

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ  
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ  
ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΚΗΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ανίχνευση δίκλωνων βλαβών στο DNA λόγω  
ακτινοβολίας laser Ti:Sapphire, με τη μέθοδο  
εστιών  $\gamma$ -H2AX**

**Νικόλαος Βούλγαρης**

Επιβλέπων καθηγητής: **Αναπλ. Καθ. Αλέξανδρος Γεωργακίλας**

Εξεταστική επιτροπή: **Καθ. Αλέξανδρος Παπαγιάννης**

**Αναπλ. Καθ. Απόστολος Κυρίτσης**

Αθήνα, Ιούνιος 2019



## Περίληψη

Η μελέτη των φαινομένων που συμβαίνουν κατά την αλληλεπίδραση της ιοντίζουσας και μη-ιοντίζουσας ακτινοβολίας με την βιολογική ύλη, και ειδικά το κυτταρικό DNA, αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους κλάδους της σύγχρονης τεχνολογίας και ραδιοβιολογίας.

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη επαγωγής δίκλωνων θραύσεων στο DNA με τη χρήση ακτινοβολίας laser Ti:Sapphire. Τα κύτταρα που ακτινοβολήθηκαν ήταν ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες και για την ανίχνευση τυχόν βλαβών στο DNA, χρησιμοποιήθηκε η ευαίσθητη μέθοδος εστιών  $\gamma$ -H2AX

Αρχικά πραγματοποιείται μια βιβλιογραφική ανασκόπηση των βασικών βιολογικών όρων που θα χρησιμοποιηθούν. Στη συνέχεια εξετάζονται, με βάση προηγούμενες έρευνες, οι τρόποι αλληλεπίδρασης της ιοντίζουσας και της μη-ιοντίζουσας ακτινοβολίας laser με την βιολογική ύλη, με έμφαση στις επιδράσεις τους στο DNA.

Στα πλαίσια της εργασίας αυτής πραγματοποιήθηκαν δυο πειράματα ακτινοβόλησης των ινοβλαστών με τη χρήση laser Ti:Sapphire, μήκους κύματος 807 nm, επαναληπτικότητας 85 MHz, διάρκειας παλμού  $dt=48$  s και μέσης ισχύος 360 mW. Στο πρώτο πείραμα τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν 30 λεπτά μετά την ακτινοβόληση. Στο δεύτερο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν δυο ομάδες κυττάρων, η πρώτη εκ των οποίων μονιμοποιήθηκε 30 λεπτά μετά την ακτινοβόληση ενώ η δεύτερη 60 λεπτά μετά την ακτινοβόληση. Τα κύτταρα εκτέθηκαν στην ακτινοβολία laser για διαφορετικά χρονικά διαστήματα προκειμένου να μεταβληθεί η συνολική ενέργεια ανά επιφάνεια που δέχονται.

Μετά την μονιμοποίηση πραγματοποιήθηκε η μέθοδος εστιών  $\gamma$ -H2AX με σκοπό την ανίχνευση βλαβών στο DNA. Η ιστονική πρωτεΐνη H2AX αποτελεί έναν ευρέως αποδεκτό βιοδείκτη σύνθετης βλάβης του DNA, η οποία φωσφορυλιώνεται άμεσα στα σημεία του DNA όπου έχει επέλθει δίκλωνη θραύση ( $\gamma$ -H2AX).

Τα αποτελέσματα του πειράματος δεν έδειξαν σημαντική μεταβολή του αριθμού των εστιών  $\gamma$ -H2AX, μεταξύ των δύο χρόνων επώασης μετά την ακτινοβολήση (30 και 60 λεπτά). Ακόμη παρατηρήθηκε ότι ο αριθμός των εστιών  $\gamma$ -H2AX που ανιχνεύθηκαν ήταν σημαντικά μικρότερος από τον αυτόν που προκύπτει κατά την ακτινοβολήση με ιοντίζουσα ακτινοβολία. Ταυτόχρονα, συγκρίνοντας κύτταρα που δεν δέχτηκαν ακτινοβολία με αυτά που ακτινοβολήθηκαν, παρατηρήθηκε σχετική αύξηση των εστιών για συγκεκριμένες τιμές του χρόνου ακτινοβολήσης. Τα βιβλιογραφικά αποτελέσματα με τη χρήση παρόμοιων διατάξεων laser είναι εξαιρετικά περιορισμένα, καθιστώντας την άμεση σύγκριση των αποτελεσμάτων δύσκολη. Συμπερασματικά, κρίνεται απαραίτητη η πραγματοποίηση παρόμοιων πειραμάτων, δοκιμάζοντας μεγαλύτερο εύρος χρόνων ακτινοβολήσης, προκειμένου να εξεταστούν περαιτέρω οι μηχανισμοί αλληλεπίδρασης της μη-ιοντίζουσας ακτινοβολίας laser με το DNA.

# **Abstract**

The study of the effects from the interaction of ionizing and non-ionizing radiation with biological matter, especially with cellular DNA, is one of the most important fields of modern technology and radiation biology.

The purpose of this work is the study of the induction of double strand breaks in the DNA, due to radiation produced by a femtosecond Ti:Sapphire laser, with wavelength of 807 nm, repetition rate of 85 MHz, pulse duration of 48 fs and average power of 360 mW. The cells that were irradiated were human skin fibroblasts. The method of  $\gamma$ -H2AX foci was utilized for the detection of any double strand breaks in the DNA.

Firstly, the basic biological terms that will be used in the study are described. Next, the mechanisms that ionizing and non-ionizing radiation interact with the DNA is being explored, based on previous studies.

For the purpose of this study, two experiments took place utilizing the Ti:Sapphire laser to irradiate human fibroblastic cells. In the first experiment, the cells were fixated 30 minutes after irradiation. In the second experiment, two groups of cells were used, with the first being fixated 30 minutes after irradiation and the second 60 minutes after irradiation. The cells were exposed to laser radiation for different time periods, in order to change the total energy per area that they received.

Following the fixation of the cells, the method of  $\gamma$ -H2AX foci was utilized in order to measure any breaks in the DNA.  $\gamma$ -H2AX (phosphorylated histone protein H2AX) foci appear at the points of double strand breaks, which makes this histone protein a widely accepted biomarker of complex DNA damage.

The results of the experiments did not show a significant difference in the number of  $\gamma$ -H2AX foci between the two different incubation periods after the irradiation (30 and 60 minutes respectively). It was also observed that the total number of foci in each cell was significantly lower than of a typical cell irradiated with ionizing radiation. What is more, by comparing the irradiated and non-irradiated cells, a noteworthy increase in the number of foci for specific irradiation times was seen. Previous studies with similar laser systems are limited, making the direct comparison of our results difficult. In conclusion, more experiments are deemed necessary, testing various irradiation times, in order to further investigate the specific effects of laser radiation in DNA.

## Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Δρ. Αλέξανδρο Γεωργακίλα, αναπληρωτή καθηγητή ΕΜΠ, για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας εργασίας. Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθ. Αλέξανδρο Παπαγιάννη και τον Αναπλ. Καθ. Απόστολο Κυρίτση για την τιμή που μου έκαναν να εξετάσουν την εργασία μου. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την υποψ. Διδάκτωρ Ιφιγένεια Μαυραγάνη για την πληθώρα συμβουλών που μου έδωσε μέσα στον τελευταίο χρόνο και για την ουσιαστική και συνεχή βοήθειά της στην εκτέλεση των πειραμάτων.

Επίσης ευχαριστώ τον Δρ. Δημήτρη Κλέτσα, διευθυντή ερευνών, και την Δρ. Ελένη Μαυρογονάτου, εντεταλμένη ερευνήτρια, από το Εργαστήριο Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών “Δημόκριτος”, για την ευγενική παραχώρησή τους των απαραίτητων υλικών και του εργαστηρίου τους για την εκτέλεση μέρους του πειράματος της εργασίας καθώς και για τις πολύτιμες οδηγίες τους.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Δρ. Δόμνα Κοτσιφάκη και τον υποψ. Διδάκτωρ Γιώργο Καρελιώτη για την καθοδήγησή τους κατά τη χρήση του laser Ti:Sapphire και για την καταλυτική βοήθειά τους σε κάθε απορία μου. Στη συνέχεια ευχαριστώ πολύ την Καθ. Μυρσίνη Μακροπούλου για τη στήριξη της κατά τη διάρκεια των σπουδών μου. Επίσης ευχαριστώ θερμά την υποψ. Διδάκτωρ Ιωάννα Τρέμη για την βοήθειά της στο πειραματικό μέρος της εργασίας αυτής.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου για την συνεχή τους πίστη, συμπαράσταση και υποστήριξη.



# Περιεχόμενα

Περίληψη.....	iii
Abstract.....	v
Ευχαριστίες.....	vii
Περιεχόμενα.....	ix

## Μέρος 1<sup>ο</sup>: Θεωρία

<b><u>Κεφάλαιο 1: Βασική Βιολογία</u></b> .....	3
1.1 Το κύτταρο.....	3
1.1.1 Βιολογία του κυττάρου.....	3
1.1.2 Πυρήνας ευκαρυωτικού κυττάρου.....	4
1.2 Το γενετικό υλικό.....	5
1.2.1 Δομή του DNA.....	5
1.2.2 Οργάνωση του DNA.....	7
1.3 Ο κυτταρικός κύκλος.....	9

## **Κεφάλαιο 2: Ακτινοβολίες και βιολογικά συστήματα.....11**

2.1	Ιοντίζουσα ακτινοβολία.....	11
2.1.1	Εισαγωγικά στοιχεία.....	11
2.1.2	Αλληλεπίδραση ιοντίζουσας ακτινοβολίας με την ύλη .....	12
2.2	Μη-ιοντίζουσα ακτινοβολία laser.....	14
2.2.1	Εισαγωγικά στοιχεία .....	14
2.2.2	Femtosecond laser – laser Ti:Sapphire.....	16
2.3	Αλληλεπίδραση μη-ιοντίζουσας ακτινοβολίας laser με την ύλη.....	19
2.3.1	Γενικά στοιχεία.....	19
2.3.2	Αλληλεπίδραση laser με το DNA.....	26
2.3.3	Αλληλεπίδραση femtosecond NIR laser με το DNA.....	30

## **Κεφάλαιο 3: Ανίχνευση βλαβών DNA-Μέθοδος $\gamma$ -H2AX.....33**

3.1	Βλάβες DNA και μηχανισμοί επιδιόρθωσης .....	33
3.1.1	Γενικά στοιχεία.....	33
3.2	Πρωτεΐνη H2AX.....	35
3.2.1	Γενικά στοιχεία.....	35
3.2.2	Ρόλος της πρωτεΐνης H2AX στην ανίχνευση βλαβών στο DNA.....	36

## **Μέρος 2<sup>ο</sup>: Πείραμα**

### **Κεφάλαιο 4: Πειραματική διαδικασία.....41**

4.1	Σκοπός του πειράματος.....	41
-----	----------------------------	----

4.2 Υλικά.....	43
4.2.1 Πείραμα ακτινοβόλησης ενός χρόνου επώασης.....	43
4.2.2 Πείραμα ακτινοβόλησης δύο χρόνων επώασης... ..	44
4.3 Καλλιέργεια κυττάρων και διαδικασία ακτινοβόλησης.....	46
4.3.1 Διαδικασία ακτινοβόλησης πειράματος ενός χρόνου επώασης. ....	46
4.3.3 Διαδικασία ακτινοβόλησης πειράματος δύο χρόνων επώασης.....	48
4.4 Πρωτόκολλα ανοσοφθορισμού.....	49
4.4.1 Πρωτόκολλο ανοσοφθορισμού πειράματος ενός χρόνου επώασης.....	49
4.4.2 Πρωτόκολλο ανοσοφθορισμού πειράματος δύο χρόνων επώασης.....	50

## **Μέρος 3<sup>ο</sup>: Αποτελέσματα**

### **Κεφάλαιο 5: Αποτελέσματα πειραμάτων και συμπεράσματα.....55**

5.1 Αποτελέσματα πειράματος ενός χρόνου επώασης. ....	55
5.2 Αποτελέσματα πειράματος δύο χρόνων επώασης.....	58
5.2.1 Πρώτη παρατήρηση των κυττάρων.....	58
5.2.2 Δεύτερη παρατήρηση των κυττάρων και καταμέτρηση εστιών.....	63
5.3 Σύγκριση των δυο πειραμάτων.....	70
5.4 Μελλοντικές βελτιώσεις.....	71
5.5 Συμπεράσματα .....	72

### **Βιβλιογραφία.....73**



# **ΜΕΡΟΣ 1<sup>ο</sup>**

## **ΘΕΩΡΙΑ**



# Κεφάλαιο 1

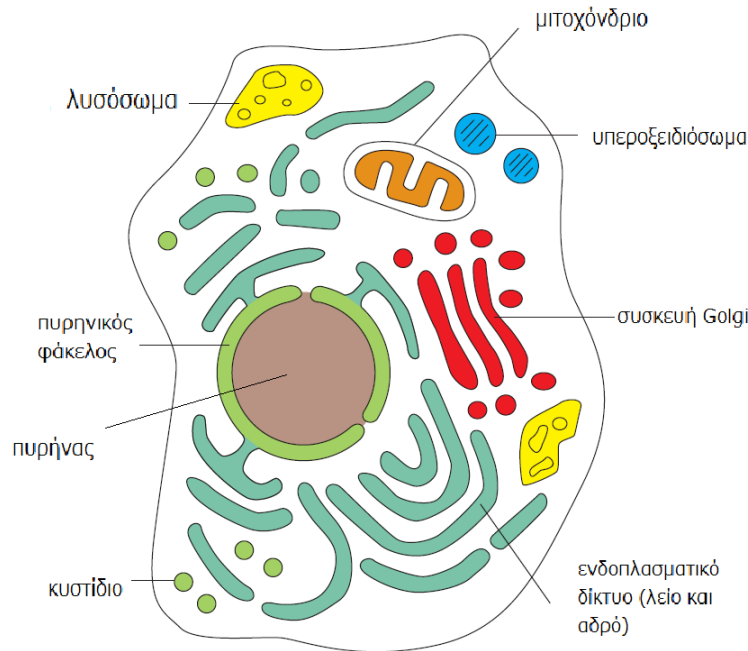
## Βασική Βιολογία

### 1.1 Το κύτταρο

#### **1.1.1 Βιολογία του κυττάρου**

Το κύτταρο, μια συστηματικά οργανωμένη ομάδα μορίων, αποτελεί τη βασική μονάδα ζωής. Οργανισμοί των οποίων τα κύτταρα δεν διαθέτουν σχηματισμένο πυρήνα ονομάζονται προκαρυωτικά ενώ οργανισμοί των οποίων τα κύτταρα διαθέτουν σχηματισμένο πυρήνα ονομάζονται ευκαρυωτικά. Κάθε ευκαρυωτικό κύτταρο διαθέτει μια μεμβράνη που περικλείει τον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα [1]. Τα ευκαρυωτικά κύτταρα διαχωρίζονται σε φυτικά και ζωικά, τα οποία παρουσιάζουν κοινά χαρακτηριστικά καθώς και μικρές διαφορές, όπως την ύπαρξη του χλωροπλάστη στα φυτικά. Κάθε ευκαρυωτικό κύτταρο περιβάλλεται από την πλασματική μεμβράνη, η οποία το προστατεύει από το περιβάλλον, ελέγχοντας τις ουσίες που εισέρχονται και εξέρχονται από αυτό [2].

Η γενετική πληροφορία του κυττάρου στεγάζεται στον πυρήνα, το πιο σημαντικό μέρος ενός κυττάρου. Στο κυτταρόπλασμα περιέχεται μεγάλος αριθμός οργανιδίων συμπεριλαμβανομένων των μιτοχονδρίων, των λυσοσωμάτων και του ενδοπλασματικού δικτύου. Τα οργανίδια αυτά σχετίζονται με διαδικασίες όπως η παραγωγή ενέργειας (μιτοχόνδια), η διάσπαση ουσιών (λυσοσώματα) και η μεταφορά ουσιών (ενδοπλασματικό δίκτυο) [3].



**Εικόνα 1.1** Απεικόνιση τυπικού ευκαρυωτικού κυττάρου (ζωικό). Διακρίνεται ο πυρηνικός φάκελος, που περικλείει τον πυρήνα, καθώς και αρκετά οργανίδια όπως τα μιτοχόνδρια, τα λυσοσώματα, η συσκευή Golgi, το λείο και το αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο, τα υπεροξειδισώματα και τα κυστίδια [1]

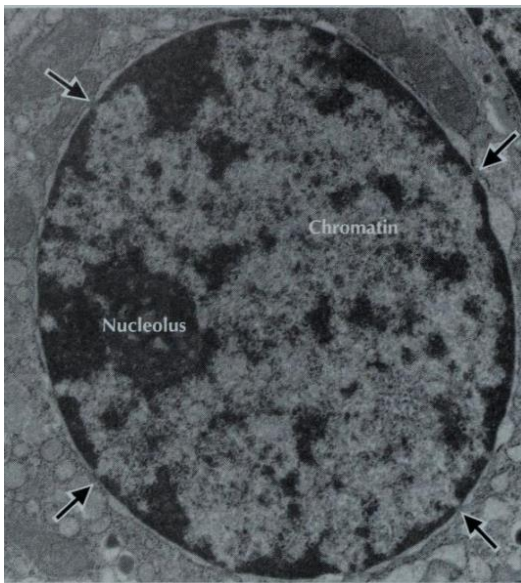
### 1.1.2 Πυρήνας ευκαρυωτικού κυττάρου

Ο πυρήνας αποτελεί το κέντρο ελέγχου των λειτουργιών του κυττάρου [4]. Οι δυο ομόκεντρες μεμβράνες που περικλείουν τον πυρήνα σχηματίζουν τον πυρηνικό φάκελο. Οι μεμβράνες αυτές διαχωρίζουν το εσωτερικό του πυρήνα από το κυτταρόπλασμα. Οι πυρηνικοί πόλοι που υπάρχουν στον πυρηνικό φάκελο παίζουν καίριο ρόλο στην φυσιολογία όλων των ευκαρυωτικών κυττάρων, επιτρέποντας την ανταλλαγή μορίων



μεταξύ του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος. Είναι σύνθετες δομές που επιτρέπουν την περιορισμένη διέλευση δομών όπως οι πρωτεΐνες και το RNA. Στον πυρήνα βρίσκονται τα μόρια του DNA, μακριά πολυμερή που περιέχουν την γενετική πληροφορία του οργανισμού [1].

Εντός του πυρήνα βρίσκεται ο πυρηνίσκος, όπου πραγματοποιείται η μεταγραφή του RNA. Το RNA είναι ένα πολυμερές που παίζει σημαντικό ρόλο στη μεταφορά της γενετικής πληροφορίας και στη πρωτεϊνοσύνθεση [4].



*Εικόνα 1.2* Εικόνα από ηλεκτρονική μικρογραφία σάρωσης ενός πυρήνα. Διακρίνεται ο πυρηνίσκος (nucleolus), η χρωματίνη (chromatin) και οι πυρηνικοί πόροι (βέλη) [4]

## **1.2 Το γενετικό υλικό**

### **1.2.1 Δομή του DNA**

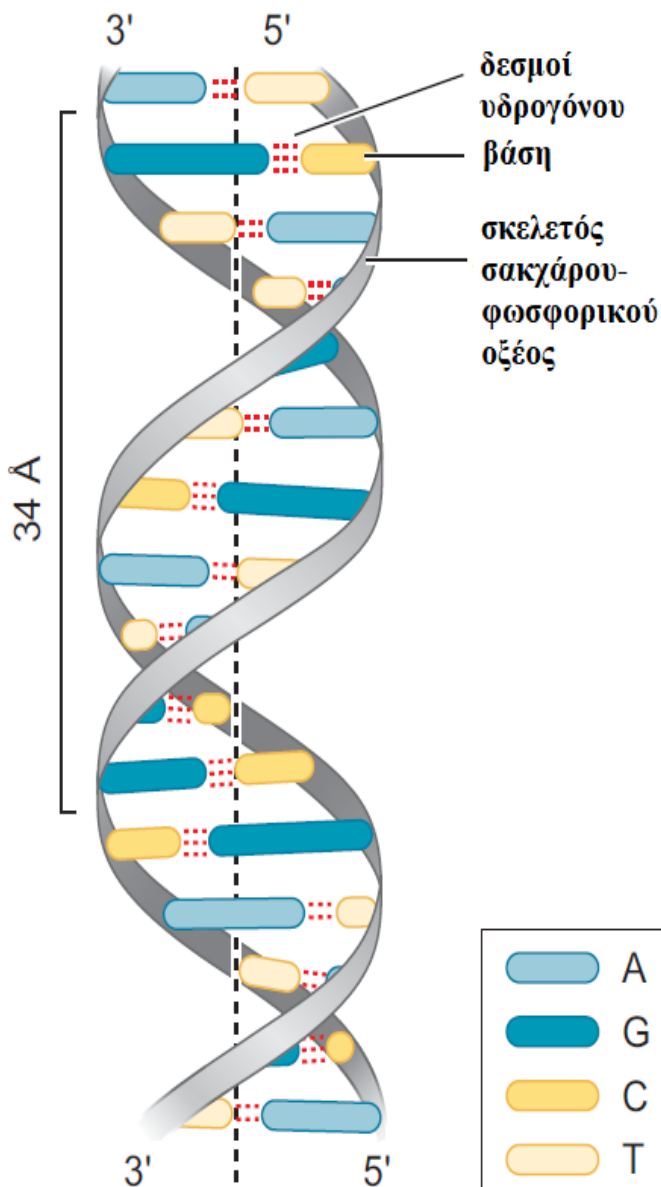
Οι γενετικές οδηγίες, τα γονίδια, είναι αποθηκευμένες σε μόρια που ονομάζονται νουκλεϊνικά οξέα, το δεσοξυριβοζονουκλεϊνικό οξύ (DNA) και το ριβοζονουκλεϊνικό οξύ (RNA). Οι οδηγίες αυτές είναι γραμμένες με τον ίδιο χημικό κώδικα, αποτελούνται από

τις ίδιες χημικές δομές και αντιγράφονται με τον ίδιο τρόπο προκειμένου να επιτρέψουν την αναπαραγωγή ενός οργανισμού. Εκτός από την αποθήκευση της γενετικής πληροφορίας, το γενετικό υλικό είναι υπεύθυνο και για τη μεταβίβαση της σε νέα κύτταρα και σε νέους οργανισμούς. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω του αυτοδιπλασιασμού του DNA.

Σε κάθε κύτταρο οι πολυμερικές αλυσίδες του DNA αποτελούνται από 4 επαναλαμβανόμενα μονομερή, που ονομάζονται νουκλεοτίδια. Τα νουκλεοτίδια είναι υπομονάδες του DNA και του RNA που λαμβάνουν κεντρικό ρόλο στην μεταφορά

ενέργειας. Κάθε νουκλεοτίδιο αποτελείται από έναν αζωτούχο δακτύλιο (βάση) συνδεδεμένο με μια πεντόζη, η οποία μπορεί να είναι δεσοξυριβόζη ή ριβόζη [1]. Η πεντόζη είναι ένα σάκχαρο 5 ατόμων C και είναι συνδεδεμένη με τουλάχιστον μία φωσφορική ομάδα. Κάθε πεντόζη συνδέεται με την επόμενη πεντόζη μέσω των φωσφορικών ομάδων αυτών, σχηματίζοντας μια πολυμερική αλυσίδα από επαναλαμβανόμενες φωσφορικές ομάδες. Το DNA επιμηκώνεται προσθέτοντας μονομερή στο ένα του άκρο.

Η κύρια λειτουργία των νουκλεοτιδίων στο κύτταρο είναι η αποθήκευση βιολογικής πληροφορίας. Το DNA περιέχει την δεσοξυριβόζη και τις βάσεις αδενίνη (A), γουανίνη (G), κυτοσίνη (C) και θυμίνη (T). Το DNA αποτελείται από δυο πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες, αντιπαράλληλες η μία στην άλλη, οι



**Εικόνα 1.3** Απεικόνιση του μοντέλου διπλής έλικας του DNA [5]

οποίες είναι ενωμένες με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των βάσεων τους και σχηματίζουν μια διπλή έλικα. Οι βάσεις κάθε μιας αλυσίδας συνδέονται με τις βάσεις της άλλης, σύμφωνα με έναν αυστηρό κανόνα συμπληρωματικότητας. Η αδενίνη συνδέεται με δυο δεσμούς υδρογόνου με τη θυμίνη και η κυτοσίνη με τρεις δεσμούς υδρογόνου με την γουανίνη. Με αυτόν το τρόπο σταθεροποιούνται τα καινούργια μονομερή και ελέγχεται η επιλογή του επόμενου μονομερούς που θα προστεθεί στην αναπτυσσόμενη αλυσίδα [2]. Η δίκλωνη έλικα του DNA έχει διάμετρο  $20 \text{ \AA} = 2 \text{ nm}$  και μια περιστροφή της συμπληρώνεται κάθε  $34 \text{ \AA} = 3,4 \text{ nm}$ . Ανά περιστροφή εμφανίζονται 10,5 ζεύγη βάσεων περίπου καθώς η απόσταση μεταξύ των βάσεων είναι  $3,4 \text{ \AA}$  [5].

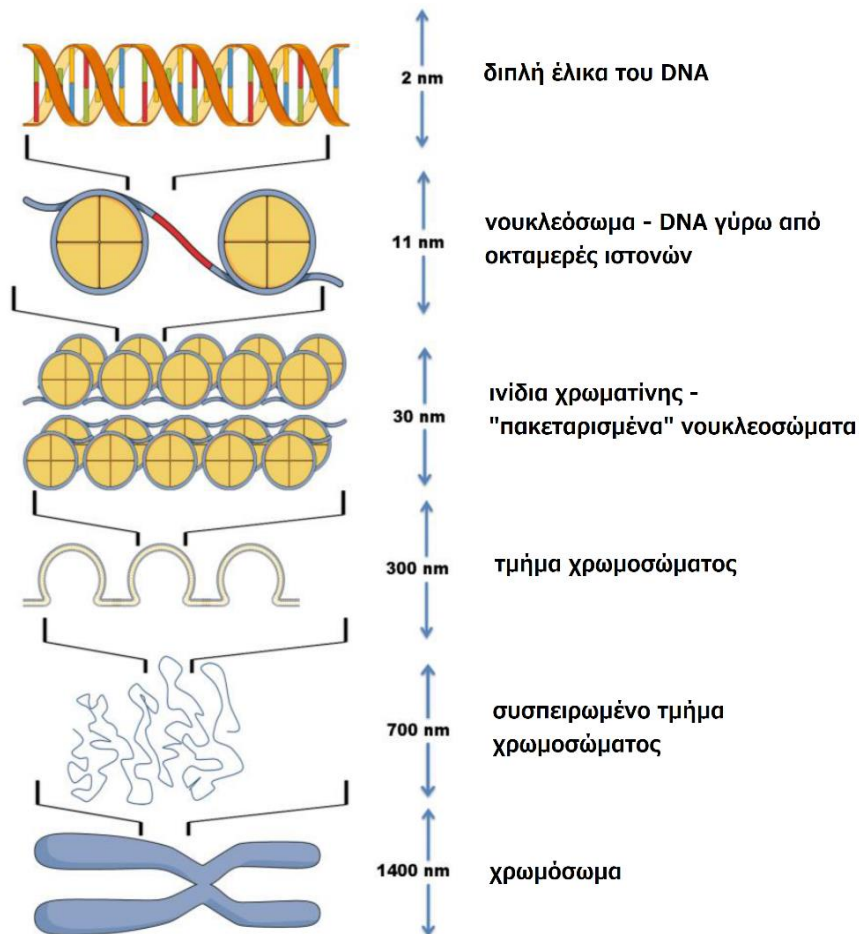
Αντίστοιχα, το RNA αποτελείται από μια πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα και περιέχει την ριβόζη και τις βάσεις αδενίνη (A), γουανίνη (G), κυτοσίνη (C) και ουρακίλη (U). Καθώς τα μόρια RNA έχουν τη μορφή μονόκλωνης αλυσίδας, η ακολουθία των βάσεων τους είναι συμπληρωματική με το αντίστοιχο μέρος της ακολουθίας του DNA, με την ουρακίλη να είναι συμπληρωματική της αδενίνης. Τα δύο νουκλεϊκά οξέα έχουν διαφορετικούς ρόλους στο κύτταρο. Στο DNA αποθηκεύονται οι κληρονομικές πληροφορίες ενώ το RNA μεταφέρει εφήμερα μοριακές οδηγίες [1].

