάλες μετά την τελευταία φυγοκέντριση κατά την επεξεργασία των δηγμάτων μετά την ακτινοβολήση. Στην πρώτη εικόνα φαίνονται οι τέσσερις φιάλες οι οποίες περιέχουν το control δείγμα και τα ακτινοβολημένα κύτταρα με νανοσωματίδια σε συγκεντρώσεις 5,10,15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ αντίστοιχα όπως φαίνονται στην πρώτη εικόνα. Στην δεύτερη εικόνα φαίνεται πιο ξεκάθαρα το control δείγμα.

Μελέτη κυτταρικού θανάτου με τη χρήση trypan blue

Σκοπός

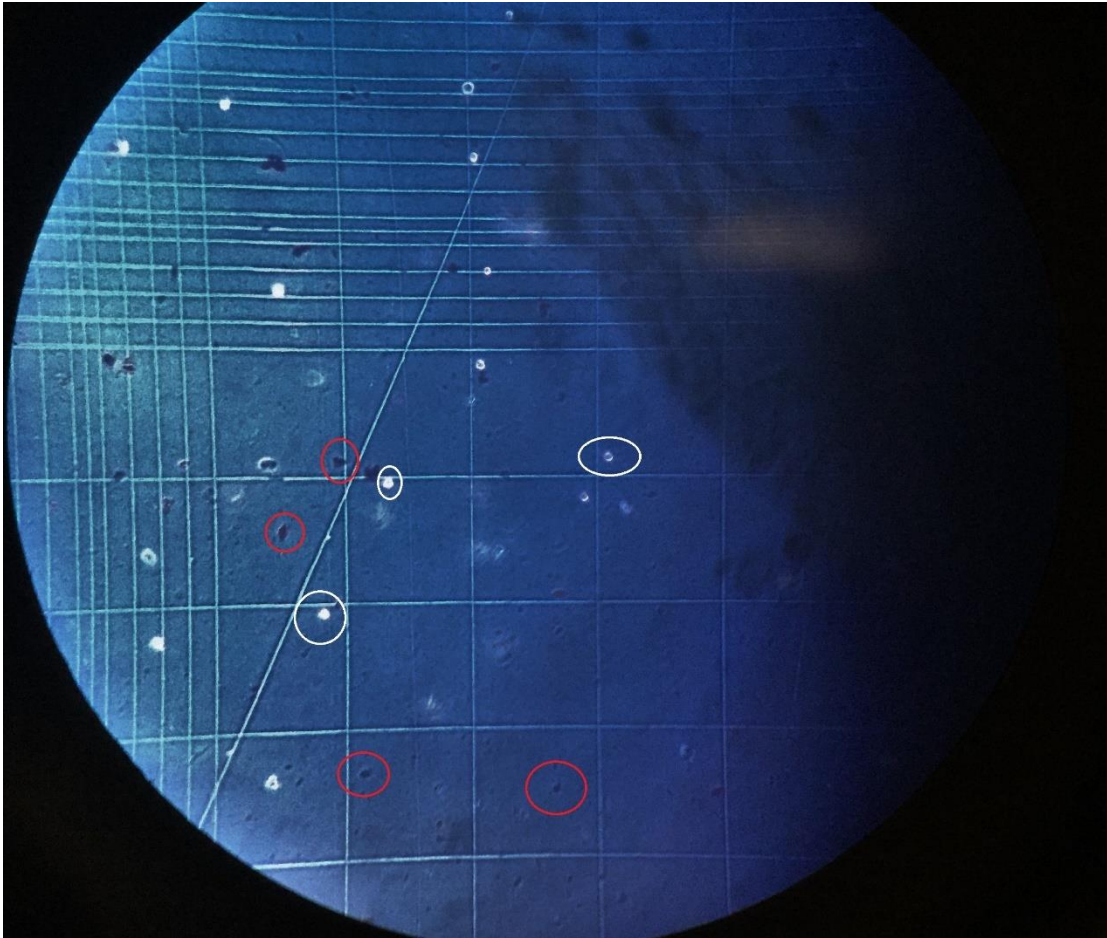
Ο σκοπός του πειράματος αυτού είναι η μελέτη ως προς του κυτταρικού θανάτου των κυττάρων με τη χρήση του δείκτη trypan blue. Θα μελετηθεί ο κυτταρικός θάνατος μετά από ακτινοβολήση σε κύτταρα με και χωρίς νανοσωματίδια σε δόση ακτινοβολίας 1 Gy. Θα γίνει επίσης η σύγκριση του δέγματος control (μη ακτινοβολημένα κύτταρα), με δέγμα κυττάρων με νανοσωματίδια χρυσού μη ακτινοβολημένα, ώστε να πραγματοποιηθεί και μια μελέτη ως προς την τοξικότητα των νανοσωματιδίων.

Αποτελέσματα

Ακολουθώντας τις διαδικασίες και το πρωτόκολλο τις εταιρίας Sigma για τη διαδικασία χορήγησης και καταμέτρησης με trypan blue από το προηγούμενο κεφάλαιο εξετάζουμε τον κυτταρικό θάνατο μη-ακτινοβολημένους κυττάρων με και χωρίς εισαγωγή νανοσωματιδίων χρυσού, καθώς και τον κυτταρικό θάνατο ακτινοβολημένων κυττάρων για δόση 1 Gy με και χωρίς νανοσωματίδια. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας Ι							
1gy		1 Gy+Gnp		With GNP		Without GNP	
Z	N	Z	N	Z	N	Z	N
26	5	5	6	30	3	7	1
14	8	4	2	18	4	11	3
30	10	3	5	23	4	8	1
15	8	8	15	46	9	10	3
24	8	17	11	20	10	11	1
11	1	12	18	19	4	10	1
4	2	13	7	45	4	6	1
2	4	15	10	11	6	5	1
1	3	18	15	14	8	4	0
7	6	13	6	23	4	2	0
10	7	11	6	25	9	1	1
6	7	10	17	19	4	7	1
11	6	14	7	20	8	5	3
9	9	12	8	27	8	2	1
11	8	20	12	52	15	12	0
16	2	10	13	33	5	3	0
9	4	18	11	14	3	3	2
9	2	11	16	32	7	1	3
4	1	20	12	10	2	7	3
20	3	16	8	8	3	12	1
3	1	20	16	2	0	4	2
14	7	5	3	9	3	11	6
7	2	7	11	1	2	10	2
10	8	3	11	13	4	12	1
12	6	10	12	16	2	13	2
9	6	15	12	13	4	5	0
6	2	11	12	38	6	18	2
8	3	19	9	32	3	11	2
8	1	16	8	53	3	10	5
12	5	17	9	24	2	11	1
12	4	13	10	34	4	8	2
8	2	10	8	28	6	5	1
Average							
10.875	4.71875	12.375	10.1875	23.5	4.96875	7.65625	1.65625

Η καταμέτρηση των ζωντανών (Z) και των νεκρών (N) κυττάρων έγινε όπως προαναφέραμε στο προηγούμενο κεφάλαιο και όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα. Τα ζωντανά κύτταρα εμφανίζονται άσπρα στο μικροσκόπιο ενώ τα νεκρά φαίνεται να είναι μπλε.

