



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΓΕΩΡΓΙΑ ΝΤΑΝΑ

**«Πειραματική Μελέτη Ακτινευαίσθητοποίησης Κυττάρων με Χρήση
Νανοσωματιδίων Χρυσού»
(Experimental Study of Cell Radiosensitization Using Gold
Nanoparticles)**

**Ακαδημαϊκή επιβλέπουσα: ΜΑΚΡΟΠΟΥΛΟΥ-ΛΟΥΚΟΓΙΑΝΝΑΚΗ ΜΥΡΣΙΝΗ,
Ομότιμη Καθηγήτρια ΕΜΠ
Επιστημονική επίβλεψη: Δρ. Ελλάς Σπυράτου, Διδάσκουσα του Ν. 407 - ΣΕΜΦΕ**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Μακροπούλου Μυρσίνη, Ομότιμη Καθηγήτρια ΕΜΠ
2. Γεωργακίλας Αλέξανδρος, Καθηγητής ΕΜΠ
3. Ευσταθόπουλος Ευστάθιος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

**ΑΘΗΝΑ, ΙΟΥΛΙΟΣ 2022
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα διπλωματική εργασία υλοποιήθηκε κατά το διάστημα μεταξύ Μαΐου του 2021 και Ιουνίου 2022, σε μια δύσκολη χρονιά λόγω του COVID-19. Είναι πάσης φύσεως γνωστό πως η εκπόνηση μιας διπλωματικής εργασίας είναι ένα εγχείρημα που απαιτεί ιδιαίτερη επιμονή και υπομονή αλλά και αφοσίωση, συστηματική ενασχόληση, αλλά πάνω από όλα σωστή καθοδήγηση. Ως την ελάχιστη δυνατή μνεία, οφείλω να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε ανθρώπους οι οποίοι συνέβαλλαν και συμπαραστάθηκαν σε εμένα (έμπρακτα ή μη) και των οποίων οι πολύτιμες και καθοριστικές οδηγίες και συμβουλές οδήγησαν στην περάτωση της διπλωματικής εργασίας αλλά και των πτυχιακών σπουδών μου.

Καταρχάς, οφείλω να ευχαριστήσω δεόντως την ομότιμη καθηγήτρια του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, κυρία Μακροπούλου-Λουκογιαννάκη. Παρόλο που το ενδιαφέρον μου στον τομέα της Ιατρικής Φυσικής μεγάλωνε χρόνο με τον χρόνο, μέσω των μαθημάτων αλλά και της διδασκαλίας της μου δόθηκε η δυνατότητα να εμβαθύνω σε αυτόν τον τόσο ελκυστικό κλάδο. Οφείλω λοιπόν, να την ευχαριστήσω υπέρ του δέοντος για την συνεργασία που αναπτύξαμε, τις γνώσεις που μου μεταλαμπαδεύσε αλλά και για τις πολύτιμες συμβουλές, διορθώσεις και την οργάνωση του περιεχομένου στο σύνολο της διπλωματικής εργασίας.

Επειτα, θα ήθελα να ευχαριστήσω εκ των προτέρων τον κύριο Γεωργακίλα Αλέξανδρο, μέλος τις τριμελούς επιτροπής εξέτασης της διπλωματικής εργασίας, ο οποίος με τις γνώσεις του στο χειρισμό των νανοσωματιδίων αλλά και των κυττάρων βοήθησε σημαντικά στην εκπόνηση της παρούσας εργασίας. Παράλληλα, οφείλω να ευχαριστήσω και τον κύριο Ευσταθόπουλο Ευστάθιο, μέλος της τριμελούς επιτροπής εξέτασης της διπλωματικής εργασίας, ο οποίος ήταν καταλυτικός παράγοντας στον τομέα της δοσιμετρίας στην ακτινοθεραπεία.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την μεταδιδασκτορική ερευνήτρια κυρία Σπυράτου Ελλάς, η οποία με τις γνώσεις της βοήθησε στην εκπόνηση αυτής της διπλωματικής εργασίας. Η άμεση ανταπόκριση της σε οποιοδήποτε προβληματισμό μου και το αμέριστο ενδιαφέρον της ήταν καθοριστικά για την υλοποίηση αυτής της εργασίας. Ακόμη, η πολύτιμη υποστήριξή της ήταν υπέρ του δέοντος σημαντική, ειδικά σε στιγμές που την χρειάστηκα.

Ευχαριστίες, ωστόσο, δεν θα μπορούσα να μην απευθύνω και στην υποψήφια διδάκτορα Φυσικό Ιατρικής Κουρή Μαρία, η οποία ήταν πάντα παρούσα σε κάθε στάδιο και βήμα. Οι παραγωγικές της υποδείξεις, η αντίληψη της επί όλων των θεμάτων αλλά και ο επιδέξιος τρόπος να επισημαίνει τα λάθη μου και τις διορθώσεις της, ήταν καταλυτικός παράγοντας για την υλοποίηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Όμως, κυρίως την ευχαριστώ γιατί μέσα από την ματιά αλλά και τις γνώσεις της, εμπλούτισε τις σκέψεις μου και διεύρυνε τους ορίζοντές μου.

Κλείνοντας, ευχαριστώ από καρδιάς τους γονείς και φίλους μου για την ηθική υποστήριξη τους, την υπομονή αλλά και την κατανόηση που έδειξαν όλο αυτό το διάστημα της εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας. Τους ευγνωμονώ που στέκονται πάντα δίπλα μου, τόσο στις επιτυχίες αλλά και τις αποτυχίες μου παρακινώντας με για τα μέγιστα δυνατά πάντα.

Ντάνα Γεωργία

.....
Γεωργία Ντάνα

© (2022) Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο. All rights Reserved. Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς το συγγραφέα. Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σ' αυτό το έγγραφο εκφράζουν το συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευτεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματεύεται την μελέτη των Ιοντιζουσών Ακτινοβολιών για τη θεραπεία του καρκίνου σε συνδυασμό με την έγχυση νανοσωματιδίων χρυσού στον καρκινικό όγκο, με σκοπό να διαπιστωθεί σε τι βαθμό τα νανοσωματίδια χρυσού ακτινοευαισθητοποιούν τα καρκινικά κύτταρα, ώστε να επέλθει ο κυτταρικός τους θάνατος. Πιο συγκεκριμένα, η παρούσα εργασία ξεκινά με μια εισαγωγή στην χρήση των νανοσωματιδίων στην Ιατρική αλλά και κάποιες συγκεκριμένες εφαρμογές τους με σκοπό την θεραπεία κυρίως καρκινικών όγκων. Εν συνεχεία, παρουσιάζονται βασικές γνώσεις σχετικά με τις Ιοντιζουσες Ακτινοβολίες, τα είδη τους, την αλληλεπίδρασή τους με την ύλη, την αλληλεπίδρασή τους με την βιολογική ύλη αλλά και τις εφαρμογές τους στην Ιατρική. Μία από αυτές τις εφαρμογές είναι και η Ακτινοθεραπεία, που όλο και περισσότεροι άνθρωποι σήμερα καταφεύγουν σε αυτήν. Για αυτόν το λόγο λοιπόν, δεν θα μπορούσαν να παραλειφθούν οι βασικές αρχές της Ακτινοθεραπείας, αλλά και ο τρόπος για την ενίσχυση της αποτελεσματικότητάς της. Επίσης, αναφέρεται η χρήση των νανοσωματιδίων χρυσού ως ακτινοευαισθητοποιητές αλλά και η φυσική της ακτινοευαισθητοποίησης. Κλείνοντας, το κεφάλαιο πραγματεύεται τους ορισμούς και τη χρήση της καμπύλης επιβίωσης και του γραμμικού τετραγωνικού μοντέλου (linear quadratic), στα οποία θα βασιστεί η μετέπειτα επεξεργασία. Το επόμενο κεφάλαιο, έχει αφιερωθεί στις μεθόδους μέτρησης του κυτταρικού θανάτου με σημαντική αναφορά στην κυτταρομετρία ροής, με την οποία και θα ασχοληθούμε στην παρούσα εργασία. Από το κεφάλαιο 4 και μετά, ο αναγνώστης έρχεται σε επαφή με το πειραματικό μέρος της παρούσας εργασίας. Για την υλοποίηση του πειραματικού μέρους, χρειάστηκε να έχουμε πρόσβαση σε Μονάδα Ακτινοθεραπείας και πράγματι η έρευνα αυτή πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο «Αττικόν». Πιο συγκεκριμένα, με τη χρήση του γραμμικού επιταχυντή VitalBeam™ του κατασκευαστικού οίκου Varian που βρίσκεται στο τμήμα Ακτινοθεραπείας στο Β' Εργαστήριο Ακτινολογίας του νοσοκομείου αλλά και με τη χρήση ενός X-ray Irradiator κατέστη εφικτή η ακτινοβόληση των καρκινικών κυττάρων SIHA για διάφορες δόσεις και με διαφορετικές ενέργειες της τάξεως των keV και των MeV. Έπειτα από την ακτινοβόληση των κυττάρων αλλά και πριν, η κυτταρική αυτή σειρά καλλιεργήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο καλλιέργειάς τους και εν συνεχεία μετρήθηκε ο κυτταρικός τους θάνατος, με την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής, σε συνεργασία με τους βιολόγους στο Β' Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής στο Αττικό Νοσοκομείο όπου και εκεί ακολούθηθηκε το αντίστοιχο πρωτόκολλο. Ακόμη, αφού πάρθηκαν τα αποτελέσματα του κυτταρικού θανάτου από την κυτταρομετρία ροής, τα δεδομένα επεξεργάστηκαν και εξήχθησαν τα ραβδογράμματα, τα οποία δείχνουν τη διαφορά του ποσοστού επιβίωσης μεταξύ πηγαδιών όπου υπάρχουν μόνο καρκινικά κύτταρα και μεταξύ πηγαδιών που έχουν καρκινικά κύτταρα και νανοσωματίδια χρυσού. Τέλος, από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων, εξήχθησαν τα γραφήματα με τις καμπύλες του ποσοστού επιβίωσης των κυττάρων συναρτήσει της δόσης που έλαβαν. Στις καμπύλες αυτές υπάρχουν η θεωρητική καμπύλη του ποσοστού επιβίωσης, τα πειραματικά σημεία για το ποσοστό επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων πηγάδι και τα σημεία της καμπύλης του ποσοστού επιβίωσης των κυττάρων που βρίσκονται μαζί με διάφορες συγκεντρώσεις νανοσωματιδίων χρυσού. Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται, υποδεικνύουν τον σημαντικό ρόλο των νανοσωματιδίων χρυσού ως ακτινοευαισθητοποιητές στη θεραπεία του καρκίνου. Αφότου τα πειράματα έλαβαν τέλος, τα αποτελέσματα παρουσιάστηκαν, σχολιάστηκαν και αξιολογήθηκαν.

ABSTRACT

This current thesis is, overall, focused on the research of Ionizing Radiation for the treatment of cancer in combination with the injection of gold nanoparticles into the cancerous tumor, in order to determine the extent to which the gold nanoparticles radiosensitize the cancer cells so that their cancer cells can die. In particular, the present essay begins with an introduction to the use of nanoparticles in Medicine as well as some specific applications for the treatment of mainly cancerous tumors. Following this introduction, fundamental knowledge is presented about Ionizing Radiations, their types, their interaction with matter, their interaction with biological matter and their applications in Medicine. One of these applications is Radiotherapy, which more and more people today resort to. For this reason, neither the principles of Radiotherapy nor the way to enhance its effectiveness could not be omitted. Also, it is necessary for the use of gold nanoparticles as radiosensitizers and the physics of radiosensitization to be mentioned. Concluding, the chapter also deals with the definitions and use of the survival curve and the linear quadratic model, on which the subsequent processing will be based. The next chapter is dedicated to the methods of measuring cell death with important reference to flow cytometry, which we will deal with in the present essay. From chapter 4 onwards, the reader meets the experimental part of the present essay. For the implementation of the experimental part, we needed to have access to the Radiotherapy Unit at the University General Hospital "Attikon". More specifically, with the use of the linear accelerator VitalBeam™ of the Varian manufacturer located in the Radiotherapy department in the 2nd Radiology Laboratory of the hospital but also with the use of an X-ray Irradiator, it was possible to irradiate the cancer cells (SIHA cells) with different doses and energies (keV and MeV). Before and after the irradiation of the cells, this cell line was cultured according to their culture protocol and then their cell death was measured, by the method of flow cytometry, in collaboration with biologists at the B Laboratory of Pathological Anatomy Hospital where the corresponding protocol was followed. Also, after obtaining the results of cell death from flow cytometry, the data were processed and bar graphs were extracted, at which is shown the difference in survival fraction between wells with only cancer cells and between wells with cancer cells and gold nanoparticles. Finally, from processing the results, the graphs with the curves of the cell survival fraction were extracted depending on the dose received. In these curves, there is the ideal curve of the survival fraction, the experimental points for the survival rate of the cells that are alone in the corresponding well and the points of the curve of the cells with the percentage of surviving gold. Finally, the results presented indicate the important role of gold nanoparticles as radiosensitizers in the treatment of cancer. After the experiments were completed, the results were presented, commented on, and evaluated.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

1. Νανοδοματίδια στην κλίμακα μεγέθους
2. Μέγεθος νανοϋλικών στη νανοδιάσταση
3. Εισαγωγή φαρμάκου σε καρκινικό όγκο
4. Μοριακή απεικόνιση και θεραπεία καρκίνου
5. In vivo φθορισμός σε ποντίκι που φέρει όγκο
6. Εντοπισμός καρκινικών κυττάρων με τη χρήση κβαντικών τελειών και υπεριάδους ακτινοβολίας
7. Νανοδοματίδια που μεταφέρουν σε οργανισμό φάρμακο και ανιχνεύουν φυσικοχημικά ερεθίσματα
8. Θεραπείας υπερθερμίας σε ποντίκι με τη χρήση laser
9. Εξάρτηση υπερθερμίας & άλλων θεραπειών
10. In vivo μελέτη της υπερθερμίας με χρήση διαφόρων παραγόντων
11. Διάγνωση και θεραπείες με υπερθερμία
12. Multilayered SPION
13. Φωτοθερμική θεραπεία σε ποντίκι
14. Φάσμα ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας
15. Φωτοηλεκτρικό φαινόμενο
16. Εξάρτηση φωτοηλεκτρικού φαινομένου από την ενέργεια του φωτονίου
17. Κλίμακα αποτελεσμάτων ακτινοβολίας πάνω σε βιολογικούς ιστούς.
18. Δομή DNA που έχει υποστεί βλάβη
19. Καμπύλες δόσης βάθους
20. Συντελεστής απορρόφησης ενέργειας
21. Βασικές μορφές αλληλεπίδρασης φωτονίων με την ύλη
22. Φωτοηλεκτρικό φαινόμενο
23. Εναπόθεση δόσης για ένα νανοδοματίδιο χρυσού
24. Καμπύλη επιβίωσης
25. Καμπύλες κυτταρικής επιβίωσης
26. Καμπύλες κυτταρικής επιβίωσης
27. Βλάβες DNA
28. Γραμμικό τετραγωνικό πρότυπο
29. Ανταπόκριση οξέως αντιδρώντος ιστού και οψίμως αντιδρώντα ιστού στην κλασματοποίηση (fractionation) της δόσης
30. Καμπύλη επιβίωσης κυττάρων σε συνθήκες επαρκούς οξυγόνωσης/υποξικές συνθήκες
31. Αιματοκυτταρόμετρο και εισαγωγή Trypan Blue
32. Βασικά συστήματα κυτταρομετρίας
33. Υδροδυναμικό σύστημα ροής
34. Εμπρόσθια και πλευρική σκέδαση (Forward & Side Scatter)
35. Φίλτρα κυτταρομετρίας ροής
36. Forward & Side Scatter
37. Σχήματα νανοδοματιδίων χρυσού
38. Plate για την καλλιέργεια κυττάρων
39. Επωαστήριο
40. Ακτινοσκοπικό μηχάνημα ακτίνων X
41. Γραμμικός επιταχυντής Varian

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

1. Τιμές λόγου α/β σε ανθρώπινους ιστούς και όγκους
2. Τιμή του RER (Radiation Enhancement Ratio) για ενέργεια 27 keV και δόσεις 0,5, 1 & 1,5 Gy
3. Τιμή του RER (Radiation Enhancement Ratio) για ενέργεια 6 MeV και δόσεις 1, 2 & 4 Gy

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

1. Ραβδόγραμμα ποσοστού επιβίωσης για ενέργεια 27 keV & δόση 0,5 Gy
2. Ραβδόγραμμα ποσοστού επιβίωσης για ενέργεια 27 keV & δόση 1 Gy
3. Ραβδόγραμμα ποσοστού επιβίωσης για ενέργεια 27 keV & δόση 1,5 Gy
4. Ραβδόγραμμα ποσοστού επιβίωσης για ενέργεια 6 keV & δόση 1 Gy
5. Ραβδόγραμμα ποσοστού επιβίωσης για ενέργεια 6 keV & δόση 2 Gy
6. Ραβδόγραμμα ποσοστού επιβίωσης για ενέργεια 6 keV & δόση 4 Gy
7. Θεωρητική καμπύλης επιβίωσης & πειραματικά σημεία για δόσεις 0,5, 1 & 1,5 Gy για συγκέντρωση AuNPs 2,5 $\mu\text{gr/ml}$
8. Θεωρητική καμπύλης επιβίωσης & πειραματικά σημεία για δόσεις 0,5, 1 & 1,5 Gy για συγκέντρωση AuNPs 5 $\mu\text{gr/ml}$
9. Θεωρητική καμπύλης επιβίωσης & πειραματικά σημεία για δόσεις 0,5, 1 & 1,5 Gy για συγκέντρωση AuNPs 10 $\mu\text{gr/ml}$
10. Θεωρητική καμπύλης επιβίωσης & πειραματικά σημεία για δόσεις 0,5, 1 & 1,5 Gy για συγκέντρωση AuNPs 20 $\mu\text{gr/ml}$
11. Θεωρητική καμπύλης επιβίωσης & πειραματικά σημεία για δόσεις 1, 2 & 4 Gy για συγκέντρωση AuNPs 0,5 $\mu\text{gr/ml}$
12. Θεωρητική καμπύλης επιβίωσης & πειραματικά σημεία για δόσεις 1, 2 & 4 Gy για συγκέντρωση AuNPs 2,5 $\mu\text{gr/ml}$
13. Θεωρητική καμπύλης επιβίωσης & πειραματικά σημεία για δόσεις 1, 2 & 4 Gy για συγκέντρωση AuNPs 5 $\mu\text{gr/ml}$
14. Θεωρητική καμπύλης επιβίωσης & πειραματικά σημεία για δόσεις 1, 2 & 4 Gy για συγκέντρωση AuNPs 10 $\mu\text{gr/ml}$
15. Θεωρητική καμπύλης επιβίωσης & πειραματικά σημεία για δόσεις 1, 2 & 4 Gy για συγκέντρωση AuNPs 20 $\mu\text{gr/ml}$

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Κεφάλαιο 1 : Η Χρήση Νανοσωματιδίων Στη Νανοϊατρική

- 1.1 Εισαγωγή
- 1.2 Εφαρμογές Νανοσωματιδίων στην Ιατρική
 - 1.2.1 Διαγνωστική Ιατρική
 - 1.2.1.1 Μοριακή Απεικόνιση
 - 1.2.2 Φαρμακευτική Ιατρική
 - 1.2.3. Εισαγωγή στην Υπερθερμία
 - 1.2.3.1 Μαγνητική Υπερθερμία
- 1.3 Φωτοθερμία

Κεφάλαιο 2 : Ιοντίζουσες Ακτινοβολίες

- 2.1 Η φυσική της Ιοντίζουσας Ακτινοβολίας
- 2.2. Ακτίνες γ & X
- 2.3 Αλληλεπίδραση Ιοντίζουσας Ακτινοβολίας με την Ύλη
- 2.4 Αλληλεπίδραση Βιολογικής Ύλης & Ακτινοβολίας
- 2.5 Βιολογικά Αποτελέσματα της Αλληλεπίδρασης Ύλης & Ακτινοβολίας
- 2.6 Εφαρμογές Ιοντιζουσών Ακτινοβολιών στην Ιατρική
- 2.7 Ενίσχυση Αποτελεσματικότητας Ακτινοθεραπείας
 - 2.7.1 Η Χρήση των Νανοσωματιδίων Χρυσού ως Ακτινοευαισθητοποιητές
 - 2.7.2 Η Φυσική της Ακτινοευαισθητοποίησης των Νανοσωματιδίων Χρυσού
- 2.8 Καμπύλες επιβίωσης

Κεφάλαιο 3: Μέτρηση Κυτταρικού Θανάτου

- 3.1 Εισαγωγή
- 3.2 Μέθοδος χρώσης κυττάρων με Trypan Blue
- 3.3 Εισαγωγή στην κυτταρομετρία ροής
 - 3.3.1 Υδροδυναμικό Σύστημα Ροής
 - 3.3.2 Οπτικό Σύστημα
 - 3.3.3 Ηλεκτρονικό Σύστημα
- 3.4 Εφαρμογές Κυτταρομετρίας Ροής

Κεφάλαιο 4 : Πειράματα Ακτινοβόλησης Καρκινικών Κυττάρων με τη Χρήση Νανοσωματιδίων

- 4.1 Εισαγωγή
- 4.2 Καλλιέργεια της Κυτταρικής Σειράς
 - 4.2.1 Διαδικασία επώασης των νανοσωματιδίων
- 4.3 Ακτινοβολήσεις κυττάρων με ενέργειες keV
 - 4.3.1 Συγκριτικές ακτινοβολήσεις κυττάρων με τη χρήση AuNPs
- 4.4 Ακτινοβολήσεις κυττάρων με ενέργειες MeV
 - 4.4.1 Συγκριτικές ακτινοβολήσεις κυττάρων με τη χρήση AuNPs
- 4.5 Αποτελέσματα μετρήσεων του κυτταρικού θανάτου με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής
- 4.6 Αποτελέσματα ακτινοβολήσεων
 - 4.6.1 Ακτινοβόληση με ενέργειες keV
 - 4.6.2 Ακτινοβόληση με ενέργειες MeV

- 4.7 Καμπύλες επιβίωσης
- 4.7.1 Καμπύλες Επιβίωσης για keV
- 4.7.2 Καμπύλες Επιβίωσης για MeV
- 4.8 Υπολογισμός RER (Radiation Enhancement Ratio)