Προκειμένου να συνεχίσει τη λειτουργία αποθήκευσης πληροφορίας, το DNA πρέπει να δημιουργεί αντίγραφα του εαυτού του και πρέπει να εκφράζει την πληροφορία αυτή, συντελώντας στη σύνθεση μορίων στο κύτταρο. Η διαδικασία αυτή οδηγεί στην παραγωγή δύο ειδών πολυμερών, τα RNA και τις πρωτεΐνες. Κατά τη διαδικασία της μεταγραφής χρησιμοποιούνται κομμάτια της αλληλουχίας του DNA προκειμένου να συντεθούν μόρια RNA. Στη συνέχεια, κατά τη σύνθετη διαδικασία της μετάφρασης, πολλά από τα μόρια RNA κατευθύνουν τη σύνθεση πρωτεϊνών. Κάθε τμήμα DNA που περιέχει τον κώδικα για τη σύνθεση διαφορετικής πρωτεΐνης ονομάζεται γονίδιο [2].

### 1.2.2 Οργάνωση του DNA

Ειδικές πρωτεΐνες διπλώνουν κάθε μόριο DNA σε μια δομή που ονομάζεται χρωμόσωμα. Το ανθρώπινο γονιδίωμα περιέχει περίπου  $3,2 \times 10^9$  νουκλεοτίδια μοιρασμένα σε 24 χρωμοσώματα. Το DNA διπλώνεται με τη βοήθεια πρωτεϊνών και σχηματίζει τα ινίδια

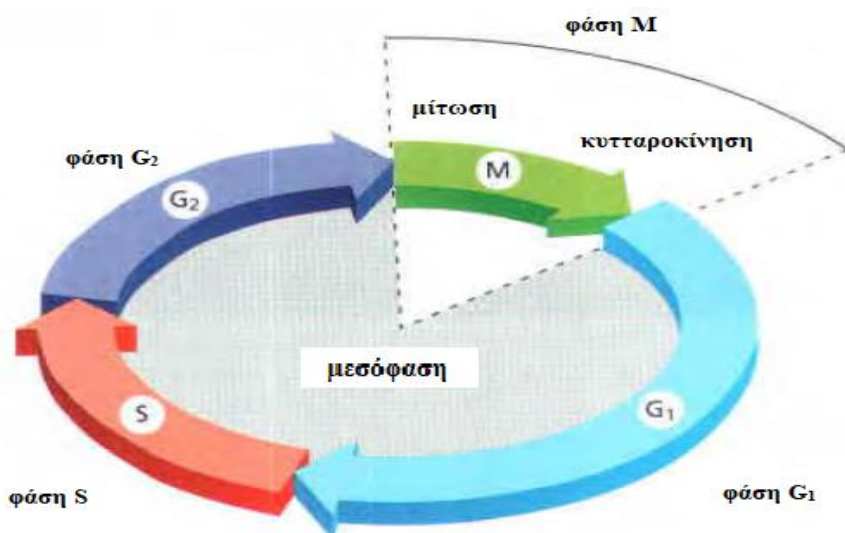
χρωματίνης, τα οποία αναδιπλώνονται περαιτέρω και σχηματίζουν τα χρωμοσώματα. Μονάδα οργάνωσης της χρωματίνης είναι το νουκλεόσωμα [1]. Οι ιστόνες H1, H2A, H2B, H3 και H4 είναι θετικά φορτισμένες, βασικές πρωτεΐνες που δημιουργούν ιονικούς δεσμούς με το αρνητικά φορτισμένο DNA και παίζουν μεγάλο ρόλο στο σχηματισμό των νουκλεοσωμάτων [3]. Το νουκλεόσωμα συνίσταται από DNA μήκους 146 ζευγών βάσεων γύρω από ένα οκταμερές ιστόνων. Έτσι επιτυγχάνεται ο απαραίτητος βαθμός αναδίπλωσης, προκειμένου να χωρέσει το DNA μήκους περίπου δυο μέτρων στον πυρήνα, ο οποίος έχει διάμετρο μικρότερη από 10 μικρόμετρα [6].



*Εικόνα 1.4 Αναπαράσταση των επιπέδων συσπείρωσης του DNA, από την διπλή έλικα μέχρι το χρωμόσωμα [7]*

### 1.3 Κυτταρικός κύκλος

Ο κυτταρικός κύκλος είναι ο αναγκαίος μηχανισμός με τον οποίο όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί αναπαράγονται. Τα πιο σημαντικά στάδια του κύκλου είναι η μίτωση, όταν ο πυρήνας διαχωρίζεται, και η κυτταροκίνηση, όταν το κύτταρο χωρίζεται στα δύο. Τα δυο αυτά στάδια μαζί συντελούν την φάση M του κυτταρικού κύκλου. Με την ολοκλήρωση της φάσης M, επέρχεται η κυτταρική διαίρεση και παράγονται δύο θυγατρικά κύτταρα. Το στάδιο μεταξύ δυο φάσεων M ονομάζεται μεσόφαση, η οποία χωρίζεται σε τρεις φάσεις: G<sub>1</sub>, S και G<sub>2</sub>. Η φάση S έπεται της G<sub>1</sub> και ακολουθείται από την G<sub>2</sub>. Κατά τις δύο αυτές φάσεις το κύτταρο συνεχίζει να αναπτύσσεται, ενώ κατά την S αντιγράφει το πυρηνικό του DNA. Η ανάπτυξη του κυττάρου κατά τις φάσεις G<sub>1</sub> και G<sub>2</sub>, συνοδεύεται από μεταγραφή γονιδίων και σύνθεση πρωτεϊνών [1]. Η διάρκεια της φάσης G<sub>1</sub> επηρεάζεται σημαντικά από εξωτερικούς παράγοντες και μπορεί να οδηγήσει το κύτταρο σε μια φάση αδράνειας, G<sub>0</sub>, για μέρες, εβδομάδες ή και χρόνια [2]. Ο κυτταρικός κύκλος ενός τυπικού ανθρώπινου κυττάρου διαρκεί περίπου 24 ώρες. Η μίτωση και η κυτταροκίνηση διαρκούν μόλις 1 ώρα, με συνέπεια το κύτταρο να περνάει το 95% του χρόνου ζωής του στη μεσόφαση [4].



*Εικόνα 1.5 Ο κυτταρικός κύκλος. Διακρίνονται οι φάσεις G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> και M. Κατά τις φάσεις G<sub>1</sub> και G<sub>2</sub> το κύτταρο αναπτύσσεται και στο τέλος της φάσης M πραγματοποιείται η κυτταροκίνηση [2]*

Κύτταρα σε διαφορετικά στάδια του κυτταρικού κύκλου μπορούν να διαφοροποιηθούν από το περιεχόμενο τους σε DNA. Συγκεκριμένα, τα ζωικά κύτταρα είναι διπλοειδή, περιέχουν δηλαδή δυο αντίγραφα του κάθε χρωμοσώματος. Κατά την φάση S το γενετικό υλικό διπλασιάζεται, παραμένει διπλάσιο για την G<sub>2</sub> και επανέρχεται στην αρχική ποσότητα μετά την κυτταροκίνηση. Η οπτικοποίηση του DNA επιτυγχάνεται πειραματικά με τη χρήση φθορίζουσας χρωστικής που προσδένεται σε αυτό. Μέσω ανάλυσης της έντασης του φθορισμού με κυτταρομετρία ροής, είναι δυνατόν να διακριθεί η φάση του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκεται κάθε κύτταρο [4].

## Κεφάλαιο 2

# Ακτινοβολίες και βιολογικά συστήματα

### 2.1 Ιοντίζουσα ακτινοβολία

#### 2.1.1 Γενικά στοιχεία

Η ιοντίζουσα ακτινοβολία αποτελείται είτε από φορτισμένα σωματίδια με μάζα, όπως πρωτόνια και ηλεκτρόνια ή ουδέτερα κβάντα ενέργειας χωρίς μάζα, τα φωτόνια και τα νετρίνα. Ιοντίζουσα ακτινοβολία μπορεί να προέρχεται από το περιβάλλον, με τη μορφή κοσμικής και ηλιακής ακτινοβολίας, ή από πηγές που βρίσκονται στη Γη. Τα σωματίδια-α, πυρήνες  $^4\text{He}$ , εκπέμπονται διαπερνώντας το φράγμα του δυναμικού Coulomb ενός βαρέου πυρήνα, μέσω του φαινομένου σήραγγας. Τα σωματίδια-β εκπέμπονται κατά το μετασχηματισμό ενός πυρήνα σε έναν με ένα πρωτόνιο περισσότερο και ένα νετρόνιο λιγότερο, έχοντας τον ίδιο ατομικό αριθμό και εκπέμποντας ταυτόχρονα ένα ηλεκτρόνιο και ένα αντι-νεutrino. Οι ακτίνες-γ είναι ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία που εκπέμπεται από ραδιενεργή πηγή, όταν αποδιεγείρεται μια διεγερμένη πυρηνική ενεργειακή

κατάσταση [8]. Οι ακτίνες X αποτελούν και αυτές ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, δηλαδή ιονισμένα φωτόνια, που παράγονται όμως από μηχανήματα. Η ιοντίζουσα ακτινοβολία μετριέται σε ηλεκτρονιοβόλτ (eV). Ένα ηλεκτρονιοβόλτ ισοδυναμεί με την ενέργεια που προσλαμβάνει ένα ηλεκτρόνιο όταν επιταχύνεται μέσω μιας διαφοράς δυναμικού ενός Volt. Η ισοδύναμη τιμή ενός ηλεκτρονιοβόλτ στο σύστημα S.I. είναι  $1,602 \times 10^{-16}$  Joules [9].

### 2.1.2 Αλληλεπίδραση ιοντίζουσας ακτινοβολίας και ύλης

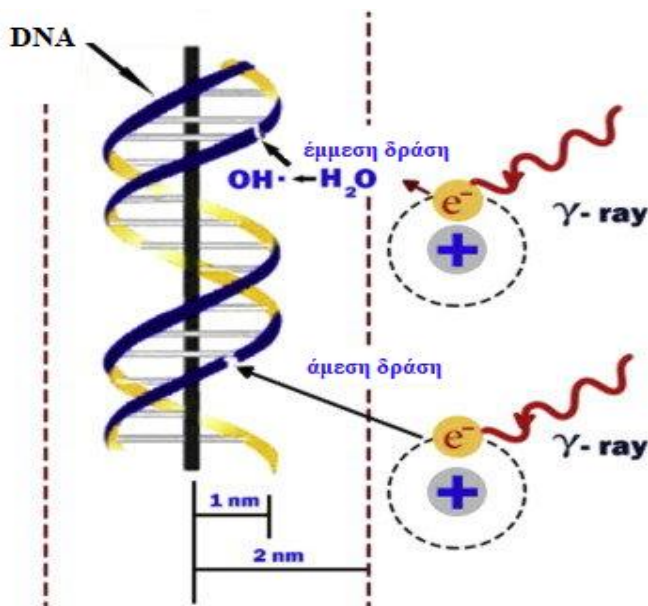
Η αλληλεπίδραση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας με βιολογικούς οργανισμούς οδηγεί σε συγκεκριμένα βιολογικά αποτελέσματα που μπορεί να εκδηλωθούν σαν κλινικά συμπτώματα. Οι βλάβες μπορεί να είναι είτε σωματικές, που εκδηλώνονται στον ίδιο οργανισμό ή κληρονομικές, που εκδηλώνονται στους απογόνους του [9]. Τα πιθανά αποτελέσματα της δράσης της ιοντίζουσας ακτινοβολίας περιλαμβάνουν τις βλάβες στο κυτταρικό DNA, τον κυτταρικό θάνατο, τις χρωμοσωμικές αλλοιώσεις, καρκινογένεση κ.ά. [10].

Ο βαθμός επίδρασης της ιοντίζουσας ακτινοβολίας με την ύλη μπορεί να μετρηθεί ποσοτικά μέσω των μεγεθών ενεργειακή δόση D (ενέργεια που απορροφάται από την ύλη), δόση ιοντισμού  $D_1$  (σχετίζεται με το φορτίο που απελευθερώνεται λόγω ακτινοβολίας στον αέρα) και ισοδύναμη δόση  $D_q$  (εκφράζει το βαθμό επίδρασης της ακτινοβολίας στο σώμα). Το είδος της ιοντίζουσας ακτινοβολίας καθορίζει την διεισδυτικότητα της. Τα σωματίδια-α δεν μπορούν να διαπεράσουν ένα φύλλο χαρτιού και θέτουν κίνδυνο σε έναν οργανισμό μόνο εάν επέλθει κατάποση ή εισπνοή αντικειμένου που τα εκπέμπει. Τα σωματίδια-β ανακόπτονται από λεπτά κομμάτια πλαστικών ή μετάλλων. Οι ακτίνες X και οι ακτίνες-γ δεν μπορούν να διαπεράσουν κομμάτια πυκνών μέσων μεγάλου πάχους, όπως είναι ο μόλυβδος. Ο τρόπος αλληλεπίδρασης της ακτινοβολίας-γ με την ύλη σχετίζεται με την κβαντική φύση των φωτονίων και περιγράφεται μέσω του φωτοηλεκτρικού φαινομένου και του φαινομένου Compton. Η κλασική προσέγγιση της ακτινοβολίας οδήγησε στην ανάπτυξη των θεωριών Thompson και Rayleigh. Ακόμα, εάν η ενέργεια του φωτονίου που



απορροφάται ξεπεράσει τα 1,022 MeV, παράγεται ένα ζεύγος ηλεκτρονίου-ποζιτρονίου σε μια διαδικασία που ονομάζεται δίδυμη γένεση [8].

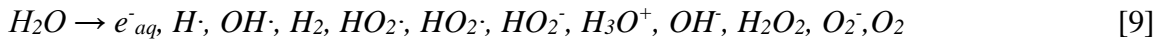
Συνοπτικά, η δράση της ακτινοβολίας μπορεί να διαχωριστεί σε έμμεση και άμεση. Κατά την έμμεση δράση, το μόριο DNA υφίσταται αλλοιώσεις μέσω δευτερογενών αντιδράσεων, όπως την ραδιόλυση του νερού. Κατά την άμεση δράση, το ίδιο το μόριο DNA δέχεται την ιοντίζουσα ακτινοβολία και μπορεί να οδηγήσει στη χημική αλλοίωσή του, προκαλώντας ακόμα και κυτταρικό θάνατο [10].



*Εικόνα 2.1 Έμμεση (ραδιόλυση νερού) και άμεση δράση ιοντίζουσας ακτινοβολίας, με συνέπεια την επαγωγή βλάβης στο DNA [10]*

Καθώς το νερό αποτελεί βασικό συστατικό των κυττάρων, όταν ένα ραδιενεργό σωματίδιο εισέρχεται στο κύτταρο πραγματοποιείται ιοντισμός του νερού. Έτσι σχηματίζονται ελεύθερα ηλεκτρόνια, ελεύθερες ρίζες υδρογόνου ( $H\cdot$ ), ρίζες υδροξυλίου ( $OH\cdot$ ), υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και άλλα είδη δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS ή Reactive Oxygen Species) [9]. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου είναι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου που σχετίζονται με βλάβες στην περιοχή του DNA, συμπεριλαμβανομένων των μονόκλωνων και δίκλωνων θραύσεων [11]. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι ιδιαίτερα τοξικό για τα βιολογικά μόρια και μπορεί να προκαλέσει βλάβη στο DNA. Ενώ ο πυρηνικός φάκελος προστατεύει το γενετικό υλικό, αυτό είναι ιδιαίτερα ευάλωτο σε

τοξίνες όταν το κύτταρο πρόκειται να διαιρεθεί. Η ραδιόλυση του νερού μπορεί να γραφεί συνοπτικά ως εξής:



Μετά τη ραδιόλυση, υπάρχει πιθανότητα τα αρχικά μόρια του νερού να σχηματιστούν ξανά. Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω της ανασύζευξης (άμεση δημιουργία των μορίων από τα σχηματισμένα ιόντα), της αποκατάστασης (σχηματισμός των μορίων  $10^{-3}$  δευτερόλεπτα μετά την ραδιόλυση) ή της επιδιόρθωσης από κατάλληλο ένζυμο [8].

Είδη βλαβών που μπορεί να προκαλέσει η ιοντίζουσα ακτινοβολία είναι το μονό σπάσιμο της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας DNA στην περιοχή σύνδεσης μεταξύ σακχάρου-φωσφορικής ομάδας (Single Strand Break ή SSB), το σπάσιμο δύο πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων DNA σε γειτονικές περιοχές (Double Strand Break ή DSB), η διαμοριακή σύνδεση μεταξύ DNA και πρωτεϊνών (ή η σύνδεση μεταξύ των νουκλεοτιδίων του ίδιου μορίου DNA) και η χημική αλλοίωση οργανικών βάσεων [9]. Η δίκλωνη θραύση (DSB) είναι η πιο επικίνδυνη βλάβη που μπορεί να προκαλέσει η ιοντίζουσα ακτινοβολία στο DNA [12].

## **2.2 Μη-ιοντίζουσα ακτινοβολία laser**

### **2.2.1 Εισαγωγικά στοιχεία**

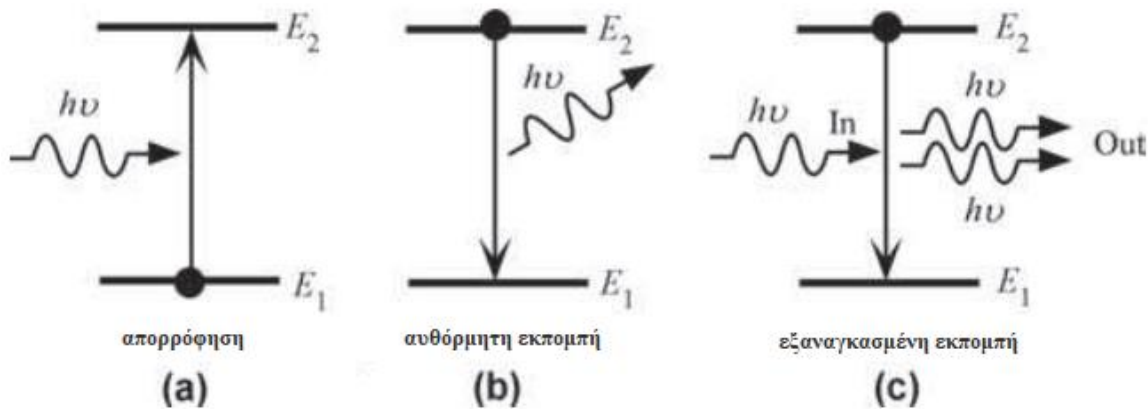
Η λέξη laser αποτελεί το ακρωνύμιο του «Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation» (ενίσχυση φωτός με εξαναγκασμένη εκπομπή ακτινοβολίας). Ο βασικός μηχανισμός λειτουργίας των laser απαιτεί ένα ενεργό μέσο το οποίο έχει τη δυνατότητα να εκπέμπει ακτινοβολία στην επιθυμητή περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος όταν διεγερθεί. Ακόμη, πρέπει να δημιουργηθεί μια αντιστροφή πληθυσμών μέσα στο ενεργό υλικό, δηλαδή να υπάρχουν περισσότερα διεγερμένα άτομα ή μόρια σε κάποιο υψηλότερο ενεργειακό επίπεδο. Η αντιστροφή πληθυσμού επιτυγχάνεται μέσω κάποιου μηχανισμού άντλησης της ενέργειας που συχνά είναι κάποιο άλλο laser. Τέλος πρέπει να υπάρχει οπτική ανατροφοδότηση στα άκρα του ενεργού υλικού, προκειμένου να υπάρχει

πραγματική ταλάντωση laser. Αυτό επιτυγχάνεται χάρη στο οπτικό αντηχείο, μια οπτική συσκευή ανατροφοδότησης [13]. Εάν ικανοποιούνται αυτές οι συνθήκες, εξασφαλίζεται μια ισχυρά συγκεντρωμένη, μονοχρωματική δέσμη φωτός, η οποία καθιστά τα laser εξαιρετικά χρήσιμα. Η τεχνολογία των laser αναπτύσσεται διαρκώς από το 1960 και χρησιμοποιείται πλέον ευρέως σε πολλούς τομείς όπως η ιατρική, η επικοινωνία, οι βιομηχανικές εφαρμογές κ.α. [14].

Όταν ένα ηλεκτρόνιο υφίσταται μεταβάσεις μεταξύ δυο ενεργειακών επιπέδων είτε εκπέμπει είτε απορροφά ένα φωτόνιο, το οποίο περιγράφεται ως κύμα συχνότητας:

$$\nu = \frac{\Delta E}{h}$$

,όπου  $\Delta E$  είναι η ενεργειακή διαφορά των επιπέδων και  $h$  η σταθερά του Planck.



**Εικόνα 2.2** Διάγραμμα ενεργειακών επιπέδων όπου φαίνεται (a) η απορρόφηση, (b) αυθόρμητη εκπομπή και (c) η εξαναγκασμένη εκπομπή [15]

Μεταξύ των επιπέδων αυτών μπορεί να πραγματοποιηθεί η διαδικασία της αυθόρμητης εκπομπής, κατά την οποία το ηλεκτρόνιο πέφτει στο κατώτερο επίπεδο με τυχαίο τρόπο, και η διαδικασία της εξαναγκασμένης εκπομπής, όπου το ηλεκτρόνιο υποχρεώνεται να πέσει στο κατώτερο επίπεδο [14]. Η ενίσχυση του φωτός βασίζεται στην εξαναγκασμένη εκπομπή η οποία οδηγεί στην παραγωγή φωτονίων ίδιας συχνότητας, φάσης και κατεύθυνσης [15].

Τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά της ακτινοβολίας laser είναι η κατευθυντικότητα, η μονοχρωματικότητα, η υψηλή φωτεινότητα και η συμφωνία φάσης (χωρική και χρονική)

της εξερχόμενης δέσμης φωτονίων. [14,16]. Η πλειοψηφία των laser μπορεί να ταξινομηθεί σαν: laser μονωτών με προσμείξεις (σαπφείρου, ρουβινίου, νεοδυμίου κ.α.), laser ημιαγωγών (GaAs κ.α), laser αερίων (ατομικά, ιοντικά, ατμών μετάλλου και μοριακά) και laser υγρών χρωστικών. Στα laser μονωτών, το ενεργό μέσο είναι ένα κρυσταλλικό ή άμορφο υλικό, όπου έχει γίνει έγχυση άλλου υλικού με τη μορφή ιόντων [14]. Τα laser μπορούν να διαχωριστούν επίσης ανάλογα με το είδος λειτουργίας τους σε laser συνεχούς λειτουργίας (CW ή continuous wave laser) και laser παλμικής λειτουργίας (pulsed laser). Για την παραγωγή υπερβραχέων παλμών της τάξης των  $10^{-7}$ - $10^{-8}$  s και  $10^{-8}$ - $10^{-14}$  s χρησιμοποιούνται αντίστοιχα οι τεχνικές λειτουργίας μετατρέπόμενου ρυθμού (Q-switching) και εγκλειδωσης ρυθμού (mode locking) [13].

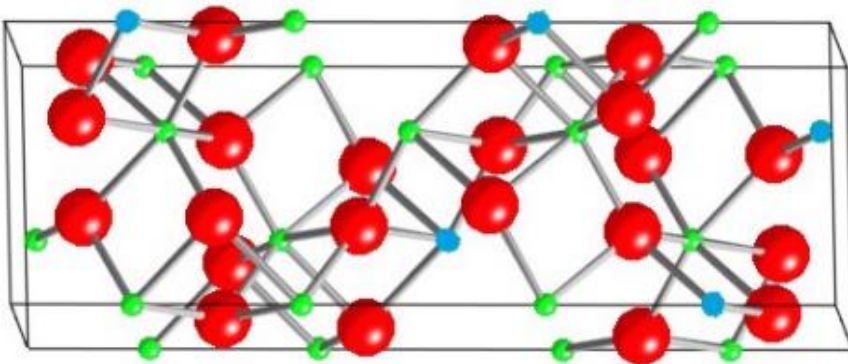
### **2.2.2 Femtosecond laser – Το laser Ti:Sapphire**

Είκοσι περίπου χρόνια μετά την εφεύρεση των laser, επιτεύχθηκε η συρρίκνωση της διάρκειας του παλμού στη κλίμακα των picosecond ( $1\text{ps} = 10^{-12}$ ) και femtosecond ( $1\text{fs} = 10^{-15}$  s). Τα περισσότερα από τα laser υπερβραχέων παλμών (Ultra-short laser pulse) της τάξης των femtosecond, εκπέμπουν ακτινοβολία στο σχεδόν υπέρυθρο και στο ορατό μέρος του φάσματος. Η εφεύρεση των laser αυτών άνοιξε τον δρόμο για καινούργιους τομείς έρευνας και εφαρμογών σε ποικίλα πεδία όπως η επιστήμη των υλικών και η βιοϊατρική [17]. Η λειτουργία των παλμικών laser βασίζεται στη ακτινοβόληση παλμών εξαιρετικά μικρής διάρκειας (τάξη των femtosecond =  $10^{-15}$  s) με σταθερό ρυθμό. Τα laser της κατηγορίας αυτής συνήθως δίνουν τυπικές τιμές της έντασης ακτινοβολίας κορυφής της τάξης των  $10^{12}$  W/m<sup>2</sup>, εάν εστιαστούν σε επιφάνεια της τάξης των  $10^{-7}$  m<sup>2</sup> [14]. Η παραγωγή υπερβραχέων παλμών επιτυγχάνεται συνήθως με τη μέθοδο εγκλειδωσης ρυθμών (mode-locking) [17]. Χάρη στη σταθερή φάση ανάμεσα στους ρυθμούς του οπτικού αντηχείου, προσθέτοντας τα ηλεκτρικά πεδία σχηματίζονται κορυφές οι οποίες αντιστοιχούν στους υπερβραχείς παλμούς [13].



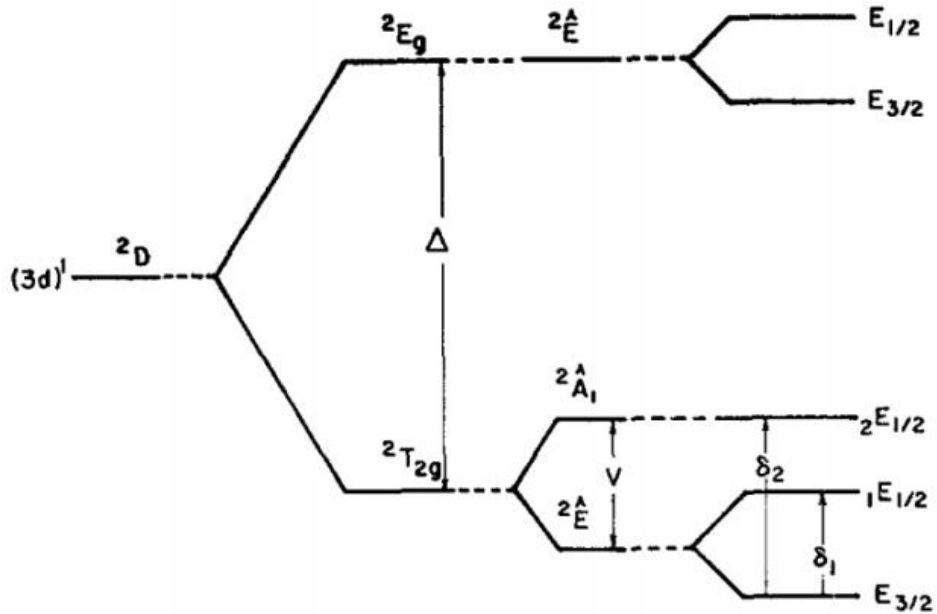
*Εικόνα 2.3 Φωτογραφία της διάταξης laser Ti:Sapphire που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία*

Η πρώτη κατασκευή laser Ti:Sapphire, πραγματοποιήθηκε το 1982 και ήταν το πρώτο laser που παρήγαγε παλμούς πολύ μικρής διάρκειας [17]. Τα laser Ti:Sapphire (ή  $Ti:Al_2O_3$ ) είναι laser μονωτών. Όπως όλα τα laser μονωτών, είναι στερεό, εύκολο να συντηρηθεί και ικανό να δημιουργήσει υψηλές ισχύες κορυφής. Επίσης παρουσιάζει σταθερό ρυθμό επανάληψης (επαναληπτικότητα). Το ενεργό μέσο είναι κρύσταλλος σαφείρου ( $Al_2O_3$ ) και οι προσμίξεις είναι ιόντα  $Ti^{+3}$  [14]. Τα laser αυτά εκπέμπουν παλμικά ή συνεχώς, κυρίως στην περιοχή του εγγύς υπέρυθρου, βρίσκοντας εφαρμογές για τιμές του μήκους κύματος συνήθως κοντά στα 800 nm. Laser της κατηγορίας αυτής μπορούν να ρυθμιστούν έτσι ώστε να εκπέμπουν ακτινοβολία από 680 nm μέχρι και 1130 nm. Η άντληση τους πραγματοποιείται συνήθως με τη χρήση άλλων laser συνεχούς λειτουργίας, μήκους κύματος 514 nm μέχρι 532 nm [18].