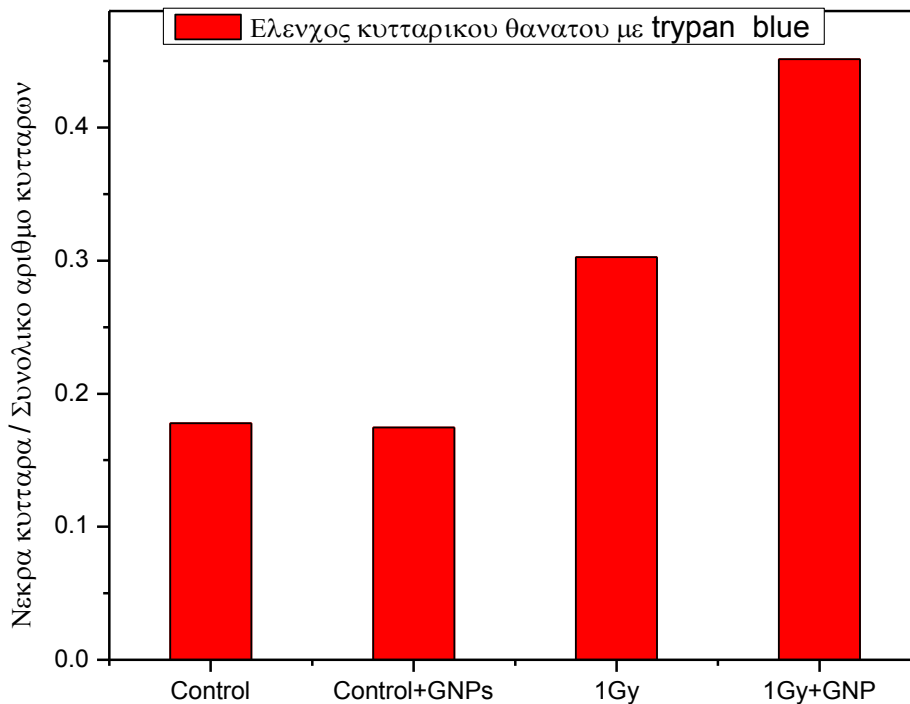


Εικ.28 Εικόνα από το μικροσκόπιο κατά την μέτρηση του κυτταρικού θανάτου στην οποία φαίνονται τα 16 τετράγωνα στα οποία βρίσκονται μέσα ένας αριθμός κυττάρων . Με μπλε σκούρο χρώμα (κόκκινοι κύκλοι) είναι τα νεκρά κύτταρα ενώ με άσπρο χρώμα (άσπροι κύκλοι) είναι τα ζωντανά κύτταρα.

Από τις μέσες τιμές του παραπάνω Πίνακα (πίνακα 1) βρίσκουμε το λόγο κυτταρικού θανάτου των κυττάρων για το control, με και χωρίς νανοσωματίδια καθώς και για τα ακτινοβολημένα κύτταρα με και χωρίς νανοσωματίδια.

$$\text{Κυτταρικός θάνατος \%} = \frac{N}{total} \cdot 100 \quad (11)$$

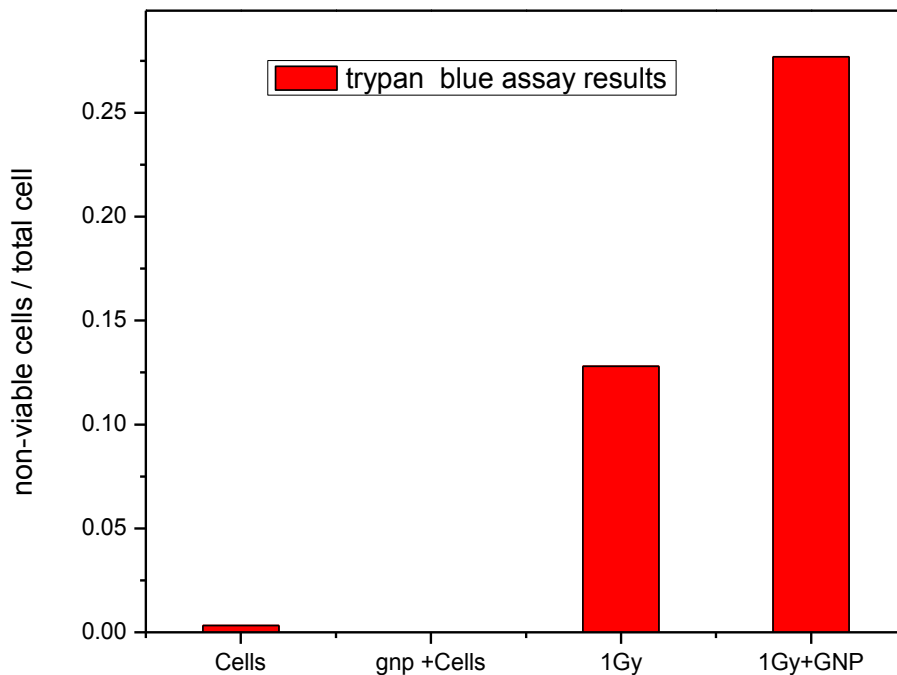
Από τον παραπάνω τύπο υπολογίζουμε τους λόγους κυτταρικού θανάτου και κάνουμε τα παρακάτω διαγράμματα:



Εικ.29 Διάγραμμα κυτταρικού θανάτου στον άξονα y έχουμε τους λογούς N/total και στον άξονα x τον τρόπο επεξεργασίας των κυττάρων. Στο διάγραμμα αυτό φαίνεται ξεκάθαρα η αύξηση του κυτταρικού θανάτου με την χρήση των νανοσωματιδίων χρυσού. Μάλιστα η αύξηση ανέρχεται στο 15%.

Στο παραπάνω διάγραμμα είναι εμφανές ότι μετά από την πρόσληψη των νανοσωματιδίων και σε συνδυασμό με την ακτινοβόληση δεν αυξάνεται μόνο η ακτινοευαισθησία αλλά και η απόπτωση των κυττάρων κάτι που ενισχύει τη θεωρία περί αύξησης του βιολογικού αποτελέσματος μετά την ακτινοβόληση στον καρκίνο.

Επιπλέον από το παραπάνω διάγραμμα μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι συγκριτικά τα μη ακτινοβολημένα κύτταρα με νανοσωματίδια και το control (Cells) εμφανίζουν περίπου το ίδιο ποσοστό N/total κύτταρα (διαφορά 0,4% περισσότερα νεκρά με την χρήση GNP), πράγμα που επιβεβαιώνει και τη μη τοξικότητα του χρυσού που χρησιμοποιήσαμε. Αυτό φαίνεται καλύτερα από το παρακάτω διάγραμμα.



Εικ.30 Διάγραμμα κυτταρικού θανάτου στον άξονα γ έχουμε τους λόγους N/total και στον άξονα x τον τρόπο επεξεργασίας των κυττάρων. Στο διάγραμμα αυτό έχει αφαιρεθεί από όλους τους λόγους, το control κάνοντας έτσι μια βαθμονόμηση στο σύστημα και εμφανίζοντας έτσι την αύξηση του κυτταρικού θανάτου με τη χρήση νανοσωματιδίων με και χωρίς ακτινοβολήση, καθώς και με σκέτη ακτινοβολία.

Ακτινοβολήση κυττάρων με νανοσωματίδια

Σκοπός

Ο σκοπός του πειράματος αυτού είναι η μελέτη και σύγκριση του βιολογικού αποτελέσματος, διαφόρων δόσεων ακτινοβολίας μεταξύ 0 και 1Gy και οι χάραξη της καμπύλης τους σε συνάρτηση με τη δόση για κύτταρα με νανοσωματίδια και χωρίς. Το βιολογικό αποτέλεσμα της δόσης προκύπτει με την καταμέτρηση των χρωμοσωμικών θραυσμάτων που εμφανίζονται μετά από κάθε ακτινοβολήση, τα νανοσωματίδια που χρησιμοποιήθηκαν είναι σε συγκέντρωση 15μg/ml η οποία αποδείχθηκε και η πιο επιλέξιμη σε σχέση με τα 5 και μg/ml από το πείραμα 2 και η διάμετρος τους 11nm.