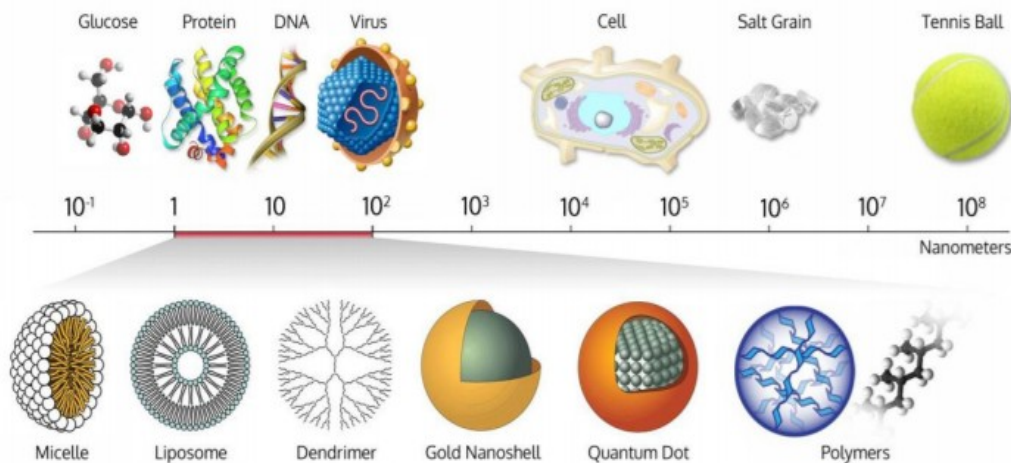
Συμπεράσματα

Βιβλιογραφία

Κεφάλαιο 1: Η Χρήση Νανοσωματιδίων Στην Νανοϊατρική

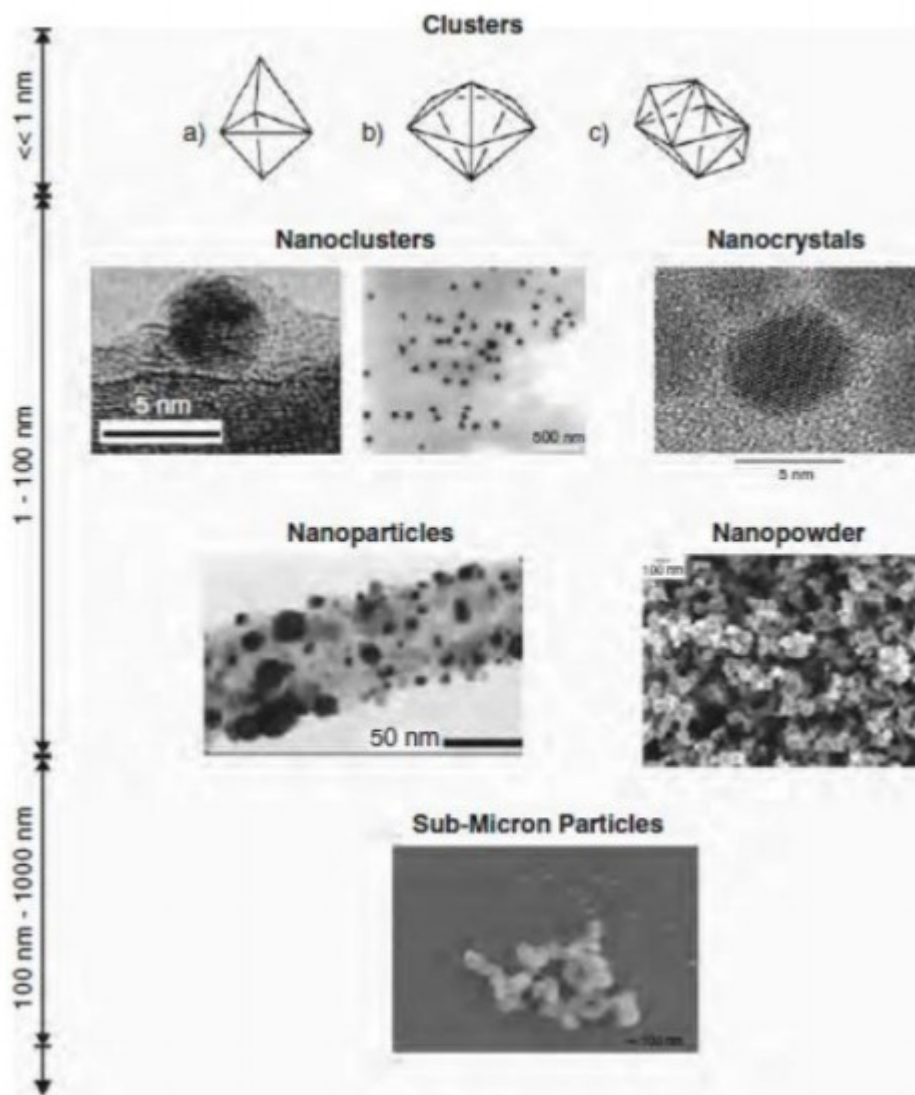
1.1 Εισαγωγή

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον στους επιστημονικούς κλάδους παρουσιάζουν τα νανοσωματίδια μιας και είναι η ενοποιητική γέφυρα των συμπαγών υλικών και των ατομικών και μοριακών δομών. Ως νανοσωματίδια ορίζονται λοιπόν, όλα τα στερεά σώματα τα οποία έχουν και τις τρεις διαστάσεις της δομής τους μικρότερες των 100 nm (Διάφας & al., 2014).



Εικόνα 1.1: Απεικόνιση νανοσωματιδίων στην κλίμακα μεγέθους (Di Ventra & al., 2004)

Τα συστήματα που βρίσκονται σε ακόμη πιο μικρή κλίμακα μεγέθους μπορούν να χαρακτηριστούν ως μοριακά συσσωματώματα (nanocluster), ενώ τα νανοσωματίδια που έχουν κρυσταλλική ατομική δομή χαρακτηρίζονται ως νανοκρύσταλλοι (nanocrystals), σε αντίθεση βέβαια με τα άμορφα, τα οποία δεν έχουν καμία ομοιογένεια ως προς το σχήμα και το μέγεθός τους και τα οποία αναφέρονται ως νανοσκόνη (nanopowder). Όσον αφορά τις κβαντικές τελείες (quantum dots), είναι ημιαγώγιμα νανοσωματίδια με διαστάσεις κάτω των 10nm συνήθως, οι οποίες μάλιστα έχουν ως βασικό γνώρισμα το μεγάλο ενεργειακό χάσμα που υπάρχει μεταξύ της ζώνης σθένους και της ζώνης αγωγιμότητας, γεγονός το οποίο οδηγεί σε πολύ καλά διαχωρισμένες ενεργειακές καταστάσεις (Δουζένης, 2021).



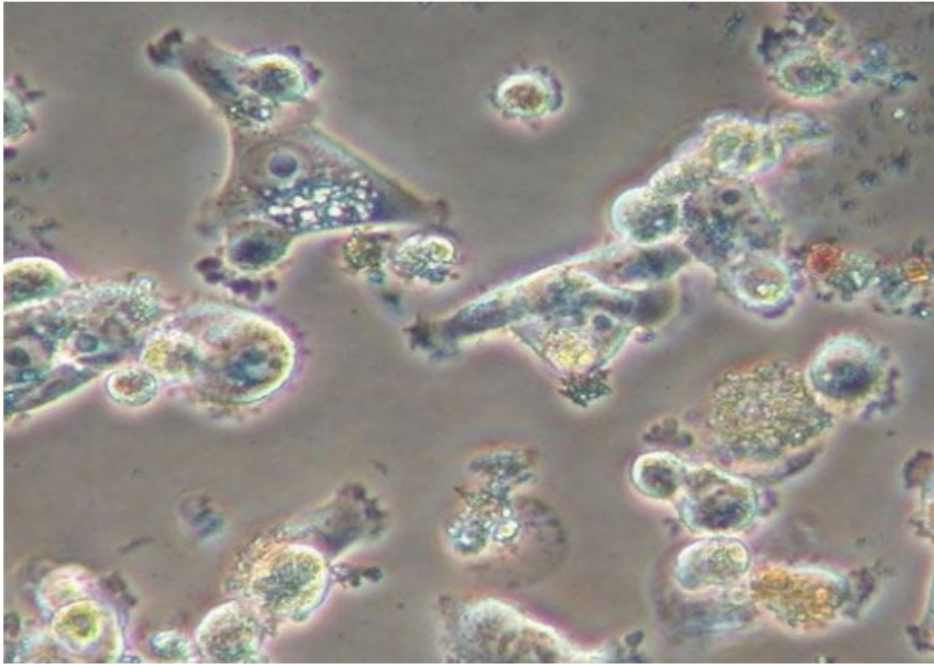
Εικόνα 1.2 : Απεικόνιση του μεγέθους των νανοϋλικών στη νανοδιάσταση (Δουζένης., 2021)

Τα πολυπόικλα σχήματα που μπορούν να πάρουν τα νανοσωματίδια είναι οι συμμετρικές μορφολογίες όπως είναι η σφαίρα, ο κύβος ή τα πολύεδρα συστήματα, αλλά και οι διάφορες ακόμη πιο σύνθετες μορφές. Οι παράγοντες, οι οποίοι θα καθορίσουν την τελική δομή αλλά και τη μορφολογία των νανοσωματιδίων, αφορούν κυρίως την κρυσταλλική φάση όπου και διαμορφώνονται οι αρχικοί πυρήνες των νανοσωματιδίων, αλλά και τα χαρακτηριστικά που θα περιγράψουν την εκάστοτε μοναδιαία κυψελίδα (Lee & al., 2003).

1.2 Εφαρμογές Νανοσωματιδίων Στην Ιατρική

Η ταχύτατη ανάπτυξη του κλάδου των νανοσωματιδίων έχει ένα ιδιαίτερος θετικό αντίκτυπο σε σχεδόν όλους τους τομείς της ζωής του ανθρώπου ενώ οι εφαρμογές των νανοσωματιδίων στον τομέα αυτόν ονομάζονται νανοϊατρική. Ο βασικός πυλώνας του τομέα της νανοϊατρικής λοιπόν είναι η βελτίωση της θεραπευτικής ιατρικής, της διαγνωστικής, της χειρουργικής, και της συστηματικής ιατρικής παρακολούθησης, χρησιμοποιώντας νανοσωματίδια (Robert A. & al., 1999). Συνεπώς, τα νανοσωματίδια βοηθούν σημαντικά στη διάγνωση και στη θεραπεία πολλών ασθενειών, μιας και καταφέρνουν να καταπολεμήσουν την ασθένεια σε κυτταρικό επίπεδο, να είναι

ορατά στις απεικονιστικές μελέτες και να μεταφέρουν θεραπευτικές ουσίες, π.χ. φάρμακα αλλά ακόμη και γονίδια και πρωτεΐνες σε κατεστραμμένους ιστούς (Ευσταθόπουλος & al., 2018).



Εικόνα 1.3 : Απεικόνιση εισαγωγής φαρμάκων που στοχεύουν αποκλειστικά στον όγκο χωρίς να επηρεάζουν τα γύρω υγιή κύτταρα (C.Ho & al., 1993).

1.2.1 Διαγνωστική Ιατρική

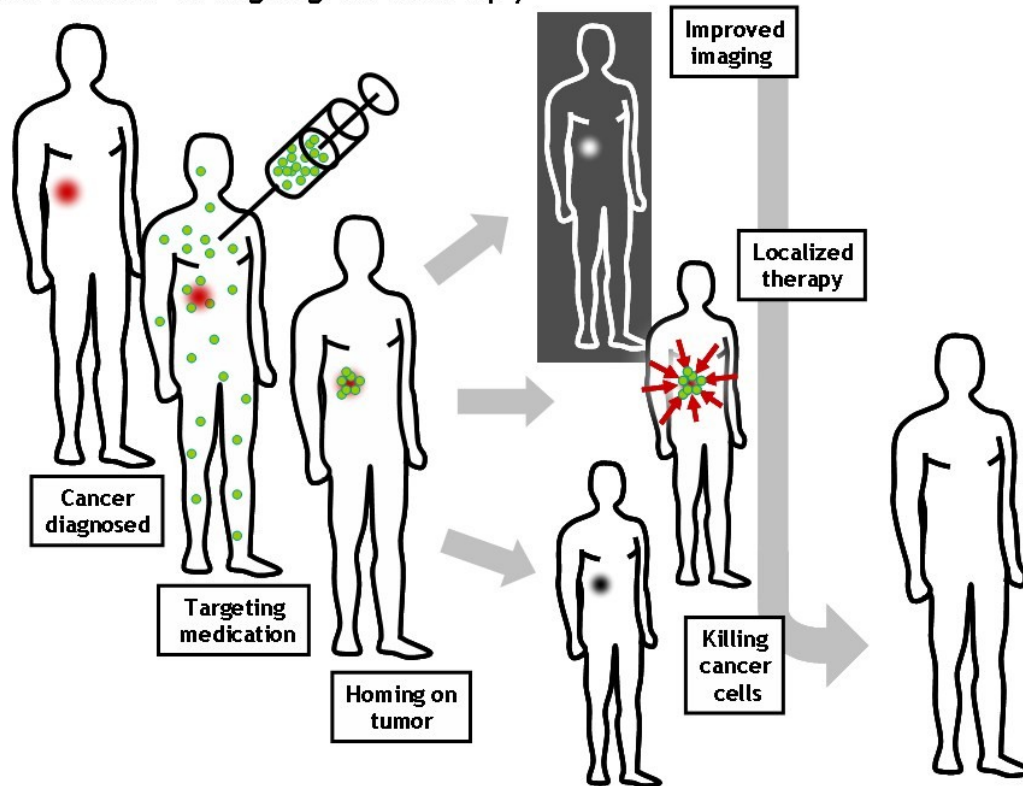
Όσον αφορά την διαγνωστική ιατρική, εστιάζει κυρίως στην έγκαιρη διάγνωση των διαφόρων ασθενειών και δεδομένου αυτού, έχουν αναπτυχθεί πολλά διαγνωστικά εργαλεία των οποίων τα βασικά χαρακτηριστικά είναι το εξαιρετικά μικρό τους μέγεθος, η μικρή ποσότητα δείγματος που απαιτείται αλλά και η παροχή βιολογικών δεδομένων με ακρίβεια σε μια μέτρηση (Κυπαρισσίδης & al., 2007). Υπάρχουν δύο μεγάλες κατηγορίες νανοδομών που αφορούν τη διαγνωστική ιατρική, οι βιοαισθητήρες και οι συσκευές μοριακής απεικόνισης, στις οποίες και θα αναφερθούμε.

1.2.1.1 Μοριακή Απεικόνιση

Κατά τη διάρκεια της θεραπείας ενάντια στον καρκίνο, εντείνεται η προσπάθεια για τον υπολογισμό σε μακροσκοπικό επίπεδο με τις κλασικές απεικονιστικές τεχνικές, ώστε να μειωθεί ένας όγκος ή να υπάρξουν παθολογικές αλλαγές σε ένα όργανο. Αντιθέτως, η μοριακή απεικόνιση συνδράμει στην διάγνωση μίας ασθένειας σε μοριακό επίπεδο, πριν ακόμη και από την εκδήλωση των κλινικών συμπτωμάτων της. Ένα απεικονιστικό μόριο που είναι συνδεδεμένο σε ένα νανοσωματίδιο μπορεί να λειτουργήσει ώστε να στοχεύσει κάποια αισθητήρια όργανα ειδικά για κάθε ασθένεια. Εφόσον τα συγκεκριμένα νανοσωματίδια τονίζουν μονάχα τους κατεστραμμένους ιστούς, αυξάνοντας την αντίθεση μεταξύ των υγιών και των κατεστραμμένων ιστών, καθίσταται

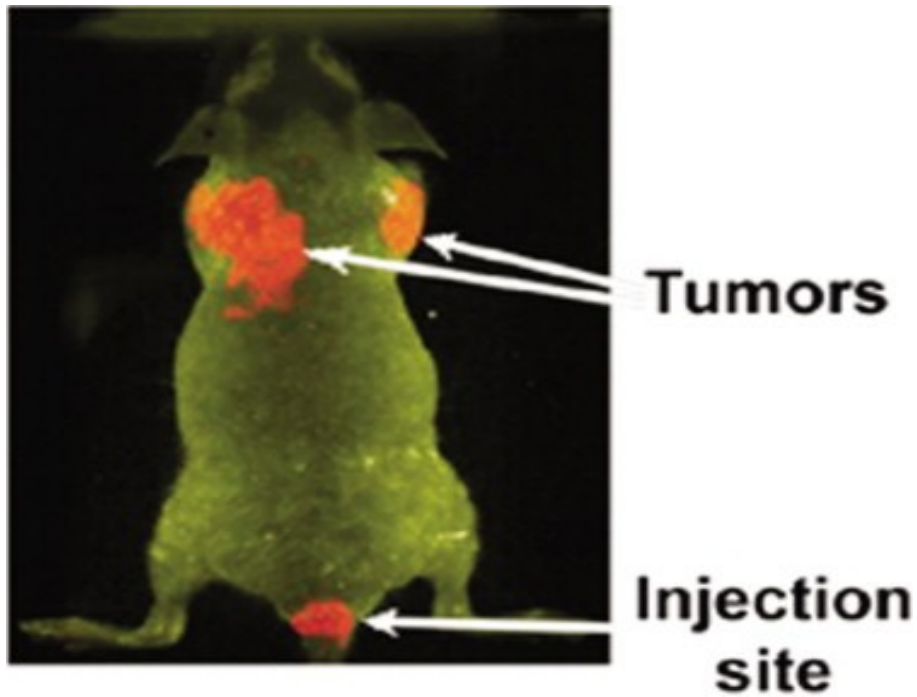
δυνατή η διάγνωση μιας ασθένειας πριν από την εκδήλωση των συμπτωμάτων (Karunaratne & al., 2007).

Molecular imaging & therapy

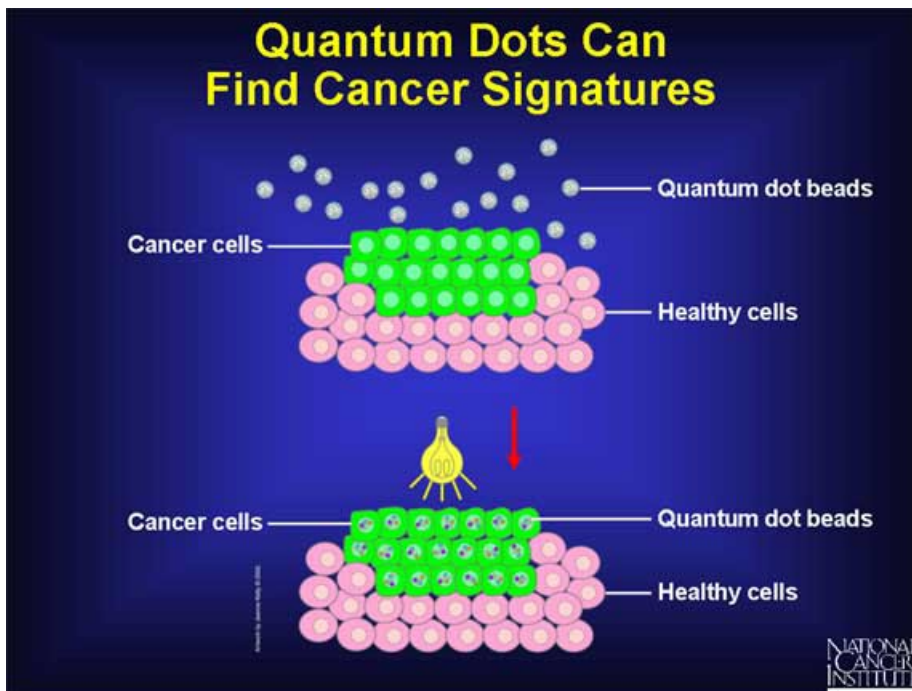


Εικόνα 1.4 : Η διαδικασία της μοριακής απεικόνισης και θεραπείας καρκίνου (https://en.wikipedia.org/wiki/Molecular_imaging).

Ένα από τα εργαλεία που χρησιμοποιούνται πιο συχνά στη μοριακή απεικόνιση είναι οι κβαντικές τελείες, ιδιαίτερα για τη διάγνωση καρκίνου. Πιο αναλυτικά, οι κβαντικές τελείες από CdSe, όταν εκτεθούν σε υπεριώδες φως, φωσφορίζουν και το γεγονός αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τον χειρουργό ιατρό καθώς εκείνος θα μπορεί να δει τον όγκο που φωσφορίζει και έτσι με τη σωστή επέμβαση να τον απομακρύνει επιτυχώς. Αυτός είναι ένας τρόπος ώστε να προλάβουμε τον καρκίνο στα πρώτα του στάδια (Karunaratne & al., 2007). Επιπλέον, στη φωτοδυναμική θεραπεία οι κβαντικές σφαίρες στο σώμα και στον περιβάλλοντα τον όγκο ιστό μπορούν να θερμανθούν από την ενέργεια των φωτονίων και τελικά να παραχθούν μόροξυγόνου υψηλής ενέργειας τα οποία θα καταστρέψουν τον όγκο. Σημαντικό πλεονέκτημα της χρήσης των κβαντικών τελειών είναι το γεγονός πως δεν είναι τοξικές για τον ανθρώπινο οργανισμό, όπως είναι η χημειοθεραπεία (Wang & al., 2005).



Εικόνα 1.5 : Απεικόνιση *in vivo* φθορισμού σε ποντίκι που φέρει όγκο, στον οποίο χρησιμοποιήθηκαν αισθητήρες κβαντικών τελειών (Wang & al., 2005).



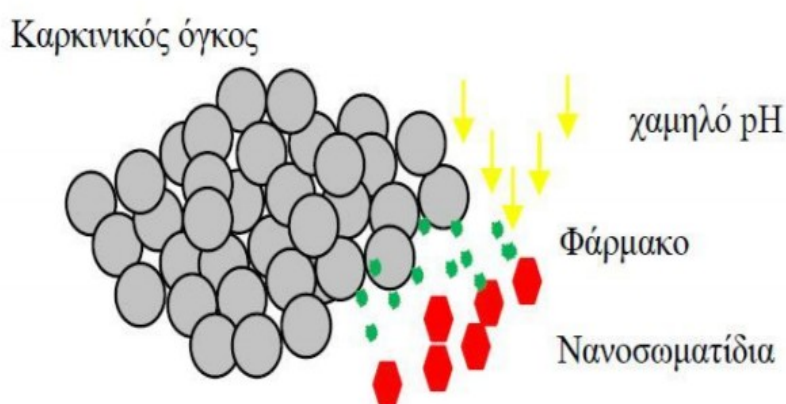
Εικόνα 1.6 : Εντοπισμός καρκινικών κυττάρων με τη χρήση κβαντικών τελειών και υπεριώδους ακτινοβολίας (Παπαδημητρίου & al., 2016).

Υπερπαραμαγνητικά νανοσωματίδια του οξειδίου του σιδήρου (SPION, super paramagnetic iron oxide nanoparticles) είναι μικρά νανοσωματίδια συνθετικού $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ ή Fe_3O_4 των οποίων ο πυρήνας

είναι μικρότερος των 10 nm και έχει οργανική ή ανόργανη επικάλυψη. Ένα SPION καλυμμένο με δεξτράνη (dextran) χρησιμοποιείται τα τελευταία 10 χρόνια σε όλη την Ευρώπη ως σκιαγραφικό σε μαγνητική τομογραφία συκωτιού. Αυτά τα νανοσωματίδια μπορούν να αυξήσουν την διαγνωστική ευαισθησία και ακρίβεια τροποποιώντας τον χρόνο αποκατάστασης των πρωτονίων (Karunaratne & al., 2007).

1.2.2 Φαρμακευτική Ιατρική

Στον τομέα της θεραπευτικής ιατρικής, τα φάρμακα μεταφέρονται επιλεκτικά σε ιστούς και όργανα και η απελευθέρωση του φαρμάκου ελέγχεται για την παροχή της πιο αποτελεσματικής θεραπείας ασθενειών. Τα φάρμακα μπορούν να απελευθερωθούν στο ανθρώπινο σώμα με μία από τις ποικίλλες μεθόδους.



Εικόνα 1.7: Απεικόνιση νανοσωματιδίων που μεταφέρουν με ασφάλεια στο εσωτερικό ενός οργανισμού κάποιο φάρμακο και ανιχνεύουν φυσικοχημικά ερεθίσματα-«σήματα», όπως είναι το χαμηλό pH, στον περιβάλλοντα χώρο τους, απελευθερώνουν αυτά τα φάρμακα, δρώντας έτσι εξειδικευμένα στον στόχο τους (Λιασκώνη, 2016).