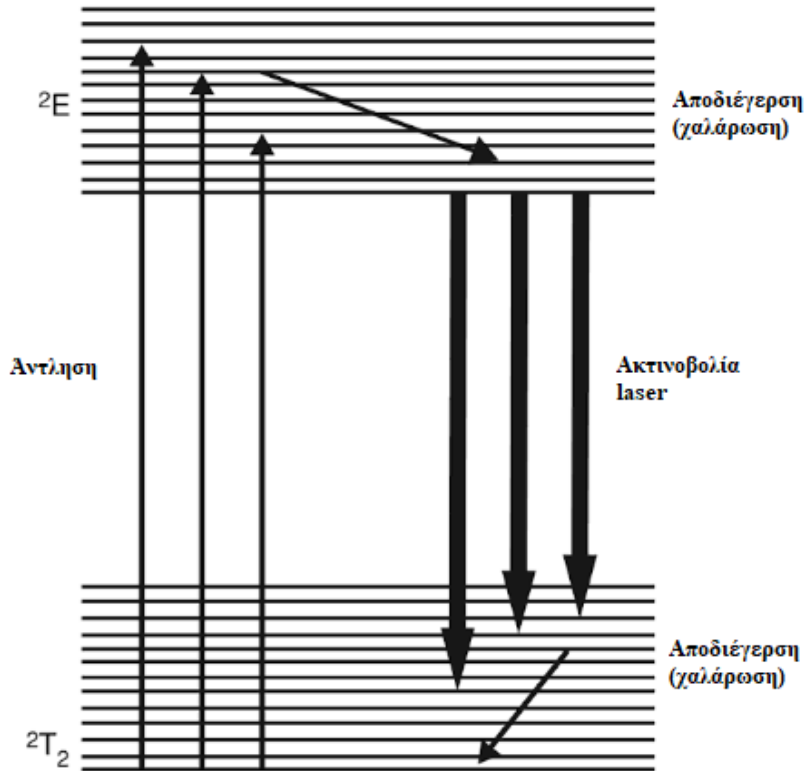
*Εικόνα 2. Διάταξη του  $Ti:Al_2O_3$ . Διακρίνονται άτομα οξυγόνου (κόκκινα), αργιλίου (πράσινα) και τιτανίου (μπλέ) [19]*

Το Ti έχει κανονικά την ηλεκτρονιακή διάταξη [Ar] 4s<sup>2</sup>3d<sup>2</sup>. Επομένως, συνεισφέροντας με 3 ηλεκτρόνια στην κρυσταλλική δομή, παραμένει ένα ηλεκτρόνιο 3d και προκύπτει μια τριπλά εκφυλισμένη κατάσταση <sup>2</sup>T<sub>2</sub> και μια διπλά εκφυλισμένη κατάσταση <sup>2</sup>E, λόγω των πεδίων των ατόμων οξυγόνου και λόγω σύζευξης σπιν-τροχιακού [19].



*Εικόνα 2. Διαχωρισμός των ενεργειακών καταστάσεων 3d [19]*

Άντληση πραγματοποιείται από την κατάσταση <sup>2</sup>T<sub>2</sub> προς τις διεγερμένες ταλαντωτικές καταστάσεις της <sup>2</sup>E. Αποδιέγερση στη βασική κατάσταση (χαλάρωση) της <sup>2</sup>E πραγματοποιείται μέσω αλληλεπιδράσεων με τα φωνόνια του κρυστάλλου. Η ακτινοβολία laser παράγεται με την αποδιέγερση στις διεγερμένες ταλαντωτικές καταστάσεις της <sup>2</sup>T<sub>2</sub>. Ακολουθεί σχεδόν άμεση αποδιέγερση στη βασική ταλαντωτική κατάσταση της <sup>2</sup>T<sub>2</sub>. Το σύστημα αυτό μπορεί να χαρακτηριστεί σαν σύστημα τεσσάρων επιπέδων [20,21].



Εικόνα 2. Ενεργειακό διάγραμμα των καταστάσεων του laser Ti:Sapphire [21]

## 2.3 Αλληλεπίδραση μη-ιοντίζουσας ακτινοβολίας laser και ύλης

### 2.3.1 Γενικά στοιχεία

Κατά την αλληλεπίδραση ακτινοβολίας laser με την έμβια ύλη, ανάλογα με τις οπτικές ιδιότητες του στόχου θα επέλθει, ανάκλαση, σκέδαση, μετάδοση ή απορρόφηση της ακτινοβολίας. Η ανάκλαση πραγματοποιείται στην επιφάνεια του στόχου, οδηγώντας στην αλλαγή της κατεύθυνσης της δέσμης φωτός. Κατά την ανάκλαση δεν μεταβάλλεται το μήκος κύματος της ακτινοβολίας. Η σκέδαση είναι η αλλαγή της διεύθυνσης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας σε διάφορες κατευθύνσεις, ως συνέπεια της αλληλεπίδρασής της με την ύλη. Η φωτεινή ενέργεια που απορροφάται από την έμβια ύλη μετατρέπεται σε

ενέργεια χημικών δεσμών, θερμότητα, μηχανική ενέργεια, ενέργεια ηλεκτρικού πεδίου ή φωτεινή ενέργεια. Ο φθορισμός αποτελεί μια συνέπεια της απορρόφησης ακτινοβολίας, κατά την οποία η βιολογική ύλη που ακτινοβολήθηκε, εκπέμπει φωτόνια χαμηλότερης ενέργειας από αυτή που δέχτηκε [16,22].

Η ακτινοβολία laser που απορροφάται από βιολογική ύλη, μπορεί να οδηγήσει σε:

-Φωτοχημικά αποτελέσματα τα οποία βρίσκουν εφαρμογές στη φασματοσκοπία laser, στη φωτοδυναμική θεραπεία κ.α.

-Φωτοθερμικά αποτελέσματα όπως είναι η πήξη και η ατμοποίηση

-Φωτομηχανικά αποτελέσματα τα οποία βρίσκουν εφαρμογές στη χειρουργική, στη λιθοτριψία κ.α.

Εάν για ένα στοιχείο με πάχος  $\Delta x$  το οποίο απορροφά μια τέλεια μονοχρωματική δέσμη μοναδιαίας διατομής, θεωρηθεί ότι συμβαίνει μια ηλεκτρονιακή μετάβαση μεταξύ δυο ενεργειακών επιπέδων, τότε η μεταβολή της έντασης της δέσμης ως συνάρτηση της απόστασης είναι:

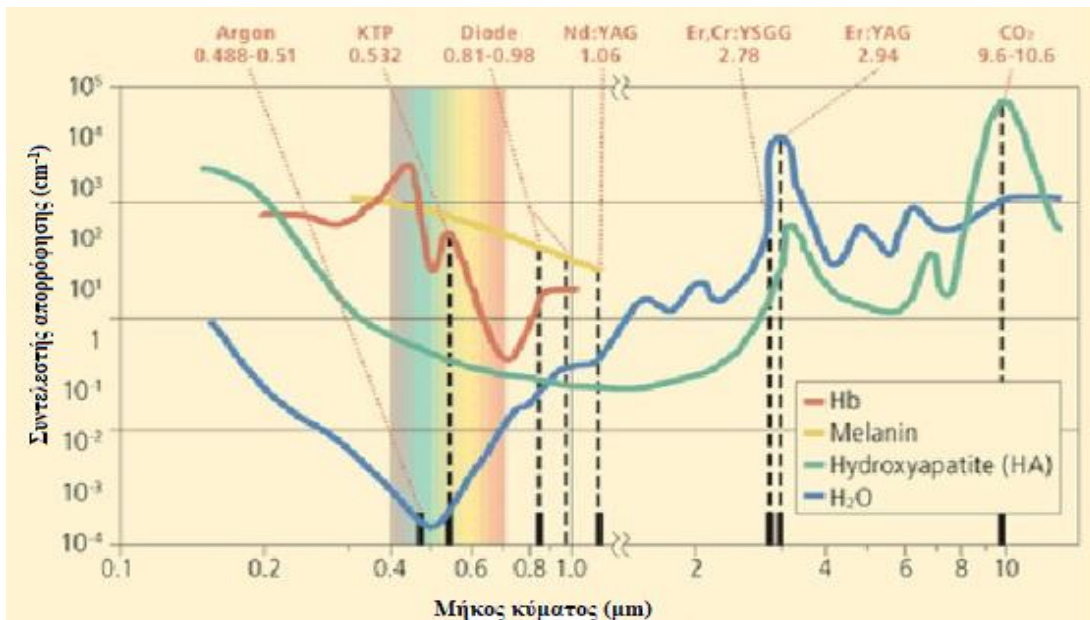
$$\Delta I(x) = I(x + \Delta x) - I(x)$$

Η μεταβολή  $\Delta I(x)$  είναι ανάλογη της απόστασης και του  $I(x)$ . Αυτό συνεπάγεται ότι θα ισχύει η σχέση:

$$\Delta I(x) = -aI(x)\Delta x$$

Όπου ο σταθερά αναλογίας  $a$  ονομάζεται συντελεστής απορρόφησης, εξαρτάται από το υλικό και το μήκος κύματος  $\lambda$  της ακτινοβολίας και έχει μονάδες  $m^{-1}$  στο σύστημα μονάδων SI [14].

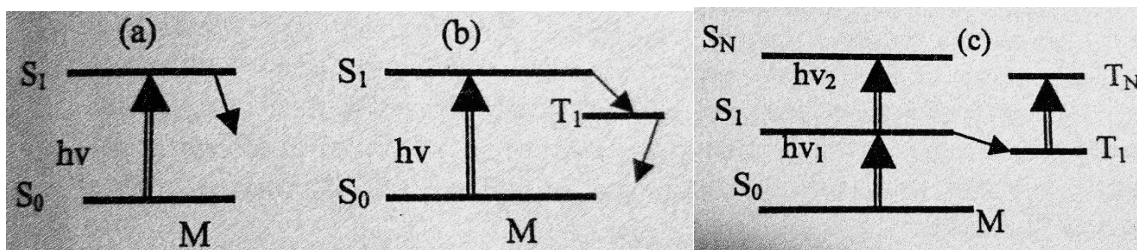




**Εικόνα 2.4** Συντελεστής απορρόφησης για το νερό (μπλέ), την αιμοσφαιρίνη (κόκκινο), τη μελανίνη (κίτρινο) και τον υδροξυαπατίτη (πράσινο) ως συνάρτηση του μήκους κύματος (λογαριθμική κλίμακα). Παρατηρείται ελάττωση του συντελεστή απορρόφησης στην περιοχή 600-900 nm [22].

Η φωτοχημική δράση των laser βρίσκει εφαρμογές μέσω των μηχανισμών της μονοφωτονικής απορρόφησης (απορρόφηση ενός φωτονίου με επακόλουθη βιοχημική αντίδραση) και της πολύ-φωτονικής απορρόφησης (μη γραμμικό φαινόμενο), η οποία μπορεί να οδηγήσει σε φωτοδιάσπαση χημικών δεσμών. Η δι-φωτονική απορρόφηση αποτελεί την απλούστερη περίπτωση της πολύ-φωτονικής απορρόφησης. Κατά τη διαδικασία αυτή, απορρόφηση ενός φωτονίου οδηγεί στην μετάβαση από τη θεμελιώδη στάθμη, σε μια ενδιάμεση και στη συνέχεια πραγματοποιείται απορρόφηση ενός ακόμα φωτονίου προκαλώντας διέγερση σε μια άλλη τελική κατάσταση. Καθώς ο χρόνος παραμονής του ηλεκτρονίου στην πρώτη διεγερμένη στάθμη είναι της τάξης των nanosecond ( $10^{-9}$  second) και picosecond ( $10^{-12}$  second), εάν δεν διεγερθεί περαιτέρω, το ηλεκτρόνιο αποδιεγείρεται, επιστρέφοντας στη θεμελιώδη κατάσταση. Η αποδιέγερση πραγματοποιείται μέσω του φθορισμού (εκπομπή φωτονίων χαμηλότερης ενέργειας), μέσω της εσωτερικής μετατροπής της ενέργειας του ηλεκτρονίου σε ενέργεια διαταραχών (προκαλεί τον σχηματισμό ελεύθερων ριζών και άλλων δραστικών μορφών οξυγόνου),

μέσω της αποβολής ηλεκτρονίου (οδηγώντας στον σχηματισμό κατιόντος) και μέσω μετάβασης σε μια τριπλά διεγερμένη κατάσταση [16].



**Εικόνα 2.5** Αναπαράσταση της φωτοχημικής δράσης σε βιομόριο  $M$ , το οποίο βρίσκεται σε θεμελιώδη στάθμη  $S_0$ . Δέση laser ενέργειας  $h\nu$  προσπίπτει στο  $M$ . (a) Μονο-φωτονική διέγερση του βιομορίου σε διεγερμένη στάθμη  $S_1$ . (b) Μονο-φωτονική διέγερση του  $M$  και μεταφορά ενέργειας μέσω κατάστασης τριπλέτας σε γειτονικά μόρια οξυγόνου ( $\gamma$ ) δι-φωτονική διέγερση του βιομορίου [16]

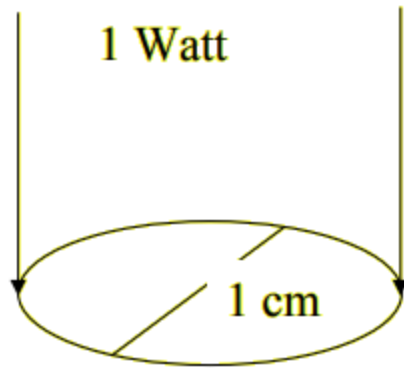
Το είδος των βιολογικών αποτελεσμάτων που μπορεί να προκληθούν λόγω θερμότητας εξαρτάται από την θερμοκρασία που θα επιτευχθεί κατά την ακτινοβολία. Τα πιθανά αποτελέσματα αυτά περιλαμβάνουν καταστροφικές βλάβες στο κύτταρο, στις πρωτεΐνες και ακόμα στο ίδιο το DNA [22].

Τα φωτοθερμικά, φωτοχημικά και φωτομηχανικά αποτελέσματα της δράσης των laser βρίσκουν εφαρμογές στην ιατρική. Οι εφαρμογές αυτές περιλαμβάνουν τη χειρουργική, την οφθαλμολογία, τη θεραπεία του καρκίνου κ.α. Το μήκος κύματος εκπομπής στα 10,6  $\mu\text{m}$  απορροφάται έντονα από τα μόρια του νερού και η εξάτμισή του νερού οδηγεί στην στοχευμένη καταστροφή του ιστού. Τα laser  $\text{CO}_2$  βρίσκουν συχνά εφαρμογή στη γενική χειρουργική για αυτόν το λόγο. Ακόμη, ακτινοβολία laser με μήκος κύματος 630 nm, σε συνδυασμό με ειδική χρωστική ουσία HpD, έχει οδηγήσει στην καταστροφή καρκινικών ιστών, μέσω μιας χημικής ένωσης που σχηματίζεται λόγω των φωτοχημικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα κατά την ακτινοβολία (φωτοδυναμική θεραπεία) [14,23]. Φωτομηχανικά φαινόμενα μπορεί να προκληθούν από δέσμες υψηλής ισχύος και μικρής διάρκειας παλμών (όπως Q-switched Nd-YAG). Με κατάλληλη εστίαση, ακόμα και ένας παλμός χαμηλής ενέργειας μπορεί να προκαλέσει τον σχηματισμό πλάσματος και ενός υδροδυναμικού κρουστικού κύματος, ικανό να σχίσει ιστό, όπως μεμβράνες του οφθαλμού [23].

Τα laser Αλεξανδρίτη ( $\text{Cr}^{+3}:\text{BeAl}_2\text{O}_4$ ) χρησιμοποιούνται ευρέως στην ιατρική. Μπορεί να εκπέμψει ακτινοβολία μήκους κύματος 710 – 820 nm, αλλά συνήθως βρίσκει εφαρμογή κοντά στα 755 nm. Συγκεκριμένα, στη δερματολογία, χρησιμοποιούνται για την αφαίρεση τριχών, τατουάζ αλλά και διαφόρων δερματικών ασθενειών. Η μελανίνη που βρίσκεται στο δέρμα και τις τρίχες απορροφά την ακτινοβολία αυτού του μήκους κύματος (διάγραμμα 2.4) [24]. Τα laser αυτά χρησιμοποιούνται με διάρκεια παλμού της τάξεως των millisecond αλλά και nanosecond. Συγκεκριμένα, laser Αλεξανδίτη με διάρκεια παλμού τις τάξης των millisecond, χρησιμοποιούνται για την αποτρίχωση καθώς η διάρκεια του παλμού είναι μικρότερη από τον χρόνο θερμικής αποκατάστασης του θύλακα της τρίχας και επομένως παράγεται η απαραίτητη θερμότητα για την καταστροφή του. Η πυκνότητα ισχύος κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 10 και 100  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Τα laser της κατηγορίας αυτής χρησιμοποιούνται και με διάρκεια παλμού της τάξης των nanosecond για την αντιμετώπιση τατουάζ και μελάσματος, με στόχο την μελανίνη αλλά και για αγγειακές βλάβες, με στόχο την αιμοσφαιρίνη. Η πυκνότητα ισχύος κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 7 και 30  $\text{J}/\text{cm}^2$  [25].

Η βιολογική δράση της ακτινοβολίας laser εξαρτάται από τις φυσικές παραμέτρους της ακτινοβολίας όπως το μήκος κύματος, η πυκνότητα ενέργειας, η πυκνότητα ισχύος, ο χρόνος αλληλεπίδρασης, καθώς και από τις οπτικές, θερμικές και μηχανικές ιδιότητες του στόχου. Η πυκνότητα ισχύος ή ένταση ( $I$ ) ορίζεται ως ο λόγος της φωτεινής ισχύος ( $P$ ) προς τη επιφάνεια ( $A=\pi r^2$ , για κυκλική επιφάνεια) που καλύπτει η δέσμη και εκφράζεται στο σύστημα μονάδων SI με  $\text{W}/\text{m}^2$ , όπου 1 W (Watt) = 1 J (Joule)  $\times$  s (second) [26].

$$I = \frac{P}{A}$$



*Εικόνα 2.6 Ο λόγος της φωτεινής ισχύος προς το εμβαδό της διατομής δίνει την πυκνότητα ισχύος ( $W/m^2$ ) [16]*

Ακόμα, χρησιμοποιείται η πυκνότητα ενέργειας (fluence), το μέτρο της ενέργειας προς τη μονάδα επιφάνειας, η οποία εκφράζεται στο σύστημα μονάδων SI με  $J/m^2$ . Για ενέργεια  $E$  (J) και επιφάνεια  $A$  ( $m^2$ ), η πυκνότητα ενέργειας  $F$  δίνεται από τη σχέση:

$$F = \frac{E}{A}$$

Η μέγιστη πυκνότητα ενέργειας (peak fluence), για γκαουσιανή δέσμη (Gaussian beam) υπολογίζεται ως εξής:

$$F_{\mu\epsilon\gamma} = \frac{E}{\pi w^2/2}$$

Όπου  $w$ , η γκαουσιανή ακτίνα. Για τις γκαουσιανές δέσμες, δέσμες οι οποίες περιγράφονται από την γκαουσιανή κατανομή, η πυκνότητα ισχύος  $I$  της δέσμης ισχύος  $P$  δίνεται από την σχέση:

$$I = \frac{P}{\pi w^2/2} \exp\left(-2 \frac{r^2}{w^2}\right)$$

Όπου η γκαουσιανή ακτίνα  $w$  είναι η απόσταση από τον άξονα της δέσμης όπου η πυκνότητα ισχύος ισούται με το  $1/e^2$  ( $\approx 13,5$  %) της μέγιστης τιμής της.

Κατά συνέπεια, η μέγιστη πυκνότητα ισχύος για γκαουσιανή δέσμη θα είναι:

$$I_{\mu\epsilon\gamma} = \frac{P}{\pi w^2} \quad [26]$$

Συχνά χρησιμοποιείται και ο όρος φωτεινότητα για να περιγράψει την ισχύ που εκπέμπεται ανά μονάδα επιφάνειας και ανά μονάδα στερεάς γωνίας. Στο σύστημα μονάδων SI εκφράζεται ως  $W/(m^2sr)$  [14]. Στα παλμικά laser, σημαντικό ρόλο παίζει η χρονική διάρκεια του παλμού και η επαναληπτικότητα, δηλαδή το πλήθος των παλμών ανά δευτερόλεπτο [16]. Για laser μέσης ισχύος  $P_{μέση}$  (W), εμβαδού επιφάνειας δέσμης  $A$  ( $m^2$ ) και επαναληπτικότητας  $f_{επαν}$  ( $s^{-1}$ ), η ενέργεια ανά παλμό  $E_{παλμ}$  (J/παλμό) υπολογίζεται μέσω της σχέσης:

$$E_{παλμ} = \frac{P_{μέση}}{f_{επαν}} \quad (1)$$

Η μέγιστη ισχύς  $P_{μέγ}$  θα δίνεται από την σχέση:

$$P_{μέγ} = \frac{E_{παλμ}}{t_{παλμ}} \quad (2)$$

Συνδυάζοντας τις σχέσεις (1) και (2) προκύπτει ότι:

$$P_{μέση} = P_{μέγ} t_{παλμ} f_{επαν}$$

Η μέση και η μέγιστη πυκνότητα ισχύος υπολογίζονται αντίστοιχα ως:

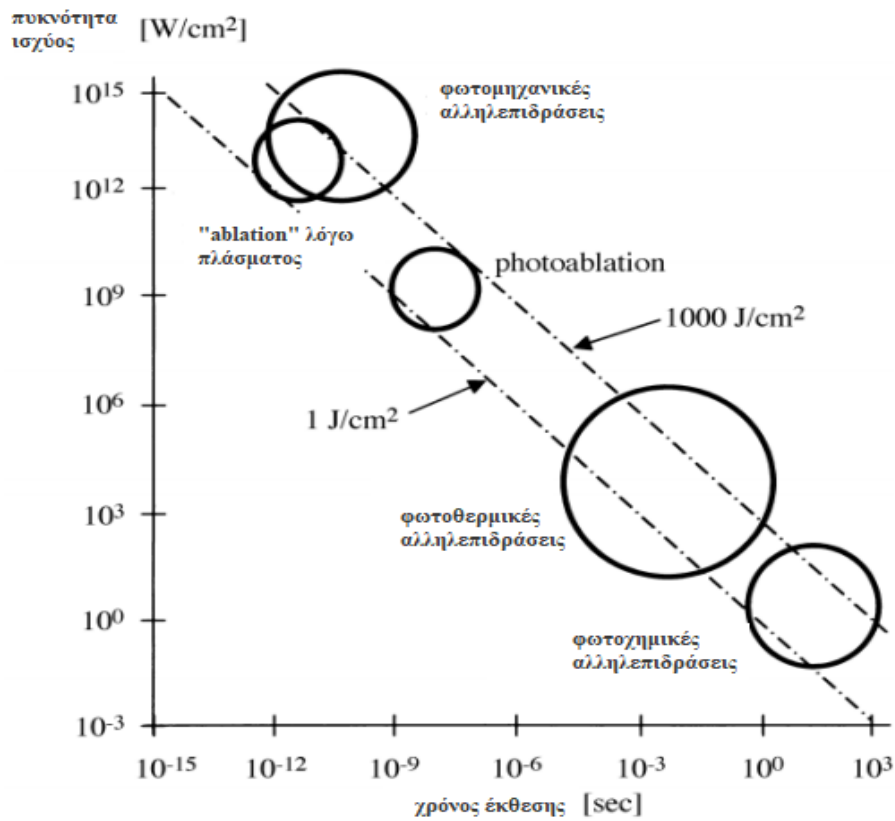
$$I_{μέση} = \frac{P_{μέση}}{A} \quad \text{και} \quad I_{μέγ} = \frac{P_{μέγ}}{A}$$

Η συνολική ενέργεια ανά μονάδα επιφάνειας, για χρόνο ακτινοβολήσης  $t_{ακτιν}$  μπορεί να υπολογιστεί ως εξής:

$$E_{ολική} = \frac{E_{παλμ} f_{επαν} t_{ακτιν}}{A}$$

Κατά την ακτινοβολήση με laser που εκπέμπουν ακτινοβολία με μήκος κύματος στο εγγύς υπέρυθρο (NIR) και διάρκεια παλμού της τάξης του 1  $\mu s$ , έχουν παρατηρηθεί έντονα θερμικά αποτελέσματα. Η παραγωγή θερμότητας κατά τη χρήση laser αυτής της κατηγορίας με στόχο την ακτινοβολήση βιολογικής ύλης, εξαρτάται από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας, τα απορροφητικά χαρακτηριστικά του στόχου, εάν η

ακτινοβολία πραγματοποιείται με παλμικό ή συνεχές laser, τον χρόνο έκθεσης και την πυκνότητα ισχύος [22].



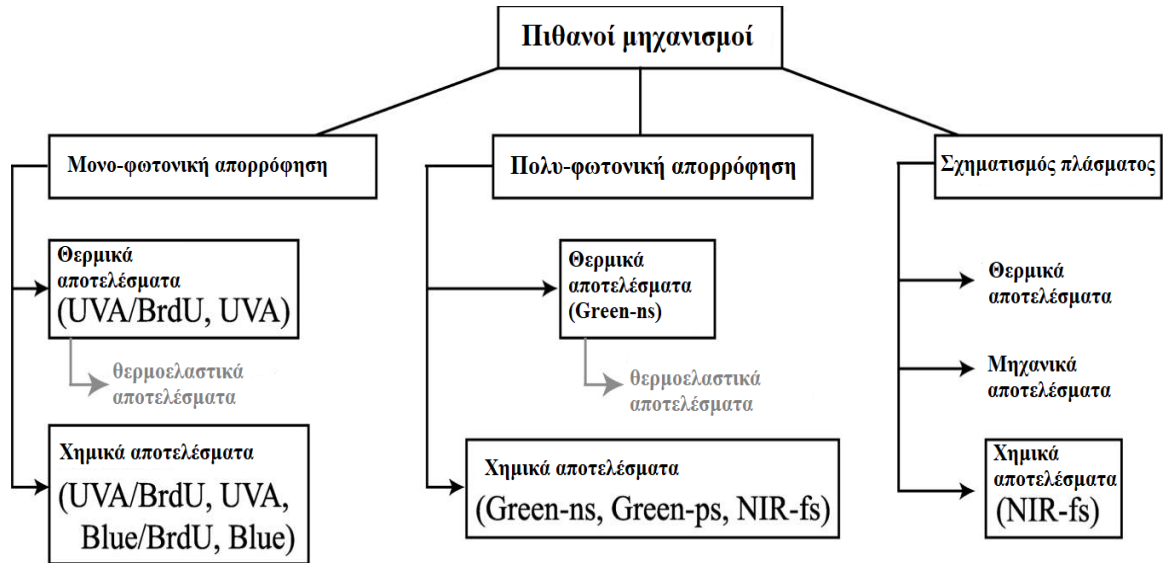
*Εικόνα 2.7 Αλληλεπιδράσεις laser-βιολογικών ιστών ως συνάρτηση της πυκνότητας ισχύος και χρόνου έκθεσης στην ακτινοβολία. Διακρίνονται χαρακτηριστικά ακτινοβολήσης που μπορεί να προκαλέσουν φωτομηχανικά, φωτοθερμικά ή φωτοχημικά αποτελέσματα [22]*

### 2.3.2 Αλληλεπίδραση ακτινοβολίας laser και DNA

Η ιοντίζουσα ακτινοβολία χρησιμοποιείται ευρέως σαν εργαλείο επαγωγής βλαβών στο DNA, με σκοπό την μελέτη των επιδιορθωτικών μηχανισμών του. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η δυνατότητα πρόκλησης θραύσεων στο DNA, με τη χρήση μη-ιοντίζουσας ακτινοβολίας laser. Ένα μεγάλο πλεονέκτημα της χρήσης laser είναι ο ακριβής καθορισμός των διαστάσεων της περιοχής που πρόκειται να ακτινοβοληθεί. Με αυτό τον τρόπο παρέχεται η δυνατότητα μελέτης συγκεκριμένης περιοχής του κυττάρου, με διαστάσεις της τάξης των μικρομέτρων [27,28]. Πειράματα δράσης σε χρωμοσώματα με τη χρήση laser

πραγματοποιούνται από το 1969, με τη χρήση laser ιόντων-αργού [29]. Βάσει ερευνών, μεταβάλλοντας παράγοντες όπως το μήκος κύματος, τη διάρκεια παλμού και την επαναληπτικότητα της δέσμης laser, καθώς και την επιφάνεια και τη διάρκεια ακτινοβολίας μπορεί να προκληθούν διαφορετικά είδη βλαβών στο DNA [30,31].