Αποτελέσματα μετρήσεων

Ακολουθώντας λοιπόν τις διαδικασίες του πρώτου μέρους για τις κυτταροκαλλιέργειες και την επεξεργασία μετά την ακτινοβολία δημιουργήσαμε για

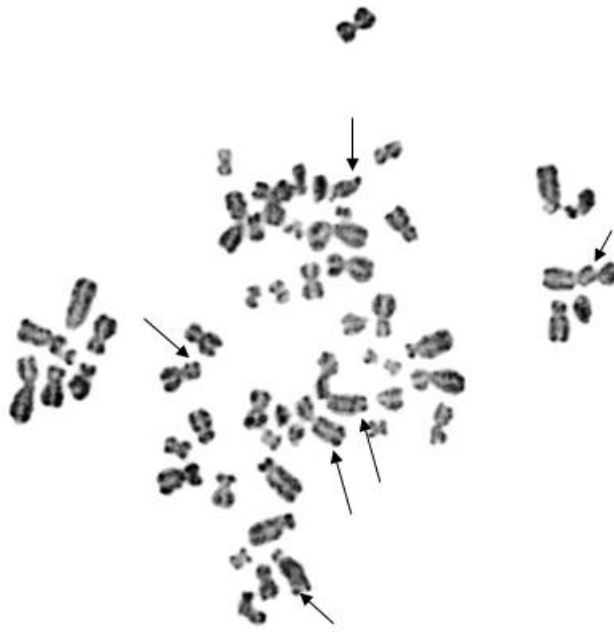
κάθε ακτινοβολία 6 διαφορετικά slide στα οποία ήταν «στρωμένα» πάνω οι διάφοροι πυρήνες και τα χρωμοσώματα από κάθε μετάφαση. Κάθε μετάφαση αποτελεί και πάλι μια μέτρηση.

Σε κάθε μέτρηση μετράμε τόσο τον αριθμό των χρωμοσωμάτων όσο και τον αριθμό των θραυσμάτων. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων φαίνονται στους πίνακες στο τέλος της εργασίας.

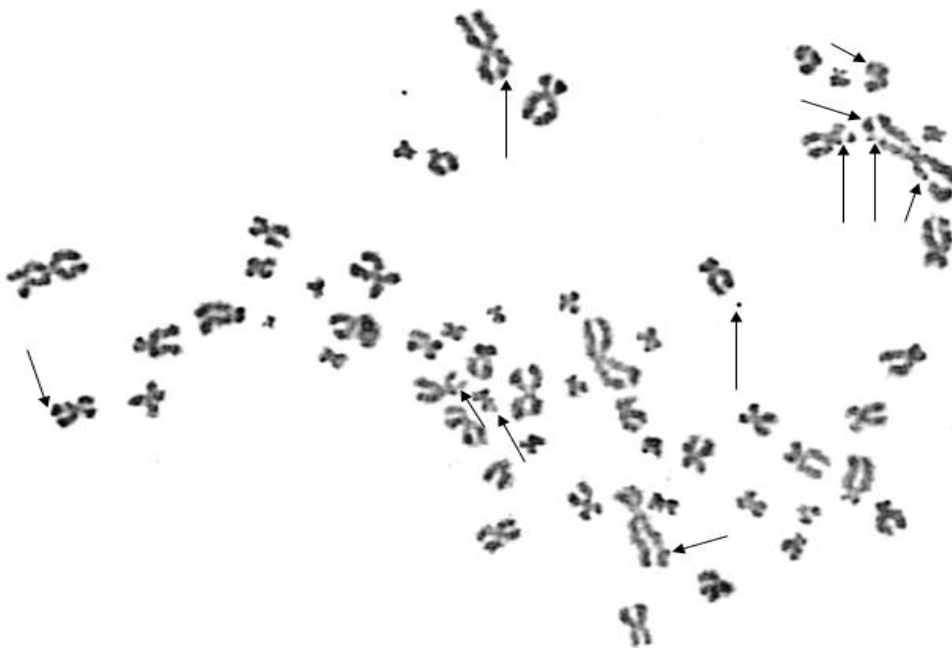
Όπως φαίνεται και στις παρακάτω εικόνες για μικρότερες δόσεις έχουμε μικρότερο αριθμό θραυσμάτων, ενώ καθώς αυξάνουμε τη δόση ο αριθμός των θραυσμάτων αυξάνεται κι αυτός. Για τις δόσεις 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1Gy η μέση τιμή των θραυσμάτων που προκύπτουν αντίστοιχα είναι: 0.54 ± 0.09 , 5.59 ± 0.23 , 11.08 ± 0.24 , 17.1 ± 0.3 , 22.76 ± 0.48 .



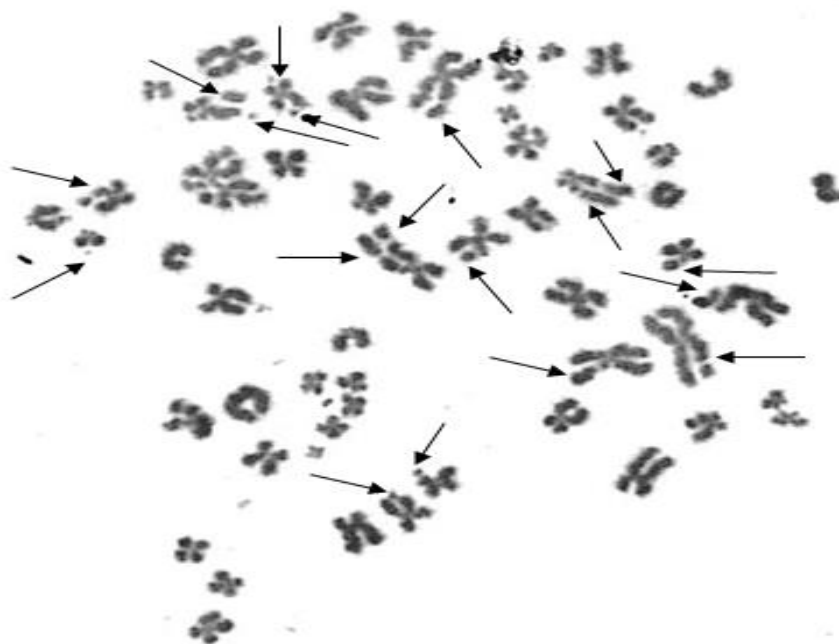
Εικ.31 Τυπική μετάφαση από το μικροσκόπιο, για κύτταρα PC-3 με νανοσωματίδια μη ακτινοβολημένα (control) μετά από επεξεργασία κλασικής μεθόδου βιοδοσιμετρίας για την καταμέτρηση χρωμοσωμικών αλλοιώσεων και πιο συγκεκριμένα θραυσμάτων. Στη συγκεκριμένη εικόνα καταγράφονται 59 χρωμοσώματα και 1 θραύσμα.



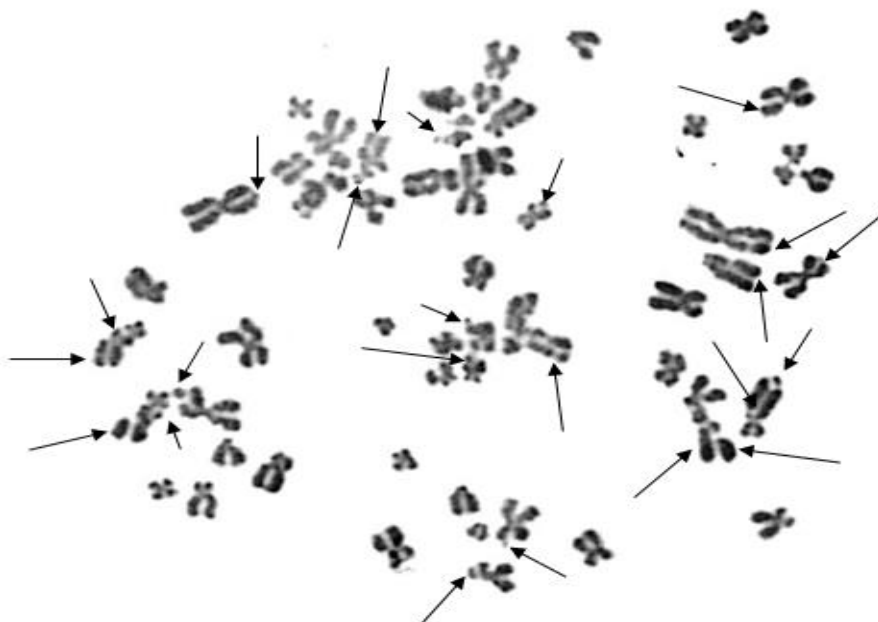
Εικ.32 Τυπική μεταφαση από το μικροσκόπιο, για κύτταρα PC-3 με νανοσωματίδια ακτινοβολημένα με 0,25Gy μετά από επεξεργασία κλασικής μεθόδου βιοδοσιμετρίας για την καταμέτρηση χρωμοσωμικων αλλοιώσεων και πιο συγκεκριμένα θραυσμάτων. Στη συγκεκριμένη εικόνα καταγράφονται 53 χρωμοσώματα και 6 θραύσματα.