Οι μέθοδοι έγχυσης ενός φαρμάκου στο ανθρώπινο σώμα έχουν ως απαιτούμενο το φάρμακο να απορροφάται γρηγορότερα και ευκολότερα από τον οργανισμό με σκοπό την ταχύτερη δράση στον ιστό-στόχο. Σε κάποιες περιπτώσεις, διαπιστώθηκε πως φάρμακα τα οποία είχαν ιδιαίτερα υψηλή απόδοση στο εργαστήριο, στην πράξη δεν είχαν το ίδιο αποτέλεσμα, κάτι το οποίο μπορεί να οφείλεται στην υποβάθμιση της θεραπευτικής ουσίας πριν αυτή φτάσει στον προκαθορισμένο στόχο. Στην περίπτωση χαμηλής διαλυτότητας του φαρμάκου, θα πρέπει ο ασθενής να λάβει υψηλότερη δόση φαρμάκου, κάτι το οποίο οδηγεί σε πολλαπλές παρενέργειες για τον ασθενή (Karunaratne & al., 2007). Η παραγωγή των νανοϋλικών συνέδραμε στη χρήση τους ως νανομεταφορείς για να χορηγηθούν αποτελεσματικά τα φάρμακα. Μερικά από τα οφέλη τους σχετικά με άλλους μεταφορείς φαρμάκων είναι το μέγεθος τους, το οποίο αν και ιδιαίτερα μικρό, συνδράμει στην υπέρβαση των φυσιολογικών εμποδίων που συναντώνται στο ανθρώπινο σώμα και στην είσοδό τους στα κύτταρά του οργανισμού. Επιπροσθέτως, η αυξημένη διαλυτότητά τους βοηθά στην αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας των θεραπευτικών συστατικών τους (Rawat & al., 2006). Ένα ακόμη όφελος που προκύπτει, είναι η ικανότητά τους να χορηγούνται στοχευμένα με την

απελευθέρωση τους να είναι υπό τον έλεγχο συγκεκριμένων σημάτων βασιζόμενα στη θερμοκρασιακή ευαισθησία ή σε κάποια μαγνητική ιδιότητα.

Επιπλέον, οι νανομεταφορείς μπορούν να μεταφέρουν πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα και άλλα μικρομόρια ενώ παράλληλα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία καρκίνου. Επιπροσθέτως, θεωρούνται ως βιοσυμβατά υλικά, αφού βάζοντας πάνω τους ένα «στρώμα» που δρα ως διεπιφάνεια. Παράλληλα, αξιολογείται ότι είναι, όπως προαναφέρθηκε, και το μικρό τους μέγεθος (το οποίο είναι μικρότερο από 1 μm) αφού λόγω αυτού μπορούν να πάρουν ποικίλλες μορφές (Koo & al., 2005).

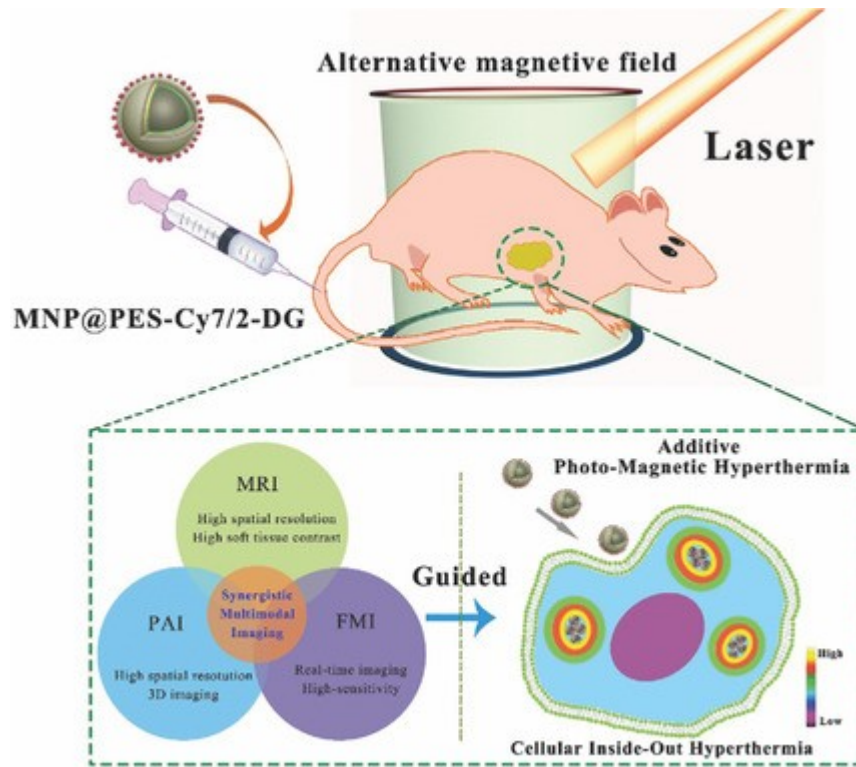
Σχετικά με τον σχεδιασμό τους, αρχικά θα πρέπει να εξεταστεί ενδελεχώς η φαρμακοκινητική, η βιοδιανομή και η αποτελεσματική συγκέντρωση των νανοσωματιδίων στο όργανο-στόχο. Οι παράγοντες που συμβάλλουν στην επιρροή της σταθερότητας της εσωτερικής και εξωτερικής διανομής των νανοσωματιδίων στο βιολογικό αυτό μικροπεριβάλλον είναι τρεις : η χημική τους φύση, ο χωρικός προσανατολισμός τους και το μέγεθος τους (Pridgen & al., 2008),(Peer & al., 2007). Συνήθως τα νανοϋλικά που χρησιμοποιούνται κατά κόρων είναι εκείνα που βιοδιασπώνται και τα μεταλλικά νανοσωματίδια. Τέλος, οι νανομεταφορείς πρέπει να πληρούν κάποιες προϋποθέσεις οι οποίες είναι αυτές της μη τοξικότητας, της ανοσογονικότητας και της ικανότητας μεταφοράς και απελευθέρωσης επαρκών ποσοτήτων των φαρμάκων (Wen-Tso Liu, 2006).

1.2.3 Εισαγωγή στην Υπερθερμία

Η υπερθερμία συνδέεται με τον κυτταρικό θάνατο με τρεις μηχανισμούς: την κυτταρική απόπτωση, την κυτταρική νέκρωση και τη νεκρόπτωση, έναν τύπο προγραμματισμένης νέκρωσης. Η κυτταρική απόπτωση συμβαίνει όταν οι θερμοκρασίες θέρμανσης κυμαίνονται από 41°C έως 47°C. Η υπερβολική κυτταρική νέκρωση συμβαίνει με θερμικό σοκ για θερμοκρασίες συνήθως υψηλότερες των 50°C, προκαλώντας ταχύτερα κυτταρικό θάνατο από την απόπτωση και βασίζεται στη μετουσίωση των πρωτεϊνών.

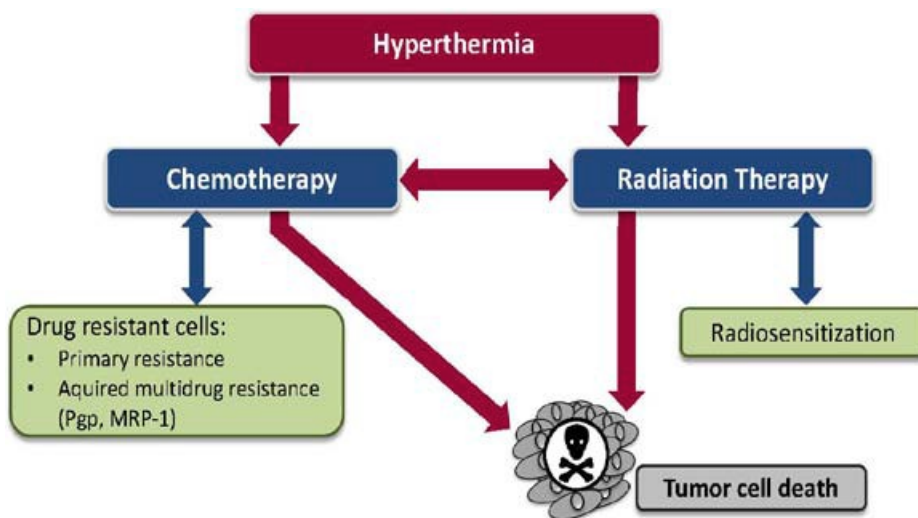
Η θεραπεία με υπερθερμία μπορεί να διεξαχθεί με διάφορες τεχνικές. Κάποιες από αυτές είναι οι ραδιοσυχνότητες, τα μικροκύματα, τα κύματα υπερήχων και τα λέιζερ που είναι λιγότερο επεμβατικές θεραπείες. Επιπλέον, η υπερθερμία μπορεί να ελαχιστοποιήσει την τοξικότητα των χημικών και ραδιενεργών παραγόντων, καταστρέφοντας έτσι τα άρρωστα κύτταρα, χωρίς όμως να βλάψει τα υγιή, αλλά θερμαίνοντας τα κακοήγη κύτταρα. Η υπερθερμία για θεραπευτικούς σκοπούς προκαλείται τεχνητά και ελέγχεται. Εφόσον τα καρκινικά κύτταρα έχουν μικρότερη ανθεκτικότητα στις υψηλές θερμοκρασίες από αυτή των υγιών κυττάρων, η υπερθερμία μπορεί να προκαλέσει αυθόρμητη απόπτωση των καρκινικών κυττάρων ή μπορεί να βοηθήσει στην καταστροφή τους σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία (Gautherie, 1990).

Όσον αφορά τα μεταλλικά νανοσωματίδια, έχουν χρησιμοποιηθεί ως συστήματα θέρμανσης που ενεργοποιούνται με φως. Μπορούν να ενσωματωθούν σε όγκους, επιτρέποντας έτσι την υψηλή εναπόθεση θερμότητας στην περιοχή του όγκου μέσω του επιφανειακού πλασματικού συντονισμού σε χαμηλές εντάσεις λέιζερ και ελαχιστοποιώντας τη βλάβη στον περιβάλλοντα υγιή ιστό.



Εικόνα 1.8 : Αναπαράσταση της θεραπείας υπερθερμίας σε ποντίκι με τη χρήση laser. [Hao & al., 2018]

Αναλυτικότερα, η υπερθερμία έχει αποδειχθεί και σε in vitro και σε in vivo δοκιμές ότι συνδράμει στα αποτελέσματα της ακτινοθεραπείας για διάφορους λόγους, συμπεριλαμβανομένης της αλλαγής στην ευαισθησία των κυττάρων ανάλογα με τη φάση του κυτταρικού κύκλου, την επιδιόρθωση βλαβών DNA και την υποξία. Συμπερασματικά, η υπερθερμία προκαλεί καταστροφή καρκινικών κυττάρων μέσω διαταραχής της διαπερατότητας των μεμβρανών των κυττάρων (αναστολή πολλαπλασιασμού ή θάνατος) και καταστροφή των λυσοσωμάτων (κυτταρική θανατηφόρα απόπτωση) ενώ παράλληλα δρα σε συνδυασμό όπως προαναφέρθηκε με την ακτινοθεραπεία με διάφορους τρόπους. Ένας από αυτούς είναι μέσω της θερμικής καταστροφής των πρωτεϊνών DNA αναστέλλοντας την επιδιόρθωση της μη θανατηφόρας ακτινικής βλάβης.



Εικόνα 1.9 : Απεικόνιση εξάρτησης υπερθερμίας & άλλων θεραπειών (www.cancer.org).

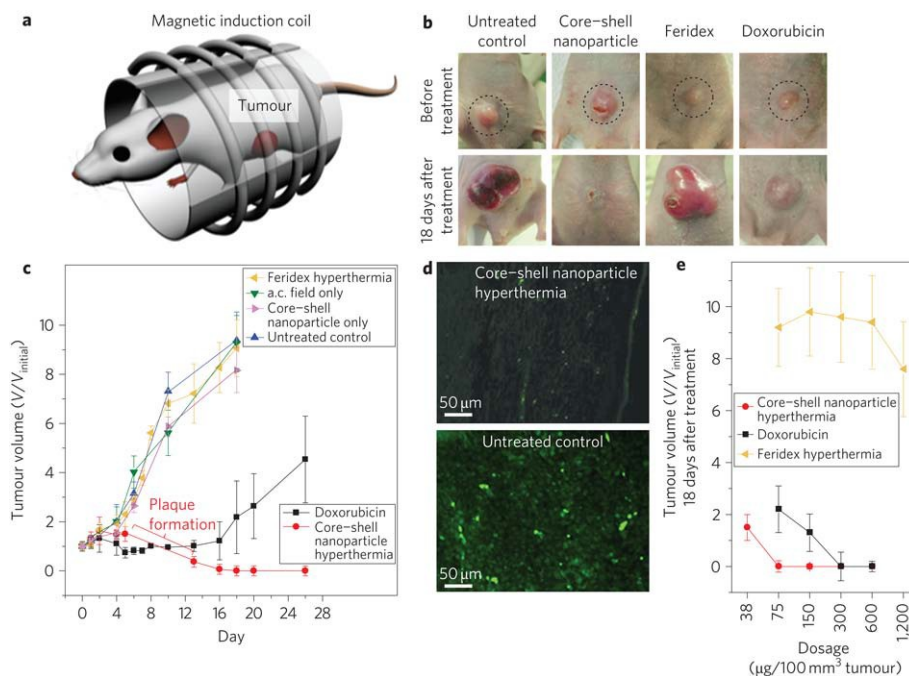
Με τη βοήθεια των νανοσωματιδίων χρυσού, η υπερθερμία επέρχεται σε ένα νέο στάδιο. Τα νανοσωματίδια χρυσού αποδείχθηκαν πως είναι ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο για την έρευνα και την θεραπεία του καρκίνου, που μπορούν να προωθήσουν τη θερμική θανάτωση των καρκινικών κυττάρων. Τα κύρια πλεονεκτήματα των νανοσωματιδίων χρυσού, τα οποία χρησιμοποιούνται στη βιοτεχνολογία, είναι ότι μπορούν να μετατρέψουν την απορροφούμενη ακτινοβολία σε θερμότητα ενώ, λόγω της ευαισθησίας τους στα μήκη κύματος στο κοντινό υπέρυθρο, είναι εξίσου σε πλεονεκτική θέση. Επιπλέον γνωρίζουμε πως ο χρυσός είναι ένα αδρανές ευγενές μέταλλο που δεν αντιδρά με τους φυσιολογικούς βιολογικούς ιστούς και διατηρεί τη μοριακή σταθερότητα του (Weibo & al., 2008).

Τα σωματίδια τα οποία ενεργοποιούνται από μήκη κύματος στο κοντινό υπέρυθρο βρίσκονται στα όρια μεγέθους που επιτρέπουν την επέμβαση στα καρκινικά κύτταρα τα οποία μάλιστα είναι της τάξεως των 60-400nm. Συνεπώς, το μέγεθος αλλά και η γεωμετρία των χρυσών νανοσωματιδίων καθορίζουν τη κυτταρική βλάβη στους όγκους. Ωστόσο, έρευνες έχουν δείξει ότι αυτά τα νανοσωματίδια αντιδρούν με τον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων κυρίως συνδυαστικά με υπερθερμία, ενώ παράλληλα κατά ένα μέρος η τοξικότητα των νανοσωματιδίων χρυσού οφείλεται και στην επίδραση τους στο πυρήνα των καρκινικών κυττάρων (Weibo & al., 2008).

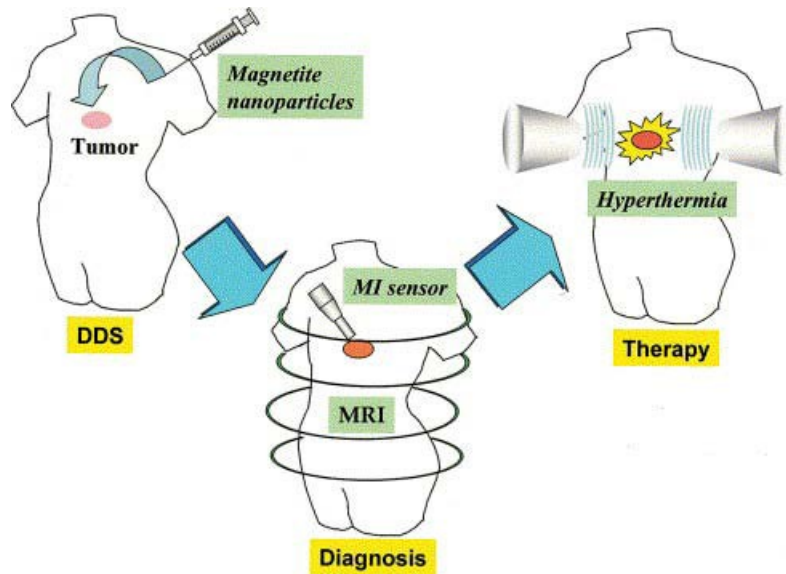
1.2.3.1 Μαγνητική Υπερθερμία

Τα μαγνητικά νανοσωματίδια μπορούν να εφαρμοστούν με ιδιαίτερη αποτελεσματικότητα στην μαγνητική υπερθερμία. Η μαγνητική υπερθερμία θα μπορούσε να θεωρηθεί ως συμπληρωματική θεραπεία της χημειοθεραπείας, της ακτινοθεραπείας και της χειρουργικής στην αντιμετώπιση του καρκίνου. Το γεγονός πως τα μαγνητικά νανοσωματίδια, όταν εκτεθούν σε εναλλασσόμενο μαγνητικό πεδίο, παράγουν θερμότητα ήταν η κινητήριος δύναμη ώστε να έρθει στο προσκήνιο από τους επιστήμονες η ιδέα της μαγνητικά επαγόμενης υπερθερμίας. Έτσι σε ένα εναλλασσόμενο μαγνητικό πεδίο, εμφανίζονται επαγόμενα ρεύματα σε μεταλλικά μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίων του σιδήρου με αποτέλεσμα, να παράγεται θερμότητα στο μέταλλο (Maenosono & al., 2006). Το φαινόμενο αυτό ενισχύεται πολύ σε μέταλλα που παρουσιάζουν συλλογική μαγνητική συμπεριφορά (Maenosono & al., 2006). Συνεπώς, όταν εκτίθενται σε εναλλασσόμενο μαγνητικό πεδίο τα σωματίδια καθίστανται ισχυρές πηγές θερμότητας, καταστρέφοντας τα καρκινικά κύτταρα

μιας και είναι πιο ευαίσθητα από τα φυσιολογικά κύτταρα σε θερμοκρασίες που υπερβαίνουν τους 41°C (Maenosono & al., 2006). Μιας και η ροή αίματος στους καρκινικούς όγκους είναι ανεπαρκής, θα υπάρξει αύξηση της συσσώρευσης του γαλακτικού οξέος σε αυτούς και πτώση του pH. Βέβαια, γνωρίζουμε πως τα κύτταρα πεθαίνουν ευκολότερα σε όξινο περιβάλλον, αφού γίνονται πιο ευαίσθητα στην αύξηση της θερμοκρασίας. Ακόμη, η αύξηση της θερμοκρασίας γίνεται ευκολότερα όταν η ροή αίματος είναι ανεπαρκής και τα καρκινικά κύτταρα έχουν χαμηλή θερμική αντίσταση σε σχέση με τα φυσιολογικά (Μπακογλίδης, 2011). Συνεπώς, συμπεραίνουμε πως η υπερθερμία μπορεί να εξοντώσει εκλεκτικά τα καρκινικά κύτταρα αυξάνοντας την θερμοκρασία μονάχα στην περιοχή του όγκου, ενώ πολλαπλές έρευνες παρουσίασαν ότι η υπερθερμία σκοτώνει τα καρκινικά κύτταρα, συνήθως με μικρές βλάβες στους φυσιολογικούς ιστούς. Ακόμη, συμπεραίνουμε πως ο όγκος μπορεί να συρρικνωθεί είτε σκοτώνοντας τα καρκινικά κύτταρα, είτε προκαλώντας βλάβες σε πρωτεΐνες και δομές μέσα σε αυτά. Σχεδόν σε όλες τις κλινικές μελέτες, η υπερθερμία χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλες μορφές αντικαρκινικής θεραπείας, όπως η χημειοθεραπεία και η ακτινοθεραπεία, αφού η υπερθερμία κάνει τα καρκινικά κύτταρα πιο ευαίσθητα στην ακτινοβολία και την δράση των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων.

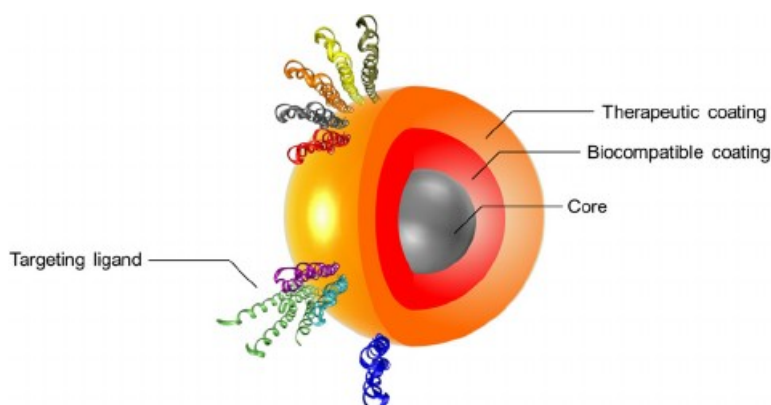


Εικόνα 1.10 : *In vivo* μελέτη της υπερθερμίας με χρήση διαφόρων παραγόντων. Εμφανής η επιτυχία της χρήσης υπερθερμίας με νανοσωματίδια τύπου *core-shell* όπως τα χρυσά νανοσωματίδια (Jae-Hyun Lee & al., 2011)



Εικόνα 1.12 : Αναπαράσταση διάγνωσης και θεραπείας με υπερθερμία, με χρήση υπερπαραμαγνητικών νανοσωματιδίων (Grillone & al., 2017)

Επιπλέον, όσον αφορά την υπερθερμία και τα υπερπαραμαγνητικά νανοσωματίδια, γνωρίζουμε πως, κατά την κατασκευή των σιδηρομαγνητικών υλικών στη νανοκλίμακα, εμφανίζεται μια ιδιότητα τους η οποία ονομάζεται υπερπαραμαγνητισμός. Όταν για την παρασκευή αυτών των υλικών χρησιμοποιείται το οξείδιο του σιδήρου, τότε αυτά ονομάζονται SPIONs (Super-Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticles) (Katarzyna & al., 2014). Τα SPIONs απαρτίζονται από έναν πυρήνα οξειδίου του σιδήρου, ενώ επικαλύπτονται ή ενσωματώνονται σε ένα πολυμερές για να ενεργοποιήσουν το συσσωρευμένο όγκο. Η ενσωμάτωση των SPIONs σε ένα υδρόφιλο σωματίδιο πολυμερούς, όπως η δεξτράνη, είναι η πιο συχνή μέθοδος ενώ αρκετές φορές χρησιμοποιείται και το πυρίτιο για την επικάλυψη τους.



Εικόνα 1.11 : Σχηματική αναπαράσταση ενός multilayered SPION με σκοπό την χρήση του στον τομέα της ιατρικής (Radomski & al.)