Στην εικόνα 2.9 παρουσιάζονται πιθανοί μηχανισμοί βλαβών DNA που μπορεί να επιφέρουν μερικά διαφορετικά είδη συστημάτων laser.



**Εικόνα 2.8** Διάγραμμα πιθανών μηχανισμών επαγωγής βλάβης στο DNA από διάφορα συστήματα laser. Διαχωρίζονται οι μηχανισμοί μονο-φωτονικής και πολύ-φωτονικής απορρόφησης καθώς και ο σχηματισμός πλάσματος. Αναγράφονται τα αντίστοιχα θερμικά, χημικά και μηχανικά αποτελέσματα [30]

Η απορρόφηση ακτινοβολίας μήκους κύματος 700-900 nm από βιολογικούς ιστούς έχει παρατηρηθεί να είναι αρκετά χαμηλή, σε σύγκριση με άλλα μήκη κύματος [32]. Το μέγιστο μήκος κύματος γραμμικής απορρόφησης για βάσεις του DNA κυμαίνεται μεταξύ των 200 nm και 290 nm (περίπου 260 nm). Σε αυτά τα μήκη κύματος, οι βλάβες στο DNA προκαλούνται κυρίως λόγω μονο-φωτονικής (γραμμικής) απορρόφησης [27,33,34].

Κατά την πολύ-φωτονική απορρόφηση, δύο ή περισσότερα φωτόνια απορροφώνται από τα μόρια του στόχου. Η ενέργεια που προσφέρεται ισοδυναμεί με την ενέργεια ενός φωτονίου ακτινοβολίας μήκους κύματος ίσο με το μήκος κύματος της πηγής διαιρεμένο

κατά τον αριθμό των απορροφημένων φωτονίων [33,34]. Για παράδειγμα, απορρόφηση 3 φωτονίων από ακτινοβολία μήκους κύματος 780 nm, ισοδυναμεί με την ενέργεια απορρόφησης ενός φωτονίου μήκους κύματος 260 nm.

Τα φωτοπροϊόντα είναι αποτελέσματα χημικών αντιδράσεων που οφείλονται σε διέγερση του DNA λόγω μονο-φωτονικής ή πολύ-φωτονικής απορρόφησης. Καθώς η ενέργεια των φωτονίων απορροφάται από τα μόρια των νουκλεοτιδίων, αυτά μεταπίπτουν σε διεγερμένη κατάσταση, με αλλαγές στις θέσεις των ηλεκτρονίων, αναδιάταξη των χημικών δεσμών και δημιουργία καινούργιων χημικών ενώσεων μεταξύ των νουκλεϊκών οξέων, τα φωτοπροϊόντα. Τα φωτοπροϊόντα προδιαθέτουν στην εμφάνιση μεταλλάξεων και ενδέχεται να προκαλέσουν μεταβολές στη δομή του DNA. Τα συνηθέστερα φωτοπροϊόντα είναι τα διμερή πυριμιδών, που περιλαμβάνουν τα διμερή κυκλοβουτανίου (CPDs) και τις ενώσεις 6-4 πυριμιδίνης-πυριμιδόνης (6-4 PP) [35]. Σχηματισμός φωτοπροϊόντων έχει παρατηρηθεί με τη χρήση ακτινοβολίας laser μήκους κύματος που ανήκει στο υπεριώδες (π.χ. 266, 337 nm), στο ορατό (π.χ. 405 nm) και στο εγγύς υπέρυθρο φάσμα (π.χ. 775, 800, 1050 nm) [27,30,33].

Βλάβες στο DNA, μπορούν να επέλθουν ως συνέπεια σχηματισμού ελεύθερων ριζών και δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). Οι χημικές ενώσεις αυτές παράγονται σαν αποτέλεσμα μονο-φωτονικής ή δι-φωτονικής απορρόφησης. Σχηματισμός δραστικών μορφών οξυγόνου έχει παρατηρηθεί σε ακτινοβολίες μήκους κύματος που κυμαίνονται μεταξύ του υπεριώδους και του εγγύς υπέρυθρου (π.χ. 266, 365, 405, 800 nm) [27,30,36]. Έχει παρατηρηθεί ότι αλλοιώσεις στο DNA που προκαλούνται λόγω των παραγόντων αυτών, μπορεί να μετατραπούν σε δίκλωνες θραύσεις κατά τη διάρκεια της επιδιόρθωσης, δεδομένου της πλησιότητας των δυο πολυνουκλεωτιδικών αλυσίδων [37].

Θερμικά αποτελέσματα ενδέχεται να υπάρξουν σαν συνέπεια μονο-φωτονικής ή δι-φωτονικής απορρόφησης. Η αύξηση της θερμοκρασίας μπορεί να προκαλέσει βλάβες ή και μετουσίωση του DNA. Ενώ ο κίνδυνος επαγωγής μη επιθυμητών βλαβών είναι υψηλός, ορίζοντας κατάλληλες παραμέτρους όπως χρόνο και επιφάνεια ακτινοβολήσης, η αύξηση της θερμοκρασίας μπορεί να περιοριστεί σημαντικά. [30]. Για παράδειγμα, ακτινοβολήση νερού για 1 δευτερόλεπτο με χρήση laser μήκους κύματος 850 nm και μέσης έντασης 100 mW, αναμένεται να οδηγήσει σε αύξηση θερμοκρασίας κατά 0,2 K, μη θέτοντας έτσι σε



κίνδυνο την ακεραιότητα του DNA. Ακόμη, πρέπει να σημειωθεί ότι αλληλεπιδράσεις μεταξύ ελεύθερων ηλεκτρονίων και ατόμων προκαλούν αύξηση της θερμοκρασίας. Η αύξηση αυτή μπορεί να προκαλέσει αλλοιώσεις στο DNA, οι οποίες είναι όμως αμελητέες σε σύγκριση με την βλάβη που προκαλεί η ακτινοβολία, έμμεσα ή άμεσα [27]. Καταστροφικά για την ακεραιότητα του DNA θερμικά αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί σε UVA (337 nm) laser λόγω μονο-φωτονικής απορρόφησης και σε Green (532 nm) ns και ps laser, λόγω δι-φωτονικής απορρόφησης [30].

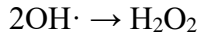
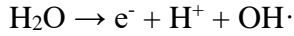
Από τις πρώτες έρευνες στον τομέα αυτό, έδειξαν ότι για χαμηλή δόση υπερϊώδους ακτινοβολίας, παρουσιάζεται η δυνατότητα πρόκλησης βλάβης σε αυτό, εάν έχει πρώτα προστεθεί η χρωστική βρωμοδεοξουριδίνη (νουκλεοσιδικό ανάλογο BrdU) [34]. Σε επόμενες μελέτες, χρησιμοποιώντας χρωστικές όπως η BrdU ή η Hoechst, μονόκλωνες και δίκλωνες θραύσεις παρατηρήθηκαν για πολλές διατάξεις μεταξύ των 337 και 514 nm. Για την ανίχνευση των δίκλωνων θραύσεων συνήθως χρησιμοποιείται η μέθοδος εστιών  $\gamma$ -H2AX [27,30,38]. Συγκεκριμένα, έρευνες με laser στο UV-B(290-320 nm) και στο UV-A (320-400nm) έχουν δείξει ότι επάγουν φωτοπροϊόντα καθώς και μονόκλωνες και δίκλωνες θραύσεις στο DNA. Όταν χρησιμοποιούνται laser τέτοιου μήκους κύματος, η προσθήκη ευαισθητοποιητών, μπορεί να μειώσει την ενέργεια που είναι απαραίτητη για την επαγωγή βλάβης στο DNA, διευκολύνοντας την διαδικασία των θραύσεων. Πρέπει να σημειωθεί όμως ότι η χρήση ευαισθητοποιητών ενδέχεται να προκαλέσει ανεπιθύμητες βλάβες στο DNA, να επηρεάσει τις διαδικασίες επιδιόρθωσης και να οδηγήσει σε δυσκολία εξαγωγής συμπερασμάτων όσον αφορά τους μηχανισμούς επίδρασης της ακτινοβολίας laser [39,31]. Χρησιμοποιώντας ακτινοβολία laser με μήκη κύματος 355 nm και 405 nm, ερευνητές παρατήρησαν κυρίως μονόκλωνες αλλά και δίκλωνες θραύσεις στο DNA ακόμα και χωρίς την προσθήκη BrdU. Με αύξηση του χρόνου ακτινοβολίας παρατήρησαν επίσης αύξηση στον αριθμό των δίκλωνων θραύσεων [31]. Με τη χρήση ακτινοβολίας laser μήκους κύματος 337 nm έχουν παρατηρηθεί ακόμα αλλοιώσεις βάσεων σε συνδυασμό με δίκλωνες θραύσεις στο DNA [30].

### 2.3.3 Αλληλεπίδραση Femtosecond NIR laser με το DNA

Όταν χρησιμοποιούνται παλμοί της τάξεως των picosecond ( $10^{-12}$  s) και femtosecond ( $10^{-15}$  s), η μέση ένταση που δέχεται ο στόχος μπορεί να περιοριστεί σε επίπεδα συμβατά με την επιβίωση του κυττάρου. Μη γραμμική διέγερση (πολύ-φωτονική απορρόφηση) με τη χρήση παλμικών laser στο κοντινό υπέρυθρο (NIR), μπορεί να προκαλέσει στοχευμένη αλλοίωση στο DNA κυττάρων [27,30,34].

Τα laser σχεδόν υπέρυθρης ακτινοβολίας (NIR) δεν απαιτούν προσθήκη νουκλεοσιδικών ανάλογων για την επαγωγή βλαβών στο DNA. Χρήση laser Er:Yag, μήκους κύματος 775 nm και 1050 nm, με ολική πυκνότητα ισχύος  $326 \text{ GW/cm}^2$  και  $800 \text{ GW/cm}^2$ , σε περιοχή σχήματος σταυρού (10μm η κάθε γραμμή) έχει οδηγήσει στην εμφάνιση φωτοπροϊόντων καθώς και δίκλωνων θραύσεων στο DNA. Οι θραύσεις έχουν ανιχνευθεί με τη μέθοδο γ-H2AX. Ακτινοβολία μήκους κύματος μεγαλύτερο της μέγιστης απορρόφησης 3 φωτονίων για το DNA (μεγαλύτερο από περίπου  $3 \times 260 \text{ nm}$ ) δείχνει να περιορίζει σημαντικά τη δημιουργία φωτοπροϊόντων [33].

Πειράματα με διατάξεις laser Ti:Sapphire, μήκους κύματος 700 - 850 nm, ενισχύουν την άποψη ότι είναι δυνατή η πρόκληση βλάβης μέσω φαινομένων που οφείλονται στην πολύ-φωτονική απορρόφηση. Ακτινοβολώντας επιφάνεια της τάξης των μικρομέτρων, έχει παρατηρηθεί σημαντικός αριθμός εστιών γ-H2AX καθώς και των πρωτεϊνών ATM, 53BP-1, οι οποίες υποδεικνύουν την ύπαρξη δίκλωνων θραύσεων στο DNA. Ακόμη έχει ανιχνευθεί το σύμπλοκο DNA-ligase IV/XRCC4, το οποίο σχετίζεται με τον μηχανισμό μη ομόλογης σύνδεσης άκρων (NHEJ), ενός από τους κυριότερους μηχανισμούς επιδιόρθωσης των δίκλωνων θραύσεων [34,39]. Ένας μηχανισμός επαγωγής δίκλωνης θραύσης DNA λόγω ακτινοβολίας femtosecond laser στο κοντικό υπέρυθρο (NIR), δείχνει να είναι ο σχηματισμός ιόντων και ελεύθερων ριζών, συμπεριλαμβανομένων των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), ως συνέπεια πολύ-φωτονικής απορρόφησης. Λόγω της υψηλής πυκνότητας των φωτονίων και της υψηλής κορυφής του ηλεκτρικού πεδίου των παλμικών laser, μπορεί να παρατηρηθούν φαινόμενα φωτοϊονισμού. Κατά τη διαδικασία αυτή, που ονομάζεται “Optical breakdown”, παράγονται ελεύθερα ηλεκτρόνια και ρίζες, λόγω σχηματισμού πλάσματος χαμηλής πυκνότητας και λαμβάνουν χώρα χημικές διεργασίες που περιλαμβάνουν αλλά δεν περιορίζονται στις ακόλουθες:



Τα ηλεκτρόνια, τα ιόντα και οι ελεύθερες ρίζες που σχηματίζονται προκαλούν έμμεσα βλάβες στο DNA. Για παράδειγμα το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) μπορεί να προκαλέσει μονόκλωνες και δίκλωνες θραύσεις στο DNA [9]. Μονόκλωνες και δίκλωνες θραύσεις του DNA έχουν παρατηρηθεί με τη χρήση laser Ti:Sapphire, μήκους κύματος 800 nm, επαναληπτικότητας 76 MHz, διάρκειας παλμού 200 fs, επιφάνεια ακτινοβολίας  $4,9 \mu\text{m}^2$ , ενέργεια ανά παλμό 0,72 nJ και μέγιστη πυκνότητα ισχύος  $0,93 \times 10^{12} \text{ W/cm}^2$ . Η πυκνότητα ισχύος που είναι απαραίτητη για σχηματισμό πλάσματος χαμηλής πυκνότητας έχει εκτιμηθεί να είναι της τάξεως των  $10^{12} \text{ W/cm}^2$  [30,33,34,40]. Η μελέτη της επίδρασης της ακτινοβολίας τέτοιων laser υποδεικνύει αποτελέσματα παρόμοια με την δράση ιοντίζουσας ακτινοβολίας στο DNA, συμπεριλαμβανομένων, μονόκλωνων και δίκλωνων θραύσεων καθώς και χημική αλλοίωση βάσεων [27]. Σχηματισμός πλάσματος παρατηρήθηκε επίσης σε πειράματα ακτινοβολίας DNA μέσα σε υγρό μέσο, οδηγώντας στον σχηματισμό ηλεκτρονίων χαμηλής ενέργειας και υδροξυλίων ( $\text{OH}\cdot$ ). Αυτά προκάλεσαν τον σχηματισμό μονόκλωνων καθώς και δίκλωνων θραύσεων στο DNA. Παρατηρήθηκε ότι οι ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου παίζουν μεγάλο ρόλο στον σχηματισμό των δίκλωνων θραύσεων του DNA. Τα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν μετά από ακτινοβολία διάρκειας 180 δευτερολέπτων με χρήση laser Ti:Sapphire, 800 nm, 1kHz επαναληπτικότητας, διάρκειας παλμού 40 fs, με διάμετρο δέσμης 9mm [42].

Διμερή κυκλοβουτανίου (CPDs) καθώς και δίκλωνες θραύσεις στο DNA έχουν παρατηρηθεί και με τη χρήση laser Ti:Sapphire στα 750 nm αλλά και στα 800 nm (διάρκειας παλμού 200 fs, επαναληπτικότητας 76 MHz, ενέργειας ανά παλμό 0,72 nJ, επιφάνειας ακτινοβολίας  $4,9 \mu\text{m}^2$ ), εξαιτίας πολύ-φωτονικής απορρόφησης των σχεδόν υπέρυθρων παλμών. Ταυτόχρονα ενδέχεται να παρατηρηθούν αλλοιώσεις στη δομή των ακτινοβολημένων κυττάρων, δυσχεραίνοντας έτσι την προσπάθεια ακριβούς προσδιορισμού του μηχανισμού επαγωγής της βλάβης. Πρωτεΐνες που έχουν παρατηρηθεί περιλαμβάνουν την DNA-PKcs και την γH2AX, οι οποίες υποδεικνύουν την εμφάνιση

δίκλωνων θραύσεων στο DNA [30,43]. Εκτός από τα διμερή κυκλοβουτανίου, υπάρχει η δυνατότητα σχηματισμού ενώσεων 6-4 πυριμιδίνης-πυριμιδόνης (6-4PPs) [44].

Χρησιμοποιώντας laser Ti:Sapphire, με μήκος κύματος στο εγγύς υπέρυθρο, υπάρχει κίνδυνος επαγωγής θερμικών βλαβών στο DNA και στο κύτταρο. Ενώ laser της κατηγορίας αυτής συνήθως προκαλούν αμελητέα αύξηση της θερμοκρασίας με κατάλληλη επιλογή της επιφάνειας ακτινοβολήσης, παρουσιάζουν υψηλό κίνδυνο πρόκλησης θερμοελαστικής καταπόνησης στο DNA καθώς η διάρκεια παλμού των περισσότερων είναι μικρότερη από τον χρόνο που απαιτείται για να διασκορπιστεί η καταπόνηση αυτή [30]. Το DNA έχει τη δυνατότητα να μεταβάλει τη διάταξη του όταν επέρχεται αλλαγή της θερμοκρασίας, προκειμένου να μειώσει την καταπόνηση που δέχεται. Η μεταβολές αυτές στη δομή του DNA ενδέχεται να προκαλέσουν προβλήματα στη σωστή λειτουργία του [45]. Πειράματα έχουν πραγματοποιηθεί με laser με μήκος κύματος 800 nm, επαναληπτικότητας 76 MHz, για την ακτινοβολήση επιφάνειας 4,9  $\mu\text{m}^2$  για 100  $\mu\text{s}$ , έχουν δείξει ότι δεν συσσωρεύεται αρκετή θέρμανση για να προκαλέσει σημαντικές θερμικές βλάβες [30].

Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι για laser που εκπέμπουν στο εγγύς υπέρυθρο, δεν παρατηρείται αξιοσημείωτος αριθμός αλλοιώσεων βάσεων. Υπάρχουν ενδείξεις ότι τέτοιοι τύποι βλαβών μειώνονται σημαντικά μετά τα 470 nm [30]. Ακόμη, laser παλμών πολύ μικρής χρονικής διάρκειας έχει παρατηρηθεί να προκαλούν φθορισμό στο DNA, σε σύμπλοκα χρωστικής-DNA [28]. Καθώς τα laser αυτής τη κατηγορίας προκαλούν μεγάλο αριθμό βλαβών στο DNA, δεν είναι πάντα εύκολος ο προσδιορισμός των μηχανισμών που ευθύνονται για αυτές [33].

## Κεφάλαιο 3

# Ανίχνευση βλαβών DNA – Μέθοδος γ- H2AX

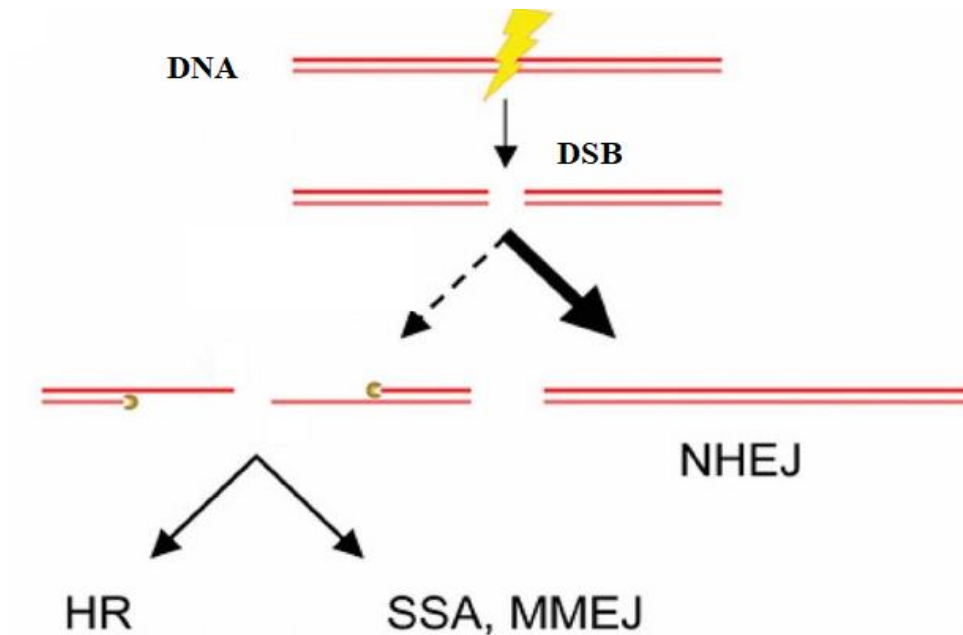
### 3.1 Βλάβες DNA και μηχανισμοί επιδιόρθωσης

#### 3.1.1 Γενικά στοιχεία

Το κυτταρικό DNA μπορεί να υποστεί βλάβες λόγω ακτινοβολίας, περιβαλλοντικών παραγόντων καθώς και λόγω δραστικών ενώσεων που σχηματίζονται στο ίδιο το κύτταρο. [1]. Οι δραστικές αυτές ενώσεις (οξυγόνου ή και αζώτου) προκαλούν βλάβες στο DNA, οδηγώντας συχνά σε απόπτωση του κυττάρου [46]. Η απόπτωση αποτελεί έναν αυτόματο μηχανισμό κυτταρικού θανάτου ο οποίος πραγματοποιείται προκειμένου να απορριφθούν κύτταρα μη επιθυμητά ή κατεστραμμένα [1]. Διαφορετικά είδη βλαβών στο DNA, αναγνωρίζονται από διαφορετικούς επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου [34]. Η αντίδραση του κυττάρου σε μια βλάβη καθώς και η επιδιόρθωση αυτής, αποτελεί σημαντικό μηχανισμό, απαραίτητο για τη διατήρηση της γονιδιακής ακεραιότητας.

Οι δίκλωνες θραύσεις στο DNA, αποτελούν τον πιο επικίνδυνο τύπο βλάβης για το κύτταρο και τον οργανισμό [6]. Οι θραύσεις αυτές αναγνωρίζονται και επιδιορθώνονται συνήθως από τους μηχανισμούς μη-ομόλογης σύνδεσης άκρων (NHEJ) και ομόλογου

ανασυνδυασμού (HR) αλλά και από τους μηχανισμούς SSA (single strand annealing) και σύνδεσης άκρων μέσω μικρο-ομολογιών (MMEJ ή microhomology mediated end joining) [30,47]. Οι μέθοδοι SSA και MMEJ όμως είναι μεταλλαξιγόνοι, επομένως σε ανθρώπινα κύτταρα παρατηρούνται οι μέθοδοι NHEJ και HR [48,49].



**Εικόνα 3.1** Απεικόνιση των μηχανισμών επιδιόρθωσης δίκλωνων θραύσεων στο DNA. Ανάλογα με τη μορφολογία της βλάβης μπορεί να πραγματοποιηθεί η μη-ομόλογη σύνδεση άκρων (NHEJ), ο ομόλογος ανασυνδυασμός (HR), ο μηχανισμός SSA ή η σύνδεση άκρων μέσω μικρο-ομολογιών (MMEJ) [47]

Ο μηχανισμός της μη-ομόλογης σύνδεσης άκρων είναι ταχύς, αλλά ενδέχεται να περιέχει σφάλματα. Κατά τη διαδικασία αυτή αφαιρούνται κάποια ζεύγη βάσεων και στη συνέχεια τα άκρα του DNA επανενώνονται. Τα ετεροδιμερή των πρωτεϊνών Ku70/Ku80 αναγνωρίζουν το σημείο όπου έχει επέλθει η δίκλωνη θραύση και προσδένονται σε αυτό. Στη συνέχεια, η πρωτεΐνη DNA-PKcs και το σύμπλοκο DNA-ligase IV/XRCC4 επιδιορθώνουν την βλάβη στο DNA. Η πρωτεΐνη DNA-PKcs μπορεί να προκαλέσει τη φωσφορυλίωση αρκετών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένης της ιστονικής πρωτεΐνης H2AX [50,51].

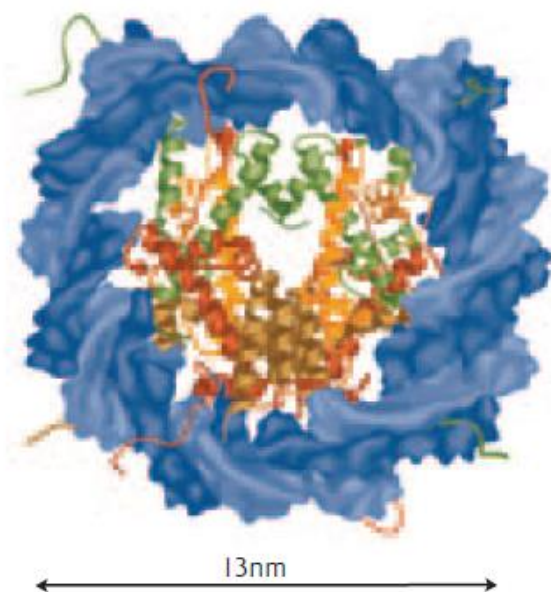
Ο μηχανισμός του ομόλογου ανασυνδυασμού είναι αργός και πιο ασφαλής από την μη-ομόλογη σύνδεση άκρων. Κατά τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιούνται κομμάτια ομόλογου DNA προκειμένου να επιδιορθωθεί η βλάβη [50]. Τα κομμάτια του ομόλογου DNA λαμβάνονται από την αδελφή χρωματίδη [5]. Η μη-ομόλογη σύνδεση άκρων πραγματοποιείται κατά την φάση G<sub>1</sub> του κυτταρικού κύκλου, ενώ ο ομόλογος ανασυνδυασμός κατά το τέλος της φάσης S ή κατά την αρχή της φάσης G<sub>2</sub> [34,52].

Το κύτταρο αντιδρά σε δίκλωνη θραύση του DNA, μέσω της φωσφορυλίωσης χιλιάδων μορίων της H2AX στην περιοχή της βλάβης. Η αντίδραση αυτή μπορεί να γίνει ορατή χρησιμοποιώντας κατάλληλο αντίσωμα. Κατά την επαγωγή δίκλωνης θραύσης, ο κυτταρικός κύκλος σταματάει στις φάσεις G<sub>1</sub> ή G<sub>2</sub> (cell cycle arrest). Μερικές από τις πιο εύκολα ανιχνεύσιμες πρωτεΐνες που σχετίζονται με την άμεση απόκριση του κυττάρου στην ανίχνευση βλάβης DNA, είναι οι H2AX, ATM, CDKN1A και TP53 [12]. Μια δίκλωνη θραύση στο DNA μπορεί να προκαλέσει τελικά απώλεια της γενετικής πληροφορίας και να επηρεάσει τον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά τη μίτωση ή να προκαλέσει προβλήματα στην πορεία της αντιγραφής. Εάν δεν επιδιορθωθεί σωστά, μπορεί να προκληθούν χρωμοσωμικές αναδιατάξεις, κυτταρική γήρανση (cellular senescence), καρκινογένεση και απόπτωση [53].