Εικ.33 Τυπική μεταφαση από το μικροσκόπιο, για κύτταρα PC-3 με νανοσωματίδια ακτινοβολημένα με 0,5Gy μετά από επεξεργασία κλασικής μεθόδου βιοδοσιμετρίας για την καταμέτρηση χρωμοσωμικων αλλοιώσεων και πιο συγκεκριμένα θραυσμάτων. Στη συγκεκριμένη εικόνα καταγράφονται 56 χρωμοσώματα και 11 θραύσματα.

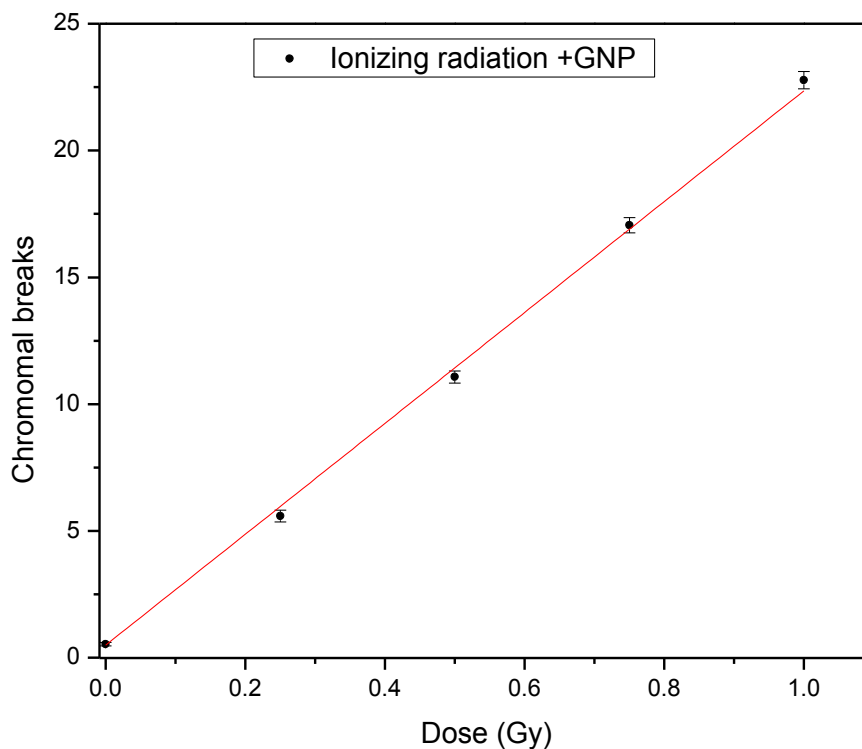


Εικ.34 Τυπική μεταφαση από το μικροσκόπιο, για κύτταρα PC-3 με νανοσωματίδια ακτινοβολημένα με 0,75Gy μετά από επεξεργασία κλασικής μεθόδου βιοδοσιμετρίας για την καταμέτρηση χρωμοσωμικων αλλοιώσεων και πιο συγκεκριμένα θραυσμάτων. Στη συγκεκριμένη εικόνα καταγράφονται 56 χρωμοσώματα και 18 θραύσματα.



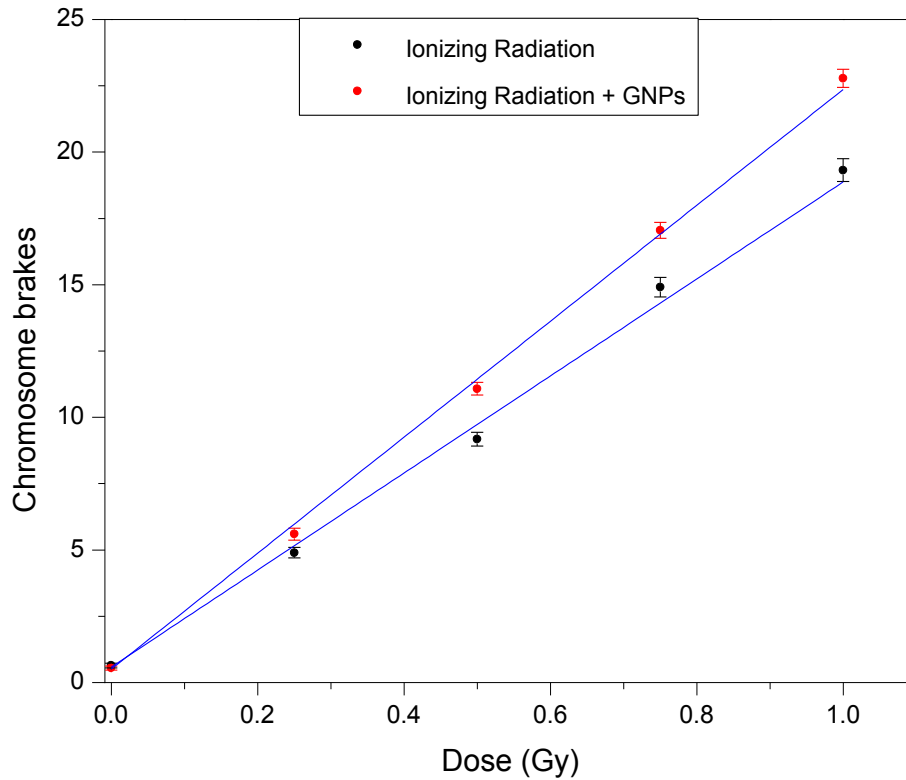
Εικ.35 Τυπική μεταφαση από το μικροσκόπιο, για κύτταρα PC-3 με νανοσωματίδια ακτινοβολημένα με 1Gy μετά από επεξεργασία κλασικής μεθόδου βιοδοσιμετρίας για την καταμέτρηση χρωμοσωμικων αλλοιώσεων και πιο συγκεκριμένα θραυσμάτων. Στη συγκεκριμένη εικόνα καταγράφονται 56 χρωμοσώματα και 23 θραύσματα.

Στην παρακάτω γραφική παράσταση απεικονίζεται το βιολογικό αποτέλεσμα συνάρτηση της δόσης της ακτινοβολίας με νανοσωματίδια στα κύτταρα και τα τέσσερα σημεία αντιστοιχούν στις μέσες τιμές των θραυσμάτων για τις δόσεις 0 με 1Gy.



Εικ.36 Πειραματική καμπύλη των χρωμοσωμικών αλλοιώσεων σε συνάρτηση με την δόση της ακτινοβολίας για το πείραμα 27/7/17 η καμπύλη πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα OriginLab. Τα σημεία που εμφανίζονται στην καμπύλη προέρχονται από τις μέσες τιμές των θραυσμάτων για κάθε δόση. Η ευθεία που περνάει ανάμεσα από τα σημεία είναι η βέλτιστη ευθεία που περνάει από τα πειραματικά σημεία η οποία είναι της μορφής $y=ax+b$ με y : ο αριθμός των θραυσμάτων και x : η δόση ($y=18.66x+0.56$).

Στη συνέχεια κάνουμε για να μπορέσουμε να δούμε και εξετάσουμε τις διαφορές των καμπυλών του πειράματος 1 και 4 κάνουμε μια κοινή γραφική παράσταση εικ καθώς επίσης υπολογίζουμε και την ποσοτικά αύξηση της δόσης.