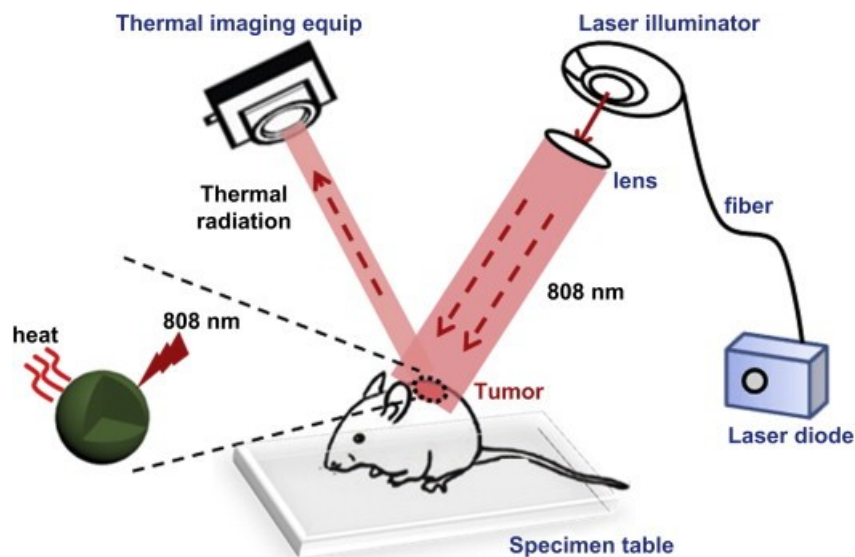
Όταν σε έναν ιστό έχουν εισαχθεί SPIONs και εφαρμόσουμε σε αυτόν εξωτερικό μαγνητικό πεδίο, εκείνος θα θερμανθεί και θα έχουμε υπερθερμία σε αυτή την περιοχή. Στην πράξη, όλα αυτά

γίνονται με ενδοφλέβια έγχυση των SPIONs για να παραδοθούν σε πιθανές εστίες μεταστατικών καρκινικών κυττάρων.

1.3 Φωτοθερμία

Η Φωτοθερμική θεραπεία (PhotoThermal Therapy - PTT) είναι μια επέκταση της PDT (φωτοδυναμικής θεραπείας - PhotoDynamicTherapy) που δεν χρειάζεται οξυγόνο καθώς ο διεγερμένος φωτοευαισθητοποιητής απελευθερώνει ενέργεια (θερμότητα) που σκοτώνει τα στοχευόμενα κύτταρα. Οι γενικές ιδανικές απαιτήσεις και ταυτόχρονα τα εμπόδια για έναν αποτελεσματικό φωτοευαισθητοποιητή είναι η υψηλή φωτοσταθερότητα, η ελάχιστη αυτοσυσσωμάτωση, η χαμηλή τοξικότητα, η υψηλή ειδικότητα στο στόχο, η χαμηλή υδροφοβία και οι μικροί χρόνοι κυκλοφορίας (Dougherty & al., 1998). Με την ταχεία ανάπτυξη της νανοτεχνολογίας έχει προταθεί μια επαναστατική ανάπτυξη έξυπνων νανοσυστημάτων για να ξεπεραστούν αυτά τα εμπόδια και να χρησιμοποιηθεί για στοχευμένη διανομή φαρμάκων αλλά και για την παρακολούθηση της εξέλιξης του καρκίνου. Νανοσωματίδια χρυσού, πυριτίου και πολυμερούς, κβαντικές κουκίδες (quantum-dots), νανοσωλήνες, λιποσώματα και δενδριμερή έχουν εξεταστεί ως συστήματα παράδοσης φαρμάκων στη νανοϊατρική και τη φαρμακευτική τεχνολογία (<https://euon.echa.europa.eu/el/future-of-nanomedicines>). Ακόμη, τα περισσότερα υλικά που παρουσιάζουν ενδιαφέρον στην φωτοθερμική θεραπεία όπως είδαμε βρίσκονται στην νανοκλίμακα, με εύρος μεγέθους 20-300 nm μιας και τα μόρια αυτού του μεγέθους έχει παρατηρηθεί πως συσσωρεύονται σε καρκινικούς όγκους και ιστούς.

Η φωτοθερμική θεραπεία έχει αναδυθεί ως μια ελάχιστα επεμβατική μέθοδος για τη θεραπεία του καρκίνου, μετατρέποντας την ενέργεια φωτονίων σε θερμότητα επαρκή ώστε να προκαλέσει καταστροφή των κυττάρων μέσω απόπτωσης ή νέκρωσης ανάλογα με τη δόση laser, το μήκος κύματος του φωτός και το χρόνο ακτινοβολίας.



Εικόνα 1.13 : Σχηματική αναπαράσταση φωτοθερμικής θεραπείας σε ποντίκι (Zhou Zhigao & al., 2013)

Τα νανοσωματίδια δείχνουν μια πιο αποτελεσματική φωτοθερμική ικανότητα όταν βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη από ότι όταν ενσωματώνονται. Ακόμη, μερικά νανοσωματίδια δεν είναι τοξικά σε χαμηλές συγκεντρώσεις, αλλά όταν ο χρόνος επώασης ή η συκέντρωση αυξάνεται, δείχνουν ένα βαθμό τοξικότητας. Επιπλέον, οι υψηλές συγκεντρώσεις νανοσωματιδίων αυξάνουν

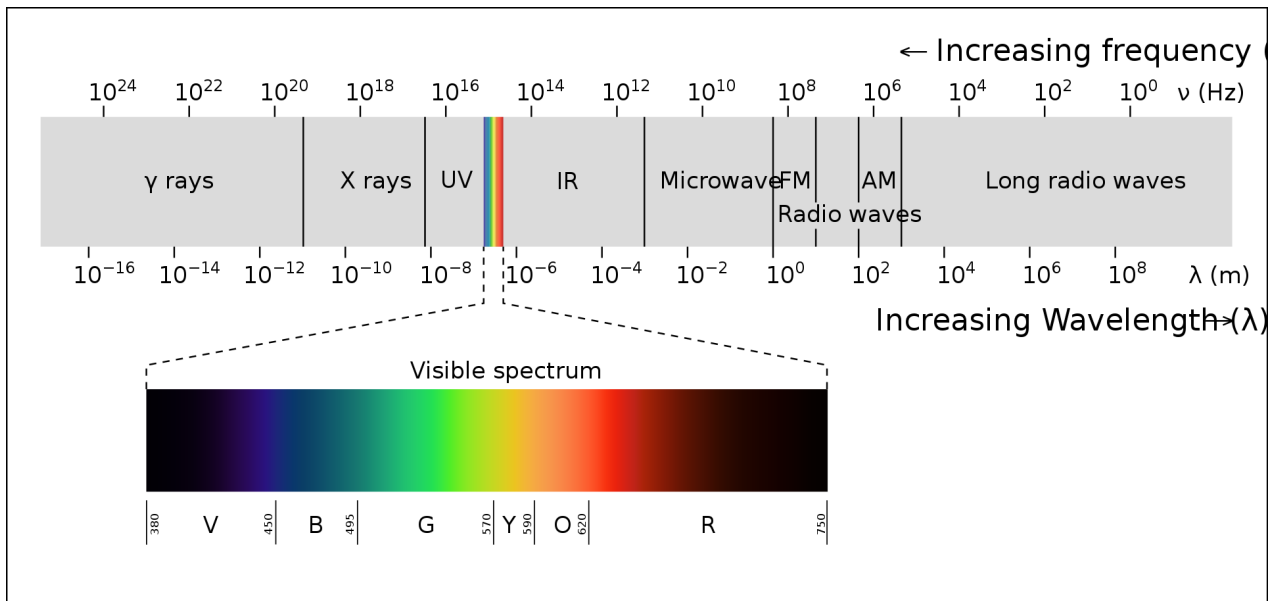
την πιθανότητα συσσωμάτωσης και αυτό θεωρείται ως ένα κρίσιμο σημείο, καθώς οι οπτικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων επιδεινώνονται έντονα από την παρουσία συσσωμάτωσης (Zhao & al.,2009).

Κεφάλαιο 2 : Ιοντίζουσες Ακτινοβολίες

2.1 Η Φυσική της Ιοντίζουσας Ακτινοβολίας

Ακτινοβολία είναι εκπομπή ενέργειας με τη μορφή κυμάτων ή σωματιδίων, η οποία μπορεί να διαδοθεί στο κενό και στην ύλη. Χωρίζεται σε δύο κυρίους τύπους, τις ιοντίζουσες ακτινοβολίες (IR, ionizing radiation) και τις μη ιοντίζουσες ακτινοβολίες (NIR, non-ionizing radiation). Μη ιοντίζουσες ακτινοβολίες (NIR) καλούμε συνήθως την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία με μικρή σχετικά ενέργεια φωτονίων, όπως είναι η ορατή ακτινοβολία, η υπέρυθρη, η υπεριώδης (κατά το μεγαλύτερο μέρος), τα ραδιοκύματα, και σε σύγκριση με άλλες μορφές ακτινοβολίας (ακτίνες γάμμα ή ακτίνων X), οι NIR έχουν χαμηλότερες συχνότητες και κατά συνέπεια μεγαλύτερο μήκος κύματος (IRPA, 1998). Οι μη ιοντίζουσες ακτινοβολίες δεν είναι διεισδυτικές και δεν είναι ικανές να προκαλέσουν ατομικό ή μοριακό ιοντισμό, αλλά είναι ικανές να προκαλέσουν ηλεκτρικές, θερμικές ή χημικές επιδράσεις στα κύτταρα, άλλοτε ευεργετικές και άλλοτε επιβλαβείς για τη λειτουργία τους. Ο ιοντισμός του ατόμου προκύπτει συνήθως με «βίαιη» απομάκρυνση ενός ή περισσοτέρων ηλεκτρονίων, από τις ηλεκτρονιακές στιβάδες του ατόμου, με αποτέλεσμα την παραγωγή ιόντων και φωτονίων. Τα ιόντα και τα φωτόνια αυτά, οφείλονται αφενός στα ηλεκτρόνια που απομακρύνθηκαν από το άτομο και αφετέρου στην έλλειψη ηλεκτρονίων από τις κενές θέσεις που δημιουργήθηκαν στα άτομα που απέμειναν μετά την αλληλεπίδραση. Για να μπορέσει να επιτευχθεί αυτό, απαιτείται ενέργεια η οποία προσδίδεται στο άτομο από κάποιο εξωτερικό αίτιο, π.χ. πρόσπτωση ακτινοβολίας ή κάποιο φορτισμένο σωματίδιο. Η ενέργεια αυτή, πρέπει προφανώς να είναι μεγαλύτερη από την ενέργεια σύνδεσης του ηλεκτρονίου στις στιβάδες του ατόμου. Η τιμή της ενέργειας σύνδεσης εξαρτάται από το ίδιο το άτομο και τη στιβάδα στην οποία είναι συνδεδεμένο το ηλεκτρόνιο. Μεταξύ των αιτιών που μπορούν να προκαλέσουν ιοντισμό, όπως προαναφερθήκαμε, είναι και οι ακτινοβολίες υψηλής ενέργειας και για αυτό αποκαλούνται ιοντίζουσες ακτινοβολίες. Ιοντίζουσες ακτινοβολίες ονομάζουμε λοιπόν τις ακτινοβολίες που έχουν αρκετά μεγάλη ενέργεια, ώστε να μπορούν να ιοντίσουν την ύλη. Χωρίζονται στις ηλεκτρομαγνητικές και τις σωματιδιακές και μπορούν να διεισδύουν στην ύλη. Αντίθετα με τις NIR, έχουν χαμηλότερα μήκη κύματος και υψηλότερες συχνότητες, είναι πιο ισχυρές και πιο διεισδυτικές (Alpen, 1997).

Πιο συγκεκριμένα, η ιοντίζουσα ακτινοβολία μπορεί να μεταφέρει αρκετή ενέργεια για να απελευθερώσει ηλεκτρόνια από άτομα ή μόρια, προκαλώντας τους ιοντισμό. Αποτελείται από ενεργητικά υποατομικά σωματίδια, ιόντα ή άτομα που κινούνται με υψηλές ταχύτητες, και ηλεκτρομαγνητικά κύματα στο φάσμα των υψηλών ενεργειών. Είδη ιοντίζουσας ακτινοβολίας είναι οι ακτίνες-γ, οι ακτίνες X, καθώς και σωματίδια άλφα, βήτα, πρωτόνια και νετρόνια. Οι κοσμικές ακτίνες και η διάσπαση των ραδιενεργών ισότοπων είναι οι κύριες πηγές φυσικής ιοντίζουσας ακτινοβολίας στη Γη, που πολλές φορές αναφέρονται και ως ακτινοβολία υποβάθρου. Στο διάστημα, οι φυσικές εκπομπές θερμικής ακτινοβολίας από την ύλη σε εξαιρετικά υψηλές θερμοκρασίες, μπορεί να είναι ιοντίζουσες. Η ιοντίζουσα ακτινοβολία μπορεί να παραχθεί ακόμα και από την επιτάχυνση φορτισμένων σωματιδίων από φυσικά ηλεκτρομαγνητικά πεδία. Μπορεί επίσης να δημιουργηθεί τεχνητά χρησιμοποιώντας σωλήνες ακτίνων X, επιταχυντές σωματιδίων και οποιαδήποτε από τις διάφορες μεθόδους που παράγουν τεχνητά ραδιοϊσότοπα. Εφαρμόζεται επικοινωνιακά σε ένα ευρύ φάσμα τομέων, όπως η ιατρική, η έρευνα, αλλά παρουσιάζει κίνδυνο για την υγεία, εάν δεν λαμβάνονται κατάλληλα μέτρα κατά της ανεπιθύμητης έκθεσης. Η έκθεση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία προκαλεί βλάβη σε ζωντανούς ιστούς, και μπορεί να οδηγήσει σε μεταλλάξεις, σε ασθένειες που οφείλονται στην ακτινοβολία, σε καρκίνο, και στο θάνατο (Alpen, 1997).



Εικόνα 2.1 Φάσμα ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας

Τα φωτόνια είναι ηλεκτρικά ουδέτερα, μπορούν να ιοντίζουν άτομα συνήθως απευθείας μέσω του φωτοηλεκτρικού φαινομένου και του φαινομένου Compton. Οποιαδήποτε από τις δύο αλληλεπιδράσεις, θα προκαλέσει την εκτίναξη ενός ηλεκτρονίου από ένα άτομο σε σχετικιστικές ταχύτητες, μετατρέποντας αυτό το ηλεκτρόνιο σε ένα σωματίδιο βήτα (δευτερεύον σωματίδιο βήτα), που θα ιοντίσει πολλά άλλα κοντινά άτομα. Δεδομένου ότι τα περισσότερα από τα επηρεαζόμενα άτομα ιοντίζονται άμεσα από τα δευτερεύοντα σωματίδια βήτα, τα φωτόνια αποτελούν έμμεση ιοντίζουσα ακτινοβολία. Η ακτινοβολία φωτονίων ονομάζεται ακτίνες γάμμα εάν παράγεται από μια πυρηνική αντίδραση, από διάσπαση υποατομικών σωματιδίων, ή ραδιενεργό διάσπαση στο εσωτερικό του πυρήνα. Αλλιώς ονομάζεται ακτίνες X που παράγονται έξω από τον πυρήνα. Ο γενικός όρος «ακτινοβολία φωτονίων» επομένως χρησιμοποιείται για να περιγράψει και τις δύο. Οι σύγχρονες τεχνολογίες και ανακαλύψεις οδήγησαν σε μια επικάλυψη μεταξύ ενεργειών των ακτίνων X και των ακτίνων γάμμα. Σε πολλούς τομείς έχουν την ίδια λειτουργία, διαφέροντας μόνο στην προέλευση της ακτινοβολίας. Στην αστρονομία, εν τούτοις, όπου η προέλευση της ακτινοβολίας συχνά δεν είναι δυνατόν να προσδιοριστεί με αξιοπιστία, ο παλαιότερος συμβατικός διαχωρισμός έχει διατηρηθεί, με τις ακτίνες X να ορίζονται μεταξύ περίπου 120 eV και 120 keV και τις ακτίνες γάμμα ως οποιαδήποτε ενέργεια άνω των 100 έως 120 keV, ανεξάρτητα από την πηγή.

2.2 Ακτίνες γ & X

Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία (ΗΜΑ) δεν έχει μάζα, δε μεταφέρει ηλεκτρικό φορτίο, δεν επηρεάζεται από ηλεκτρικά ή μαγνητικά πεδία και έχει σταθερή ταχύτητα (μεταβάλλεται εν μέρει αν αλλάξει το υλικό μέσο). Επίσης διαδίδεται στο κενό και σε υλικά σώματα. Η πορεία της είναι ευθύγραμμη, μπορεί όμως να σκεδαστεί, όταν αλληλεπιδράσει με την ύλη. Η αλληλεπίδραση ΗΜΑ και ύλης γίνεται είτε μέσω απορρόφησης (εναπόθεση ενέργειας), είτε μέσω σκέδασης (αλλαγή πορείας). Χαρακτηρίζεται από το μήκος κύματος λ , τη συχνότητα ν και την ενέργεια E . Η ακτινοβολία γ είναι ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία (φωτόνια) υψηλής ενέργειας, που συνοδεύει τις ραδιενεργές διασπάσεις των πυρήνων. Η διέλευση της μέσα από τα πλέγματα των ατόμων της ύλης, και η πιθανότητά της να αλληλεπιδράσει με τα ηλεκτρόνια, ή τους πυρήνες, των ατόμων είναι σχετικά μικρή. Συνεπώς είναι διεισδυτική ακτινοβολία χαμηλού LET και αποκόπτεται δύσκολα. Συνήθως, για την προστασία μας από αυτήν κατά τις ιατρικές και βιομηχανικές εφαρμογές,

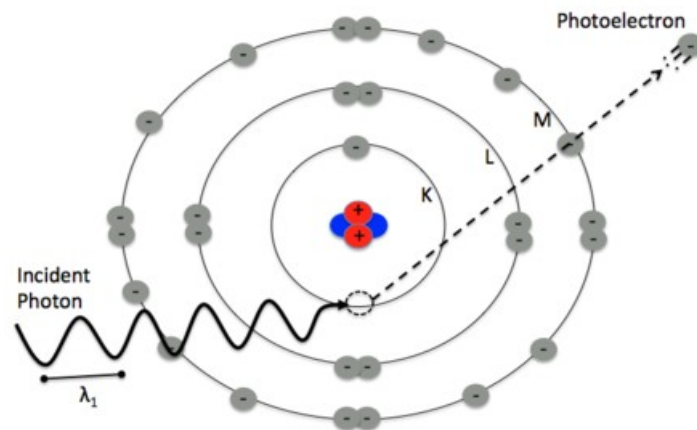
χρησιμοποιείται ασπίδα από μόλυβδο ή σκυρόδεμα, το πάχος της οποίας πρέπει να εξαρτάται από την ενέργεια και την ένταση της ακτινοβολίας.

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

2.3 Αλληλεπίδραση Ιοντίζουσας Ακτινοβολίας με την Ύλη

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

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

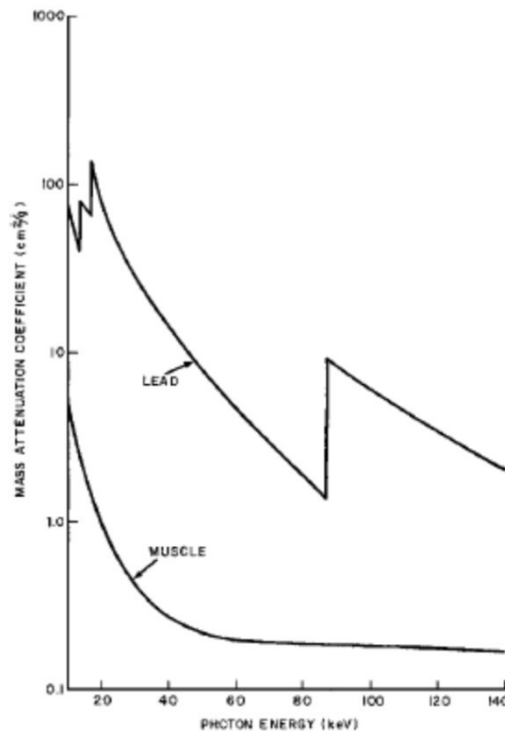


Εικόνα 2.2 : Φωτοηλεκτρικό φαινόμενο, το φωτόνιο απορροφάται από ηλεκτρόνιο κάποιας στιβάδας του ατόμου και το ιοντίζει (εκπομπή φωτοηλεκτρονίου) από την αναδιάταξη των ηλεκτρονίων εκπέμπονται φωτόνια

Η κενή θέση του εκπεμπόμενου ηλεκτρονίου (μένει ιοντισμένο το άτομο) συμπληρώνεται από εξωτερικότερο ηλεκτρόνιο με μικρότερη βέβαια ενέργεια σύνδεσης. Η δεύτερη κενή θέση, με τη σειρά της, θα συμπληρωθεί με άλλο ακόμη εξωτερικότερο ηλεκτρόνιο κ.ο.κ. Οι μεταπτώσεις των ηλεκτρονίων συνοδεύονται από εκπομπή ενέργειας (τα εξωτερικότερα ηλεκτρόνια έχουν μικρότερη ενέργεια σύνδεσης από τα εσωτερικότερα) είτε με τη μορφή χαρακτηριστικής ακτινοβολίας X, είτε με κινητική ενέργεια εκπεμπόμενων ηλεκτρονίων Auger. Η πιθανότητα εκπομπής χαρακτηριστικής ακτινοβολίας X μειώνεται όσο μικραίνει ο ατομικός αριθμός του υλικού και συνήθως δε συμβαίνει κατά την αλληλεπίδραση φωτονίων – μαλακών ιστών στις συνθήκες διαγνωστικής ακτινολογίας. Η πιθανότητα φωτοηλεκτρικής απορρόφησης ανά μονάδα μάζας είναι ανάλογη του Z^3/E^3 , όπου Z ο ατομικός αριθμός του υλικού και E η ενέργεια του προσπίπτοντος φωτονίου. Το πλεονέκτημα της φωτοηλεκτρικής απορρόφησης στην απεικόνιση της ακτινοδιαγνωστικής είναι ότι δε δημιουργούνται δευτερογενή φωτόνια που θα μείωναν την ποιότητα της εικόνας. Το γεγονός πάντως ότι η πιθανότητα φωτοηλεκτρικού φαινομένου είναι αντιστρόφως ανάλογη της ενέργειας

των φωτονίων στην τρίτη δύναμη, εξηγεί, εν μέρει, το ότι η αντίθεση (contrast) της εικόνας μειώνεται κατά την απεικόνιση, όταν χρησιμοποιούνται προσπίπτοντα φωτόνια μεγαλύτερης ενέργειας. Διπλασιασμός της ενέργειας των φωτονίων μειώνει οκτώ φορές την πιθανότητα να συμβεί φωτοηλεκτρική απορρόφηση. Παρόλο που γενικά η πιθανότητα φωτοηλεκτρικού φαινομένου μειώνεται με αύξηση της ενέργειας των φωτονίων, υπάρχει μια εξαίρεση.

Για κάθε στοιχείο, ή υλικό, η γραφική παράσταση του μαζικού συντελεστή εξασθένησης (mass attenuation coefficient) ως συνάρτηση της ενέργειας των φωτονίων, παρουσιάζει σημεία ξαφνικής ασυνέχειας που καλούνται κορυφές απορρόφησης και οδηγούν τη γραφική παράσταση να λαμβάνει ένα πριονωτό σχήμα.