## **3.2 Ιστονική πρωτεΐνη H2AX**

### **3.2.1 Γενικά στοιχεία**

Το οκταμερές ιστονών του νουκλεοσώματος είναι ένα σύμπλεγμα διαφορετικών ιστονικών πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα ένα τετραμερές των ιστονικών πρωτεϊνών H3 και H4 και δύο διμερή των H2A και H2B, ένα σε κάθε άκρο, σχηματίζουν ένα οκταμερές [6]. Η οικογένεια H2A των ιστονικών πρωτεϊνών παρουσιάζει μεγάλο αριθμό παραλλαγών. Μια από αυτές τις παραλλαγές είναι η H2AX, η οποία παρουσιάζει μεγάλη χρησιμότητα στην ανίχνευση δίκλωνων θραύσεων στο DNA [54].



*Εικόνα 3.2* Απεικόνιση κύριας δομής νουκλεοσώματος. Είναι ορατό το DNA (διαφορετικές αποχρώσεις του μπλέ), το τετραμερές ιστονών H3 και H4 (πράσινο και κίτρινο), τα διμερή ιστονών H2A και H2B (κόκκινο και καφέ) [6]

### 3.2.2 Ο ρόλος της πρωτεΐνης H2AX στην ανίχνευση βλαβών στο DNA

Η  $\gamma$ -H2AX είναι η μορφή της ιστονικής πρωτεΐνης H2AX που έχει υποστεί φωσφορυλίωση στην εστία της δίκλωνης βλάβης. Είναι απαραίτητη για τη συγκέντρωση και σταθεροποίηση άλλων πρωτεϊνών αναγκαίων για την επιδιόρθωση του DNA και παίζει ρόλο στη μη-ομόλογη σύνδεση άκρων (NHEJ) και στον ομόλογο ανασυνδυασμό (HR). Όσο οι δίκλωνες θραύσεις επιδιορθώνονται, τόσο μειώνεται και ο αριθμός των εστιών  $\gamma$ -H2AX. Με τη χρήση πρωτεύοντος αντισώματος, με σκοπό τον εντοπισμό, και δευτερεύοντος αντισώματος, με σκοπό τον φθορισμό, καθίσταται εφικτή η παρατήρηση των εστιών  $\gamma$ -H2AX μέσω μικροσκοπίου [12].

Η ανακάλυψη ότι παρουσιάζεται φωσφορυλίωση της ιστονικής πρωτεΐνης H2AX στην χρωματίνη κοντά σε εστία δίκλωνης θραύσης στο DNA, βοήθησε σημαντικά την έρευνα επαγωγής και επιδιόρθωσης βλαβών του DNA [55]. Η κινάση ATM και η κινάση DNA-PK σχετίζονται άμεσα με την φωσφορυλίωση της H2AX στις εστίες DSB. Η φωσφορυλίωση απλώνεται και προς τις δυο κατευθύνσεις των αλυσίδων, έως ότου οι



θραύσεις επανενωθούν [56]. Καθώς παρατηρείται υψηλή συγκέντρωση της πρωτεΐνης 53BP-1 κοντά στην περιοχή όπου έχει επέλθει η δίκλωνη θραύση, θεωρείται ότι η πρωτεΐνη αυτή εμπλέκεται στον σχηματισμό της κινάσης ATM, η οποία οδηγεί στην φωσφορυλίωση της ιστονικής πρωτεΐνης H2AX. [34].

Ο αριθμός των δίκλωνων βλαβών DNA που εμφανίζονται παρουσιάζει σχεδόν 1:1 αναλογία με τον αριθμό των ορατών εστιών  $\gamma$ -H2AX, γεγονός που καθιστά τη μέθοδο αυτή εξαιρετικά χρήσιμη για την ποσοτικοποίηση των επαγόμενων βλαβών [57]. Καθώς το γενετικό υλικό διπλασιάζεται κατά τη μίτωση σε σχέση με την φάση G<sub>1</sub>, έχει παρατηρηθεί διπλάσιος αριθμός εστιών  $\gamma$ -H2AX στα κύτταρα κατά τη μετάφαση [58]. Ακόμη, η μέθοδος εστιών  $\gamma$ -H2AX μπορεί να χρησιμεύσει στην βελτιστοποίηση θεραπείας για κάθε ασθενή, ποσοτικοποιώντας την ικανότητα του καθενός για επιδιόρθωση δίκλωνων θραύσεων DNA [53]. Συγκριτικά με άλλες μεθόδους, η μέθοδος  $\gamma$ -H2AX παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία σε αλλαγές της κατάστασης του γονιδιώματος. Προκειμένου να υπάρξει μεγαλύτερης ακρίβειας ανίχνευση των δίκλωνων θραύσεων DNA, είναι δυνατός ο συνδυασμός της μεθόδου  $\gamma$ -H2AX με την 53BP-1 [17].

Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα και ινοβλάστες, ο αριθμός των εστιών  $\gamma$ H2AX παρουσιάζεται αυξημένος σε ηλικιωμένους δότες, υποδεικνύοντας ότι η γήρανση παίζει ρόλο στη κινητική της επιδιόρθωσης δίκλωνων θραύσεων DNA [53]. Ακόμη, μελετώντας ποντίκια με ελλιπή H2AX, έγινε εμφανές ότι η H2AX είναι ενεργό συστατικό της αντίδρασης του κυττάρου σε βλάβη DNA. Η έλλειψη έστω και ενός αλληλόμορφου γονιδίου H2AX, θέτει σε κίνδυνο την γονιδιακή ακεραιότητα [59]. Σε πειράματα με μη-ιοντίζουσα ακτινοβολία laser, έχει ακόμα βρεθεί ότι η συνολική ενέργεια που απαιτείται για το επιτευχθεί φωσφορυλίωση της H2AX, παρουσιάζει διαφορές μεταξύ διαφορετικών συστημάτων laser [30].



## **ΜΕΡΟΣ 2**

## **ΠΕΙΡΑΜΑ**



## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4**

### **Σκοπός και εκτέλεση του πειράματος**

#### **4.1 Σκοπός του πειράματος**

Έχει παρατηρηθεί ότι χρησιμοποιώντας laser μήκους κύματος από το υπεριώδες (ultraviolet ή UVA), μέχρι το σχεδόν υπέρυθρο (near-infrared ή NIR), υπάρχει η δυνατότητα επαγωγής βλάβης του γενετικού υλικού στον πυρήνα του κυττάρου μέσω διαφορετικών μηχανισμών [30]. Τέτοιες χρήσεις της ακτινοβολίας laser δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς. Καθώς οι βραχύχρονοι παλμοί λέιζερ συναντούν πολλές βιολογικές εφαρμογές, η ανάγκη για κατανόηση των μηχανισμών με τους οποίους αλληλεπιδρούν με τη βιολογική ύλη είναι υψηλή [60].

Σκοπός του πειράματος είναι η ανίχνευση τυχόν δίκλωνων θραύσεων στο DNA ινοβλαστών, μετά από έκθεση τους σε ακτινοβολία που προέρχεται από femtosecond laser Ti:Sapphire. Προκειμένου να ανιχνευθούν τυχόν βλάβες στο DNA χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος εστιών γ-H2AX. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν 2 πειράματα. Και για τα δυο πειράματα χρησιμοποιήθηκε το ίδιο είδος κυττάρων, ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες (AG01523).

Κατά την ακτινοβολήση μεταβάλλαμε τον χρόνο έκθεσης προκειμένου να μεταβληθεί η συνολική ενέργεια που θα λάβουν τα κύτταρα σε κάθε μια θέση. Το πρώτο πείραμα είχε ως σκοπό την πρώτη εκτίμηση του χρόνου έκθεσης εντός του οποίου υπάρχει η δυνατότητα πρόκλησης δίκλωνης θραύσης του DNA. Χρησιμοποιώντας το laser Ti:Sapphire, ακτινοβολήθηκαν συνολικά 12 καλυπτρίδες με ινοβλάστες για διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Ακόμη, μια καλυπτρίδα δέχτηκε ιοντίζουσα ακτινοβολία (positive control) και μια καλυπτρίδα δεν ακτινοβολήθηκε καθόλου (negative control).

Το δεύτερο πείραμα είχε ως σκοπό την αναζήτηση του εύρους εντός του οποίου υπήρχε δυνατότητας πρόκλησης δίκλωνης θραύσης του DNA, βάσει των αποτελεσμάτων του πρώτου πειράματος και τη μελέτη της χρονικής εξέλιξης των επιδιορθωτικών μηχανισμών. Στο πείραμα αυτό, χρησιμοποιήθηκαν δυο ομάδες ινοβλαστών οι οποίες ακτινοβολήθηκαν υπό τις ίδιες συνθήκες. Κάθε ομάδα περιλάμβανε 8 καλυπτρίδες με κύτταρα, εκ των οποίων η μια δεν ακτινοβολήθηκε (negative control). Μετά την ακτινοβολήση, η πρώτη ομάδα κυττάρων παρέμεινε για 30 λεπτά στον κλίβανο επώασης, σε θερμοκρασία 37°C, ενώ η δεύτερη για 60 λεπτά. Η διαδικασία της μονιμοποίησης σταματά την αυτόλυση των κυττάρων, διαφυλάσσει τη δομική σταθερότητά τους και επιτρέπει την παρατήρησή τους χωρίς αλλαγές, ακόμα και μήνες μετά την μονιμοποίηση.

## **4.2 Υλικά**

### **4.2.1 Πείραμα ακτινοβολήσης ενός χρόνου επώασης (30 λεπτά)**

#### **Καλλιέργεια κυττάρων**

Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν είναι ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες (AG01523), παροχή του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» (Δρ. Δ. Κλέτσας). Η σειρά αυτή προέρχεται από ανθρώπινη ακροβυστία [61]. Οι ινοβλάστες καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM 15% FBS. Πριν από την επίστρωση στις πλάκες καλλιέργειας πολλαπλών θέσεων γινόταν θρυψινοποίηση, τα κύτταρα επαναιωρούνταν σε θρεπτικό υλικό DMEM 15% FBS και το εναιώρημα των κυττάρων μοιραζόταν στις 8 κεντρικές θέσεις της πλάκας (500μl / θέση). Μετά από μερικές ημέρες πραγματοποιήθηκε η παραλαβή των κυττάρων, αφού επιβεβαιώθηκε κατόπιν μικροσκοπικής παρατήρησης ότι τα κύτταρα είχαν σχηματίσει ένα πλήρες ταπήτιο.

Οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε πλάκα καλλιέργειας 24 (4×6) θέσεων (βοθρίων) της εταιρίας Greiner. Η κάθε καλυπτρίδα (ROTH) είχε διάμετρο 12 mm. Μετά την επίστρωση, τα κύτταρα κάλυπταν περίπου το 40-50% της επιφάνειας της καλυπτρίδας. Οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν στις 8 εσωτερικές θέσεις της πλάκας καλλιέργειας.

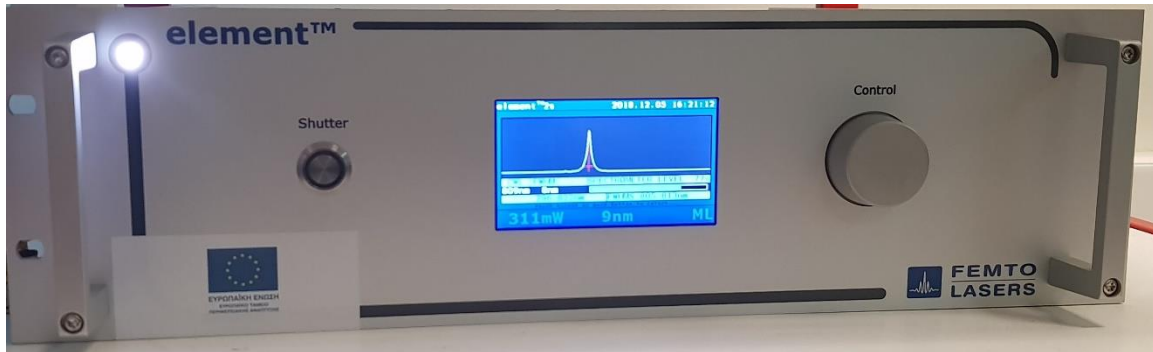
#### **Πηγή ιοντίζουσας ακτινοβολίας**

Πηγή κοβαλτίου-60 ( $^{60}\text{Co}$ ) Gamma chamber 4000A (Isotope Group, Bhabha Atomic Research Company, Trombay, Bombay, India). Ρυθμός δόσης 2,8 Gy/min. Συνολική δόση που δέχτηκαν τα κύτταρα «positive control» είναι 10 Gy.

#### **Διάταξη laser Ti:Sapphire**

Το σύστημα laser που χρησιμοποιήθηκε για την ακτινοβολήση ήταν Ti:Sapphire femtosecond laser (spectra-Physics-element<sup>TM</sup> 100 250) με μήκος κύματος  $\lambda = 807 \text{ nm}$ , εύρος ζώνης FWHM = 14 nm, επαναληπτικότητα = 85 MHz, διάρκεια παλμού  $dt = 48 \text{ fs}$ ,

μέση ισχύ  $P_{AVG} = 360 \text{ mW}$  και διάμετρο δέσμης ( $1/e^2$ )  $< 2 \text{ mm}$ . Μετρώντας την ισχύ του laser με τη χρήση ισχυόμετρου βρέθηκε να είναι  $321 \text{ mW}$ . Μετρώντας την ξανά μετά την τοποθέτηση ενός καθρέπτη προκειμένου η δέσμη να προσπίπτει κάθετα στα κύτταρα, βρέθηκε να είναι  $240 \text{ mW}$ .



*Εικόνα 4.1 Μέρος της διάταξης του femtosecond laser Ti:Sapphire που χρησιμοποιήθηκε, η φωτογραφία λήφθηκε πριν την ακτινοβολήση*

### **Μικροσκόπιο**

Το μικροσκόπιο φθορισμού στο οποίο μελετήθηκαν τα κύτταρα είναι το AxioPlan 2, Carl Zeiss Microscopy, στο Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε «Δημόκριτος».

### **4.2.2 Πείραμα ακτινοβολήσης δύο χρόνων επώασης (30 και 60 λεπτά)**

Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα της ίδιας κυτταρικής σειράς με το πρώτο, ινοβλαστών δέρματος AG01523.

Οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν στην ίδια πλάκα καλλιέργειας 24 θέσεων (Greiner) και χρησιμοποιήθηκαν οι 8 κεντρικές θέσεις της και στις δυο ομάδες.

Για την ακτινοβολήση χρησιμοποιήθηκε το ίδιο σύστημα Ti:Sapphire femtosecond laser (spectra-Physics-element™ 100 250). Τοποθετώντας τον καθρέπτη προκειμένου η δέσμη να προσπίπτει κάθετα στα κύτταρα, η ισχύς μετρήθηκε να είναι  $230 \text{ mW}$  με τη χρήση ισχυόμετρου.





*Εικόνα 4.2 Πρόσωση της διάταξης του laser Ti:Sapphire. Η φωτογραφία λήφθηκε λίγο πριν την ακτινοβολήση των κυττάρων.*

#### **Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στο πρωτόκολλο $\gamma$ -H2AX**

Για τη μονιμοποίηση των κυττάρων του δεύτερου πειράματος χρησιμοποιήθηκε διάλυμα παραφορμαλδεΐδης 2% και ζαχαρόζης 2% σε PBS. Για την παρασκευή του προστέθηκαν 4N NaOH και θερμάνθηκε στους 70-80°C σε φούρνο μικροκυμάτων. Για 500 ml, προστέθηκαν 10 g παραφορμαλδεΐδης, 10 g ζαχαρόζης και αφού η θερμοκρασία μειώθηκε, 50 ml PBS.

Προκειμένου να καθιστούν οι κυτταρικές μεμβράνες διαπερατές στο δεύτερο πείραμα, χρησιμοποιείται διάλυμα P-Solution στο οποίο προστίθεται Triton X-100. Για την παρασκευή του χρησιμοποιούνται 100 mM ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCL (pH 7.4), 50 mM EDTA και Triton X-100 συγκέντρωσης 0,5%. Για 500 ml προστίθενται 50 ml 1M Tris-HCL, pH 7.4 και 50 ml EDTA. Για κάθε 50 ml του P-solution, προστίθενται 250  $\mu$ L 100% Triton X-100.

Η σύσταση του διαλύματος blocking PBG ήταν 0.2% ζελατίνη ψαριού, η οποία έφτασε σε βρασμό στους 50°C προκειμένου να διαλυθεί, και 0.5% Bovine Serum Albumin fraction v. Το μείγμα αυτό θερμάνθηκε στους 37°C σε φούρνο μικροκυμάτων. Για 500 ml προστέθηκαν 1g ζελατίνη ψαριού, 2,5 g BSA και 50 ml PBS.

Η συγκέντρωση της φθορίζουσας χρωστικής DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) που χρησιμοποιήθηκε στο δεύτερο πείραμα ήταν 1mg/ml σε H<sub>2</sub>O. Η χρωστική DAPI προσδένεται στις περιοχές του DNA που είναι πλούσιες σε Αδενίνη-Θυμίνη και εκπέμπει μπλε φθορισμό, επομένως μπορεί να παρατηρηθεί μέσω μικροσκοπίου με τη χρήση μπλε φίλτρου. Το μικροσκόπιο που χρησιμοποιήθηκε για τη παρατήρηση των κυττάρων ήταν αρχικά το AxioPlan 2, Carl Zeiss.

## **4.3 Διαδικασία ακτινοβόλησης**

### **4.3.1 Πείραμα ακτινοβόλησης ενός χρόνου επώασης (30 λεπτά)**

Αφού τα κύτταρα μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο του κτηρίου φυσικής της ΣΕΜΦΕ, τοποθετήθηκαν απευθείας στον κλίβανο επώασης στους 37°C για 20 λεπτά. Τα κύτταρα ακτινοβολήθηκαν για διαφορετικά χρονικά διαστήματα όπως φαίνεται στον πίνακα 4.3.1. Η διακοπή της δέσμης έγινε μετακινώντας χειροκίνητα ένα κλείστρο. Σε κάθε τρυβλίο υπήρξαν 2 negative controls, δηλαδή κύτταρα που δεν ακτινοβολήθηκαν καθόλου. Υπήρχε ακόμη ένα positive control που ακτινοβολήθηκε ξεχωριστά με ιοντίζουσα ακτινοβολία.

Η δέσμη του laser ανοίχθηκε με τη χρήση φακού και μετρήθηκε στο εργαστήριο σαν έλλειψη με μεγάλο άξονα  $d_1 = 0,55$  cm και μικρό άξονα  $d_2 = 0,42$  cm. Επομένως για το εμβαδόν  $A$  ισχύει ότι:  $A = \pi \frac{d_1 d_2}{2}$ . Η μέση ισχύς μετρήθηκε να είναι 240 mW. Χρησιμοποιήθηκαν οι σχέσεις που αναφέρθηκαν στην παράγραφο 2.3.1.

Η συνολική ενέργεια ανα μονάδα επιφάνειας (πυκνότητα ενέργειας), για χρόνο ακτινοβόλησης  $t_{\text{ακτιν}}$  μπορεί να υπολογιστεί ως εξής:

$$E_{\text{ολική}} = \frac{E_{\text{παλμ}} f_{\text{επαν}} t_{\text{ακτιν}}}{A}$$

Θέση	Χρόνος ακτινοβολήσης (s)	Πυκνότητα ενέργειας (J/cm <sup>2</sup> )
1	2	2.65
2	4	5.29
3	6	7.94
4	8	10.58
5	10	13.23
6	15	19.84
7	20	26.46
8	25	33.07
9	30	39.69
10	35	46.30
11	40	52.91
12	45	59.53

*Πίνακας 4.3.1: Χρόνος ακτινοβολήσης και συνολική πυκνότητα ενέργειας που δέχτηκαν οι ινοβλάστες σε κάθε θέση για κάθε χρόνο ακτινοβολήσης*

Η μέση και η μέγιστη πυκνότητα ισχύος υπολογίζονται αντίστοιχα ως:

$$I_{\text{μέση}} = \frac{P_{\text{μέση}}}{A} \quad \text{και} \quad I_{\text{μέγ}} = \frac{P_{\text{μέγ}}}{A}$$

Η ενέργεια ανά παλμό και η μέγιστη ισχύς δίνονται αντίστοιχα από τις σχέσεις:

$$E_{\text{παλμ}} = \frac{P_{\text{μέση}}}{f_{\text{επαμ}}} \quad \text{και} \quad P_{\text{μεγ}} = \frac{E_{\text{παλμ}}}{t_{\text{παλμ}}}$$

<b>E<sub>παλμ</sub></b> (nJ)	<b>P<sub>μέγ</sub></b> (kW)	<b>I<sub>μέγ</sub></b> (MW/cm <sup>2</sup> )	<b>I<sub>μέση</sub></b> (W/cm <sup>2</sup> )
2.82	58.75	0.32	1.32

*Πίνακας 4.3.2 Ενέργεια ανά παλμό, μέγιστη ισχύς, μέγιστη και μέση πυκνότητα ισχύος, όπως υπολογίστηκαν*

Μετά την ακτινοβολήση τα κύτταρα τοποθετήθηκαν ξανά στον κλίβανο επώασης στους 37°C. Έπειτα από το πέρας μισής ώρας, πραγματοποιήθηκε η διαδικασία μονιμοποίησης των κυττάρων ακολουθώντας το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην παράγραφο 4.4.1.

### 4.3.2 Πείραμα ακτινοβόλησης δύο χρόνων επώασης (30 και 60 λεπτά)

Στο πείραμα αυτό τα κύτταρα ακτινοβολήθηκαν με τον ίδιο τρόπο και στα δύο τρυβλία, όπως φαίνεται αναλυτικά στον πίνακα 4.3.2. Ακόμη, 2 θέσεις δεν ακτινοβολήθηκαν (negative controls), μια σε κάθε τρυβλίο. Η δέσμη του laser ανοίχθηκε με τη βοήθεια φακού, σχηματίζοντας έλλειψη με μεγάλο άξονα 6.74 mm και μικρό άξονα 5.08 mm. Η ακριβής μέτρηση των αξόνων της έλλειψης πραγματοποιήθηκε μέσω του προγράμματος ImageJ χρησιμοποιώντας εικόνα που περιείχε τη δέσμη του laser και ένα μέτρο αναφοράς. Θέτοντας ως κλίμακα τον χάρακα της φωτογραφίας, μετρήθηκε ακριβώς η επιφάνεια της δέσμης. Η μέση ισχύς μετρήθηκε να είναι 230 mW.

Θέση	Χρόνος ακτινοβόλησης (s)	Ενέργεια (J/cm <sup>2</sup> )
1	1	0.86
2	20	17.11
3	40	34.21
4	60	51.32
5	80	68.42
6	100	85.53
7	120	102.64

*Πίνακας 4.3.3: Χρόνος ακτινοβόλησης και πυκνότητα ενέργειας που δέχτηκαν οι ινοβλάστες σε κάθε θέση για κάθε χρόνο ακτινοβόλησης*

<b>E</b> <sub>παλμ</sub> (nJ)	<b>P</b> <sub>μέγ</sub> (kW)	<b>I</b> <sub>μέγ</sub> (MW/cm <sup>2</sup> )	<b>I</b> <sub>μέση</sub> (W/cm <sup>2</sup> )
2.71	56.46	0.21	0.86

*Πίνακας 4.3.4 Ενέργεια ανά παλμό, μέγιστη ισχύς, μέγιστη και μέση πυκνότητα ισχύος, όπως υπολογίστηκαν*

Μετά την ακτινοβόληση τα κύτταρα τοποθετήθηκαν στον κλίβανο επώασης στους 37°C. Μετά το πέρας 30 λεπτών, βγάλαμε το πρώτο τρυβλίο από τον κλίβανο επώασης και μετά το πέρας 1 ώρας, το δεύτερο. Αμέσως μετά την έξοδο κάθε τρυβλίου από τον κλίβανο

επώασης, ακολούθησε η διαδικασία μονιμοποίησης που περιγράφεται στην παράγραφο 4.4.2.

## **4.4 Πρωτόκολλο ανοσοφθορισμού**

### **4.4.1 Πείραμα ακτινοβόλησης ενός χρόνου επώασης (30 λεπτά)**

Στο πρώτο πείραμα ακολουθήθηκε το εξής πρωτόκολλο:

Μετά την ακτινοβόληση, τα κύτταρα επωάζονται στον κλίβανο, στους 37° C για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται αναρρόφηση του θρεπτικού υλικού. Ακολουθεί η μονιμοποίηση των κυττάρων με τη χρήση διαλύματος φορμαλδεΰδης συγκέντρωσης 3.7%. Τοποθετούνται 0,5 ml φορμαλδεΰδης κατευθείαν μέσα σε κάθε μια θέση του τρυβλίου. Τα κύτταρα παραμένουν στη φορμαλδεΰδη, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, για 10 λεπτά. Εν συνεχεία, πραγματοποιείται αφαίρεση του υλικού μονιμοποίησης και προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος PBS (Phosphate Buffered Saline). Συνολικά πραγματοποιούνται 3 εκπλύσεις με PBS, διάρκειας 5 λεπτών η κάθε μία. Οι εκπλύσεις διευκολύνουν να λάβουμε τελικά ευδιάκριτα αποτελέσματα. Τα δείγματα φυλάσσονται εν συνεχεία στους 4° C. Τα κύτταρα μπορούν να φυλαχτούν για διάστημα μερικών μηνών χωρίς να υπάρξει πρόβλημα στην παρατήρηση βλαβών.

Στη συνέχεια πραγματοποιούνται 2 εκπλύσεις με PBS, διάρκειας 10 λεπτών η κάθε μία. Το pH του PBS είναι περίπου 7, τιμή η οποία είναι επιθυμητή για τον ανοσοφθορισμό. Ακολουθεί η τοποθέτηση διαλύματος Triton συγκέντρωσης 0,2% το οποίο καθιστά τις κυτταρικές μεμβράνες διαπερατές σε αντισώματα [62]. Ακολουθεί επώαση σε πάγο, διάρκειας 5 λεπτών.

Στη συνέχεια, προστίθεται το διάλυμα blocking, προκειμένου να γίνει κάλυψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης του αντισώματος που προστίθεται αργότερα. Η σύσταση του διαλύματος blocking ήταν 1% BSA (Bovine Serum Albumin), το οποίο παρασκευάστηκε με 0,5 γραμμάρια BSA σε PBS. Η διαδικασία πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου.

Προκειμένου το αντίσωμα που θα προσθέσουμε να παραμείνει στο κέντρο της κάθε καλυπτρίδας, χαράζουμε απαλά περιμετρικά της καλυπτρίδας.

Ακολουθεί η προσθήκη του επιλεγμένου αντισώματος anti-phospho-H2AX (Ser 139) της εταιρίας MERCK. 5 ml αντισώματος αραιώνονται σε 495 ml διαλύματος blocking, δίνοντας αναλογία 1/100. Τα κύτταρα επωάζονται για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου έχοντας τοποθετήσει 25 ml σε κάθε καλυπτρίδα. Έπειτα πραγματοποιούνται 3 εκπλύσεις με PBS διάρκειας 10 λεπτών η κάθε μία και μετά προστίθεται το δεύτερο αντίσωμα. Το anti-rabbit αντίσωμα αυτό είναι συζευγμένο με φθοροφόρο (πράσινο) και αραιωμένο σε διάλυμα blocking με αναλογία 1/200. Τοποθετούνται 25 ml σε κάθε καλυπτρίδα και τα κύτταρα επωάζονται για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Αφού έχει προστεθεί φθοροφόρα ουσία, απαιτείται όσο δυνατόν λιγότερη άμεση επαφή με πηγές φωτός. Στη συνέχεια προστίθεται PBS και έπειτα 4 mg/ml της χρωστικής ουσίας DAPI το οποίο θα δεσμευτεί στο DNA.