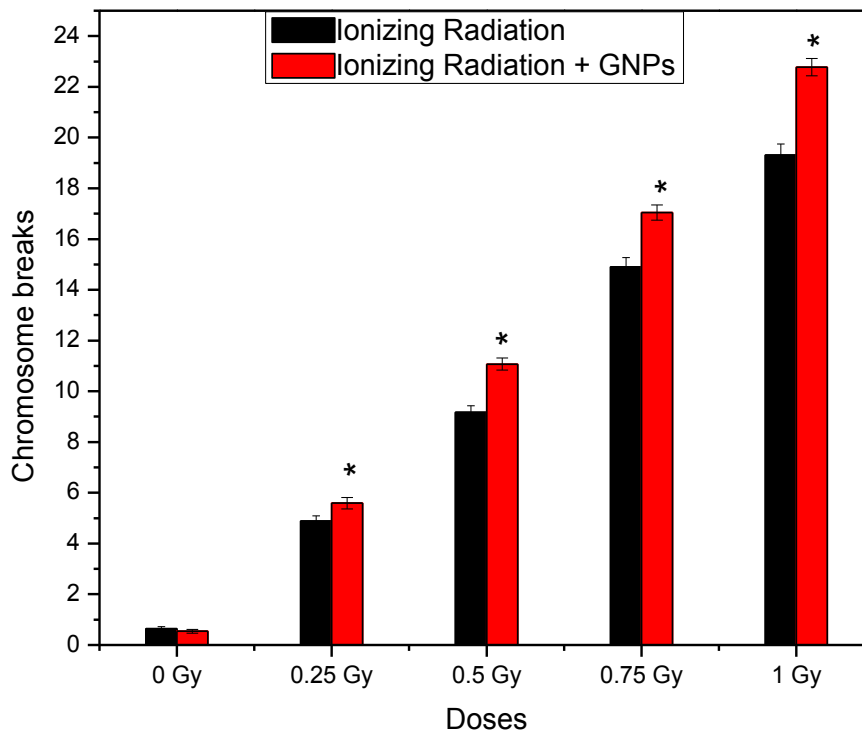


Εικ.37 Πειραματική καμπύλη των χρωμοσωμικών αλλοιώσεων σε συνάρτηση με την δόση της ακτινοβολίας για το πείραμα 27/7/17 η καμπύλη πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα OriginLab. Τα σημεία που εμφανίζονται στην καμπύλη προέρχονται από τις μέσες τιμές των θραυσμάτων για κάθε δόση. Η ευθεία που περνάει ανάμεσα από τα σημεία είναι η βέλτιστη ευθεία που περνάει από τα πειραματικά σημεία η οποία είναι της μορφής $y=ax+b$ με y : ο αριθμός των θραυσμάτων και x : η δόση ($\gamma=18.66x\pm 0.56$).

Στην παραπάνω γραφική παράσταση γίνεται εμφανής η αύξηση της ακτινοευαισθησίας μετά από τη χρήση των νανοσωματιδίων (βέλτιστη καμπύλη 1) τα ποσοστά την αύξησης προέρχονται με βάση τον τύπο

$$\text{Ποσοστιαία αύξηση \%} = \frac{|\bar{X}(\text{πειρ.1}) - \bar{X}(\text{πειρ.4})|}{\bar{X}(\text{πειρ.1})} \times 100 \quad (12)$$

όπου \bar{X} η μέση τιμή των θραυσμάτων από για κάθε δόση



Εικ.38 Διάγραμμα σύγκρισης σκέτης ακτινοβολίας (μαύρες στήλες) και ακτινοβολίας με νανοσωματίδια (κόκκινες στήλες) για δόσεις μεταξύ 0,25 και 1Gy. Στον άξονα y έχουμε τον αριθμό των θραυσμάτων και στον άξονα x την δόση ακτινοβολίας που έλαβαν τα κύτταρα. Στο διάγραμμα γίνεται πιο φανερή αύξηση της δόσεις που έλαβαν τα κύτταρα, όπως επίσης και ο αριθμός των θραυσμάτων του control δείγματος είναι περίπου ίδιος (στα όρια του σφάλματος) και στις δυο περιπτώσεις.

Με βάση τον παραπάνω τύπο στα 0,25Gy παρατηρείται μια αύξηση 14.3% στα 0,5Gy παρατηρείται αύξηση 20.8% στα 0,75Gy παρατηρούμε αύξηση 14.8% και στο 1Gy 17.9%. Βλέπουμε λοιπόν πως η αύξηση ως προς την ραδιοευαισθησία κυμαίνεται στις τιμές 14 με 21 %, οι διαφορές σε αυτές τιμές οφείλεται σε μεγάλο βαθμός στο ποσό των νανοσωματιδίων που έχει εισέλθει στα κύτταρα καθώς και στην τοποθεσία τους μέσα στο κάθε κύτταρο. Όπως είδαμε και στη θεωρία νανοσωματίδια που εισέρχονται μέσα στον πυρήνα έχουν την ικανότητα παραγωγής δευτερευόντων ηλεκτρονίων τα οποία μπορούν να προκαλέσουν μεγάλη ζημιά στον DNA των κυττάρων.

Κεφάλαιο Γ

Συμπεράσματα: Τα πορίσματα που απορρέουν με τη λήξη των πειραμάτων και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Συμπεράσματα

Από την παραπάνω πειραματική μελέτη επιβεβαιώνεται η αρχική μας υπόθεση, περί ενίσχυσης της δόσης της ακτινοβολίας με την χρήση των νανοσωματιδίων χρυσού. Με βάση το πρώτο πείραμα που κάναμε, αποδεικνύεται πως τα κύτταρα που χρησιμοποιήσαμε είναι τα ίδια ακτινοευαίσθητα, καθώς εμφανίζουν μεγάλο πλήθος θραυσμάτων για σχετικά μικρές δόσεις ακτινοβολίας. Δηλαδή για δόση 0,25 Gy είχαμε κατά μέσο όρο 4.89 θραύσματα, ενώ για δόση 1Gy 19,31 θραύσματα. Επιληθεύεται επίσης η γραμμική εξάρτηση μεταξύ θραυσμάτων και δόσης.

Με βάση το δεύτερο πείραμα και την εισαγωγή των GNP πριν την ακτινοβολήση προσμετρήσαμε και επιβεβαιώσαμε και τη θεωρία για την καταλληλότερη συγκέντρωση νανοσωματιδίων. Παρατηρήθηκε πως η καταλληλότερη αναλογία GNP ήταν 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ για την οποία είχαμε την μεγαλύτερη αύξηση της δόσης, η οποία ανέρχονταν στο 23 τοις εκατό. Από την αύξηση επιβεβαιώνεται και η εισαγωγή των νανοσωματιδίων μέσα στα κύτταρα μας. Αποδεικνύεται επίσης και η εξάρτηση της αύξησης της ακτινοευαισθησίας από την συγκέντρωση των νανοσωματιδίων. Γενικότερα και στις τρεις συγκεντρώσεις εμφανίζεται σημαντική αύξηση της ραδιο-ευαισθησίας σε ποσοστό 6, 9 και 23%.

Μετά τη διεξαγωγή του τρίτου πειράματος με τη βοήθεια του δείκτη trypan blue παρατηρήσαμε ότι τα νανοσωματίδια δεν ενισχύουν μόνο την ακτινοευαισθησίας των κυττάρων αλλά και τον κυτταρικό θάνατο σε ποσοστό περίπου 15%, καθώς επίσης ελέγχθηκε και η τοξικότητα του χρυσού. Από τα αποτελέσματα που λάβαμε συμπεράναμε πως τα νανοσωματίδια χρυσού που εισήγαμε στα κύτταρα δεν ήταν τοξικά καθώς το control δείγμα και το δείγμα με κύτταρα και νανοσωματίδια είχαν περίπου την ίδια αναλογία N/total κύτταρα.

Από το τελευταίο πείραμα παρατηρήσαμε ότι με την εισαγωγή νανοσωματιδίων χρυσού στα κύτταρα έχουμε αύξηση της ραδιοευαισθησίας σε όλες τις δόσεις ακτινοβολίας που δώσαμε στα κύτταρα πράγμα που επιβεβαιώνει τη θεωρία και την πληθώρα ερευνών που έχουν πραγματοποιηθεί την τελευταία δεκαετία περίπου. Πιο συγκεκριμένα οι αυξήσεις που παρατηρήθηκαν κυμαίνονται μεταξύ 14 και 20%.

Επίσης είναι σημαντικό να παρατηρήσουμε πως στο πείραμα τρία και στο πείραμα τέσσερα για την δώσει 0,5 Gy η αύξηση διαφέρει κατά 3 τοις εκατό αυτό πιθανά να οφείλεται στην πρόσληψη των νανοσωματιδίων από τα κύτταρα, πράγμα που μας ωθεί στο συμπέρασμα ότι με μεγαλύτερη πρόσληψη μέσα στα κύτταρα θα έχουμε καλύτερα αποτελέσματα.