Εικόνα 2.3 : Απεικόνιση εξάρτησης του φωτοηλεκτρικού φαινομένου από την ενέργεια του φωτονίου

Όπως ήδη αναφέρθηκε, ένα φωτόνιο δεν μπορεί να απορροφηθεί με φωτοηλεκτρικό φαινόμενο από ένα άτομο, αν η ενέργεια του φωτονίου είναι έστω λίγο μικρότερη από τη ενέργεια σύνδεσης του ηλεκτρονίου στο άτομο. Η ενέργεια του φωτονίου που αντιστοιχεί σε κορυφή απορρόφησης είναι ακριβώς ίση με τη ενέργεια σύνδεσης ηλεκτρονίου της συγκεκριμένης στιβάδας, ή υποστιβάδας, του υλικού, στο οποίο έγινε η πρόσπτωση. Με τη σημερινή τεχνολογία, η φωτοηλεκτρική απορρόφηση επικρατεί στις περισσότερες εφαρμογές της απεικονιστικής διαγνωστικής ακτινολογίας (χαμηλής ενέργειας φωτόνια προσπίπτοντα σε υλικά υψηλού ατομικού αριθμού) (φθορίζουσες οθόνες, σκιαγραφικά υλικά, αλληλεπίδραση φωτονίων με οστά). Αντίθετα η σκέδαση Compton, στο ίδιο περιβάλλον, επικρατεί στην αλληλεπίδραση των ίδιων φωτονίων με μαλακούς ιστούς και αέρα.

Επιπλέον, παρατηρούμε και το φαινόμενο Auger κατά το οποίο το φωτόνιο που έχει εκπεμφθεί από την αντικατάσταση του κενού, που είχε δημιουργηθεί από το φωτοηλεκτρονικό φαινόμενο, μπορεί να απορροφηθεί από κάποιο άλλο ηλεκτρόνιο του ίδιου ατόμου. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός νέου φωτοηλεκτρονίου αφήνοντας ένα νέο κενό. Το νέο αυτό φωτοηλεκτρόνιο ονομάζεται ηλεκτρόνιο Auger. Το αρχικό κενό αντικαθίσταται από δύο κενά. Τα καινούρια κενά που δημιουργήθηκαν, καλύπτονται από μεταπτώσεις ηλεκτρονίων από φλοιούς οι οποίοι είναι

μεγαλύτεροι μέχρι το άτομο που έχει ιοντιστεί, να βρεθεί στην κατάσταση όπου δεν θα μπορέσουν να πραγματοποιηθούν άλλες μεταπτώσεις.

Η σκέδαση Compton αποτελεί αλληλεπίδραση ενός φωτονίου ενέργειας E και ενός ελεύθερου ηλεκτρονίου. Η σκέδαση Compton αποτελεί εκδήλωση της σωματιδιακής φύσης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Το φωτόνιο σκεδάζεται στο ηλεκτρόνιο αποδίδοντας του κινητική ενέργεια, T_e , και μεταφέρει το υπόλοιπο της ενέργειας, E_{sc} , σε διεύθυνση που σχηματίζει γωνία θ με την αρχική διεύθυνση διάδοσης του (Γεωργίου, 2013). Από την αρχή διατήρησης της ενέργειας και ορμής προκύπτουν οι παρακάτω σχέσεις της ενέργειας μετά τη σκέδαση του φωτονίου και του ηλεκτρονίου αντίστοιχα, όπου $m_e c^2 = 0.511 \text{ MeV}$ είναι η ενέργεια ηρεμίας του ηλεκτρονίου.

$$E_{sc} = E \left(\frac{1}{\left(\frac{E}{m_e c^2} \right) (1 - \cos \theta)} \right)$$

$$T_e = E - E_{sc} = E \left(\frac{\left(\frac{E}{m_e c^2} \right) (1 - \cos \theta)}{1 + \left(\frac{E}{m_e c^2} \right) (1 - \cos \theta)} \right)$$

Η δίδυμη γένεση αποτελεί αλληλεπίδραση μεταξύ ενός φωτονίου και του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου του πυρήνα ενός ατόμου που έχει ως αποτέλεσμα την απορρόφηση του φωτονίου και τη μετατροπή της ενέργειας του σε ένα ηλεκτρόνιο και ένα ποζιτρόνιο. Η δίδυμος γένεση αποτελεί λοιπόν ένα παράδειγμα μετατροπής ενέργειας σε μάζα και είναι η αντίστροφη διαδικασία της εξαΰλωσης ποζιτρονίου με ηλεκτρόνιο. Η δίδυμος γένεση αποτελεί σκέδαση του φωτονίου από τον πυρήνα και ο πυρήνας αποκτά ορμή και ενέργεια ανάκρουσης, που μπορεί όμως να θεωρηθεί και αμελητέα εξαιτίας της μεγάλης του μάζας (Γεωργίου, 2013). Σύμφωνα με την αρχή διατήρησης της ενέργειας E , η ενέργεια του φωτονίου θα ισούται σύμφωνα με τη σχέση:

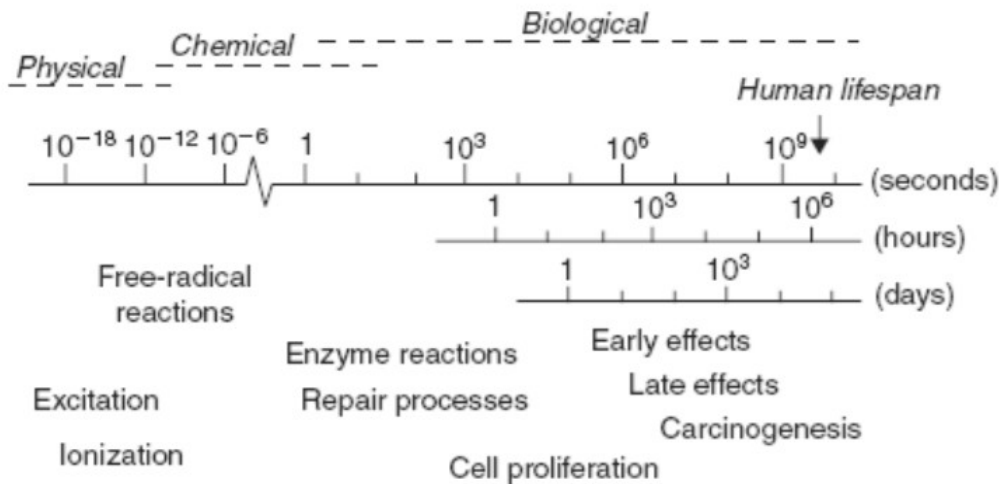
$$E = 2m_e c^2 + T_{e^-} + T_{e^+} \leftrightarrow E - 2m_e c^2 = T_{e^-} + T_{e^+}$$

Από την άνωθεν σχέση συμπεραίνουμε ότι υπάρχει ένα ενεργειακό κατώφλι για να συμβεί η δίδυμη γένεση. Το ενεργειακό κατώφλι είναι ότι η ενέργεια του φωτονίου πρέπει να είναι τουλάχιστον ίση με $2m_e c^2 = 1,02 \text{ MeV}$.

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

2.4 Αλληλεπίδραση Βιολογικής Ύλης & Ακτινοβολίας

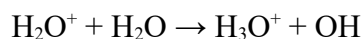
Η ιοντίζουσα ακτινοβολία μπορεί να θεωρηθεί επικίνδυνη, επειδή μεταφέρει μεγάλη ενέργεια, μεγαλύτερη από 10 eV, ικανή να εισχωρήσει στην ύλη, να διασπάσει βίαια χημικούς δεσμούς και να προκαλέσει βιολογικές βλάβες σε ζωντανούς οργανισμούς. Όταν η ακτινοβολία προκαλεί ιοντισμό σε ένα βιολογικό υλικό, π.χ. στο κυτταρόπλασμα ή στον πυρήνα ενός κυττάρου, το αποτέλεσμα είναι η ρήξη ενός χημικού δεσμού, δηλαδή η καταστροφή ενός μορίου, με σύνηθες επακόλουθο την παραγωγή δραστικών ελεύθερων ριζών. Τα αποτελέσματα της ακτινοβολήσης ενός βιολογικού συστήματος διαφέρουν σε μεγάλο βαθμό σε συνάρτηση με τη χρονική κλίμακα. Συνηθίζουμε να χωρίζουμε τις διάφορες διαδικασίες σε τρεις βασικές φάσεις: τη φυσική, τη χημική και τη βιολογική φάση.



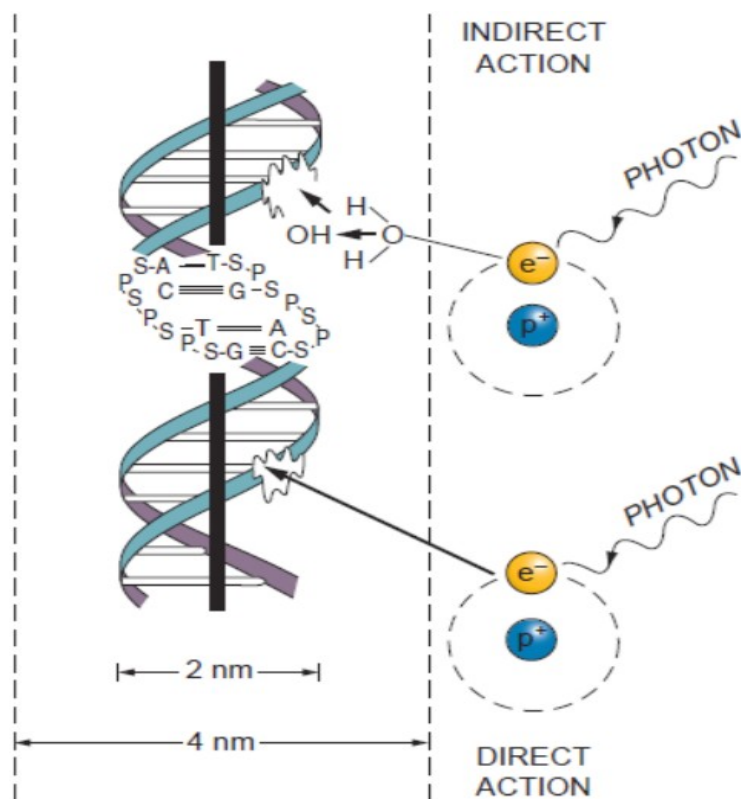
Εικόνα 2.4 : Απεικόνιση χρονικής κλίμακας των αποτελεσμάτων ακτινοβολίας πάνω σε βιολογικούς ιστούς.

Στο φυσικό στάδιο, η μεταφορά ενέργειας πραγματοποιείται σε χρόνο μικρότερο των 10^{-18} s αλλά η κατανομή της στον χώρο εξαρτάται από το είδος και την ενέργεια της ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Αν η τιμή της LET (Linear Energy Transfer - $LET = dE/dx$) είναι χαμηλή, τότε η ακτινοβολία (π.χ φωτόνια ή ηλεκτρόνια) προκαλεί μικρό αριθμό ιοντισμών και διεγέρσεων ανά μm διαδρομής. Αντιθέτως για ακτινοβολίες με υψηλή LET (σωματίδια α, πρωτόνια ή βαρέα ιόντα) παρατηρούνται πυκνοί ιοντισμοί ανά μm διαδρομής. Η ενέργεια που μεταφέρεται σε ένα μικρού όγκου βιολογικό υλικό, δεν είναι η ίδια για όλους τους στόχους και τα μόρια που το αποτελούν. Η μέση τιμή της ενέργειας που μεταφέρεται στο βιολογικό υλικό είναι η απορροφούμενη δόση. Στην ακτινοβολία χαμηλής LET ανήκουν τα φωτόνια, δηλαδή οι ακτίνες X και γ, τα σωματίδια α και β, καθώς και τα πρωτόνια. Η ακτινοβολία υψηλής LET χαρακτηρίζεται από πυκνούς ιοντισμούς και η βιολογική βλάβη που προκαλεί είναι μεγαλύτερη. Αυτό οφείλεται στην άμεση δράση της στις ευαίσθητες θέσεις του κυττάρου, αλλά και στην παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2). Στην ακτινοβολία υψηλής LET ανήκουν τα νετρόνια, τα π μεσόνια και τα βαρέα ιόντα.

Εν συνεχεία βρίσκεται το χημικό στάδιο κατά το οποίο τα άτομα του βιολογικού υλικού ακτινοβλήθηκαν και τα συστατικά των κυττάρων αντιδρούν με ταχείες χημικές αντιδράσεις. Η απορρόφηση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας από τα βιολογικά υλικά δημιουργεί ιοντισμούς και διεγέρσεις με αποτέλεσμα τη δημιουργία ορισμένων σχηματισμών που ονομάζονται ελεύθερες ρίζες. Ως ελεύθερη ρίζα (free radical) ορίζεται το εξωτερικό τροχιακό που δεν καταλαμβάνεται από ζεύγος ηλεκτρονίων (valence electron pair), αλλά από ένα μόνο ηλεκτρόνιο (μονήρες ηλεκτρόνιο).



Οι ελεύθερες ρίζες είναι άτομα ή μόρια συνήθως ηλεκτρικά ουδέτερα, με ίσους αριθμούς πρωτονίων και ηλεκτρονίων, αλλά ένα ηλεκτρόνιο της εξωτερικής στιβάδας δεν σχηματίζει ζεύγος (ασύζευκτο ηλεκτρόνιο), με αποτέλεσμα οι ελεύθερες ρίζες να είναι εξαιρετικά χημικώς δραστικές. Επειδή το μόριο που κυριαρχεί ποσοτικά στα βιολογικά υλικά είναι αυτό του ύδατος, είναι αυτό που κυρίως δέχεται την επίδραση της ακτινοβολίας (Γεωργακίλας, 2020)

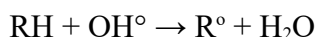


Εικόνα 2.5 : Σχηματική αναπαράσταση της δομής του DNA που έχει υποστεί την έμμεση ή άμεση δράση ιοντίζουσας ακτινοβολίας.

Συνοπτικά, η ραδιόλυση του ύδατος περιγράφεται από την εξίσωση:



Οι ελεύθερες ρίζες OH° , είναι ασταθείς, συνήθως χωρίς φορτίο και εξαιρετικά δραστικές, γι' αυτό και η εμβέλεια τους είναι μικρότερη από 100 Angstrom. Εάν ένα οργανικό μόριο, RH (π.χ. DNA), βρεθεί μέσα στην τροχιά των ελευθέρων ριζών, θα συμβούν αντιδράσεις της μορφής:



θα παραχθούν δηλαδή οργανικές ρίζες R° , που ως ασταθείς και με υψηλό ενεργειακό περιεχόμενο, θα μετασηματιστούν γρήγορα προκαλώντας μεταβολή-βλάβη στη δομή του οργανικού μορίου (Γεωργακίλας, 2020).

Επιπλέον, η ρήξη των μοριακών δεσμών προκαλεί άμεση βιολογική βλάβη, διότι καταστρέφει κάποιο μόριο ωφέλιμο για τη ζωή ή τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου. Οι δραστικές ελεύθερες

ρίζες που παράγονται από τη διάσπαση του μορίου, θα προκαλέσουν πρόσθετη, έμμεση βλάβη, ενώ καθώς επιτεθούν σε ωφέλιμα μόρια, θα τα καταστρέψουν και θα δημιουργήσουν άχρηστες ή βλαβερές για το κύτταρο χημικές ενώσεις. Ιδιαίτερη σημασία για τη ζωή και την αναπαραγωγή του κυττάρου έχουν οι βλάβες εκείνες που προκαλούνται στο γενετικό του υλικό, διότι αυτές συνδέονται τόσο με τη μεταβίβαση κληρονομικών ανωμαλιών στους απογόνους, όσο και με τη διαδικασία της καρκινογένεσης.

2.5 Βιολογικά Αποτελέσματα της Αλληλεπίδρασης Ύλης & Ακτινοβολίας

Ο άνθρωπος, κατά τη διάρκεια της ζωής του, δέχεται συνεχώς ενέργεια με τη μορφή ακτινοβολίας, τόσο από το φυσικό του περιβάλλον όσον και από τεχνητές πηγές. Η ακτινοβολία αυτή επιδρά πάνω του κατά τρόπο πολύπλοκο, εξαρτώμενο από το είδος της, την έντασή της και την ενέργεια που μεταφέρει. Οι ionτίζουσες ακτινοβολίες προκαλούν ποικιλία βιολογικών αποτελεσμάτων στους έμβιους οργανισμούς (Nikjoo & al., 2012). Τα φορτισμένα σωματίδια α και β προκαλούν διέγερση και ionτισμό των μορίων της ύλης. Επειδή η εμβέλεια των σωματίων α στη βιολογική ύλη είναι μικρότερη από $1/10$ mm, η πυκνότητα ionτισμού στις μικρές αυτές διαστάσεις θα είναι πολύ μεγάλη. Η εμβέλεια των σωματίων β στη βιολογική ύλη είναι πολύ μεγαλύτερη (μερικά cm ανάλογα με την ενέργεια) και, επομένως, η πυκνότητα ionτισμού που επιφέρουν, πολύ μικρότερη. Ειδικά ο ionτισμός της οργανικής ύλης προκαλεί μεταβολές, έστω και παροδικές, στα άτομα και τα μόρια των χημικών ενώσεων, με αποτέλεσμα τη συνήθη εμφάνιση βλαβών στα κύτταρα -και κατά προέκταση στο σύνολο του οργανισμού-, οι οποίες, αν δεν επιδιορθωθούν, οδηγούν στην τροποποίηση των κυττάρων, στην αναστολή της αναπαραγωγικής τους ικανότητας, ή στη χειρότερη περίπτωση, στη θανάτωσή τους. Ο ευαίσθητος στόχος που προκαλεί την αυξημένη ευπάθεια της ζώσας ύλης στις ionτίζουσες ακτινοβολίες, είναι το DNA. Έτσι είναι σημαντικό να αναλύσουμε την αλληλεπίδραση ακτινοβολίας – βιολογικής ύλης μικροσκοπικά, δηλαδή σε κυτταρικό επίπεδο. Οι δύο επικρατέστερες παράλληλες θεωρίες για την ερμηνεία της δράσης της ionτίζουσας ακτινοβολίας στο DNA είναι, είτε με άμεση δράση, όπου οι βλάβες μπορεί να προκληθούν απευθείας από την απορρόφηση της ακτινοβολίας, είτε με έμμεση δράση, κατά την οποία οι βλάβες οφείλονται στη δράση των ελεύθερων ριζών που παράγονται κατά το χημικό στάδιο. Μικροσκοπικά, οι δραστικές ελεύθερες ρίζες, που δημιουργήθηκαν κατά το χημικό στάδιο, επιτίθενται στη φυσιολογική αλυσίδα του DNA και προκαλούν θραύσεις. Διακρίνουμε δύο κατηγορίες θραύσεως, το μονό σπάσιμο της έλικας (SSB, single strand break) και το διπλό σπάσιμο έλικας (DSB, Double strand break). Η βασικότερη εξ αυτών και μάλιστα οι βλάβες του τύπου DSB είναι αυτές που σχετίζονται κατεξοχήν με το θάνατο του κυττάρου, καθώς είναι αυτές που συνήθως δεν επιδέχονται επιδιόρθωσης (Γεωργακίλας, 2020).

Από τους διάφορους τύπους βλάβης του DNA που συμβαίνουν στα κύτταρα όπως προαναφέρθηκε, η πιο κοινή είναι η θραύση ενός κλώνου DNA (SSB), με συχνότητα δεκάδων χιλιάδων ανά κύτταρο ανά ημέρα από άμεση επίθεση από ενδοκυτταρικούς μεταβολίτες και από ξαφνικές διασπάσεις του DNA. Το σπάσιμο αυτό δημιουργείται όταν υπάρξει ρήξη του φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ της δεσοξυριβόζης και της φωσφορικής ομάδας του κλώνου του DNA. Ωστόσο, η πιο συχνά παρατηρούμενη βλάβη από ionτίζουσα ακτινοβολία είναι η δίκλωνη θραύση (DSB), η οποία αποτελείται από δύο μονόκλωνες θραύσεις στους δύο κλώνους του μορίου. Στο σημείο όπου λαμβάνει χώρα η δίκλωνη θραύση ενδέχεται να υπάρξει απώλεια μιας ή περισσότερων βάσεων σε κάθε κλώνο του DNA. Αν η θραύση κάθε κλώνου είναι ακριβώς απέναντι από την άλλη, τότε έχουμε απώλεια πληροφορίας ενός ζεύγους βάσεων από το γονίδιο που κωδικοποιείται σε αυτό το σημείο του DNA και σε περίπτωση αδυναμίας επιδιόρθωσης μπορεί να υπάρξει μετάλλαξη. Σε περίπτωση που οι θραύσεις είναι μετατοπισμένες στους δύο κλώνους, είναι πιο πιθανή η ακριβής επιδιόρθωση και δεν χάνεται η πληροφορία του γονιδίου. Η επιδιόρθωση όμως απαιτεί την προσθήκη ενός μικρού αριθμού (συνήθως 1-3 έπειτα από βλάβη από ionτίζουσα ακτινοβολία) δεσοξυριβονουκλεοτιδίων στο τμήμα που έχει υποστεί θραύση. Ενώ σε περίπτωση που αυτή η προσθήκη μετατοπίσει τη σύνθεση πέραν του σημείου από όπου έχει χαθεί μία βάση

στον αντίθετο κλώνο, θα υπάρξει πάλι απώλεια πληροφορίας. Μόνο αν οι θραύσεις είναι αρκετά μακριά μπορούν να αντιμετωπιστούν ως μονόκλωνες θραύσεις και να επιδιορθωθούν ευκολότερα. Παράλληλα, ενώ οι βλάβες που αφορούν μόνο τον ένα κλώνο δεν είναι τόσο βιολογικά σημαντικές, οι δίκλωνες βλάβες δημιουργούν σημαντικότερο πρόβλημα διότι δεν υπάρχει πάντα ένα υγιές και άθικτο πρότυπο, πάνω στο οποίο θα μπορούσε να στηριχτεί η αντιγραφή προς επιδιόρθωση. Ωστόσο, αν δεν επιδιορθωθούν επαρκώς κυρίως οι DSBs, μπορεί να οδηγήσουν σε μεταλλάξεις ή και κυτταρικό θάνατο. Με τον όρο μετάλλαξη περιγράφουμε τις δομικές μεταβολές που υφίσταται το μόριο του DNA υπό την επίδραση βιολογικών, χημικών και φυσικών παραγόντων. Οι μεταλλάξεις του DNA μπορεί να είναι είτε ενδογενείς (αυτογενείς/αυθόρμητες), είτε εξωγενείς και οι τύποι τους ποικίλουν ανάλογα με την αιτία που τις προκαλεί. Επιπλέον, η μη επιδιόρθωση τέτοιου είδους βλαβών θέτουν σε κίνδυνο την αντιγραφή και μεταγραφή του προβληματικού DNA, οδηγώντας τελικά σε κακρινογένεση.