Προκειμένου να παρατηρηθούν τα κύτταρα στο μικροσκόπιο, οι καλυπτρίδες αφαιρέθηκαν, ξεπλύθηκαν σε νερό για να αφαιρεθούν τα άλατα από το PBS και τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες. Στη συνέχεια, προστέθηκε διάλυμα με υψηλό ιξώδες προκειμένου να δεσμεύσει τις ελεύθερες ρίζες και να αποφευχθεί χάσιμο του φθορισμού (anti-fading). Το διάλυμα αυτό περιέχει 1 mg/ml φαινυλενοδιαμίνη σε 90% γλυκερόλη σε PBS. Για να σταθεροποιηθούν τα κύτταρα και να μην κινούνται όταν παρατηρούνται στο μικροσκόπιο, στεγανοποιήθηκαν περιφερειακά με βερνίκι.

#### **4.4.2 Πείραμα ακτινοβόλησης δύο χρόνων επώασης (30 και 60 λεπτά)**

Στο δεύτερο πείραμα ακολουθήθηκε το εξής πρωτόκολλο:

Μετά την ακτινοβόληση ακολουθούν εκπλύσεις των κυττάρων με PBS και στη συνέχεια μονιμοποίηση. Κάθε φορά που γίνεται πλύση με PBS, πραγματοποιούμε 3 ξεχωριστές εκπλύσεις. Η μονιμοποίηση πραγματοποιείται με διάλυμα παραφορμαλδεΰδης 2% και

ζαχαρόζης 2%. Μετά από εκπλύσεις με PBS, προστίθεται το διάλυμα P-solution, στο οποίο έχει προστεθεί Triton X-100 συγκέντρωσης 0,5% σε θερμοκρασία δωματίου.



*Εικόνα 4.3 Πλάκα καλλιέργειας 24 θέσεων (Greiner). Χρησιμοποιήθηκαν οι κεντρικές 8 θέσεις προκειμένου να προστατευτούν από εξωγενείς παράγοντες.*

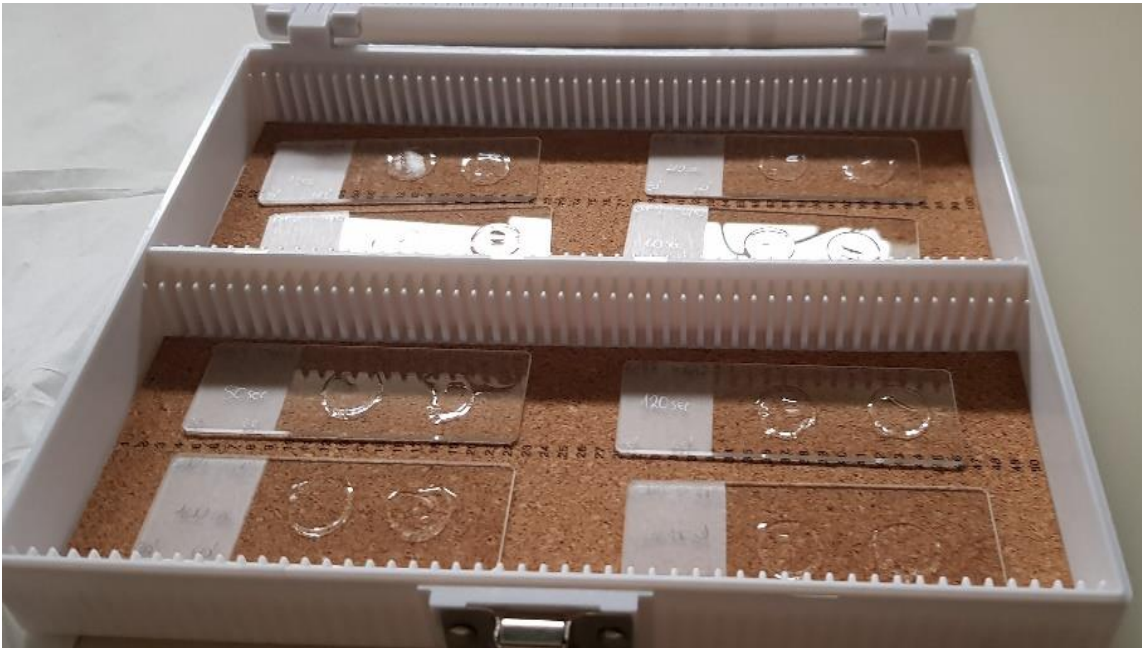
Ακολουθούν 3 εκπλύσεις με PBS και προσθήκη του διαλύματος blocking PBG. Τα κύτταρα φυλάσσονται στους 4°C και μπορούν να παραμείνουν για διάστημα σχεδόν μιας εβδομάδας εφόσον προστεθεί PBG με 0,05% νατραζίδιο (sodium azide). Στην περίπτωση μας, διατηρήθηκαν για μια ημέρα, επομένως δεν υπήρξε ανάγκη για προσθήκη νατραζιδίου.

Ακολουθεί η προσθήκη του 1<sup>ου</sup> αντισώματος (πρωτεύον αντίσωμα). Στην περίπτωση μας χρησιμοποιήθηκε pAb anti gamma H2AX rabbit (p Ser139, NB 100-384). Αρχικά πραγματοποιείται αραίωση του αντισώματος στο διάλυμα blocking PBG, με αναλογία 1:800. Στη συνέχεια, σε ξεχωριστό χαρτί τοποθετούνται σταγόνες 40 µL η κάθε μια, προσέχοντας να μην δημιουργηθούν φούσκες αέρα. Επάνω στις σταγόνες αυτές τοποθετούνται προσεκτικά οι καλυπτρίδες αφού σκουπιστούν απαλά και αντιστραφούν προκειμένου τα κύτταρα να ακουμπήσουν απευθείας με τις σταγόνες του αντισώματος.

Τα κύτταρα καλύπτονται προκειμένου να περιοριστεί η επαφή με το φως και παραμένουν καλυμμένα για 1,5 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας της ώρας αυτής, γίνονται 3 εκπλύσεις με PBS διάρκειας 5 λεπτών.

Έπειτα προστίθεται το 2<sup>ο</sup> αντίσωμα (δευτερεύον αντίσωμα). Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκε anti-rabbit Rhodamine (R-6394) αραιωμένο στο διάλυμα blocking PBG, με αναλογία 1:600. Οι καλυπτρίδες τοποθετούνται πάνω σε 40  $\mu$ L του διαλύματος αντισώματος σε μορφή σταγόνων. Τα κύτταρα φυλάσσονται στο σκοτάδι για 1 ώρα και ακολουθούν 3 εκπλύσεις με PBS διάρκειας 5 λεπτών.

Αμέσως μετά τις εκπλύσεις, οι καλυπτρίδες τοποθετούνται με την επιφάνεια των κυττάρων προς τα κάτω, σε αντικειμενοφόρες πλάκες όπου έχουν προηγουμένως τοποθετηθεί 12  $\mu$ L της χρωστικής DAPI για κάθε καλυπτρίδα (εικόνα 2. ) Προκειμένου να παρατηρηθούν τα κύτταρα στο μικροσκόπιο πρέπει να στεγνώσουν. Αφού στεγνώσουν, φυλάσσονται στους 4°C, προστατευμένα από το φως μέχρι εως και 6 μήνες. Στην περίπτωση μας έμειναν για μια ημέρα σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα μια ημέρα στους 4°C.



**Εικόνα 4.4** Τα κύτταρα φυλάσσονται μακριά από το φως, στους 4°C, έως την ημέρα παρατήρησης τους στο μικροσκόπιο



## **ΜΕΡΟΣ 3<sup>ο</sup>**

## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**



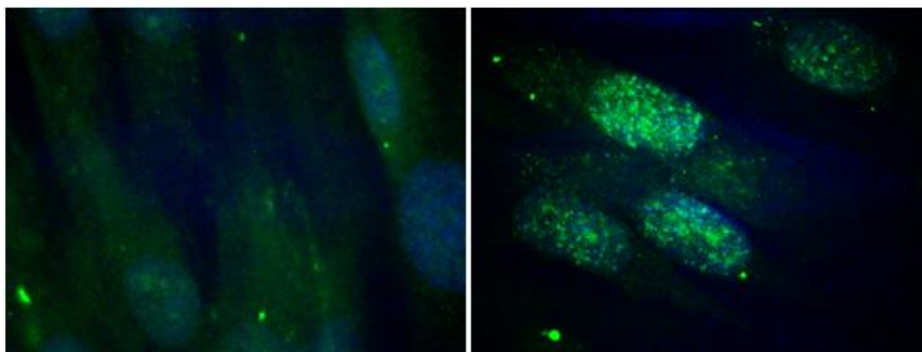
# Κεφάλαιο 5

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

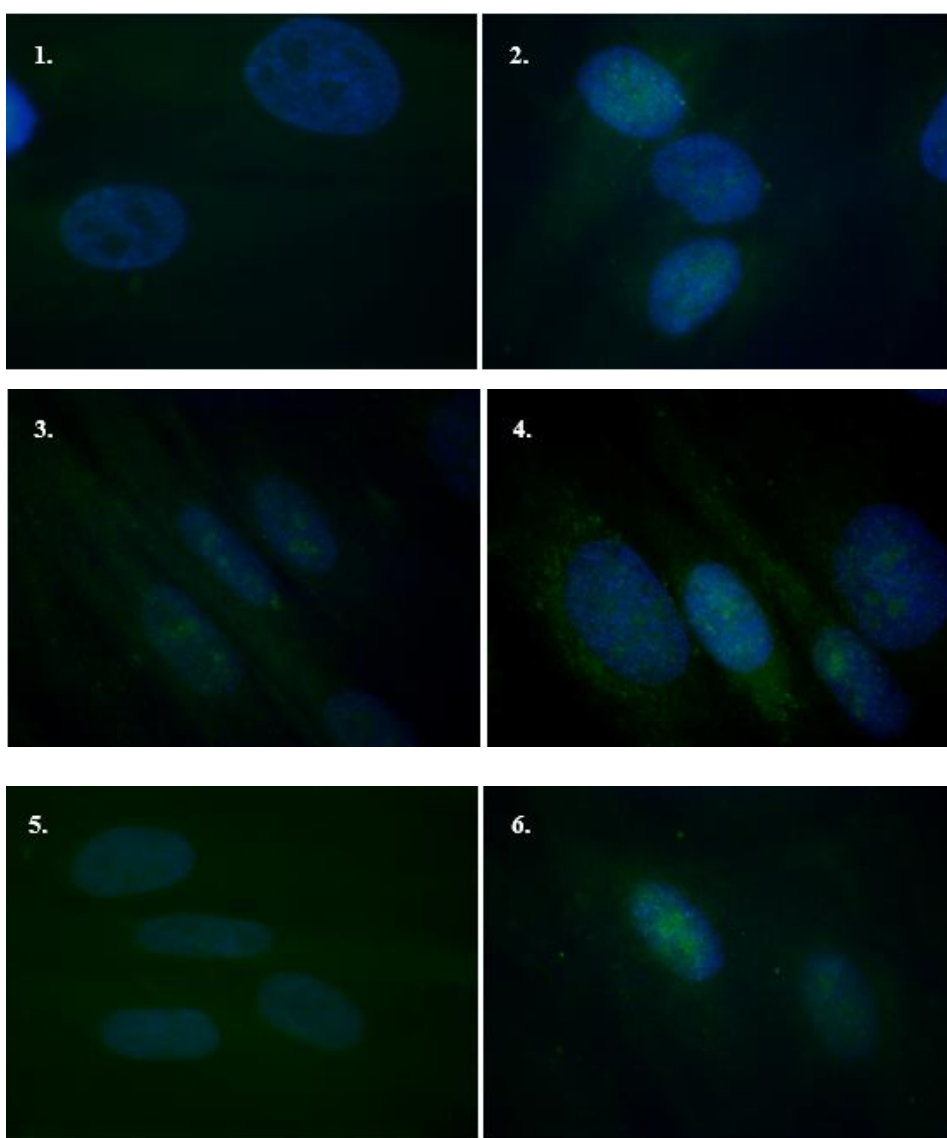
### 5.1 Αποτελέσματα πειράματος ενός χρόνου επώασης

Τα ακτινοβολημένα και μη κύτταρα παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο μετά την σταθεροποίηση τους με βερνίκι. Στη συνέχεια, οι αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετήθηκαν στο μικροσκόπιο για παρατήρηση, προκειμένου να εντοπιστούν τυχόν δίκλωνες βλάβες DNA. Οι πιθανές βλάβες αυτές υποδεικνύονται από την φωσφορυλίωση των μορίων  $\gamma$ -H2AX. Στο πείραμα αυτό περιμένουμε να έχουν έντονο πράσινο χρώμα.

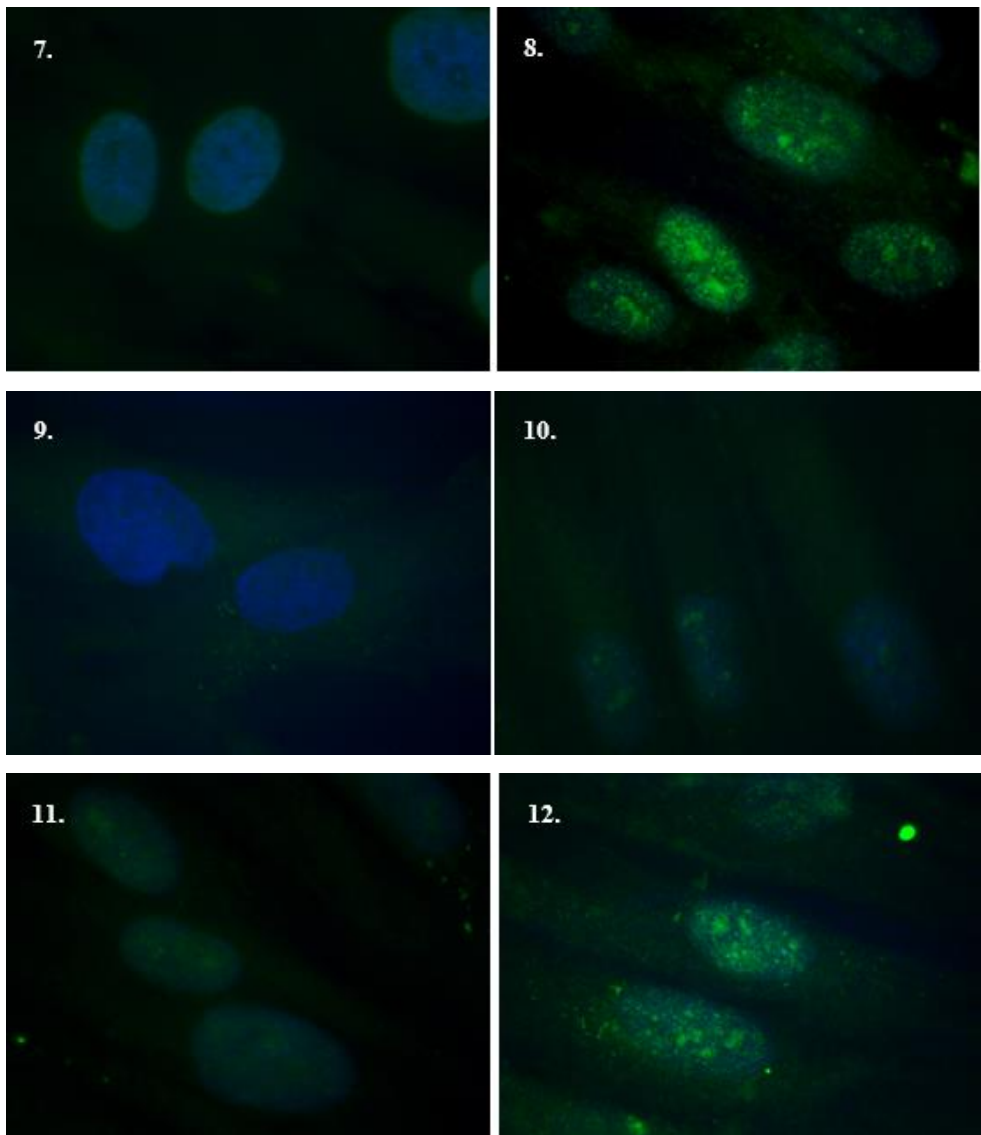
Αξιοποιώντας το λογισμικό ProgRes CapturePro software (Jenoptik), λήφθηκαν ενδεικτικές φωτογραφίες για κάθε ένα δείγμα (εικόνα 3.2 και εικόνα 3.3). Χρησιμοποιήθηκε αντικειμενικός φακός 40x και ελαιοκαταδυτικός 100x. Ακόμη λήφθηκαν φωτογραφίες των κυττάρων που δεν ακτινοβολήθηκαν (negative control) καθώς και κυττάρων που ακτινοβολήθηκαν με ιοντίζουσα ακτινοβολία (positive control). (εικόνα 3.1)



*Εικόνα 5.1* Ινοβλάστες που δεν ακτινοβολήθηκαν (αριστερά) και ινοβλάστες που εκτέθηκαν σε ιοντίζουσα ακτινοβολία (δεξιά) Εικόνες μικροσκοπίου AxioPlan 2, Carl Zeiss.



*Εικόνα 5.2* Ινοβλάστες που εκτέθηκαν σε ακτινοβολία laser για 2, 4, 6, 8, 10 και 15 s. Δεν διακρίνονται εστίες  $\gamma$ -H2AX. Εικόνες μικροσκοπίου AxioPlan 2, Carl Zeiss.



*Εικόνα 5.3* Ινοβλάστες που εκτέθηκαν σε ακτινοβολία για χρονικά διαστήματα από 20 – 45 δευτερόλεπτα. Background υψηλό στις εικόνες #8 και #12. Διακρίνονται πιθανές εστίες στην καλυπτρίδα #12. Η εικόνα αυτή είναι όμως εξαιρετικά περιορισμένη. Εικόνες μικροσκοπίου AxioPlan 2, Carl Zeiss

Από τις 12 ομάδες κυττάρων που ακτινοβολήθηκαν, αξιοσημείωτος φθορισμός παρατηρήθηκε σε αυτά που ακτινοβολήθηκαν για 25 και 45 δευτερόλεπτα. Ο αριθμός των κυττάρων που παρουσίαζαν φθορισμό παρόμοιο με τις εικόνες 3.3 αριθμό 8 και 12, ήταν πολύ μικρός σε σχέση με τα κύτταρα που ακτινοβολήθηκαν με ιοντίζουσα ακτινοβολία. Ακόμη, παρατηρήθηκε ότι η ένταση του φθορισμού ήταν μικρότερη συγκριτικά με εκείνη

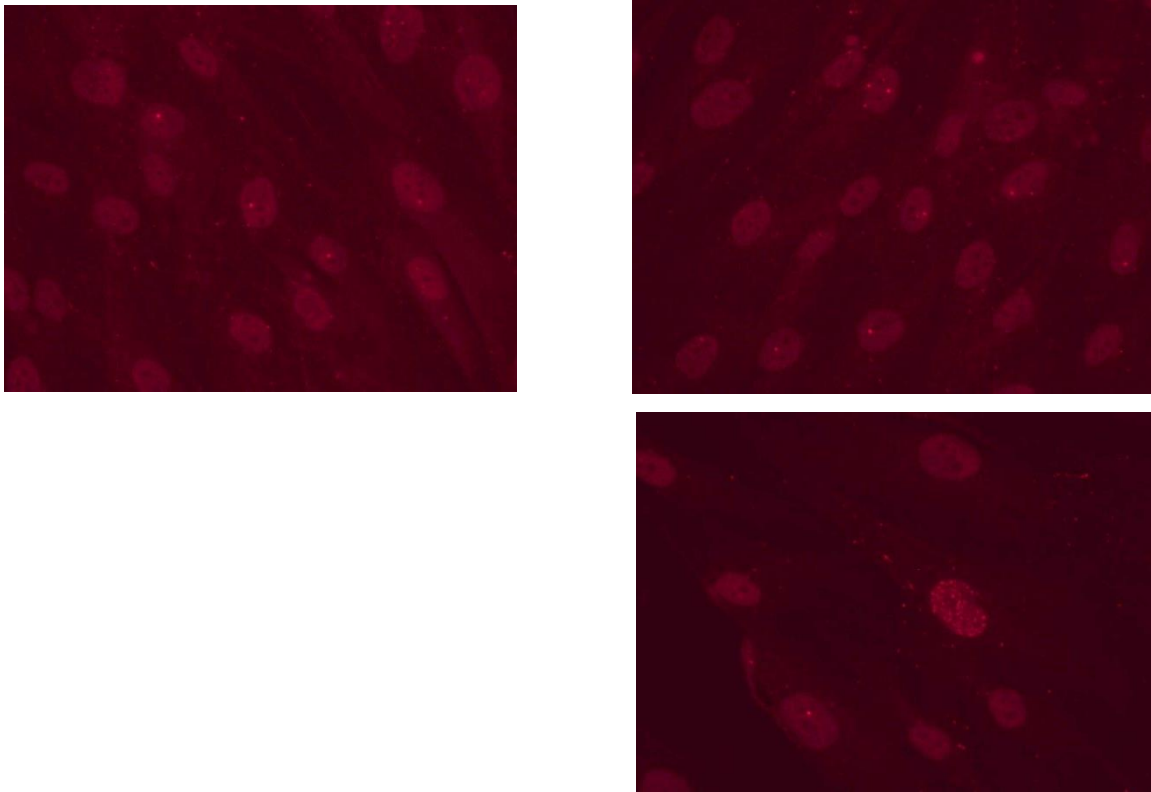
των κυττάρων που υπέστησαν βλάβες λόγω ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Τα στοιχεία αυτά δεν μας δίνουν σαφή απάντηση για τη φύση του φθορισμού που παρατηρήθηκε.

Για αυτό το λόγο, κρίθηκε απαραίτητη η επανάληψη του πειράματος, λαμβάνοντας μεγαλύτερο εύρος χρόνων ακτινοβολήσης και κατά συνέπεια ενέργειας ανά επιφάνεια.

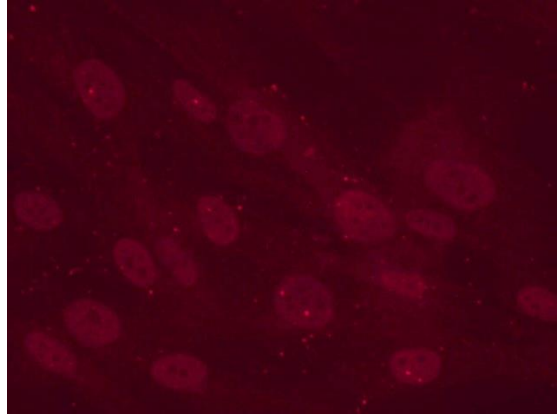
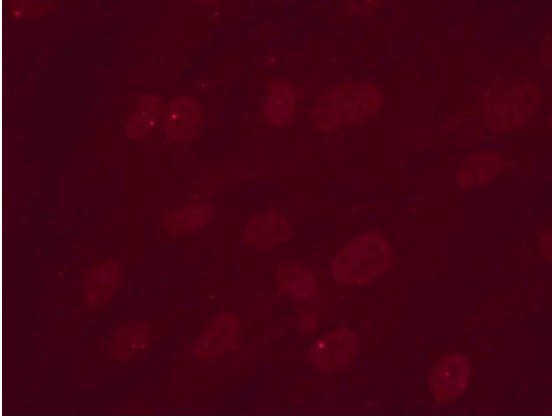
## **5.2 Αποτελέσματα πειράματος δύο χρόνων επώασης**

### **5.2.1 Πρώτη παρατήρηση των κυττάρων**

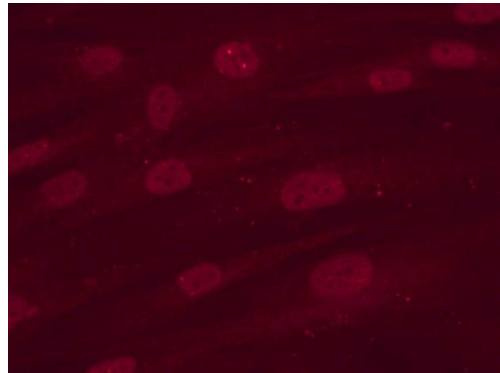
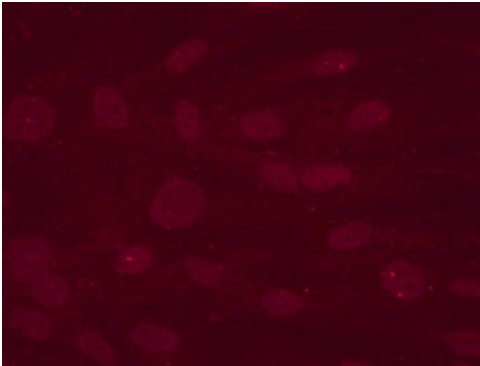
Μετά από μια ημέρα φύλαξης στους 4°C, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν στο Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» για παρατήρηση. Παρουσιάζονται ενδεικτικές εικόνες της ομάδας που μετά την ακτινοβολήση και πριν τη διαδικασία της μονιμοποίησης, παρέμεινε στον κλίβανο για 30 λεπτά και εκείνης που παρέμεινε για 60 λεπτά.



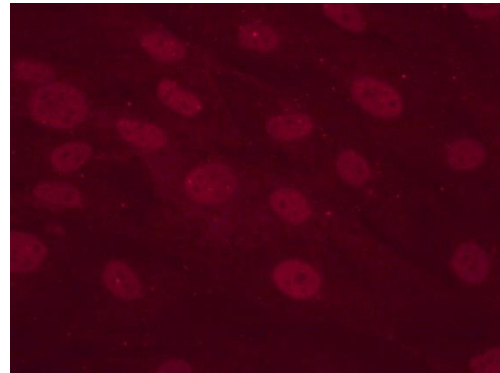
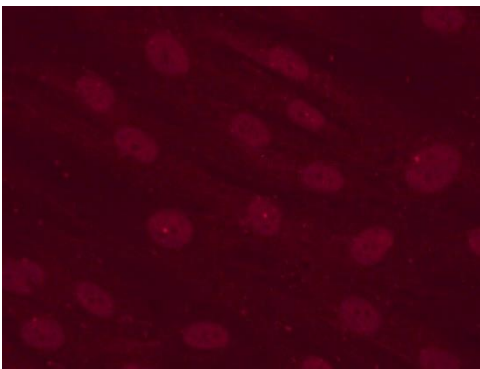
*Εικόνα 5.4* Κύτταρα που δεν ακτινοβολήθηκαν (negative controls). Έμειναν 30' (αριστερά) και 1 ώρα (δεξιά) στον κλίβανο.