Γενικότερα, οι δομές νανοσωματιδίων χρυσού που χρησιμοποιήσαμε, δείχνουν να προσφέρουν μια ευρεία επίλογων για πραγματοποίηση στρατηγικών κατά του καρκίνου. Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας μπορούμε να συμπεράνουμε, πως με περαιτέρω ερευνά τόσο στην ενεργοποίηση της επιφανείας που αποτελεί το μεγαλύτερο και πιο δύσκολο εμπόδιο για τη δημιουργία ενός στάνταρ μοντέλου θεραπείας, έτσι ώστε να γίνει η πρόσληψη πιο στοχευμένη τόσο σε κυτταρικό

επίπεδο (*in vitro* πειράματα) όσο και σε *in vivo* πειράματα και να οδηγηθεί με τη σειρά του σε κλινικές δοκιμές. Ανοίγονται δρόμοι για βελτίωση της θεραπείας του καρκίνου τόσο με τη χρυσή ακτινοβολιών όσο και με τη μεταφορά φαρμάκων (drug delivery).

Παραρτήματα

Πίνακες

Πίνακας 2

0Gy		0.25 Gy		0.5Gy		0.75Gy		1Gy	
Αριθμός χρωμοσωμάτων	Θραύσματα	Αριθμός χρωμοσωμάτων	Θραύσματα	Αριθμός χρωμοσωμάτων	Θραύσματα	Αριθμός χρωμοσωμάτων	Θραύσματα	Αριθμός χρωμοσωμάτων	Θραύσματα
58	1	56	6	55	9	60	18	54	25
50	1	58	5	59	6	58	14	58	19
60	2	44	5	57	9	58	18	58	24
57	0	38	7	54	9	61	16	51	15
56	0	49	5	47	11	57	8	56	22
46	0	45	8	50	10	58	19	56	22
58	1	46	7	56	9	56	13	55	22
56	0	58	7	57	8	57	5	57	15
60	0	33	6	58	8	59	16	60	23
57	0	58	3	61	7	57	7	55	16
57	0	67	2	52	14	62	15	57	23
57	0	43	6	56	8	59	13	61	18
47	0	56	3	55	12	57	10	60	22
56	0	57	3	56	4	57	16	55	25
56	0	31	3	54	16	61	8	56	17
59	1	54	6	42	8	57	9	58	21
55	1	57	1	61	7	56	17	59	16
60	1	57	4	56	12	53	17	56	25
51	0	55	1	54	9	54	15	54	20
57	4	60	7	54	11	57	18	52	13
58	0	56	4	54	4	56	11	53	26
58	2	56	5	58	9	56	13	59	28
57	0	56	7	56	7	58	20	57	19
56	0	60	6	58	9	54	13	50	12
59	0	46	5	59	7	57	16	57	19
58	0	57	6	56	8	56	16	56	23
48	1	51	5	50	10	57	15	57	26
58	1	52	6	56	6	56	20	52	12
62	2	57	5	52	11	59	15	59	19
58	2	58	3	54	13	54	15	56	22
57	0	55	6	55	13	49	25	58	19
53	0	54	3	56	7	53	20	33	19
55	1	61	3	58	11	56	18	58	21
60	0	51	5	60	8	54	14	55	21
61	0	49	5	56	9	51	14	56	19
57	0	45	4	51	8	58	17	53	22
44	0	59	7	57	10	54	18	59	22
59	0	56	5	57	11	50	15	56	19
42	0	57	7	54	10	56	19	55	21

60	1	39	4	59	6	57	11	57	15
58	0	52	3	58	7	60	13	55	18
58	0	54	3	57	8	58	14	57	21
54	1	59	7	58	15	54	12	57	21
52	0	58	7	58	9	55	14	56	21
59	0	36	3	51	9	52	24	46	19
60	1	58	5	56	9	56	18	56	20
58	1	56	6	57	11	54	11	58	16
57	0	50	9	59	14	59	15	53	22
51	2	55	3	60	8	55	18	56	19
51	0	50	3	58	8	56	26	57	20
49	1	54	5	56	12	61	22	59	18
53	1	51	7	58	10	57	12	60	29
57	0	51	6	54	7	56	6	56	12
50	1	47	3	58	11	59	12	56	27
58	0	60	4	54	12	56	18	51	20
56	2	86	3	57	9	55	12	54	21
59	1	56	6	55	9	55	16	53	21
57	2	60	1	54	9	57	14	52	20
44	1	43	7	54	9	56	12	52	21
59	1	58	6	61	10	57	17	56	18
51	0	53	4	54	8	59	15	54	20
54	2	54	5	54	18	56	17		23
43	0	56	9	53	4	58	16	56	20
59	0	61	3	59	9	48	14	58	15
52	1	58	4	55	9	49	16	55	22
52	0	46	4	57	6	56	16	55	27
39	0	57	1	54	10	55	14	53	19
57	0	60	3	54	10	57	18	56	18
57	0	49	5	58	8	56	11	58	23
56	0	52	5	53	8	56	17	59	20
83	0	59	7	53	10	57	14	55	19
62	1	61	8	55	11	57	16	57	19
56	0	56	6	56	7	53	15	59	19
56	3	61	9	58	8	59	21	48	20
58	1	55	3	57	11	58	14	54	21
47	0	56	4	55	11	56	18	51	22
56	1	35	4	54	9	57	14	53	26
49	0	61	3	54	8	56	17	56	16
58	0	56	5	61	6	54	16	43	20
54	1	44	5	56	14	56	18	51	32
58	1	54	1	59	10	46	12	51	16
57	0	59	3	50	9	55	17	59	16
56	0	56	5	56	7	60	13	54	18
58	3	54	1	56	10	53	17	59	21
52	1	60	6	57	9	56	16	54	22

55	0	60	6	57	10	57	19	59	24
57	0	50	10	57	10	61	16	57	24
54	2	59	5	55	8	54	14	53	12
58	1	48	8	57	10	56	15	57	21
59	0	56	4	59	9	54	12	57	21
60	1	64	3	57	4	60	15	53	12
59	0	59	7	59	7	57	16	52	18
55	1	59	8	57	5	58	13	58	22
57	3	57	6			58	22	58	28
58	0	60	1			58	14	48	11
52	2	54	3			55	16	57	15
44	0	51	7			59	17	56	21
57	0	57	9			58	8	57	21
51	2	58	2			56	14	56	8
58	0	59	5			58	12	51	7
		57	5			57	15		
		58	0			56	15		
		57	4			57	16		
		63	4			55	17		
		56	6			57	16		
		62	5						
		57	8						
		54	5						
		56	1						
		38	8						
		55	6						
		53	7						
		56	6						
		61	1						
		57	7						
Μέση Τιμή									
55	0.64	54	4.90	55.80	9.17	56.26	15.21	55.16	19.90

Πίνακας 3

5μg/ml		10μg/ml		15μg/ml	
Αριθμός χρωμοσωμάτων	Θραύσματα	Αριθμός χρωμοσωμάτων	Θραύσματα	Αριθμός χρωμοσωμάτων	Θραύσματα
60	10	57	11	59	11
60	9	54	11	57	11
56	14	56	9	57	9
47	11	37	7	50	9
52	9	56	11	56	11
55	9	55	10	45	13
53	9	55	7	37	11