Από την άλλη μεριά, υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί επιδιόρθωσης των προαναφερόμενων βλαβών. Ένας από αυτούς είναι ο MMR (mismatch repair) που διορθώνει τα λεγόμενα λάθη τοποθέτησης ενός νουκλεοτιδίου ή τα λάθη που εμφανίζονται κατά την αντιγραφή του DNA, ενώ ένας άλλος τρόπος είναι το NER (nucleotide excision repair) που διορθώνει βλάβες οι οποίες παραμορφώνουν (bulk lesions) το σχήμα της διπλής έλικος του DNA. Τέλος, υπάρχει και ο BER (base excision repair) που διορθώνει αλλοιώσεις κυρίως μόνο μιας βάσης νουκλεοτιδίου και μονόκλωνες θραύσεις (SSBs). Ο παραπάνω μηχανισμός μας αφορά ιδιαίτερα, καθώς είναι ο κύριος μηχανισμός για ιοντιζουσες ακτινοβολίες και ειδικά για χαμηλές δόσεις (μικρότερες του 1 Gy). Όσον αφορά τις DS θραύσεις, απαιτούν λεπτομερή επιδιόρθωση που μπορεί να επιτευχθεί από δύο ανεξάρτητους αλλά όχι αμοιβαία αποκλειόμενους μηχανισμούς: τη μη ομόλογη ένωση άκρων NHEJ (non-homologous end-joining) ή τον ομόλογο ανασυνδυασμό (homologous recombination-HR) (Γεωργακίλας, 2020).

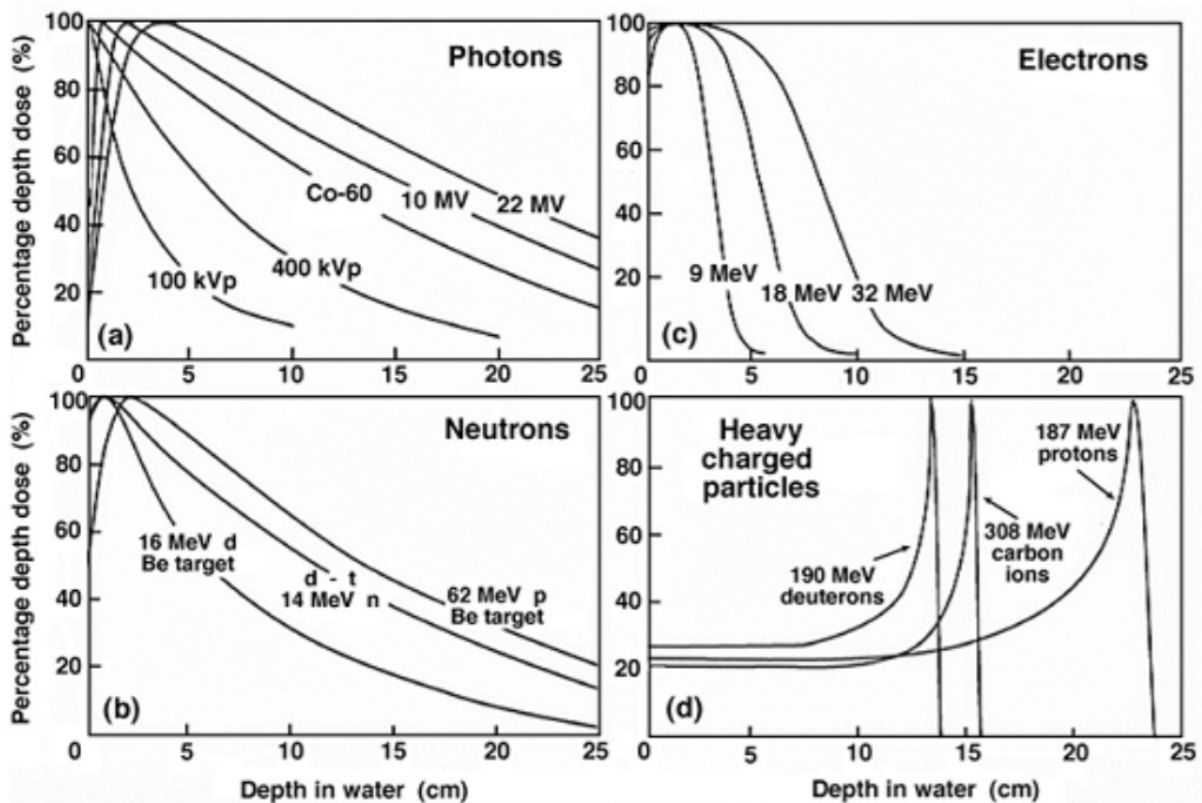
2.6 Εφαρμογές Ιοντιζουσών Ακτινοβολιών στην Ιατρική

Οι εφαρμογές των ιοντιζουσών ακτινοβολιών ποικίλλουν με κύριους τομείς αυτούς της ιατρικής και της βιολογίας. Στην ιατρική, η εφαρμογή τους έρχεται με την ακτινοθεραπεία. Η θεραπευτική χρήση ιοντιζουσών ακτινοβολιών διαπιστώθηκε σχετικά νωρίς καθώς 3 χρόνια μετά την ανακάλυψη των ακτίνων X, χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό την θεραπεία καρκινώματος. Η έντονη έκταση χρήσης τους σήμερα οφείλεται κυρίως στις θεραπευτικές τους ιδιότητες όταν αυτές χορηγηθούν με κατάλληλη δόση με σκοπό τον θάνατο των καρκινικών κυττάρων ενώ με σύγχρονες μεθόδους μπορεί να περιοριστεί η πιθανότητα ακτινοβόλησης υγιών κυττάρων. Επιπλέον, σημαντικό πλεονέκτημα για τη χρήση τους είναι η διαφορετική αντίδραση των υγιών και των καρκινικών κυττάρων σε μια πιθανή ακτινοβόλησή τους καθώς τα δεύτερα είναι πιο ακτινοευαίσθητα με αποτέλεσμα να καταστρέφονται οι βασικές τους λειτουργίες και τελικά να επέρχεται ο καρκινικός τους θάνατος (Μαργαρίτη, 1996).

Ακτινοθεραπεία είναι η επιστήμη, αντικείμενο της οποίας είναι η θεραπεία διαφόρων νόσων με τη χρήση ιοντιζουσών ακτινοβολιών. Η ακτινοθεραπεία είναι, μετά τις χειρουργικές επεμβάσεις, η περισσότερο χρησιμοποιούμενη μέθοδος αντιμετώπισης (θεραπείας) καρκίνου και παρουσιάζει την μεγαλύτερη επιτυχία. Εφαρμόζεται σε μεγάλο ποσοστό των πασχόντων από καρκίνο σήμερα, καθώς και σε πολλές περιπτώσεις καλοήθων όγκων, όπως ακουστικά νευρινώματα, δυσπλασίες, μηνιγγιώματα και άλλα, οι οποίοι δεν μπορούν να χειρουργηθούν, είτε η χειρουργική τους αφαίρεση εγκυμονεί πολλούς κινδύνους. Η ακτινοθεραπεία αποσκοπεί στην εναπόθεση με τη χρήση δέσμης ακτινοβολίας υψηλής ενέργειας (σωματιδιακής ή ηλεκτρομαγνητικής) της μέγιστης δυνατής δόσης στον όγκο-στόχο ώστε να υπάρξει αναστολή της ανάπτυξης του όγκου και της περαιτέρω διαίρεσης των κυττάρων και εντέλει πλήρης καταστροφή τους. Από την άλλη μεριά, οι ακτινοβολούμενοι όγκοι (καρκινικοί ή και καλοήθεις) γειτνιάζουν συνήθως με υγιείς ιστούς οι οποίοι πρέπει να προστατευτούν (κυρίως όσοι είναι ακτινοευαίσθητοι). Τα παραπάνω δημιουργούν

μια σύνθετη κατάσταση όπου αφενός απαιτείται μεγιστοποίηση της εναποτιθέμενης δόσης σε μια περιοχή-στόχο στο σώμα του ασθενούς με σκοπό τον τοπικό έλεγχο της νόσου, αφετέρου δε ελαχιστοποίηση της δόσης σε γειτονικές δομές, έτσι ώστε η πιθανότητα κλινικά σημαντικής βλάβης, λόγω θανάτωσης κυττάρων υγιούς ιστού σε αυτές, να διατηρηθεί σε αποδεκτό επίπεδο. Πολλά είδη ακτινοβολίας έχουν χρησιμοποιηθεί στην Ακτινοθεραπεία με κυριότερα τα φωτόνια, τα ηλεκτρόνια, τα βαρέα σωματίδια (όπως είναι τα πρωτόνια και τα νετρόνια) και τα ελαφρά ιόντα ενώ παράλληλα τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα είδη είναι τα φωτόνια και τα ηλεκτρόνια ενέργειας από 150KeV έως 50 MeV.

Όταν η δέσμη των ακτίνων πέφτει πάνω στον ασθενή, η απορροφούμενη δόση μεταβάλλεται με το βάθος και η μεταβολή αυτή καθορίζεται από τις επί τοις εκατό καμπύλες δόσης βάθους. Συμπεραίνουμε από τα παρακάτω διαγράμματα πως το διαφορετικό βάθος που διεισδύει η εκάστοτε ακτινοβολία είναι αρκετά σημαντικός δείκτης για την λήψη αποφάσεων σχετικά με τη θεραπεία του κάθε ασθενή, πχ για έναν επιφανειακό καρκίνο του δέρματος θα χρησιμοποιηθούν φωτόνια ενώ για έναν όγκο σε μεγάλο βάθος θα χρησιμοποιηθούν πρωτόνια ή άλλα βαρύτερα σωματίδια.



Εικόνα 2.6 : Τα παραπάνω διαγράμματα απεικονίζουν τις % καμπύλες δόσης βάθους, για όλες τις δέσμες που χρησιμοποιούμε στην ακτινοθεραπεία. (Φάσλα., 2014)

Παρατηρείται στο πρώτο διάγραμμα πως αν αυξηθεί ενέργεια των φωτονίων, το βάθος που εναποθέτουν το μεγαλύτερο ποσοστό της δόσης αυξάνεται. Εξίσου σημαντικό φαίνεται πως είναι και το ποσοστό της δόσης που δέχονται οι γύρω ιστοί. Το γεγονός πως τα φωτόνια, τα ηλεκτρόνια και τα βαρύτερα φορτισμένα σωματίδια αλληλεπιδρούν διαφορετικά, οδηγεί στην πύαξη διαφορετικών χαρακτηριστικών περιοχών στα παραπάνω διαγράμματα. Όσον αφορά τα φωτόνια, φαίνεται πως οι φύρω ιστοί θα δεχθούν ένα υψηλό ποσοστό της δόσης μερικά εκατοστά πριν αλλά και μετά από την εντοπισμένη περιοχή (περιοχή ακτινοβολήσης). Πιο συγκεκριμένα, πιο μετά από την περιοχή η οποία ακτινοβολείται, φαίνεται πως οι ιστοί που βρίσκονται εκεί αλλά και τα όργανα της γύρω περιοχής επιβαρύνονται αξιοσημείωτα. Αντιθέτως, λόγω ύπαρξης του build-up, οι ιστοί

που βρίσκονται πριν από τον όγκο θα δεχθούν ισχυρή ακτινοβολία όμως όχι περισσότερη από εκείνους που έπονται του καρκινικού όγκου.

Εν συνεχεία, στο γράφημα των ηλεκτρονίων (2^ο γράφημα) παρατηρείται το φαινόμενο της εναπόθεσης της δόσης σε μεγαλύτερο βάθος αλλά και η απότομη κλίση την οποία παίρνει η καμπύλη πιο μετά. Συμπεραίνεται λοιπόν, πως οι ιστοί οι οποίοι βρίσκονται πριν από την περιοχή που ακτινοβολείται, θα δεχθούν υψηλή δόση αλλά έπειτα, μιας και η κλίση είναι απότομη, οι ιστοί/ όργανα μετά τον όγκο δεν θα επιβαρυνθούν τόσο σημαντικά. Χαρακτηριστικό στοιχείο του διαγράμματος αυτού είναι η «ουρά» που βρίσκεται στα δεξιά η οποία δεν βοηθά στην εναπόθεση μεγάλης δόσης για πολλά εκατοστά ακόμα. Συνεπώς, η ιδανικότερη επιλογή για όγκους οι οποίοι βρίσκονται βαθιά είναι τα πρωτόνια και τα βαρύτερα φορτισμένα σωματίδια μιας και επιβαρύνουν κατά το ελάχιστο τους υγιείς ιστούς (Φάσλα., 2014).

Οι συνεχείς εξελίξεις αλλά και πρόοδοι στον τομέα της Ακτινοθεραπείας τα τελευταία χρόνια έχουν οδηγήσει στην βέλτιστη ακρίβεια και οριοθέτηση του καρκινικού όγκου αλλά και στην βελτιστοποίηση της κατανομής των δόσεων. Σε αυτές τις βελτιώσεις, έπαιξε σημαντικό ρόλο η ανάγκη να μειωθεί η δόση που λαμβάνουν οι φυσιολογικοί ιστοί με σκοπό να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος της τοξικότητας και της νοσηρότητας. Οι μερικές από τις νέες τεχνικές ακτινοβολίας είναι η ρυθμιζόμενη ακτινοθεραπεία (IMRT) και η ογκομετρική διαμορφωμένη θεραπεία τόξου (VMAT) (Newbold & al., 2006).

Η τεχνική IMRT (intensity-modulated radiation therapy) ένας τύπος ακτινοθεραπείας υψηλής ακρίβειας που είναι η επόμενη γενιά της 3D conformal ακτινοθεραπείας (3DCRT) (Galvin & al., 2004). Πιο συγκεκριμένα, η τεχνική αυτή αυξάνει την ικανότητα να προσαρμοστεί ο καρκινικός όγκος σε σχήματα άλλων κοίλων όγκων/σχημάτων, πχ όταν ο όγκος βρίσκεται σε μια ευάλωτη δομή όπως αυτή του νωτιαίου μυελού. Οι επιταχυντές των ακτίνων X μπορούν να δώσουν ακριβείς δόσης στους όγκους ή και σε πιο συγκεκριμένες περιοχές γύρω από αυτούς ενώ ταυτόχρονα στο μοτίβο που παρέχεται στον ασθενή, η ακτινοβολία προσδιορίζεται βάση H/Y ώστε να υπάρξει η βέλτιστη προσομοίωση της θεραπείας ή αλλιώς το treatment planning. Επιπλέον, η δόση συμφωνεί με το 3D σχήμα του όγκου ελέγχοντας ή ρυθμίζοντας την ένταση της δέσμης. Επιπλέον, η ένταση της δόσης συνήθως αυξάνεται κοντά στον GTV (Gross Tumor Volume) ενώ παράλληλα η ακτινοβολία των γύρω ιστών μειώνεται ή και αποφεύγεται εντελώς με αποτέλεσμα την καλύτερη στόχευση του όγκου με τις λιγότερες παρενέργειες και τα βέλτιστα αποτελέσματα (Galvin & al., 2004).

Από την άλλη, η τεχνική VMAT (Volumetric Modulated Arc Therapy) εισήχθη το 2007 και θεωρείται εξαιρετικά επιτυχής λόγω των ομοιόμορφων κατανομών δόσης στον καρκινικό όγκο αλλά και στην ελάχιστη δυνατή δόση για τους παρακείμενους ιστούς. Πιο συγκεκριμένα, η τεχνική αυτή τροποποιεί 3 παραμέτρους αυτή της ταχύτητας περιστροφής του gantry, σχήμα του ανοίγματος του MLC και του ρυθμού της δόσης (Teoh & al., 2011). Η VMAT εκπέμπει ακτινοβολία με περιστρεφόμενο gantry (συνήθως περιστρεφόμενα πεδία 360° με ένα ή περισσότερα τόξα), αλλάζοντας όμως το σχήμα και την ταχύτητα της δέσμης χρησιμοποιώντας MLC και ρυθμό δόσης στον γραμμικό επιταχυντή. Ένα από τα βασικότερα πλεονεκτήματά του είναι μειώνεται σημαντικά ο χρόνος έκθεσης στην ακτινοβολία. Συγκρίνοντας την VMAT και την IMRT, παρατηρείται πως η εξοικονόμηση υγιών ιστών και οργάνων σε κίνδυνο (OAR-organs at risk) εξαρτάται από τον τύπο του καρκίνου. Για παράδειγμα στη θεραπεία ρινοφαρυγγικών και στοματοφαρυγγικών καρκινωμάτων, το VMAT παρέχει καλύτερη προστασία του οργάνου σε κίνδυνο (OAR) ενώ στη θεραπεία του καρκίνου του προστάτη, το αποτέλεσμα προστασίας της OAR είναι ανάμεικτο με ορισμένες μελέτες να ευνοούν το VMAT, άλλες να ευνοούν το IMRT (Biegała & Hydzik., 2016).

2.7 Ενίσχυση Αποτελεσματικότητας Ακτινοθεραπείας

2.7.1 Η Χρήση των Νανοσωματιδίων Χρυσού ως Ακτινοευαισθητοποιητές

Η Ακτινοθεραπεία μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνη της ή και σε συνδυασμό με τη χημειοθεραπεία ή έπειτα από χειρουργική επέμβαση ενώ συχνά επιλέγεται για την ικανότητά της να επιβραδύνει την ανάπτυξη του όγκου αλλά και να ελέγχει την ενέργεια που εναποτίθεται στον ιστό με την πάροδο του χρόνου. Ωστόσο, η χρήση ιοντίζουσας ακτινοβολίας υψηλής εντάσεως ενέχει σημαντικούς κινδύνους για τους περιβάλλοντες ιστούς. Αρκετές τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί με σκοπό να ελαχιστοποιήσουν τις δόσεις ακτινοβολίας που εναποτίθενται στους υγιείς ιστούς ενώ παράλληλα να τις μεγιστοποιήσει για τα καρκινικά κύτταρα. Οι τεχνικές αυτές περιλαμβάνουν : τον διαχωρισμό της δόσης (dose fractionation) με σκοπό τα καρκινικά κύτταρα να εισέλθουν σε μια πιο ακτινοευαίσθητη φάση του κυτταρικού κύκλου πριν την θεραπεία, την διαχείριση των φαρμάκων ακτινοπροστασίας με σκοπό να μαζευτούν οι ελεύθερες ρίζες από τους υγιείς ιστούς και τους ακτινοευαισθητοποιητές με ιδιαίτερη έμφαση στα κύτταρα του όγκου. Η νανοτεχνολογία και η νανοϊατρική είναι πολλά υποσχόμενες όσον αφορά την ακτινοθεραπεία και τον καρκίνο μέσω πολλαπλών μηχανισμών συμπεριλαμβανομένων της ακτινοευαισθησίας, της ακτινοπροστασίας, της ανοσοτροποποίησης, της ενίσχυσης της δόσης ακτινοβολίας και της αποτελεσματικής χορήγησης φαρμάκων. Πολλές προσπάθειες έχουν γίνει με σκοπό την ανάπτυξη νανοφαρμάκων τα οποία «προορίζονται»/ «σχετίζονται» με την ακτινοβολία, τα οποία περιλαμβάνουν οργανικές νανοδομές όπως τα λιπосώματα και τα πολυμερή μικκύλια και ανόργανες νανοδομές όπως τα νανοσωματίδια τα οποία περιλαμβάνουν μεταλλικά στοιχεία.

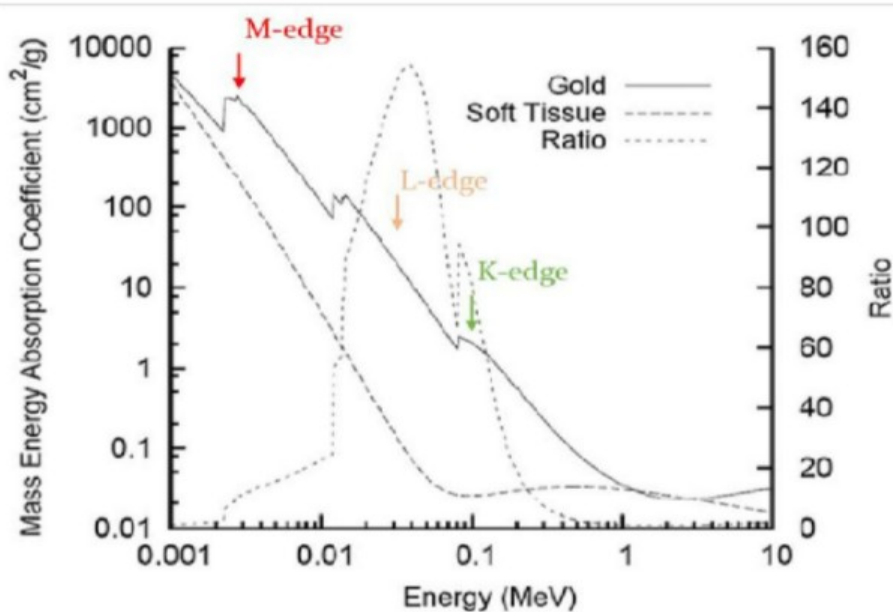
Κατά τις τελευταίες δεκαετίες, πολλά ερευνητικά προγράμματα ασχολήθηκαν με *in vivo* και *In vitro* μελέτες με εφαρμογές των μεταλλικών νανοσωματιδίων στην ακτινοθεραπεία. Αποδεικνύεται ως πολλά υποσχόμενη μέθοδος που συνδυάζεται με την ακτινοθεραπεία και πρόκειται να ενισχύσει την ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων μειώνοντας ή διατηρώντας την πιθανότητα επιπλοκής του υγιούς ιστού κατά τη διάρκεια της ακτινοθεραπείας με τη χρήση μεταλλικών νανοσωματιδίων (NPs) και ειδικά νανοσωματιδίων με υψηλό Z. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζεται στα νανοσωματίδια χρυσού (AuNPs) λόγω του υψηλού ατομικού αριθμού τους (και συνεπώς υπάρχει αντίθεση με τους μαλακούς ιστούς), το μικρό μέγεθος τους, η φυσική τους τάση να συγκεντρώνονται σε καρκινικούς όγκους, η βιοσυμβατότητά τους, η χαμηλή τοξικότητα, η σχετικά εύκολη σύνθεση και δυνατότητά τους να συνδέονται με λειτουργικά συστήματα μέσα στον βιολογικό στόχο. Όλα αυτά τα χαρακτηριστικά κατέστησαν τα νανοσωματίδια χρυσού (AuNPs) εξαιρετικά επιθυμητά για πολλαπλές εφαρμογές όπως η ακτινοθεραπεία, η ιατρική απεικόνιση και η στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων. *In vivo* και *in vitro* μελέτες έδειξαν πως υπάρχει ενίσχυση της ακτινοβολίας με νανοσωματίδια. Ωστόσο, η εφαρμογή τέτοιων μελετών στην πράξη δεν είναι εύκολη μιας και ο ακριβής μηχανισμός της ευαισθητοποίησης αυτής δεν είναι πλήρως κατανοητός. Η ακτινοευαισθησία των νανοσωματιδίων χρυσού έχει κυρίως αποδώσει στη φυσική ενίσχυση δόσης φτάνοντας την ενέργεια των φωτονίων στην τάξη των kilovolt (kV). Αυτό συμβαίνει λόγω της ισχυρής απορρόφησης του φωτοηλεκτρονίου από υλικά με υψηλό Z, με αλυσιδωτές αντιστάσεις (cascades) σε χαμηλής ενέργειας φωτοηλεκτρόνια και σε ηλεκτρόνια Auger. Ωστόσο, αυτά τα ηλεκτρόνια έχουν ένα πολύ μικρό βεληνεκές (της τάξεως των nm- μ m) μέσα στους ιστούς και μπορούν να παρέχουν υψηλές δόσεις σε νανοσωματίδια πολύ κοντινής απόστασης, γεγονός το οποίο αλλάζει κατά πολύ την ποιότητα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας προκαλώντας έτσι πολύπλοκα μοτίβα ιοντισμού τα οποία τελικά οδηγούν σε θανάσιμη βλάβη των κυττάρων. Παράλληλα, εμφανίζονται όλο και περισσότερες έρευνες οι οποίες ασχολούνται με το αντίκτυπο των νανοσωματιδίων στον κυτταρικό κύκλο, με τις μεταβολικές δραστηριότητες και τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA και τις συνέπειες στην αντίδραση των κυττάρων στην ακτινοβολία. Συνεπώς, οι συνέπειες των ραδιοβιολογικών φαινομένων είναι πιθανόν να εξαρτώνται από ένα πολύπλοκο φάσμα φυσικών, χημικών και βιολογικών παραμέτρων όπως είναι το μέγεθος

του νανοσωματιδίου, το υλικό, το φορτίο, η επίστρωση, η παραγωγή δραστικών ριζών, η κυτταρική πρόσληψη, ο κυτταρικός κύκλος κλπ.