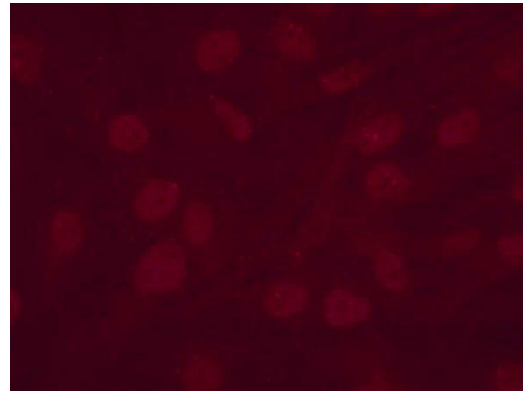
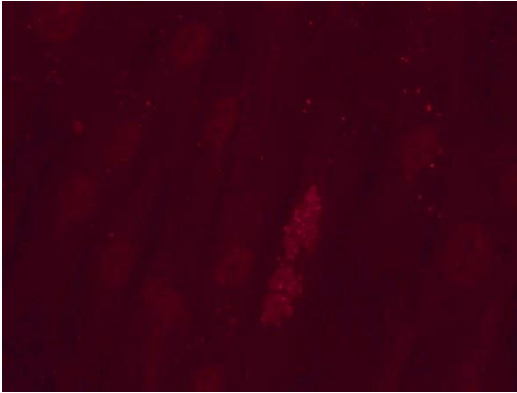
*Εικόνα 5.5* Κύτταρα που ακτινοβολήθηκαν για 1 δευτερόλεπτο. Έμειναν 30' (αριστερά) και 1 ώρα (δεξιά) στον κλίβανο



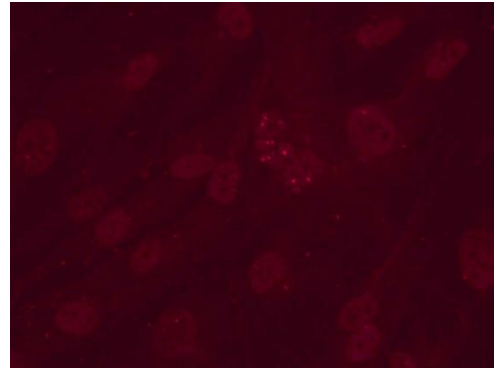
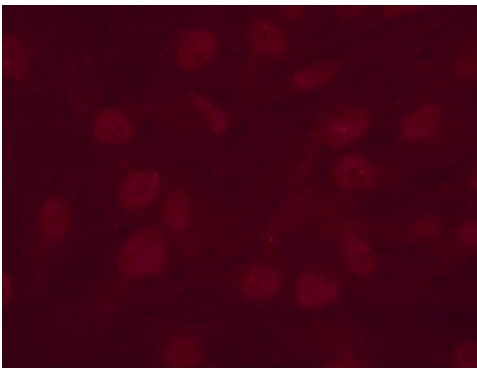
*Εικόνα 5.6* Κύτταρα που ακτινοβολήθηκαν για 20 δευτερόλεπτα. Έμειναν 30' (αριστερά) και 1 ώρα (δεξιά) στον κλίβανο



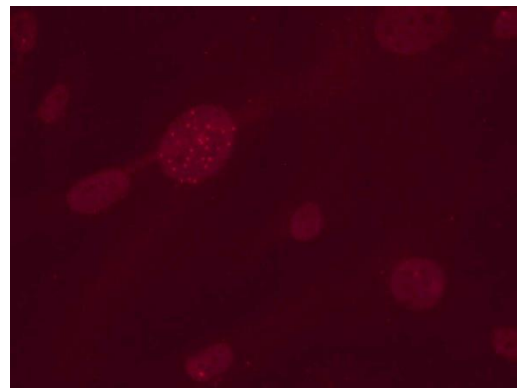
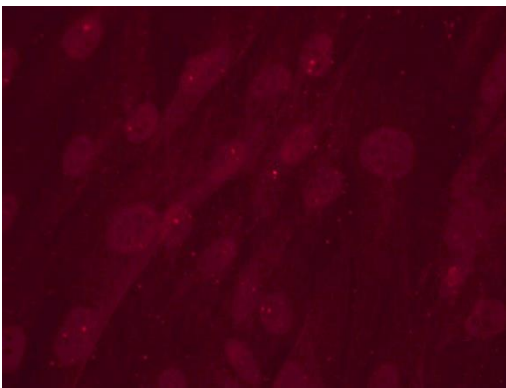
*Εικόνα 5.7* Κύτταρα που ακτινοβολήθηκαν για 40 δευτερόλεπτα. Έμειναν 30' (αριστερά) και 1 ώρα (δεξιά) στον κλίβανο



*Εικόνα 5.8* Κύτταρα που ακτινοβολήθηκαν για 60 δευτερόλεπτα. Έμειναν 30' (αριστερά) και 1 ώρα (δεξιά) στον κλίβανο.

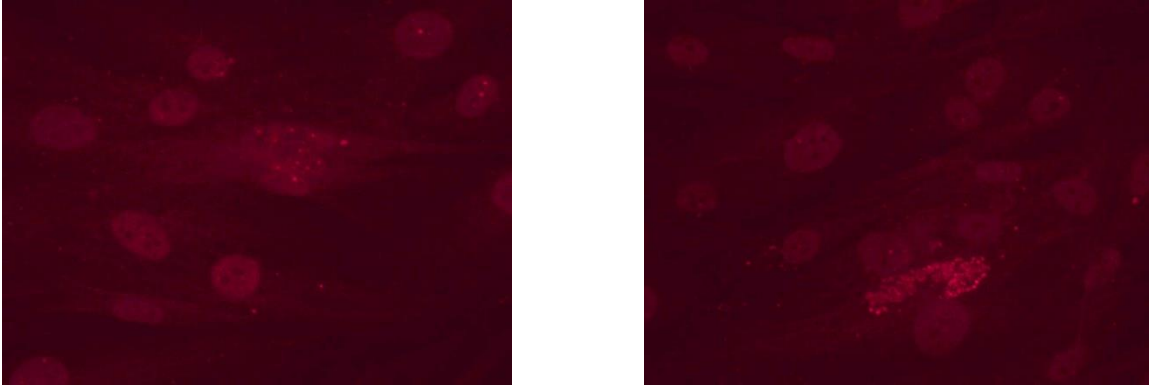


*Εικόνα 5.9* Κύτταρα που ακτινοβολήθηκαν για 80 δευτερόλεπτα. Έμειναν 30' (αριστερά) και 1 ώρα (δεξιά) στον κλίβανο



*Εικόνα 5.10* Κύτταρα που ακτινοβολήθηκαν για 100 δευτερόλεπτα. Έμειναν 30' (αριστερά) και 1 ώρα (δεξιά) στον κλίβανο. Σε ολόκληρη την καλυπτρίδα υπήρχαν μονάχα 2 πυρήνες που εμφάνιζαν πολλές εστίες, όπως ο εικονιζόμενος (δεξιά)





*Εικόνα 5.12. Κύτταρα που ακτινοβολήθηκαν για 120 δευτερόλεπτα. Έμειναν 30' (αριστερά) και 1 ώρα (δεξιά) στον κλίβανο*

Προκειμένου να εξακριβωθεί ότι τα ελάχιστα φωτεινά σημεία δεν υποδεικνύουν εστίες  $\gamma$ -H2AX, όλα τα κύτταρα παρατηρήθηκαν χρησιμοποιώντας άλλο φως στο μικροσκόπιο. Παρατηρήθηκε ότι τα σημεία αυτά φθορίζουν και στο DAPI.

Στα κύτταρα που ακτινοβολήθηκαν για 60 δευτερόλεπτα και βγήκαν από τον κλίβανο επώασης μετά από 30 λεπτά, παρατηρήθηκαν 2 αποπτωτικά κύτταρα (εικόνα 5.8 ). Εκτός από αυτά, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των κυττάρων που ακτινοβολήθηκαν για 1, 20, 40, 60 και 80 δευτερόλεπτα και βγήκαν μετά από 30 λεπτά από τον κλίβανο επώασης. Παρόμοια αποτελέσματα έδωσε και η σύγκριση για ίδιους χρόνους ακτινοβολήσης και παραμονής 1 ώρας στον κλίβανο επώασης.

Στα κύτταρα που ακτινοβολήθηκαν για 100 και 120 δευτερόλεπτα και βγήκαν μετά από 30 λεπτά από τον κλίβανο επώασης, παρατηρήθηκαν μόνο 2 πυρήνες με πολλές εστίες. Τα κύτταρα που ακτινοβολήθηκαν για τους ίδιους χρόνους αλλά παρέμειναν στον κλίβανο για 1 ώρα, παρουσίασαν 1 πυρήνα με πολλές εστίες.

Τα κύτταρα που δεν ακτινοβολήθηκαν (εικόνα 5.4 ) παρουσιάζουν ομοιότητα με εκείνα που ακτινοβολήθηκαν για διάφορες χρονικές περιόδους. Ακόμη, παρουσιάζουν φαινομενικά θετικά αποτελέσματα, όμοια με τις ομάδες 100 και 120 δευτερολέπτων.

Κύτταρα όπως αυτά των εικόνων 5.8 (αριστερά) και 5.12 (δεξιά) βρίσκονται κατά τη διαδικασία της απόπτωσης ή της μίτωσης και κατά συνέπεια δεν λαμβάνονται υπόψιν στο πείραμα αυτό.

Τα κύτταρα παρατηρήθηκαν κατά τμήματα μέσω του μικροσκοπίου και υπολογίστηκε προσεγγιστικά με το μάτι το ποσοστό των πυρήνων που παρουσίαζαν εστίες για κάθε ομάδα.

### **1s**

-30': 20% των πυρήνων παρουσιάζουν 1-2 εστίες

-60': 20% των πυρήνων παρουσιάζουν 1-2 εστίες

### **20s**

-30': 50-60% των πυρήνων παρουσιάζουν 1-2 εστίες

-60': 40-50% των πυρήνων παρουσιάζουν 1-2 εστίες

### **40s**

-30': 50-60% των πυρήνων παρουσιάζουν 1-2 εστίες

-60': 40-50% των πυρήνων παρουσιάζουν 1-2 εστίες

### **60s**

-30': 50-60% των πυρήνων παρουσιάζουν 1-2 εστίες, παρατηρήθηκε μικρός αριθμός πυρήνων με 3 εστίες

-60': 50-60% των πυρήνων παρουσιάζουν 1-2 εστίες, παρατηρήθηκε μικρός αριθμός πυρήνων με 3 εστίες

### **80s**

-30': 60-70% των πυρήνων παρουσιάζουν 1-3 εστίες

-60': 60-70% των πυρήνων παρουσιάζουν 1-3 εστίες

### **100s**

-30': 60-70% των πυρήνων παρουσιάζουν 1-3 εστίες, παρατηρήθηκε μικρός αριθμός πυρήνων με 4 εστίες

-60': 60-70% των πυρήνων παρουσιάζουν 1-3 εστίες, παρατηρήθηκε μικρός αριθμός πυρήνων με 4 εστίες

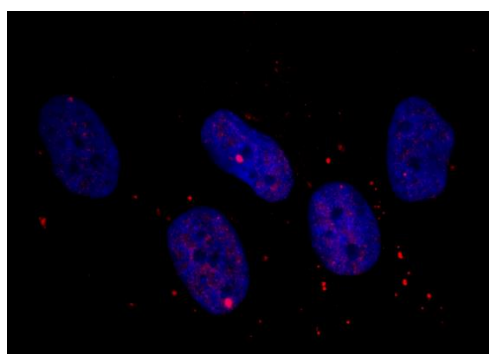
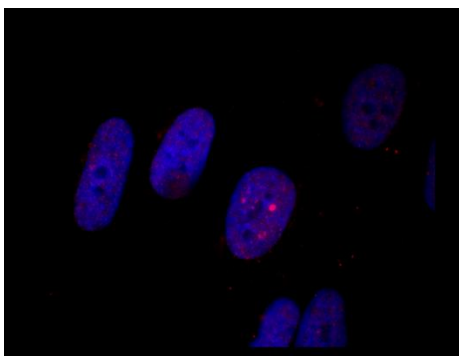
## 120s

-30': 60-70% των πυρήνων παρουσιάζουν 1-3 εστίες, παρατηρήθηκε μικρός αριθμός πυρήνων με 4 εστίες

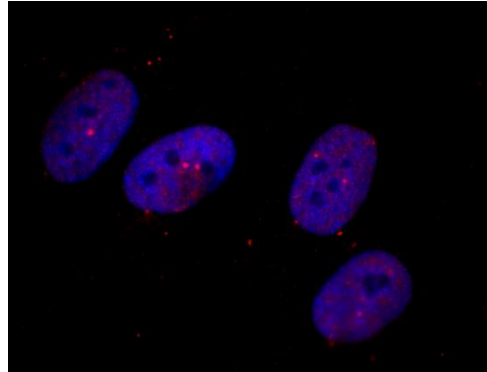
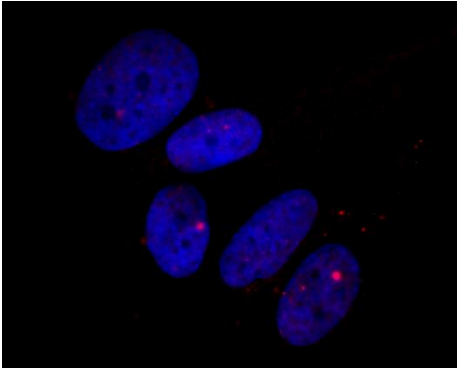
-60': 60-70% των πυρήνων παρουσιάζουν 1-3 εστίες

### 5.2.2 Δεύτερη παρατήρηση των κυττάρων και καταμέτρηση εστιών

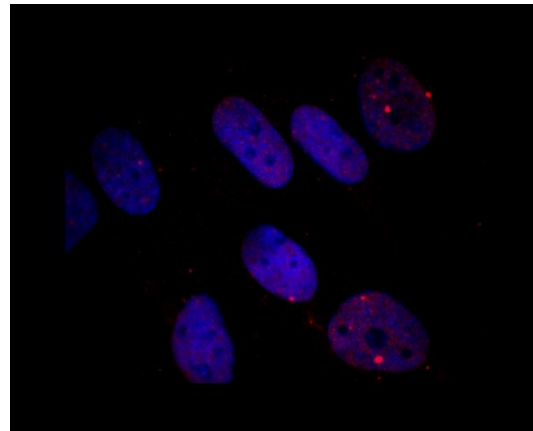
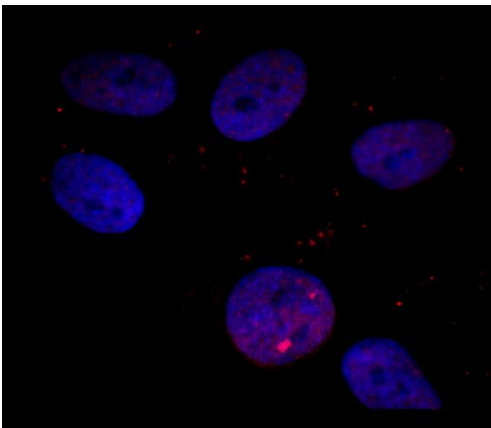
Καθώς έχει πραγματοποιηθεί μονιμοποίηση, τα κύτταρα μπορεί να παρατηρηθούν μετά τις πάροδο ακόμα και μερικών μηνών, δίχως αλλαγές της κατάστασης στην οποία βρίσκονταν όταν μονιμοποιήθηκαν. Μερικές ημέρες μετά την πρώτη παρατήρηση, οι ινοβλάστες μελετήθηκαν εκτενέστερα στο Εργαστήριο Υγειοφυσικής και Περιβαλλοντικής Υγείας, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος». Από κάθε ομάδα, λήφθηκε ένα τυχαίο δείγμα 100 πυρήνων και καταγράφηκε ο αριθμός των ορατών εστιών (στον πίνακα 5.1 σημειώνεται ο μέσος αριθμός ορατών εστιών ανά πυρήνα). Η μέτρηση των εστιών έγινε δίχως τη βοήθεια λογισμικού και τα αποτελέσματα καταγράφηκαν στο excel. Χρησιμοποιήθηκε ελαιοκαταδυτικός φακός 100x, του μικροσκοπίου επιφθορισμού AxioPLAN 2, Carl Zeiss. Η παρατήρηση και λήψη των εικόνων έγινε με το λογισμικό ISIS (Metasystems). Οι εστίες που παρατηρούνται εκτός των πυρήνων οφείλονται πιθανώς σε κάποια μόλυνση καθώς και στο γεγονός ότι θραύσεις του DNA συμβαίνουν και φυσικά, ανεξάρτητα από τη διαδικασία ακτινοβόλησης. Κατά την καταμέτρηση των εστιών τα αποπτωτικά και τα μιτωτικά κύτταρα δεν λήφθηκαν υπόψιν για την εξαγωγή συμπερασμάτων. Απορρίπτονται δηλαδή οι μεγάλοι πυρήνες (είναι μιτωτικοί, ετοιμάζονται να διαιρεθούν). Κατά την καταμέτρηση υπήρξε προσοχή έτσι ώστε οι πυρήνες των οποίων οι εστίες μετρήθηκαν να έχουν όλοι περίπου το ίδιο μέγεθος.



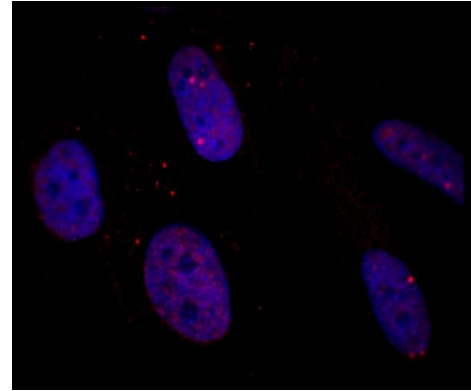
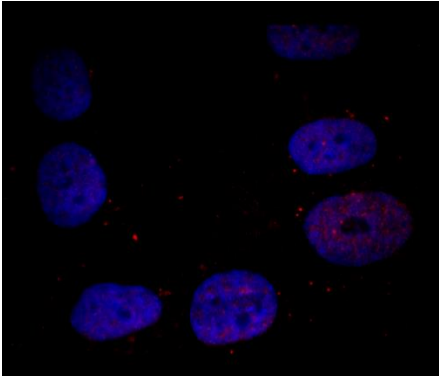
*Εικόνα 5.13* Κύτταρα που δεν ακτινοβολήθηκαν (negative controls). Έμειναν 30' (αριστερά) και 1 ώρα (δεξιά) στον κλίβανο



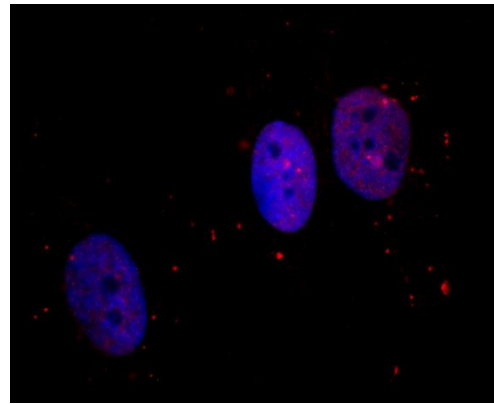
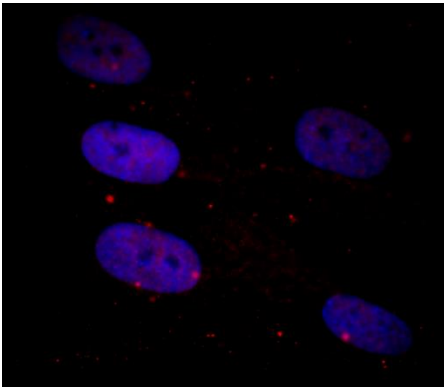
*Εικόνα 5.14* Κύτταρα που ακτινοβολήθηκαν για 1 δευτερόλεπτο. Έμειναν 30' (αριστερά) και 1 ώρα (δεξιά) στον κλίβανο



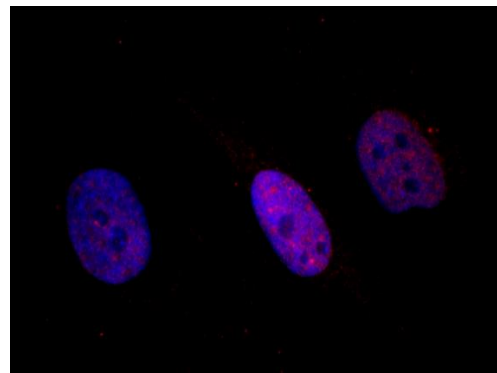
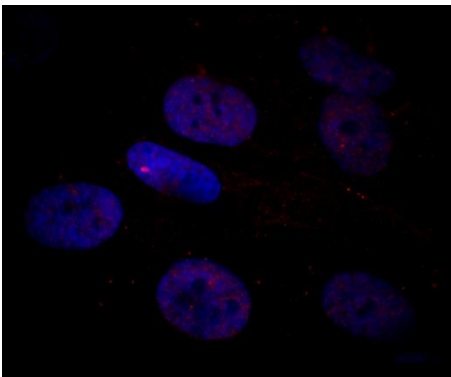
*Εικόνα 5.15* Κύτταρα που ακτινοβολήθηκαν για 20 δευτερόλεπτα. Έμειναν 30' (αριστερά) και 1 ώρα (δεξιά) στον κλίβανο



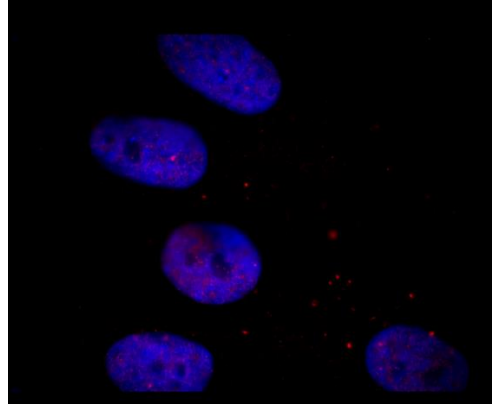
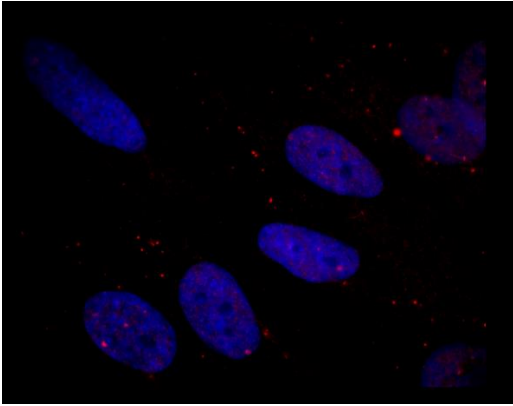
*Εικόνα 5.16* Κύτταρα που ακτινοβολήθηκαν για 40 δευτερόλεπτα. Έμειναν 30' (αριστερά) και 1 ώρα (δεξιά) στον κλίβανο



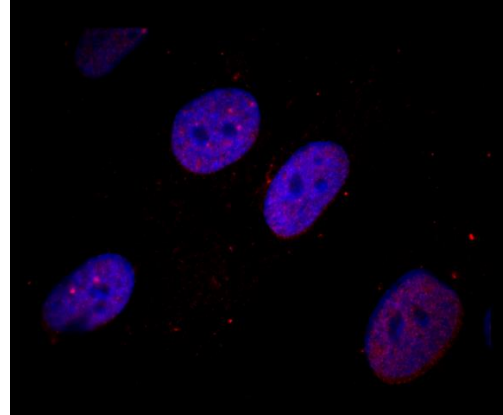
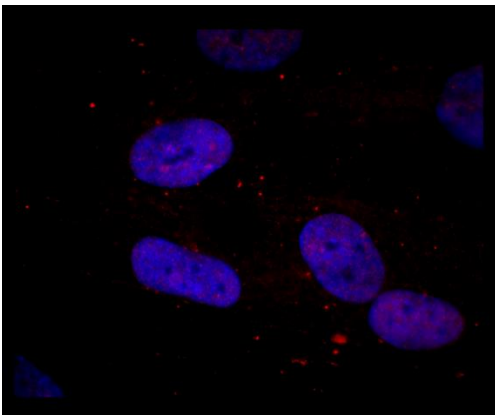
*Εικόνα 5.17* Κύτταρα που ακτινοβολήθηκαν για 60 δευτερόλεπτα. Έμειναν 30' (αριστερά) και 1 ώρα (δεξιά) στον κλίβανο



*Εικόνα 5.18* Κύτταρα που ακτινοβολήθηκαν για 80 δευτερόλεπτα. Έμειναν 30' (αριστερά) και 1 ώρα (δεξιά) στον κλίβανο



*Εικόνα 5.19* Κύτταρα που ακτινοβολήθηκαν για 100 δευτερόλεπτα. Έμειναν 30' (αριστερά) και 1 ώρα (δεξιά) στον κλίβανο



*Εικόνα 5.20* Κύτταρα που ακτινοβολήθηκαν για 120 δευτερόλεπτα. Έμειναν 30' (αριστερά) και 1 ώρα (δεξιά) στον κλίβανο

Τα αποτελέσματα που συλλέχθηκαν μετά την παρατήρηση στο μικροσκόπιο παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 5.1. Ακόμη, υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση της μέσης τιμής του αριθμού των εστιών για κάθε ομάδα κυττάρων, μέσω του τύπου:

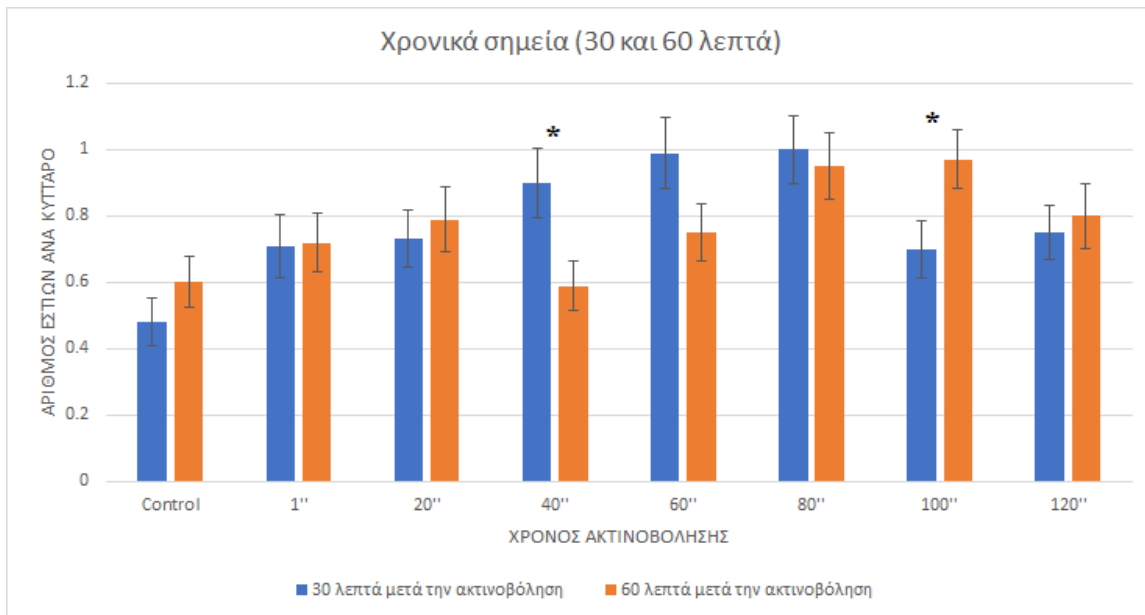
$$\sigma_{\mu} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n(n-1)}} = \frac{1}{\sqrt{n}} \sigma$$

Όπου  $n = 100$ , είναι ο αριθμός των μετρήσεων,  $\bar{x}$  είναι η μέση τιμή των μετρήσεων και  $\sigma$  είναι η τυπική απόκλιση της μιας μέτρησης [63].

Χρόνος ακτινοβολήσεως	30 λεπτά μετά την ακτινοβολήση		60 λεπτά μετά την ακτινοβολήση		Πυκνότητα Ενέργειας ( $J/cm^2$ )
	Εστίες ανα κύτταρο	Τυπική απόκλιση	Εστίες ανα κύτταρο	Τυπική απόκλιση	
Control	0,48	0,07	0,6	0,08	0
1"	0,71	0,09	0,72	0,09	0,86
20"	0,73	0,09	0,79	0,10	17,11
40"	0,9	0,10	0,59	0,08	34,21
60"	0,99	0,11	0,75	0,09	51,32
80"	1	0,10	0,95	0,10	68,42
100"	0,7	0,09	0,97	0,09	85,53
120"	0,75	0,08	0,8	0,10	102,64

*Πίνακας 5.1 Πειραματικά αποτελέσματα για τον αριθμό των εστιών ανά κύτταρο σε 2 χρονικά σημεία (30 και 60 λεπτά μετά την ακτινοβολήση). Συμπεριλαμβάνονται ινοβλάστες που δεν ακτινοβολήθηκαν και ινοβλάστες που ακτινοβολήθηκαν για διάφορους χρόνους.*

Από τα δεδομένα κατασκευάστηκε το διάγραμμα 5.1. Στο διάγραμμα αυτό παρατηρείται για τα δύο χρονικά σημεία μετά την ακτινοβολήση (30 και 60 λεπτών), ο μέσος αριθμός των εστιών ανά κύτταρο, για κάθε χρόνο ακτινοβολήσεως 1, 20, 40, 60, 80, 100 και 120 δευτερολέπτων.



**Διάγραμμα 5.1** Σύγκριση του αριθμού των εστιών μεταξύ των 2 χρονικών σημείων, 30 και 60 λεπτών, για κάθε χρόνο ακτινοβολήσης των ινοβλαστών.