70	11	56	10	48	13
55	9	57	8	55	11
58	7	56	11	30	12
53	9	60	11	56	13
58	10	57	9	60	10
56	9	59	10	56	13
53	9	57	10	56	12
52	9	58	10	49	10
57	8	54	7	57	11
56	10	58	10	56	11
57	9	60	10	53	9
59	9	57	9	56	9
57	11	56	9	60	12
55	9	55	10	53	10
62	10	50	14	60	11
59	9	55	9	56	17
55	9	57	9	58	10
59	10	54	11	59	10
59	10	56	8	55	11
60	10	55	9	61	11
55	5	55	10	51	12
57	8	59	11	54	12
80	17	57	9	54	10
56	8	57	10	59	16
45	10	56	9	57	14
58	9	55	10	52	10
55	10	57	9	55	11
59	10	56	14	58	12
58	9	57	10	57	12
53	10	53	9	55	16
58	8	55	12	46	11
52	9	52	10	61	11
58	8	55	13	58	15
58	11	53	8	59	10
60	8	60	9	59	10
59	14	58	10	59	13
57	10	84	15	55	12
54	11	54	11	60	11
58	10	58	9	60	14
55	13	60	14	65	16
52	8	61	11	90	20
55	9	57	10	58	10
56	8	53	9	53	13
51	9	60	9	52	10
54	9	54	10	56	13
56	7	55	10	53	13

55	9	55	9	52	11
58	9	54	8	46	11
57	14	54	9	53	14
56	12	58	8	57	11
56	13	58	11	55	13
59	9	72	12	58	9
59	10	47	10	55	10
59	10	53	10	55	11
55	11	58	10	64	10
51	6	45	11	56	11
57	9	52	9	54	11
59	7	80	10	55	13
54	9	47	8	60	11
56	9	56	9	60	12
55	8	53	9	45	9
58	12	56	9	54	13
58	9	48	10	54	13
54	11	56	10	57	9
55	10	57	10	60	12
57	10	57	11	58	12
61	10	56	13	57	14
58	10	52	10	60	10
53	10	54	11	57	9
58	11	60	10	57	13
57	8	53	10	54	9
57	13	59	10	51	11
53	10	55	8	55	10
44	11	56	11	54	16
58	13	56	9	58	9
52	12	46	13	57	12
51	8			53	15
49	8			57	11
52	13			56	14
54	6			53	11
55	10			54	11
54	10			59	9
57	8			57	8
54	11			38	9
58	10			48	9
59	11			56	12
58	10			36	8
61	12			54	12
56	8			58	11
43	10			58	7
56	9			49	9
55	10			55	10

58	9			54	11
55	9				
57	9				
60	8				
54	13				
Μέση Τιμή					
56	9.74	56	9.99	55	11.44

Πίνακας 4

control		0.25Gy		0.5Gy		0.75Gy		1Gy	
Αριθμός χρωμοσωμάτων	Θραύσματα	Αριθμός χρωμοσωμάτων	Θραύσματα	Αριθμός χρωμοσωμάτων	Θραύσματα	Αριθμός χρωμοσωμάτων	Θραύσματα	Αριθμός χρωμοσωμάτων	Θραύσματα
57	1	58	7	45	11	57	21	56	24
58	2	61	5	55	12	54	18	51	23
56	0	54	5	54	13	55	14	57	31
54	1	60	6	48	10	55	16	57	25
58	0	53	7	59	11	65	18	56	21
60	0	56	10	43	10	58	13	83	27
59	0	55	2	54	11	57	16	65	21
56	0	57	5	56	13	53	16	53	23
61	1	60	6	52	10	58	15	53	25
57	2	53	6	45	9	55	16	56	24
58	0	55	3	52	8	57	17	52	22
55	0	54	6	54	11	51	17	55	20
51	3	57	4	49	12	57	14	54	18
55	1	53	5	56	17	58	15	62	20
59	2	57	2	60	11	55	25	57	23
59	1	60	6	39	11	57	20	55	19
59	0	56	6	58	15	56	15	57	23
55	1	58	7	58	10	57	14	57	25
56	0	59	8	58	13	53	15	58	25
58	0	60	12	54	15	52	17	57	25
60	1	57	6	45	13	52	18	52	23
62	1	56	3	52	8	56	18	58	26
58	1	57	6	54	19	57	17	53	22
58	0	58	6	60	8	53	18	52	26
55	0	57	4	53	8	56	18	54	21
58	0	57	8	48	12	53	18	61	28
62	0	55	3	52	13	56	17	55	29
55	1	58	3	48	7	55	20	57	23
57	0	58	6	46	7	53	15	54	23
55	3	60	6	88	15	51	18	61	23
56	0	60	5	53	8	48	17	55	23

61	0	57	5	54	10	57	18	58	25
54	2	58	6	56	10	53	16	52	24
59	0	55	6	58	12	54	17	49	21
69	1	60	3	60	11	57	21	60	25
56	0	58	2	56	13	56	15	59	21
54	2	56	4	54	11	57	20	57	16
60	1	60	7	57	13	60	17	53	22
58	1	59	6	53	13	54	17	60	23
54	0	59	6	55	9	60	17	57	23
56	0	59	6	62	9	58	27	57	19
63	0	57	7	58	11	55	19	52	18
58	0	58	5	47	13	54	16	57	23
54	0	61	7	57	14	57	17	57	26
54	0	55	2	58	11	55	18	58	18
57	0	45	3	56	5	57	13	58	25
58	0	57	6	52	11	52	11	57	25
53	1	60	3	57	11	57	11	59	20
56	0	54	9	59	17	57	23	55	23
57	0	56	11	61	10	55	19	52	29
53	0	50	5	53	12	51	18	57	24
57	0	61	3	63	11	56	14	55	19
61	2	58	6	56	12	48	12	56	21
56	1	54	4	57	9	55	16	55	30
55	0	60	11	53	11	52	19	57	19
58	1	56	6	56	12	56	14	55	23
53	0	56	5	57	10	53	17	53	21
55	0	58	5	54	13	58	18	59	21
57	0	55	2	58	10	61	18	55	23
57	0	36	6	54	9	54	17	52	20
55	0	53	6	62	12	55	16	56	22
57	1	57	15	54	13	56	14	55	21
59	0	55	3	57	12	57	18	63	23
58	1	45	3	60	9	53	18	49	24
57	0	50	5	46	14	54	14	52	24
57	0	57	4	53	13	58	19	58	19
57	1	48	3	58	9	63	20	57	34
54	1	58	6	57	8	56	23	54	22
57	1	56	8	58	14	54	17	82	22
54	0	54	5	53	8	51	18	52	25
56	0	56	5	55	13	58	17	54	25
57	0	58	6	54	7	54	19	54	16
60	0	54	7	35	11	57	18	56	22
57	1	57	7	44	11	59	21	58	20
56	2	58	8	53	14	55	17	56	24
55	0	56	8	53	11	58	24	50	19
58	0	56	8	60	11	34	20	59	19

60	0	55	2	49	11	55	18	56	21
57	1	57	6	54	10	53	22	59	20
59	0	57	6	53	13	56	11	59	23
57	0	55	5	56	10	58	19	54	23
56	1	58	5	56	9	57	22	53	25
60	0	57	7	58	10	55	14	58	24
60	0	58	6	57	11	54	13	57	22
56	0	57	6	55	8	64	18	53	21
55	0	56	9	60	11	58	24	52	25
55	0	58	8	58	15	54	15	59	18
54	1	58	4	59	14	58	17	59	28
58	1	57	4	54	11	55	13	60	22
59	1	58	5	52	8	57	11	56	23
56	1	56	4	57	11	57	15	56	23
53	1	60	3	57	11	57	14	53	25
50	2	58	5	56	12	55	16	53	26
56	0	59	6	36	8	53	14	49	27
56	1	56	5	54	12	54	15	57	26
50	0	55	1	58	11	55	16	56	26
56	1	59	6	58	7	56	15	56	19
62	0	54	7	49	9	54	17	54	23
58	0	57	7	55	10	53	13	56	18
59	0	57	4	54	11	56	19	57	10
Μέση Τιμή									
56.96	0.53	56.37	5.59	54.46	11.07	55.35	17.05	56.31	22.77