2.7.2 Η Φυσική της Ακτινοευαισθητοποίησης των Νανοσωματιδίων Χρυσού

Η ενίσχυση της δόσης της ακτινοβολίας στις διεπιφάνειες υλικών με μικρό και μεγάλο ατομικό αριθμό Z μελετάται για πάνω από 50 χρόνια. Ωστόσο, η ενίσχυση της δόσης σε υλικά με υψηλό Z παρατηρήθηκε για πρώτη φορά κλινικά σε ασθενείς με μεταλλικά εμφυτεύματα οι οποίοι έκαναν ακτινοθεραπεία για την θεραπεία καρκίνου στο λαιμό και το κεφάλι. Η γενικότερη σκέψη να γίνει χρήση υλικών με υψηλό Z για ενίσχυση της δόσης αναπτύχθηκε ιδιαίτερος τα επόμενα χρόνια. Ο χρυσός είναι ένα υλικό που απορροφά εξαιρετικά τις ακτίνες X . Έτσι, αν στον όγκο μπορούσαν να προστεθούν σωματίδια χρυσού, θα οδηγούσε σε αρκετά μεγαλύτερη δόση στους καρκινικούς ιστούς συγκριτικά με τη δόση που θα λάμβαναν οι υγιείς κατά τη διάρκεια της ακτινοθεραπείας. Μελέτες και υπολογισμοί έδειξαν πως η ενίσχυση της δόσης μπορεί να είναι αρκετά σημαντική και να ξεπερνά ίσως και το 200%. Τα νανοσωματίδια χρυσού (AuNPs) συσσωρεύονται κυρίως σε *in vivo* όγκους. Ένας από τους λόγους που συσσωρεύονται εκεί είναι η μεγαλύτερη διαπερατότητα των διαφορετικών αιμοφόρων αγγείων κοντά στους όγκους ακολουθώντας την αγγειογένεση καθώς και το μειωμένο ρυθμό εκκαθάρισης του από τον οργανισμό που προκαλείται από το έλλειμμα των λειτουργικών λεμφικών αγγείων στους όγκους. Σε συνδυασμό και με τη βιοσυμβατότητα, τα νανοσωματίδια χρυσού είναι οι ιδανικοί υποψήφιοι για την ακτινοθεραπεία διότι είναι ακτινοευαισθητοποιητές με υψηλό Z .

Όταν οι ακτίνες X προσπίπτουν στην ύλη συμβαίνουν διάφορες διαδικασίες, όπως προαναφέρθηκε. Οι εκπομπές που σχετίζονται με το φαινόμενο ενίσχυσης της δόσης σε μεταλλικά νανοσωματίδια είναι σκεδαζόμενα φωτόνια (X -rays), φωτοηλεκτρόνια, ηλεκτρόνια Compton, ηλεκτρόνια Auger και φωτόνια φθορισμού. Οι χημικές βλάβες (ελεύθερες ρίζες και ιονισμός) μεταδίδονται κατά αυτόν τον τρόπο στον ιστό. Τα νανοσωματίδια χρυσού έχουν προταθεί ως πρωτοποριακοί ακτινοευαισθητοποιητές λόγω του υψηλού συντελεστή φωτοηλεκτρικής απορρόφησης. Επιστημονικές έρευνες έδειξαν πως η εφαρμογή νανοσωματιδίων χρυσού ως ακτινοευαισθητοποιητές προήλθε από την εκτεταμένη χρήση τους σε *in vivo* πειράματα αλλά και σε κάποιες μελέτες. Η σκέψη για αυτή τη χρήση τους βασίζεται κυρίως στην ιδιότητα τους να αυξάνουν τη δόση που εναποτίθεται στον όγκο-στόχο λόγω διαφορών στον μαζικό συντελεστή απορρόφησης ενέργειας, συγκριτικά με μαλακούς ιστούς.

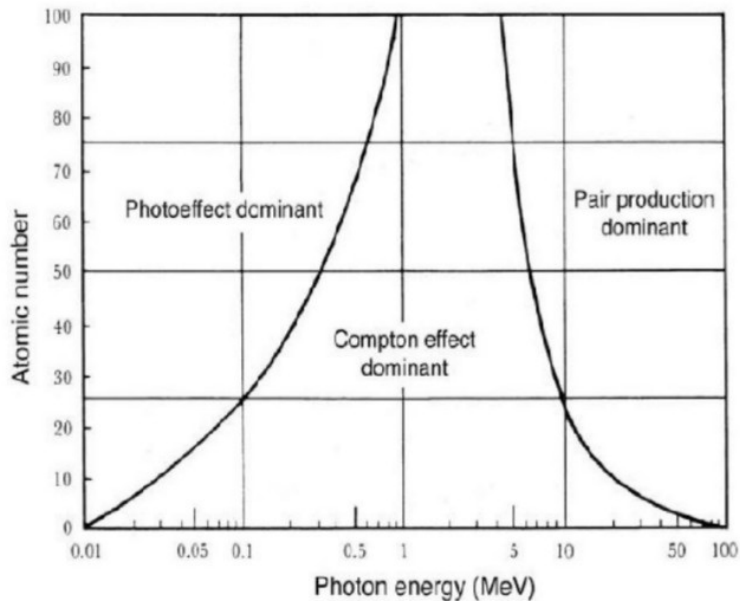


Εικόνα 2.7 : Σύγκριση του συντελεστή απορρόφησης ενέργειας για τον χρυσό και για μαλακό ιστό (Τρέμη, 2022)

Στους μαλακούς ιστούς, ο κύριος μηχανισμός από τον οποίο τα φωτόνια χάνουν ενέργεια είναι το φαινόμενο Compton. Σε αυτή τη διαδικασία, ένα φωτόνιο σκεδάζεται από ένα ελαφρώς δεσμευμένο ηλεκτρόνιο οδηγώντας έτσι σε μια μεταφορά ενέργειας από το φωτόνιο στο ηλεκτρόνιο (τυπικά το ηλεκτρόνιο οδηγείται έτσι στην απομάκρυνσή του από το άτομο). Εφόσον τα ηλεκτρόνια διατηρούν την πλειοψηφία της ενέργειάς τους έπειτα από αυτές τις σκεδάσεις, τείνουν να σταματούν σταδιακά και να έχουν μεγάλες ακτίνες σε περιπτώσεις που το φαινόμενο Compton κυριαρχεί, όπως φάνηκε σε μαλακούς ιστούς για φωτόνια με ενέργειες λίγο μεγαλύτερες από μερικά keV, οδηγώντας έτσι σε αρκετά σποραδικές κατανομές φαινομένων ιονισμού.

Το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο είναι η κύρια διαδικασία στις χαμηλές ενέργειες καθώς ένα φωτόνιο απορροφάται πλήρως από ένα δεσμευμένο ηλεκτρόνιο, το οποίο τότε απομακρύνεται από το άτομο. Σε αντίθεση με το φαινόμενο Compton, το οποίο συμβαίνει και σε ελεύθερα ηλεκτρόνια αλλά και σε ηλεκτρόνια που βρίσκονται στο άτομο, η πλήρης απορρόφηση ενός φωτονίου στο φωτοηλεκτρικό φαινόμενο μπορεί να συμβεί μόνο υπό την παρουσία νουκλεοτιδίου για να επιτρέψει την διατήρηση της ορμής. Ως αποτέλεσμα, η ενεργός διατομή του φωτοηλεκτρικού φαινομένου εξαρτάται από τον ατομικό αριθμό του ατόμου και είναι ανάλογη περίπου του Z^3 . Επίσης, το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο εξαρτάται κυρίως από τη σχέση μεταξύ της ενέργειας του φωτονίου και της δύναμης σύνδεσης του ηλεκτρονίου με το άτομο. Ειδικότερα, το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο έχει μια μέγιστη ενεργό διατομή όταν το φωτόνιο έχει οριακά την ενέργεια που απαιτείται για να απελευθερώσει το ηλεκτρόνιο (δηλαδή λίγο μεγαλύτερη από την ενέργεια δεσμού (των ηλεκτρονίων της εσωτερικής στιβάδας) και μειώνεται απότομα με την αύξηση της ενέργειας (περίπου ανάλογα του E^{-3} , όπου το E είναι η ενέργεια του φωτονίου). Αυτό σημαίνει πως σε υψηλότερες ενέργειες, το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο ελευθερώνει κυρίως ηλεκτρόνια από τις εσωτερικές στιβάδες λόγω των υψηλών ενεργειών σύνδεσής τους (binding energy). Η διαδικασία αυτή φαίνεται και στην εικόνα 1 στην καμπύλη της απορρόφησης ενέργειας μάζας του χρυσού, κάτι το οποίο μπορεί να αποδοθεί στην ικανότητα των φωτονίων να απελευθερώσουν ηλεκτρόνια από διαφορετικά τροχιακά. Αυτές οι καμπύλες εξασθένισης δείχνουν πως ο χρυσός είναι ιδιαίτερα απορροφητικός, ειδικά κοντά σε συγκεκριμένες ενέργειες. Σχετικά με τους μαλακούς ιστούς, η

καλύτερη διαφορική αντίθεση με τον χρυσό είναι περίπου στα 20 keV. Ωστόσο, η ενέργεια δέσμης είναι πολύ χαμηλή για θεραπεία με εξωτερική ακτινοβολή όγκων οι οποίοι βρίσκονται σε μεγάλο βάθος από την επιφάνεια του δέρματος λόγω της απορρόφησης των ιστών, ενώ για να αυξηθεί η απορροφητικότητα του χρυσού, καλύτερες είναι οι χαμηλές ενέργειες. Αυτές οι ενέργειες αντιστοιχούν στις ενέργειες των ηλεκτρονίων που βρίσκονται σε εσωτερικές στιβάδες. Αν και η ενέργεια δέσμης, που βρίσκεται λίγο πάνω από την κορυφή της απορρόφησης του ατόμου, είναι η ιδανική για απεικονιστικούς σκοπούς, δεν είναι και η καλύτερη επιλογή για θεραπευτικούς σκοπούς. Για παράδειγμα, ένα προσπίπτον φωτόνιο με ενέργεια 80,7 keV θα χρησιμοποιήσει όλη του την ενέργεια στο ηλεκτρόνιο της K-στιβάδας και συνεπώς δεν θα περισσέψει ενέργεια για το εκπεμπόμενο ηλεκτρόνιο.

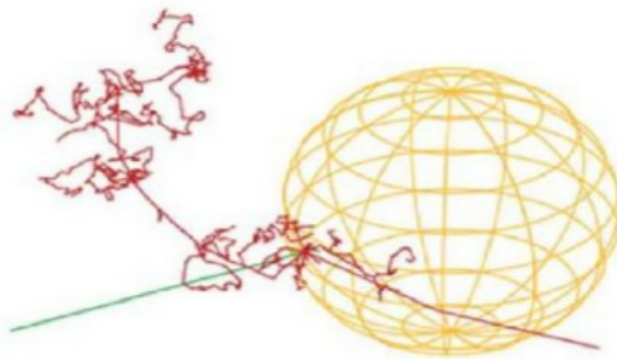


Εικόνα 2.8 : Διαγραμματική απεικόνιση των περιοχών που επικρατούν οι 3 βασικές μορφές αλληλεπίδρασης φωτονίων με την ύλη. Η αριστερή καμπύλη αναπαριστά τις περιοχές όπου ο ατομικός συντελεστής για το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο και για το φαινόμενο Compton είναι ίσοι και η δεξιά τις περιοχές όπου ο συντελεστής του φαινομένου Compton είναι ίσος με αυτόν της δίδυμης γένεσης.

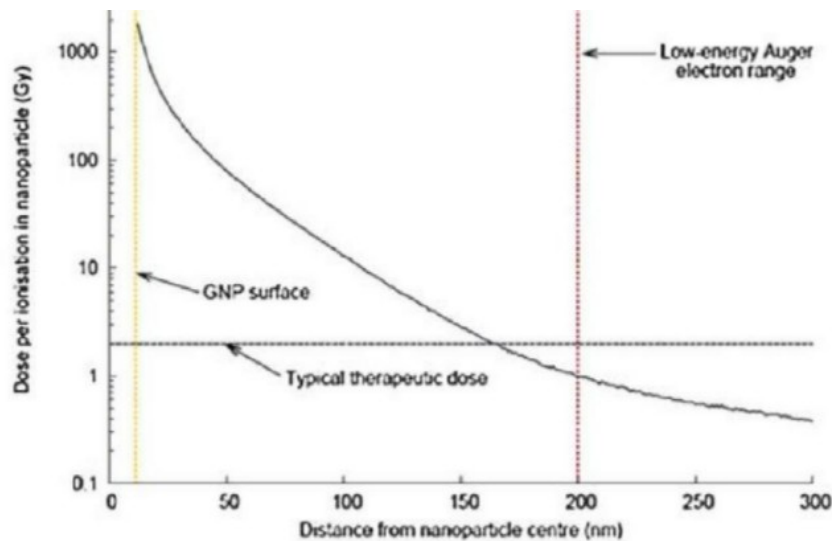
Όσον αφορά τα στοιχεία τα οποία έχουν υψηλό Z, το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο επικρατεί κατά την αλληλεπίδραση με την ύλη σε ενέργειες μικρότερες των 0,5 MeV. Η σχετική επίδραση του χρυσού (Z=79) στο μαλακό ιστό για εύρος ενεργειών πάνω από την K-κορυφή του χρυσού (80.75 keV) είναι περίπου 1217 φορές μεγαλύτερη (π.χ $79^3/7.4^3$).

Ο συνδυασμός του φωτοηλεκτρικού φαινομένου και της σκέδασης Compton ευθύνεται για την μεγάλη διαφορά των αριθμών των φωτονίων τα οποία προέρχονται από την αλληλεπίδραση με διαφορετικά υλικά χρυσού και νερού, το οποίο μάλιστα θεωρείται ως η κύρια αιτία του φαινομένου της ακτινοευαισθησίας. Περισσότερες αλληλεπιδράσεις φωτονίων παράγουν περισσότερα δευτερεύοντα ηλεκτρόνια. Έτσι, λόγω αυτού, όλη η ενέργεια των δευτερευόντων ηλεκτρονίων θα εναποτεθεί πλήρως στο μέσο, έπειτα από πολλαπλές ανελαστικές αλληλεπιδράσεις ενώ ένα πιο άμεσο φαινόμενο ενίσχυσης θα επιδράσει στην συνολική εναπόθεση ενέργειας στο μέσο. Επιπλέον, πολύ περισσότερα διεγερμένα και ιονισμένα άτομα, αλλά και μόρια, δημιουργούνται λόγω των αλληλεπιδράσεων των ηλεκτρονίων. Εξακολουθούν να συμμετέχουν στις χημικές διαδικασίες και τελικά κάποια από αυτά μετατρέπονται σε ελεύθερες ρίζες. Τέλος, η εναπόθεση ενέργειας και οι ελεύθερες ρίζες συμβάλλουν στις έμμεσες και άμεσες βλάβες.

Το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο (και σε κάποιες περιπτώσεις και η σκέδαση Compton) παράγουν άτομα τα οποία βρίσκονται σε διεγερμένη κατάσταση λόγω αποβολής ηλεκτρονίου. Τότε, τα ηλεκτρόνια που έχουν διαφύγει από το άτομο αναπληρώνονται από ηλεκτρόνια που προέρχονται από υψηλότερες στιβάδες, τα οποία μάλιστα απελευθερώνουν ενέργεια είτε ως φωτόνια φθορισμού είτε ως ηλεκτρόνια Auger. Τα φωτόνια φθορισμού μπορούν να ταξιδέψουν σε μεγαλύτερες αποστάσεις (της τάξεως των εκατοστών), έτσι, ανάλογα τον όγκο, αυτά μπορούν ή όχι να παρέχουν την επιθυμητή εντοπισμένα εναπόθεση της δόσης στον όγκο. Το εύρος της ενέργειας ενός ηλεκτρονίου Auger, το οποίο παράγεται μέσω του φαινομένου/διασποράς Auger, είναι μικρότερο ή και ίσο των 10keV. Ένα ηλεκτρόνιο των 100 eV έχει μικρό βεληνεκές (της τάξεως των 50nm), έτσι εναποθέτει όλη του την ενέργεια κοντά στην επιφάνεια του νανοσωματιδίου. Τα ηλεκτρόνια υψηλότερων ενεργειών (της τάξεως των 2 keV και των 10 keV) έχουν τη δυνατότητα να εναποθέτουν την ενέργειά τους σε απόσταση έως και 100nm και 1,5 μm στο νερό αντίστοιχα. Αντιθέτως, τα ηλεκτρόνια Auger μπορούν να φανούν αποτελεσματικά παράγοντας υψηλή τοπική πυκνότητα ιονισμού. Ωστόσο, μπορούν να ταξιδέψουν αποστάσεις αρκετά μικρότερες (της τάξεως των 10 nm για ενέργειες περίπου 100-200 eV) ενώ μερικά από αυτά μπορούν να εκπεμφθούν από το ίδιο άτομο ταυτόχρονα. Κατά τη διάρκεια του φωτοηλεκτρικού φαινομένου, μιας και κάθε εκπίπτον ηλεκτρόνιο δημιουργεί μια κενή θέση, μπορεί να οδηγήσει σε μια αλληλουχία εκπομπής επιπλέον ηλεκτρονίων Auger. . Με αυτό τον τρόπο, ο ιοντισμός στην εσωτερική στιβάδα του χρυσού, μπορεί να οδηγήσει στην απελευθέρωση αρκετών ηλεκτρονίων χαμηλής ενέργειας.



Εικόνα 2.9 : Απεικόνιση του φωτοηλεκτρικού φαινομένου στη νανοκλίμακα με ακτινοβολημένα νανοσωματίδια χρυσού



Εικόνα 2.10 : Υπολογισμένη εναπόθεση δόσης για ένα νανοσωματίδιο χρυσού έπειτα από ακτινοβολήση.

Το φάσμα του φαινομένου Auger, που έπεται της ακτινοβολήσης, δεν εξαρτάται από την ενέργεια του ιονισμένου σωματιδίου, αλλά από την στιβάδα από την οποία έχει εκπεμφθεί το φωτοηλεκτρόνιο. Η συμβολή του φαινομένου Auger είναι μικρή και αλλάζει ελάχιστα πάνω από τα 14,5 keV. Ωστόσο, αυξάνοντας την ενέργεια του φωτονίου, αυξάνεται και η αποτελεσματικότητα του φωτοηλεκτρονίου στον πυρήνα (ένα ηλεκτρόνιο των 50 KeV μπορεί να ταξιδέψει στο νερό έως και 20 μm). Αυτό, αλλάζει σημαντικά τον όγκο στον οποίο θα εναποτεθεί η δόση και ενισχύει παράλληλα την πιθανότητα το φωτοηλεκτρόνιο να αλληλεπιδράσει με μόρια DNA μέσα στον πυρήνα. Το φαινόμενο Auger είναι εντονότερο στα άτομα ενός μέσου με υψηλό Z.

Σε αντίθεση με τον χρυσό, τα ηλεκτρόνια εσωτερικής στιβάδας σε μαλακό ιστό τείνουν να έχουν ενέργεια σύνδεσης της τάξεως του 1 keV ή και λιγότερο, συνδυασμένα με οργανικά υλικά με μικρό ατομικό αριθμό, κάτι το οποίο σημαίνει πως το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο συμβάλει ελάχιστα στην απορρόφηση στους μαλακούς ιστούς ενώ παράλληλα είναι το κύριο συστατικό του ιοντισμού του χρυσού με ενέργειες έως και εκατοντάδες keV. Η σημαντικά αυξημένη φωτοηλεκτρικά ενεργός διατομή σημαίνει ότι ο χρυσός απορροφά ουσιαστικά περισσότερη ενέργεια ανά μονάδα μάζας από ότι ο μαλακός ιστός, περίπου 10 έως 150 φορές για φωτόνια της τάξεως των keV, το οποίο μεταφράζεται ως μια σημαντική αύξηση στην τοπική δόση με μικρό αριθμό νανοσωματιδίων χρυσού στον όγκο.

Στην σκέδαση Rayleigh, τα φωτόνια συγκρούονται με ολόκληρο το άτομο και όχι μόνο με ένα ηλεκτρόνιο και, επομένως, το ποσό της ενέργειας και της ορμής που μεταφέρεται είναι αμελητέο. Η ενεργός διατομή του είναι περίπου ανάλογη με το Z^2 . Η σκέδαση Rayleigh είναι πιο ~~εξέχουσα~~ σημαντική για φωτόνια χαμηλής ενέργειας, τα οποία σκεδάζονται σε υλικά με υψηλό Z. Επίσης, η ενεργός διατομή του είναι πολύ μικρή σε ιστούς με ενέργειες άνω των 60 keV και στον χρυσό άνω των 200 keV. Αφού αυτή η σκέδαση είναι ελαστική, δεν εναποτίθεται ενέργεια στον ιστό και επομένως δεν είναι χρήσιμη για τη θεραπεία.

Η δίδυμη γένεση συμβαίνει σε φωτόνια υψηλών ενεργειών (άνω του 1 MeV), όπου η προσπίπτουσα ενέργεια του φωτονίου ξεπερνά διπλά την υπόλοιπη μάζα του ηλεκτρονίου ($2 \times 0,511 = 1,022$ MeV), με αποτέλεσμα την δημιουργία ζευγών ηλεκτρονίου-ποζιτρονίου (το καθένα με ενέργεια 0,511 MeV). Αυτό το φαινόμενο είναι της τάξεως του Z^2 και έτσι η σχετική επίδραση του χρυσού στο νερό είναι περίπου 114 ($79^2/7,4^2$). Ωστόσο, η ενεργός διατομή του σε ιστό κάτω των 3 MeV είναι πλήρως αμελητέα, αλλά και πάνω από αυτό είναι πολύ μικρή. Για τον χρυσό, τα φωτόνια που παράγονται με γραμμικό επιταχυντή ηλεκτρονίων (electron Linac) άνω των 10 MeV

μπορεί να διαφέρουν, αλλά το φωτοηλεκτρικό πλεονέκτημα του χρυσού σε αυτές τις δέσμες δεν υπάρχει πια.

2.8 Καμπύλες επιβίωσης

Οι καμπύλες επιβίωσης των κυττάρων περιγράφουν τη σχέση μεταξύ της απορροφούμενης δόσης ακτινοβολίας και του ποσοστού των κυττάρων που επιβιώνουν (δηλαδή αυτά που διατηρούν την ικανότητά τους να αναπαράγονται έπειτα από την ακτινοβολή τους). Οι καμπύλες αυτές βασίζονται σε μαθηματικές εξισώσεις της θεωρίας του στόχου.