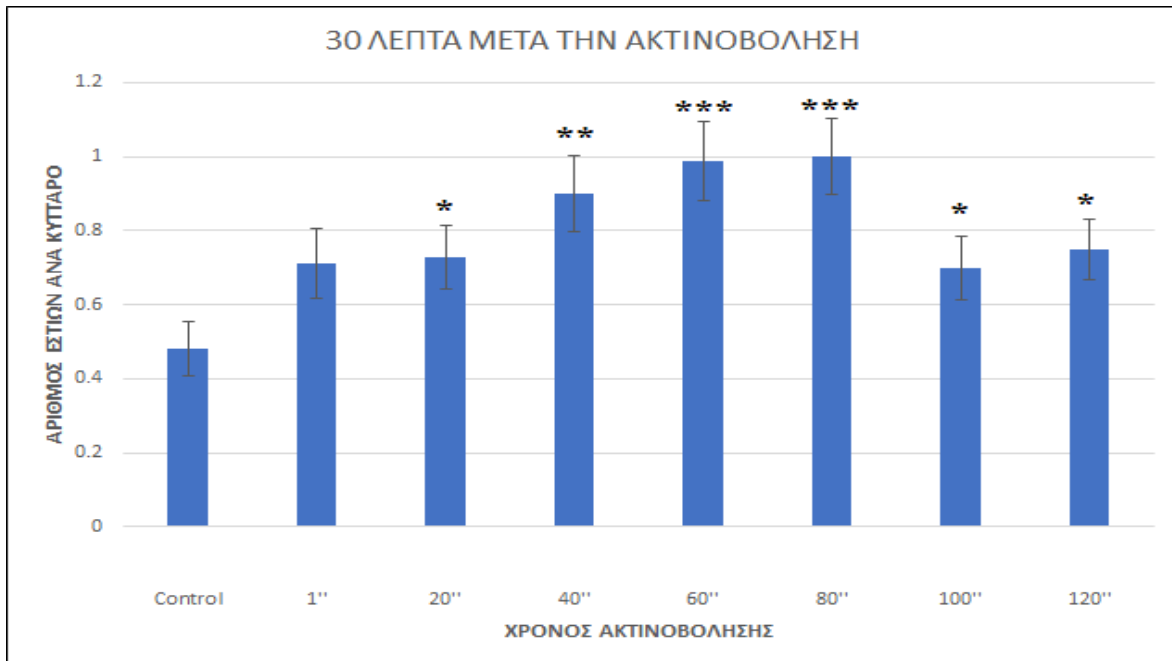
Οι τιμές που υπολογίστηκαν για τον αριθμό των εστιών συναρτήσεως του χρόνου ακτινοβολήσεως παρουσιάζει αξιοσημείωτες αποκλίσεις για τους χρόνους ακτινοβολήσεως 40 και 100 δευτερόλεπτων. Μεταξύ των δύο χρονικών σημείων, για κάθε ομάδα ακτινοβολήσεως, πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος f-test και ο έλεγχος student's t-test με το πρόγραμμα excel. Μέσω του ελέγχου f-test, εξακριβώθηκαν οι ομάδες κυττάρων που παρουσίαζαν ίδια ή διαφορετική διακύμανση στη μέση τιμή του αριθμού των εστιών. Μέσω του ελέγχου t-test, επιβεβαιώθηκε το γεγονός ότι ο μέσος αριθμός των εστιών που ακτινοβολήθηκαν για 40 και 100 δευτερόλεπτα παρουσιάζει σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο χρονικών σημείων. Τα επίπεδα σημαντικότητας είναι:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) και  $p < 0,001$  (\*\*\*). Για τα 40 δευτερόλεπτα, υπολογίστηκε  $p = 0,016$  (\*) και για τα 100 δευτερόλεπτα  $p = 0,029$  (\*)

Για τους υπόλοιπους χρόνους ακτινοβολήσεως δεν εντοπίστηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές. Φαίνεται λοιπόν πως ο χρόνος επώασης των κυττάρων στον κλίβανο επώασης (37°C) μετά την ακτινοβολήση (30 και 60 λεπτά) δεν παίζει σημαντικό ρόλο στην επιδιόρθωση τυχόν βλαβών καθώς δεν παρατηρούνται αξιοσημείωτες διαφορές στα αποτελέσματα.



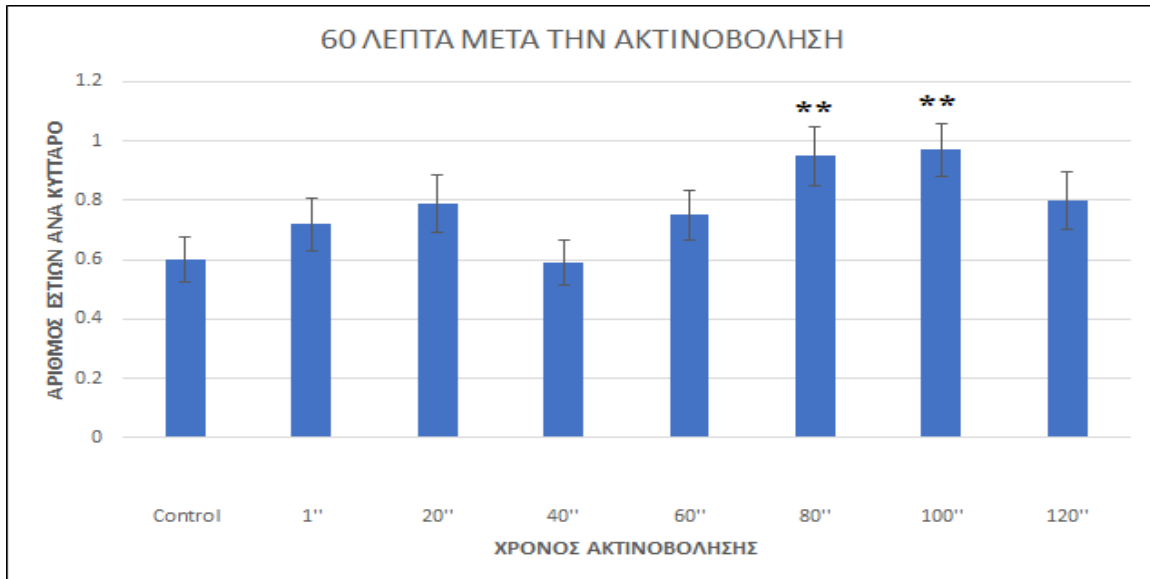
Προκειμένου να εντοπισθούν τυχόν διαφορές μεταξύ των κυττάρων που δεν ακτινοβολήθηκαν και αυτών που ακτινοβολήθηκαν, σχεδιάστηκαν τα διαγράμματα 5.2 και 5.3. Για τα κύτταρα που παρέμειναν 30 λεπτά στον κλίβανο, παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των μη ακτινοβολημένων και εκείνων που ακτινοβολήθηκαν για 60 ( $p=0,0001$ ) και 80 δευτερόλεπτα ( $p=0,00004$ ). Για τα κύτταρα που μονιμοποιήθηκαν 60 λεπτά μετά, παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των κυττάρων που δεν δέχτηκαν ακτινοβολία και εκείνων που ακτινοβολήθηκαν για 80 ( $p=0,0059$ ) και 100 ( $p=00017$ ) δευτερόλεπτα.

Συνδυάζοντας τα δεδομένα των διαγραμμάτων 5.2 και 5.3 παρατηρούνται στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των κυττάρων που ακτινοβολήθηκαν για 80 δευτερόλεπτα και αυτών που δεν ακτινοβολήθηκαν καθόλου (negative control). Οι διαφορές αυτές είναι εμφανείς και για τα δύο χρονικά σημεία μετά την ακτινοβολήση (30 και 60 λεπτά). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν πως για τον συγκεκριμένο χρόνο ακτινοβολήσης εμφανίζεται ελαφρώς πιο έντονο βιολογικό αποτέλεσμα.



**Διάγραμμα 5.2** Σύγκριση μέτρησης αριθμού εστιών ανά κύτταρο μέσω μικροσκοπίου τη χρονική στιγμή 30 λεπτών μετά την ακτινοβολήση. Εμφανίζονται στατιστικώς σημαντικές

διαφορές μεταξύ του control στις ομάδες κυττάρων που ακτινοβολήθηκαν για 60 και 80 δευτερόλεπτα ( $p=0,0001$  και  $p=0,00004$  αντίστοιχα)



**Διάγραμμα 5.3** Σύγκριση μέτρησης αριθμού εστιών ανά κύτταρο μέσω μικροσκοπίου τη χρονική στιγμή 60 λεπτών μετά την ακτινοβολήση. Εμφανίζονται στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ του control στις ομάδες κυττάρων που ακτινοβολήθηκαν για 80 και 100 δευτερόλεπτα ( $p=0,0059$  και  $p=0,0017$  αντίστοιχα)

### 5.3 Σύγκριση των δυο πειραμάτων

Καθώς δεν πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση και στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων του πρώτου πειράματος, η απευθείας σύγκριση παρουσιάζει δυσκολίες. Και στα δυο πειράματα παρατηρήθηκε μικρός αριθμός εστιών ανά πυρήνα, σε σύγκριση με τα συνήθη αποτελέσματα της ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Κατά την παρατήρηση των κυττάρων του πρώτου πειράματος, παρουσιάστηκε μικρός αριθμός πυρήνων με υψηλό αριθμός εστιών στη θέση #12. Τα κύτταρα αυτά ακτινοβολήθηκαν για 45 δευτερόλεπτα και έλαβαν συνολική ενέργεια  $59,53 \text{ J/cm}^2$ . Στο δεύτερο πείραμα, τα κύτταρα που παρουσίασαν την μεγαλύτερη απόκλιση από τα μη ακτινοβολημένα, ήταν αυτά που ακτινοβολήθηκαν για 80 δευτερόλεπτα και έλαβαν συνολική ενέργεια  $68,42 \text{ J/cm}^2$ . Απόκλιση από τα μη ακτινοβολημένα κύτταρα παρατηρήθηκε και στους ινοβλάστες που ακτινοβολήθηκαν για 60 δευτερόλεπτα και έλαβαν συνολική ενέργεια  $51,32 \text{ J/cm}^2$ . Παρά τη διαφορά στο χρόνο

ακτινοβόλησης, λόγω της αλλαγής των διαστάσεων της δέσμης μεταξύ των δύο πειραμάτων, παρατηρείται σχετικά κοντινή συνολική ενέργεια ακτινοβόλησης.

#### 5.4 Μελλοντικές βελτιώσεις

- Σε μελλοντικά πειράματα κρίνεται απαραίτητη η χρήση ηλεκτρονικού κλείστρου προκειμένου να διαχωριστεί η κάθε δόση ακτινοβολίας με μεγαλύτερη ακρίβεια απ' ό,τι με το χέρι και να δοκιμαστούν χρόνοι ακτινοβόλησης μικρότερης τάξης από αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν πείραμα.
- Επίσης κρίνεται απαραίτητη η κατά το δυνατόν πιστή αντιγραφή των συνθηκών των πειραμάτων που αναγράφονται στην βιβλιογραφία, συμπεριλαμβανομένων πειραμάτων με σημαντικά μικρότερη επιφάνεια ακτινοβόλησης, προκειμένου να επιβεβαιωθούν ή να απορριφθούν τα αναμενόμενα αποτελέσματα.
- Ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται κατά τη μετακίνηση των καλυπτρίδων καθώς υπάρχει η πιθανότητα να σπάσουν. Κατά την εκτέλεση του πρώτου πειράματος παρουσιάστηκε δυσκολία κατά την αφαίρεση των καλυπτρίδων από το τρυβλίο με χρήση τσιμπήδας. Συνιστάται να βρεθούν διαφορετικοί τρόποι μετακίνησης των καλυπτρίδων ή η χρήση διαφορετικής πλάκας καλλιέργειας
- Υπάρχει ανάγκη για επανάληψη των πειραμάτων συμπεριλαμβάνοντας αντίγραφα (duplicates) προκειμένου να περιοριστεί ο παράγοντας της τύχης.
- Η μέθοδος ανίχνευσης των εστιών  $\gamma$ -H2AX παρουσιάζει υψηλή ακρίβεια για την ανίχνευση δίκλωνων θραύσεων στο DNA. Όμως κατά την καταμέτρηση των εστιών ενδέχεται να υπάρχουν ανακρίβειες. Για αυτό το λόγο, έναντι της χειρωνακτικής καταμέτρησης προτείνεται στο μέλλον να πραγματοποιείται καταμέτρηση μέσω προγράμματος ή λογισμικού. Έτσι επιτυγχάνεται μεγαλύτερη ακρίβεια και εξοικονόμηση χρόνου.

## 5.5 Συμπεράσματα

Η μέθοδος επαγωγής βλαβών στο DNA με τη χρήση μη-ιοντίζουσας ακτινοβολίας laser, αποτελεί μια μέθοδο με μεικτά θετικά και αρνητικά αποτελέσματα. Βάσει μελετών έχει παρατηρηθεί σχηματισμός βλαβών ως αποτέλεσμα μονο-φωτονικής ή πολύ-φωτονικής απορρόφησης καθώς και λόγω της δημιουργίας πλάσματος (ελεύθερων ηλεκτρονίων). Επιθυμητά αποτελέσματα για μελέτη των μηχανισμών επαγωγής βλαβών στο DNA έχουν παρατηρηθεί με τη χρήση laser που εκπέμπουν στο υπεριώδες, συνήθως με την προσθήκη φωτοευαισθητοποιητών. Με τη χρήση laser υπερβραχέων παλμών, όπως το Ti:Sapphire, έχουν παρατηρηθεί σε κάποιες έρευνες σύνθετες βλάβες στο DNA λόγω φαινομένων πολύ-φωτονικής απορρόφησης, κυρίως με έμμεσο σχηματισμό τοξικών ενώσεων. Σε κάποιες έρευνες όμως παρατηρήθηκαν μη επιθυμητά θερμικά αποτελέσματα, τα οποία ενώ μπορούν να περιοριστούν μεταβάλλοντας τον χρόνο ακτινοβολήσης ή την διάμετρο της δέσμης, δεν παύουν να αποτελούν ένα μόνιμο κίνδυνο κατά την χρήση ακτινοβολίας laser. Επομένως κρίνεται αναγκαία η επανάληψη παρόμοιων πειραμάτων και η ακριβής καταγραφή των χαρακτηριστικών στοιχείων της διάταξης laser που χρησιμοποιείται καθώς και οι συνθήκες ακτινοβολήσης. Οι μέθοδοι ακτινοβολήσης κυττάρων με μη-ιοντίζουσα ακτινοβολία laser ενδέχεται να διευκολύνουν στο μέλλον την προσπάθεια κατανόησης των μηχανισμών αναγνώρισης και επιδιόρθωσης βλαβών στο DNA των κυττάρων.

Τα αποτελέσματα του δεύτερου πειράματος δείχνουν ότι ο διαφορετικός χρόνος επώασης στον κλίβανο επώασης δεν επηρέασε τη χρονική εξέλιξη των επιδιορθωτικών μηχανισμών. Ακόμη, η εμφάνιση κορυφών και στη συνέχεια η απότομη πτώση του αριθμού των εστιών που παρατηρούνται στα διαγράμματα 5.1 - 5.3, δεν είναι αναμενόμενο αποτέλεσμα. Το γεγονός ότι εμφανίζονται τέτοιου είδους αποκλίσεις, σε συνδυασμό με τον πολύ χαμηλό αριθμό εστιών (~1 εστία/πυρήνα) και το μικρό μέγεθος του δείγματος (100 πυρήνες/καλυπτρίδα), οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οφείλονται στο σφάλμα των μετρήσεων. Κατά συνέπεια, η ελαφρώς πιο έντονη βιολογική δραστηριότητα που παρατηρήθηκε στα κύτταρα που ακτινοβολήθηκαν για 80 δευτερόλεπτα δεν μπορεί να θεωρηθεί αρκετή για την υπόθεση πρόκλησης δίκλωνων θραύσεων του DNA των ινοβλαστών.

Καθώς το πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκε υπό διαφορετικές συνθήκες σε σχέση με την βιβλιογραφία, δεν είναι εύκολο να πραγματοποιηθεί απευθείας σύγκριση με προηγούμενα

βιβλιογραφικά αποτελέσματα. Η μέγιστη πυκνότητας ισχύος υπολογίσθηκε  $0,32 \times 10^6$  W/cm<sup>2</sup> και  $0,21 \times 10^6$  W/cm<sup>2</sup> στο πρώτο και στο δεύτερο πείραμα αντίστοιχα, αρκετές τάξεις μεγέθους χαμηλότερη των  $10^9$ - $10^{12}$  W/cm<sup>2</sup> που έχουν μετρηθεί σε έρευνες.

Καθώς στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε μόνο η μέθοδος ευαίσθητων εστιών γ-H2AX για την ανίχνευση δίκλωνων θραύσεων στο DNA, πιθανώς εάν είχε πραγματοποιηθεί και άλλη μέθοδος ανίχνευσης βλαβών να ήταν δυνατή η παρατήρηση διαφορετικών ειδών βλάβης στο DNA των ινοβλαστών.

# Βιβλιογραφία

- [1] B. Alberts, et al, *Essential Cell Biology, third edition*. Garland Science: p. 1-4, 16-17, 58, 179, 609-611 (2009)
- [2] B. Alberts, et al, *Molecular Biology Of The Cell, fifth edition*. Garland Science p. 1, 195, 1055 (2007)
- [3] O. Connor, et al, *Essentials of Cell Biology*. Cambridge, MA: NPG Education: p. 5-10, 28-29 (2010)
- [4] G. Cooper, et al, *The Cell: A Molecular Approach, first edition*. ASM Press. P. 175, 315-326, 562-564 (1997)
- [5] Watson, J., *Molecular biology of the gene*. 7th ed. Boston: Benjamin-Cummings Publishing Company. P. 77-79 (2014)
- [6] L.A. Allison, *Fundamental Molecular Biology*. Blackwell publishing p. 13, 37-40 (2007)
- [7] P. McAnena, J. Brown and M. Kerin. *Circulating Nucleosomes and Nucleosome Modifications as Biomarkers in Cancer*. *Cancers*, 9(12), p.1-2 (2017)
- [8] Ε. Γαζής, *Ιοντίζουσες ακτινοβολίες: Φυσική – Εφαρμογές στη Βιολογία και Ιατρική*. Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο. p. 10-16, 23-24, 60, 204 (1999)
- [9] E. Alpen, *Radiation Biophysics, second edition*. Academic Press. p. 4, 109, 113-124 (1998)
- [10] O.S. Desouky, N. Din, G. Zhou, *Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation*. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 8(2), pp.247-254. (2015)
- [11] T. Kryston, A. Georiev, P. Pissis, A.G. Georgakilas, *Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis*. *Mutation Research* 711 P. 193-201 (2011)
- [12] C. Redon, et al,  *$\gamma$ -H2AX as a biomarker of DNA damage induced by ionizing radiation in human peripheral blood lymphocytes and artificial skin*. *Adv Space Res*;43(8): 1171-1178. p. 2 (2009)

- [13] Δ. Ζευγώλης, *Εφαρμοσμένη Οπτική, με θέματα Οπτικών Ινών & Laser*, 3<sup>η</sup> έκδοση. Εκδόσεις Τζιόλα. P. 524, 574 (2017)
- [14] J. Wilson and J. Hawkes, *Optoelectronics: An introduction (Ελληνική μετάφραση Α.Α. Σεραφετινίδη)*. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Ε.Μ.Π. (2007) p. 200-202, 215, 288, 316
- [15] S.O. Kasap, *Optoelectronics and Photonics: Principles and Practices, Second Edition*. Pearson Education Limited. p. 282 (2013)
- [16] Μ. Μακροπούλου, Α. Παπαγιάννης, *Εφαρμογές Lasers στη Βιοϊατρική και το Περιβάλλον*. Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο. (2014)
- [17] M. Wollenhaupt, et al, *Femtosecond Laser Pulses: Linear Properties, Manipulation, Generation and Measurement*. Springer, NY. p. 1- (2007)
- [18] P.F. Moulton, *Spectroscopic and laser characteristic of Ti:Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>*. Opt. Soc. Am. B, vol.3 (1) (1986)
- [19] A. Liu, *Ti:Sapphire Lasers*. University of Michigan, p. 1-2 (2016)
- [20] K.F. Wall and A. Sanchez, *Titanium Sapphire Lasers*. The Lincoln Laboratory Journal, Vol. 3, No. 3 (1990)
- [21] W. Koechner, *Solid-State Laser Engineering, 6<sup>th</sup> Edition*. Springer-Verlag New York, p. 88-91 (2006)
- [22] R. Fekrazad, et al, *Laser in Orthodontics, Principles in Contemporary Orthodontics*. P.2-8 (2011)
- [23] J.A.S Carruth and A.L. Mc Kenzie, *Medical lasers, science and clinical practice*. (Ελληνική μετάφραση Α.Α. Σεραφετινίδη και Μ.Ι. Μακροπούλου). Εκδόσεις συμμετρία. P. 95-116 (1994)
- [24] C.P. Eduardo, et al, *Laser Dentistry Research. Principles and Practice of Laser Dentistry*, p. 303-314 (2011)
- [25] D.J. Goldberg, *Laser Dermatology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 37, 55 (2005)

- [26] R. Paschotta, *Encyclopedia of Laser Physics and Technology*, 1<sup>st</sup> edition. Wiley-VCH Berlin (2008)
- [27] E. Ferrando-May, et al, *Highlighting the DNA damage response with ultrashort laser pulses in the near infrared and kinetic modeling*. Frontier in genetics Vol 4 Article 135 (2013)
- [28] O. Svelto, *Principles of Lasers, second edition*. (Ελληνική μετάφραση Γ.Α. Κουρκουλή και Α.Α. Σεραφετινίδη). Εκδόσεις συμμετρία. P. 306 (1986)
- [29] M.W. Berns, R.S. Olson and D.E. Rounds, *In vitro production of chromosomal lesions with an argon laser microbeam*. Nature 221, 74-75. (1969)
- [30] X. Kong, S. Mohanty, J. Stephens, J. Heale, V. Gomez-Godinez, L. Shi, J. Kim, K. Yokomori and M. Berns, *Comparative analysis of different laser systems to study cellular responses to DNA damage in mammalian cells*. Nucleic acids research, 37(9) P. 1-12 (2009)
- [31] N.W. Holton & J.F. Andrews, *Application of Laser Micro-irradiation for Examination of Single and Double Strand Break Repair in Mammalian Cells*. J. Vis. Exp. (127),e56265 p. 1-2, 6(2017)
- [32] V. Kodach, D.J. Faber and T.G van Leeuwen, *Wavelength swept Ti:sapphire laser*. Optics communications 281 4975-4978 p. 1-2 (2008)
- [33] D. Trautlein et al, *Specific local induction of DNA strand breaks by infrared multi-photon absorption*. Nucleic Acids Res 38(3): e14 (2010)
- [34] E.W. Leatherbarrow, et al, *Characterization of DNA damage induced by near infrared multi-photon absorption*. Central Laser Facility Annual Report P. 1-4 (2004/2005)
- [35] Α.Ι Στρατηγός και Χ. Αντωνίου, *Οι φωτοχημικές βλάβες του DNA και ο ρόλος τους στις βιολογικές επιδράσεις της υπεριώδους ακτινοβολίας στο δέρμα*. Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής 19(2):141-145 (2002)



- [36] P.E. Hockberger et al, *Activation of flavin-containing oxidases underlies light-induced production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in mammalian cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 96, p. 6255-6260 (1999)
- [37] R. Greinert, B. Volkmer, S. Henning, E.W. Breitbart, K.O. Greulich, M.C. Cardoso & A. Rapp, *UVA-induced DNA double-strand breaks result from the repair of clustered oxidative DNA damages*. Nucleic Acids Research Vol. 40, No. 20 10263-10273 (2012)
- [38] M. Tampere and O. Mortusewicz, *DNA Damage Induction by Laser Microirradiation*. Bio-protocol Vol 6 Iss 23 (2016)
- [39] P.O. Mari, et al, *Dynamic assembly of end joining complexes requires interaction between Ku70/80 and XRCC4*. PNAS Vol 103 (49) (2006)
- [40] A. Vogel, J. Noack, G. Hüttman and G. Paltauf. *Mechanisms of femtosecond laser nanosurgery of cells and tissues*. Applied Physics B, 81(8), pp.1015-1047. (2005)
- [41] V.K. Meader, M.G. John, L.M.F. Batista, S. Ahsan and K.M. Tibbetts, *Radical Chemistry in a Femtosecond Laser Plasma: Photochemical Reduction of Ag<sup>+</sup> in Liquid Ammonia Solution*. Molecules, 23(3): 532 (2018)
- [42] J. A. Dharmadhikari et al, *Optical control of filamentation-induced damage to DNA by intense, ultrashort, near-infrared laser pulses*. Scientific Reports (2016)
- [43] M. Daddysman and C. Fecko. *DNA Multiphoton Absorption Generates Localized Damage for Studying Repair Dynamics in Live Cells*. Biophysical Journal, 101(9), P. 2294-2303. (2011)
- [44] C. Dinant, M. Jager, J. Essers, W.A.v. Cappellen, R. Kanaar, A.B. Houtsmuller & W. Vermeulen, *Activation of multiple DNA repair pathways by sub-nuclear damage induction methods*. Journal of Cell Science 120, 2731-2740 (2007)
- [45] M. Liangruksa & S. Wongwiset, *An elastic model of DNA under thermal induced stress*, Math Biosci, 300:47-54 (2018)
- [46] A. Georgakilas. *Oxidative stress, DNA damage and repair in carcinogenesis: Have we established a connection?* Cancer Letters, 327(1-2), P.3-4. (2012)

- [47] A.J. Hartlerode, R. Scully, *Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells*. Biochem J 423:157-168 (2009)
- [48] S. Ahrabi, et al, *A role for human homologous recombination factors in suppressing microhomology-mediated end joining*. Nucleic Acids Res. Vol. 44, No. 12, p. 5743-5757 (2016)
- [49] R. Bhargavam, DO. Onyango & JM. Stark, *Regulation of Single-Strand Annealing and its Role in Genome Maintenance*. Trends Genet. 32(9), p. 566-575 (2016)
- [50] M. Takata, et al, *Homologous recombination and non-homologous recombination end joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells*. EMBO J, 17:p. 5497-5508 (1998)
- [51] A.J. Davis & D.J. Chen, *DNA double strand break repair via non-homologous end-joining*. Transl Cancer Res. 2(3): 130-143 (2013)
- [52] P.A. Jeggo and M.F. Lavin, *Cellular radiosensitivity: How much better do we understand it?* International Journal of Radiation Biology 85(12):1061-1081 (2009)
- [53] OA. Sedelnikova, et al, *Delayed kinetics of DNA double-strand break processing in normal and pathological aging*. Aging Cell 7, p. 89-100 (2008)
- [54] ER. Foster and JA. Downs, *Histone H2A phosphorylation in DNA double-strand break repair*. FEBS J, jul;272(13):3231-40 p. 3231-40 (2005)
- [55] E.P. Rogakou et al, *Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo*. J. Cell Biology 146 P. 905-916 (1999)
- [56] M.P. Svetlova, et al, *Mechanism of elimination of phosphorylated histone H2AX from chromatin after repair of DNA double-strand breaks*. Mutation research 685 54-60 (2010)
- [57] K. Rothkamm, M. Lobrich, *Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses*. Proc Natl Acad Sci USA. 100(9): P. 5057-5062 (2003)

- [58] T. Kato, et al, *Comparison of the induction and disappearance of DNA double strand breaks and  $\gamma$ -H2AX foci after irradiation of chromosomes in G1 phase or in condensed metaphase cells*. Mutation Research 639 108-112. p. 3 (2008)
- [59] A. Celeste, et al, *Genomic instability in Mice Lacking Histone H2AX*. Science 296(5569): P. 922-927 (2002)
- [60] P. Gibbon, E. Forster, *Short-pulse laser - plasma interactions*. Plasm.Phys and Contr. Fus.**38**: P.769-793, (1999)
- [61] M. Sergeev, S. Constantino and P.W. Wiseman, *Measurements of Monomer-Oligomer Distributions via Fluorescence Moment Image Analysis*. Biophysical Journal Vol. 91 (3884-389) p. 5 (2006)
- [62] MC Jamur, C. Oliver, *Permeabilization of cell membranes*. Methods Mol Biol.588:63-6, (2010)
- [63] E. Αναστασάκης, Β. Πέογλος, et. ΑΙ, *Εργαστηριακές Ασκήσεις Φυσικής, Τόμος Ι, Β' Έκδοση Βελτιωμένη*. Εκδόσεις Συμμετρία,. p. 22 (2010)