Βιβλιογραφία

- [1] J. Ferlay, I. Soerjomataram, M. Ervik, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D. Parkin, D. Forman, and F. Bray, Worldwide data, World Cancer Reserch Fund International 2012.
- [2] R.L. Siegel, K.D. Miller, and A. Jemal, Cancer statistics, 2016. *CA: a cancer journal for clinicians* 66 (2016) 7-30.
- [3] B.W. Stewart, and C.P. Wild, World Cancer Report 2014, International Agency for Research on Cancer, WHO., 2014.
- [4] R. Atun, D.A. Jaffray, M.B. Barton, F. Bray, M. Baumann, B. Vikram, T.P. Hanna, F.M. Knaul, Y. Lievens, T.Y. Lui, M. Milosevic, B. O'Sullivan, D.L. Rodin, E. Rosenblatt, J. Van Dyk, M.L. Yap, E. Zubizarreta, and M. Gospodarowicz, Expanding global access to radiotherapy. *The Lancet. Oncology* 16 (2015) 1153-86.
- [5] W. Ngwa, F. Boateng, R. Kumar, D.J. Irvine, S. Formenti, T. Ngoma, C. Herskind, M.R. Veldwijk, G.L. Hildenbrand, M. Hausmann, F. Wenz, and J. Hesser, Smart Radiation Therapy Biomaterials. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 97 (2017) 624-637.
- [6] J. Zhao, M. Zhou, and C. Li, Synthetic nanoparticles for delivery of radioisotopes and radiosensitizers in cancer therapy. *Cancer nanotechnology* 7 (2016) 9.
- [7] J.F. Hainfeld, F.A. Dilmanian, D.N. Slatkin, and H.M. Smilowitz, Radiotherapy enhancement with gold nanoparticles. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 60 (2008) 977-985.
- [8] Z. Nikitaki, C.E. Hellweg, A.G. Georgakilas, and J.L. Ravanat, Stress-induced DNA damage biomarkers: applications and limitations. *Frontiers in chemistry* 3 (2015) 35.
- [9] M. Sethi, and S.K. Chakarvarti, Hyperthermia techniques for cancer treatment: A review. *International Journal of PharmTech Research* 8 (2015) 292-299.
- [10] X. Yao, C. Huang, X. Chen, Z. Yi, and L. Sanche, Chemical Radiosensitivity of DNA Induced by Gold Nanoparticles. *Journal of biomedical nanotechnology* 11 (2015) 478-85.
- [11] S. Swain, P.K. Sahu, S. Beg, and S.M. Babu, Nanoparticles for Cancer Targeting: Current and Future Directions. *Current drug delivery* 13 (2016) 1290-1302.
- [12] K. Haume, Rosa, S., Grellet, S., Śmiałek, M.A., Butterworth, K.T., Solovyov, A., Prise, K.M., Golding, J., Mason, N. M., Gold nanoparticles for cancer radiotherapy: a review. *Cancer Nano* 7 (2016) 1-20.
- [13] I.A.E. AGENCY, Radiation Oncology Physics, INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, Vienna, 2005.
- [14] IRPA, Recommendations for minor updates to the IRPA 1985 guidelines on limits of exposure to laser radiation. International Non-Ionizing Radiation Committee of the International Radiation Protection Association. *Health physics* 54 (1988) 573-4.
- [15] N.R. Council, Evaluation of Guidelines for Exposures to Technologically Enhanced Naturally Occurring Radioactive Materials, The National Academies Press, Washington, DC, 1999.
- [16] Nuclear Chain Reaction. TutorVista (2017).

- [17] COSMIC & NEUTRON RADIATION. CURIOSITY (2013).
- [18] Websping, Radioactivity: Glossary of Terms
- Cyberphysics (2017).
- [19] S. Aghevlian, A.J. Boyle, and R.M. Reilly, Radioimmunotherapy of cancer with high linear energy transfer (LET) radiation delivered by radionuclides emitting alpha-particles or Auger electrons. *Adv Drug Deliv Rev* 109 (2017) 102-118.
- [20] P.P. Dendy, and B. Heaton, *Physics for diagnostic radiology*, CRC Press, Boca Raton, 2012.
- [21] H. Nikjoo, S. Uehara, and D. Emfietzoglou, *Interaction of radiation with matter*, Taylor & Francis, Boca Raton, FL, 2012.
- [22] Wikipedia, Physical Interaction processes. (2016).
- [23] Σ.Φ. Παναγιώτης, Εισαγωγή στην κυτταρική βιολογία και γενετική. (2004).
- [24] Phases of the cell cycle. khanacademy.
- [25] B.D. Kavanagh, B.G. Haffty, and J.E. Tepper, *Radiation oncology: a snapshot in time*, 2014. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 32 (2014) 2825-6.
- [26] N.M. Dimitriou, G. Tsekenis, E.C. Balanikas, A. Pavlopoulou, M. Mitsiogianni, T. Mantso, G. Pashos, A.G. Boudouvis, I.N. Lykakis, G. Tsigaridas, M.I. Panayiotidis, V. Yannopoulos, and A.G. Georgakilas, Gold nanoparticles, radiations and the immune system: Current insights into the physical mechanisms and the biological interactions of this new alliance towards cancer therapy. *Pharmacology & therapeutics* 178 (2017) 1-17.
- [27] R.G. Mendes, A. Bachmatiuk, B. Buchner, G. Cuniberti, and M.H. Rummeli, Carbon nanostructures as multi-functional drug delivery platforms. *Journal of Materials Chemistry B* 1 (2013) 401-428.
- [28] R.L. Cecil, W.H. Kammerer, and F.J. Deprume, GOLD salts in the treatment of rheumatoid arthritis; a study of 245 cases*. *Annals of internal medicine* 16 (1942) 811-827.
- [29] N. Tanigawa, S. Sawada, and M. Kobayashi, Reaction of the aortic wall to six metallic stent materials. *Academic Radiology* 2 379-384.
- [30] H.B. Wheeler, W.E. Jaques, and T.W. Botsford, Experiences with the Use of Radioactive Colloidal Gold in the Treatment of Cancer. *Annals of Surgery* 141 (1955) 208-17.
- [31] *Gold Nanoparticles: Properties and Applications*. sigma-aldrich.
- [32] S.R. Saptarshi, A. Duschl, and A.L. Lopata, Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *Journal of nanobiotechnology* 11 (2013) 26.
- [33] S. Her, D.A. Jaffray, and C. Allen, Gold nanoparticles for applications in cancer radiotherapy: Mechanisms and recent advancements. *Adv Drug Deliv Rev* 109 (2015) 84–101.
- [34] Y. Zheng, D.J. Hunting, P. Ayotte, and L. Sanche, Radiosensitization of DNA by gold nanoparticles irradiated with high-energy electrons. *Radiation research* 169 (2008) 19-27.
- [35] P. Ionita, M. Conte, B.C. Gilbert, and V. Chechik, Gold nanoparticle-initiated free radical oxidations and halogen abstractions. *Organic & biomolecular chemistry* 5 (2007) 3504-9.
- [36] S. Ito, N. Miyoshi, W.G. Degraff, K. Nagashima, L.J. Kirschenbaum, and P. Riesz, Enhancement of 5-Aminolevulinic acid-induced oxidative stress on two cancer cell lines by gold nanoparticles. *Free radical research* 43 (2009) 1214-24.
- [37] S. Tai, Y. Sun, J.M. Squires, H. Zhang, W.K. Oh, C.Z. Liang, and J. Huang, PC3 Is a Cell Line Characteristic of Prostatic Small Cell Carcinoma. *The Prostate* 71 (2011) 1668-79.

- [38] I. Tamiolakis, S. Fountoulaki, N. Vordos, I.N. Lykakis, and G.S. Armatas, Mesoporous Au-TiO₂ nanoparticle assemblies as efficient catalysts for the chemoselective reduction of nitro compounds. *Journal of Materials Chemistry A* 1 (2013) 14311-14319.
- [39] K.T. Butterworth, J.A. Coulter, S. Jain, J. Foraker, S.J. McMahon, G. Schettino, K.M. Prise, F.J. Currell, and D.G. Hirst, Evaluation of cytotoxicity and radiation enhancement using 1.9 nm gold particles: potential application for cancer therapy. *Nanotechnology* 21 (2010) 295101-295101.
- [40] T. Wolfe, D. Chatterjee, J. Lee, J.D. Grant, S. Bhattarai, R. Taylor, G. Goodrich, P. Nicolucci, and S. Krishnan, Targeted gold nanoparticles enhance sensitization of prostate tumors to megavoltage radiation therapy in vivo. *Nanomedicine* 11 (2015) 1277-83.