A. Θεωρία στόχου (Target Theory)

Η ιοντίζουσα ακτινοβολία μεταφέρει και εντέλει εναποθέτει ενέργεια στην ύλη. Σύμφωνα με την θεωρία του στόχου, κάθε κύτταρο έχει έναν ειδικό αριθμό βιολογικών στόχων που είναι δυνατόν να αδρανοποιηθούν ύστερα από την αλληλεπίδραση τους με την ιοντίζουσα ακτινοβολία. Πιο συγκεκριμένα, η εναπόθεση ενέργειας στην ύλη δύναται να προκαλέσει ιοντισμούς και διεγέρσεις οι οποίοι με την σειρά τους μπορούν να οδηγήσουν σε θραύσματα του γενετικού υλικού ή γενικά των βιολογικών στόχων. Η επερχόμενη βιολογική καταστροφή λόγω ακτινοβολίας ενδέχεται να οδηγήσει σε αδρανοποίηση όλων των στόχων και τελικά σε αναπαραγωγικό θάνατο. Αξίζει να σημειωθεί πως κάθε χτύπημα στόχου είναι ένα τυχαίο φαινόμενο και κάθε φορά ανεξάρτητο από προηγούμενες πλήξεις.

Στα πλαίσια της προαναφερθείσας θεωρίας στόχου δημιουργήθηκαν μαθηματικά πρότυπα που περιγράφουν την απόκριση κυττάρων και ιστών στην ακτινοβολία χρησιμοποιώντας φυσικές και βιολογικές παραμέτρους.

A1. Μαθηματικά πρότυπα απόκρισης κυττάρων στην ακτινοβολία

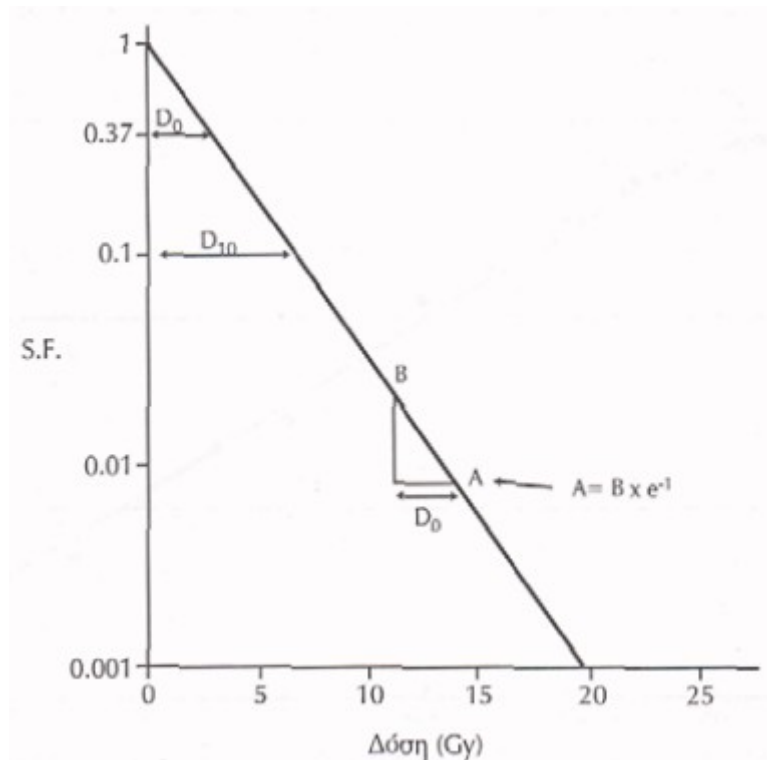
Οι παρακάτω περιπτώσεις αποτελούν διαφορετικά μοντέλα κυτταρικής επιβίωσης όπου το καθένα από αυτά αποτελεί την εξέλιξη του προηγούμενου.

α) Single target-single hit model

Η βλάβη σε μια ευαίσθητη θέση-στόχο οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο. Αυτή η βλάβη ονομάζεται βλάβη "single target-single hit" και περιγράφεται από την καμπύλη επιβίωσης του παρακάτω σχήματος και από την εκθετική εξίσωση:

$$SF = e^{-D/D_0}, \text{ όπου SF: Survival Fraction = κλάσμα κυτταρικής επιβίωσης}$$

Εάν έχουμε πχ. 100 κύτταρα και σε αυτά κατανεμηθούν τυχαία 100 θανατηφόρες βλάβες, τότε το 37% (=e-1) των κυττάρων στόχων θα αποφύγει οποιαδήποτε βλάβη και θα επιβιώσει. Εάν η δόση για να επιβιώσει το 37% των κυττάρων είναι D_0 , ο αριθμός των θανατηφόρων πληγμάτων ανά κύτταρο μετά από δόση D θα είναι D/D_0 . Βακτήρια και ιοί χαρακτηρίζονται από καμπύλες τέτοιας μορφής αλλά και ορισμένα ανθρώπινα κύτταρα ή κύτταρα πολύ ακτινοευαίθητων όγκων (Alpen, 1997).

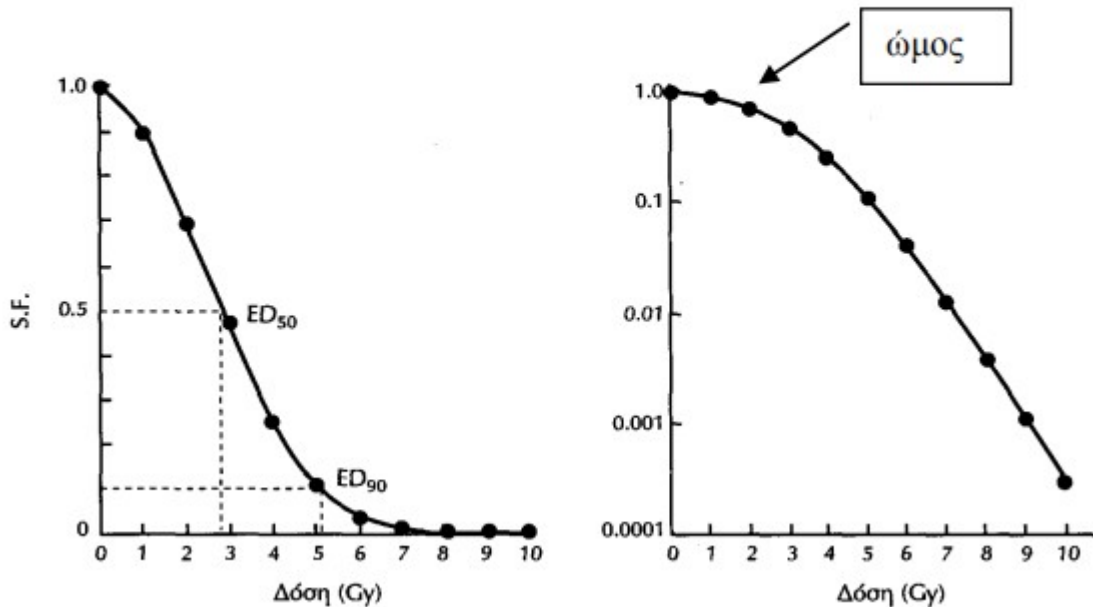


Εικόνα 2.11 : Απεικόνιση της γραφικής παράστασης καμπύλης επιβίωσης (πχ για βακτήρια και ιούς) που περιγράφεται από την εξίσωση $SF = e^{-D/D_0}$

β) Multitarget-single hit model

Το συγκεκριμένο μοντέλο προϋποθέτει και θεωρεί πως η κυτταρική καταστροφή προκύπτει από την καταστροφή πολλαπλών βιολογικών στόχων. Η πιθανότητα ενός στόχου να παραμείνει ακέραιος μετά από δόση D είναι $\exp(-D/D_0)$. Άρα η πιθανότητα να καταστραφεί ένας στόχος είναι $1 - \exp(-D/D_0)$. Αφού το κύτταρο περιέχει N στόχους, η πιθανότητα να πληγούν όλοι και επομένως το κύτταρο να θανατωθεί θα είναι $[1 - \exp(-D/D_0)]^N$ και κατά συνέχεια η πιθανότητα επιβίωσης ενός κυττάρου ισούται με $1 - [1 - \exp(-D/D_0)]^N$. Αυτή η υπόθεση της κυτταρικής βλάβης που ονομάζεται βλάβη "multi target-single hit model" παράγει διφασικές καμπύλες όπως η παρακάτω. Η καμπύλη αυτή σχεδιάστηκε αρχικά από τους Puck & Marcus το 1956 και περιγράφουν την καμπύλη επιβίωσης κυττάρων θηλαστικών.

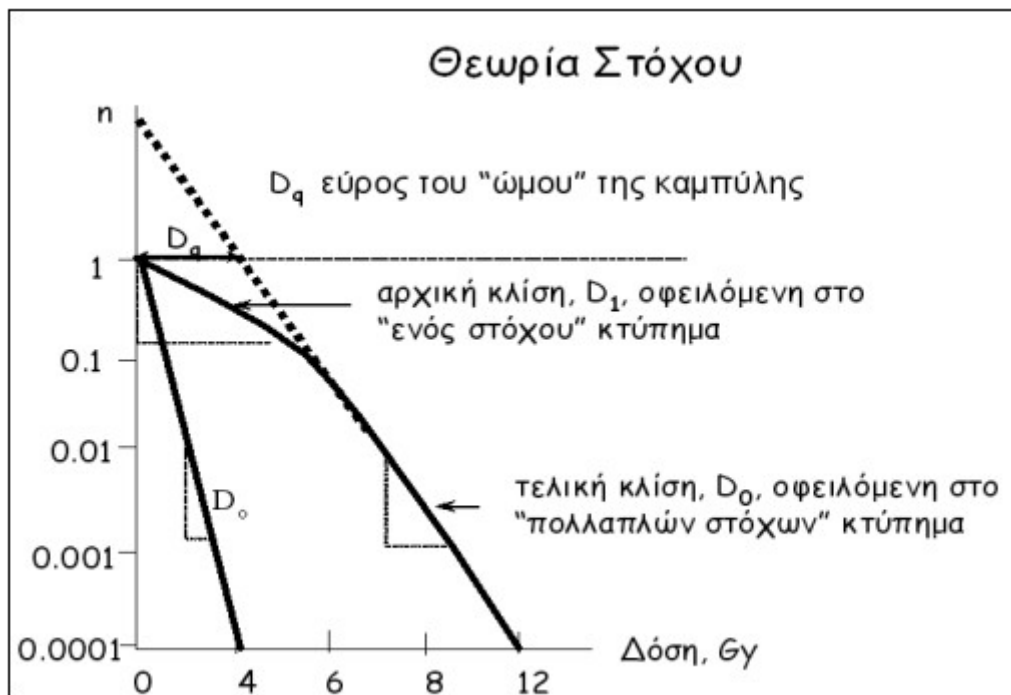
Το μοντέλο αυτό παρουσιάζει μια shoulder region σε χαμηλές δόσεις ενώ η εκθετική σχέση παρατηρείται στις υψηλότερες δόσεις. Η περιοχή αυτή παριστάνει το εύρος της δόσης που αναλώνεται λόγω της επιδιορθώσεως της μη θανατηφόρας βλάβης (Alpen, 1997).



Εικόνα 2.11 : Απεικόνιση των καμπυλών επιβίωσης των κυττάρων των θηλαστικών που είναι διφασικές. Στις υψηλές δόσεις τα κύτταρα γίνονται πιο ευαίσθητα με αποτέλεσμα να αυξάνεται η καμπυλότητα. Στο δεξί διάγραμμα, η επιβίωση περιγράφεται με λογαριθμική κλίμακα.

Στην παρακάτω εικόνα αναπαρίστανται οι καμπύλες επιβίωσης και ταυτόχρονα τα δυο παραπάνω πρότυπα και διακρίνονται οι εξής παράμετροι:

- Η δόση D_0 , που περιγράφει την κλίση του ευθύγραμμου τμήματος της καμπύλης και είναι η δόση, που μειώνει το ποσοστό (όχι τον απόλυτο αριθμό) των κυττάρων που επιβιώνουν κατά 37%.
- Ο αριθμός n , που είναι το σημείο όπου η προέκταση του ευθύγραμμου τμήματος της καμπύλης τέμνει τον κατακόρυφο άξονα, λέγεται αριθμός προεκβολής. Ο αριθμός n αντιστοιχεί στον αριθμό θέσεων-στόχων του κυττάρου. Με $n=1$ (single target theory) υπάρχει μόνο μια ευαίσθητη θέση-στόχος μέσα στο κύτταρο, που η καταστροφή της είναι αρκετή για να θανατωθεί το κύτταρο.
- Το σημείο, που η ανωτέρω προέκταση τέμνει τον οριζόντιο άξονα (σε 100% επιβίωση, $SF=1$), ονομάζεται δόση κατωφλίου (quasi-threshold dose) και συμβολίζεται με D_q . Η D_0 αντανακλά την ενδογενή κυτταρική ευαισθησία στην ακτινοβολία και τα N και d χαρακτηρίζουν το μέγεθος της καμπύλης που δημιουργείται στην shoulder region, δηλαδή την δυνατότητα επιδιορθώσεως της μη θανατηφόρας βλάβης (Dale, 1985).

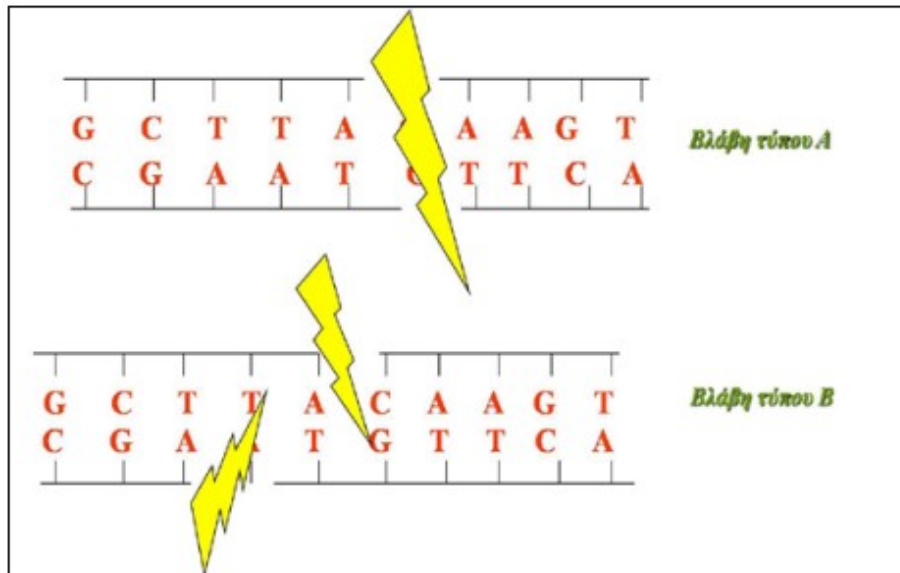


Εικόνα 2.12 : Απεικόνιση καμπυλών κυτταρικής επιβίωσης σύμφωνα με την περιγραφή τους από την target theory.

B) Linear Quadratic Model

Για την καλύτερη περιγραφή των πειραματικών δεδομένων για μεγάλο εύρος δόσεων, σχηματίστηκε η υπόθεση της ύπαρξης μέσα στο κύτταρο, πολλών ισοδύναμων θέσεων-στόχων, από τις οποίες έστω και μία μόνο εάν προσβληθεί, το κύτταρο καταστρέφεται. Οι στόχοι αυτοί είναι διπλοί, δηλαδή ο καθένας απαρτίζεται από ζεύγος θέσεων (ίσως η διπλή έλικα του DNA) (Dale, 1985). Έτσι, μπορούν να διακριθούν δύο ειδών βλάβες:

1. Βλάβη single strand break (βλάβη τύπου A).
2. Βλάβη double strand break (βλάβη τύπου B).



Εικόνα 2.13 : Σχηματική αναπαράσταση των προαναφερθέντων βλαβών σύμφωνα με το linear quadratic (LQ).

Η βλάβη τύπου A αποδεικνύεται ότι είναι γραμμικά ανάλογη της δόσης και ισούται με $\exp(-\alpha D)$, όπου α ένας θετικός συντελεστής αναλογίας ενώ η βλάβη τύπου B ισούται με $\exp(-\beta D^2)$ με β έναν συντελεστή αναλογίας επίσης. Στις χαμηλές δόσεις ή στο χαμηλό ρυθμό δόσης, επικρατούν οι βλάβες τύπου A ενώ με την αύξηση της δόσης αρχίζει να αποκτά σημασία η βλάβη τύπου B.

Έτσι, το ποσοστό επιβίωσης των κυττάρων μετά από δόση D είναι:

$$SF = \exp(-\alpha D - \beta D^2)$$

Στην περίπτωση που οι προκύπτουσες βλάβες με τους δύο ανωτέρω μηχανισμούς είναι ποσοτικά ίσες μεταξύ τους ισχύει:

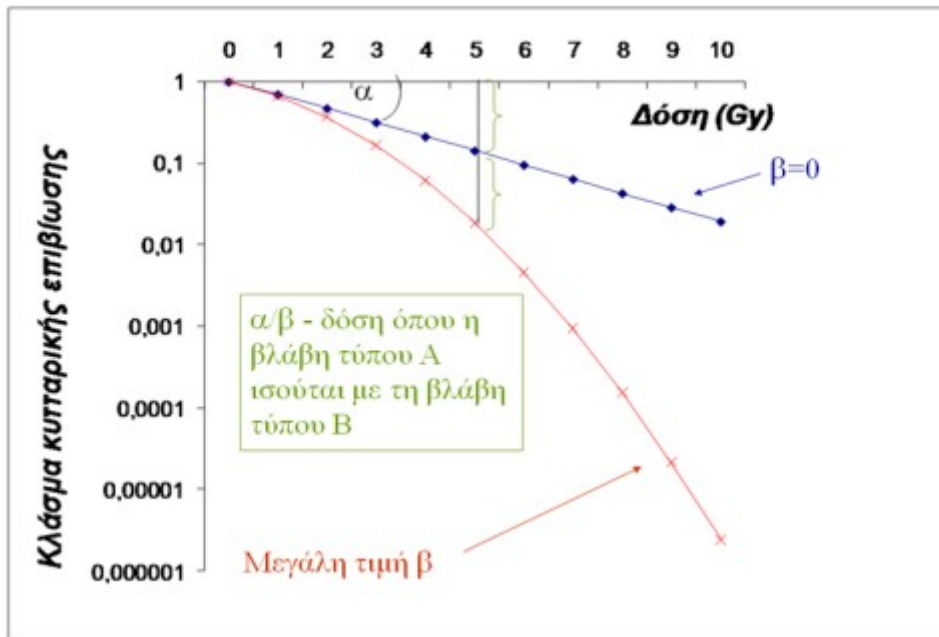
$$\exp(-\alpha D) = \exp(-\beta D^2) \text{ ή } \alpha D = \beta D^2 \text{ ή } D = \alpha/\beta.$$

Ο λόγος αυτός είναι χαρακτηριστικός για τα διάφορα είδη κυττάρων με μονάδα μέτρησης το Gy.

Το μοντέλο LQ δίνει καμπύλη επιβίωσης με κλίση που αυξάνεται συνεχώς συναρτήσει της δόσης. Το αποτέλεσμα της ακτινοβολήσης προέρχεται από τη σύνθεση δύο συνιστωσών :

- Στοιχείο “ α ” που είναι ο κυτταρικό θάνατος λόγω βλαβών που δεν επιδιορθώνονται (περιγράφει την αρχική κλίση της καμπύλης επιβίωσης του κυττάρου και αντιπροσωπεύει την βλάβη που προέρχεται από ένα single hit event (πχ hit, double strand break).
- Στοιχείο “ β ” που είναι κυτταρικό θάνατος λόγω βλαβών που μπορούν να διορθωθούν (περιγράφει την quadratic συνιστώσα του κυτταρικού θανάτου και αντιπροσωπεύει την βλάβη από ένα single event (πχ hit/hit, double strand break).

Η καμπύλη επιβίωσης είναι η σύνθεση αυτών των δυο καμπυλών και η γραμμική περιοχή καθορίζεται από το α ενώ η κυρτότητα της καμπύλης από το β (φαίνεται και στο παρακάτω σχήμα) (Dale, 1985).



Εικόνα 2.14 : Απεικόνιση του γραμμικού τετραγωνικού προτύπου. Ο λόγος α/β αντιστοιχεί στη δόση που η βλάβη τύπου A είναι ίση με την βλάβη τύπου B.

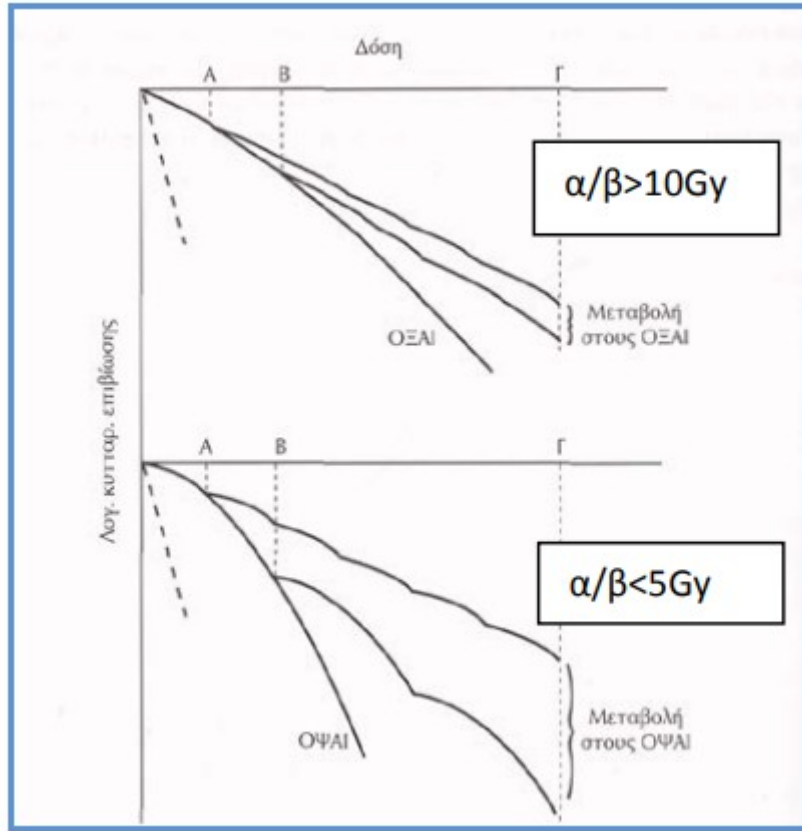
Όταν η τιμή του α/β είναι σχετικά μικρή, τότε η αντίστοιχη καμπύλη επιβίωσης έχει πιο μεγάλη κυρτότητα (δηλαδή μεγαλύτερη ικανότητα επιβίωσης). Αυτή η παρατήρηση ενέχει μεγάλη κλινική σημασία καθώς αποτελεί και τη βιολογική βάση του τρόπου με τον οποίο αντιδρούν οι διάφοροι ιστοί στην ακτινοθεραπεία.

Η επιτυχία του προτύπου LQ και η ευρεία αποδοχή του στην κλινική ραδιοβιολογία και την ακτινοθεραπεία οφείλεται κυρίως στην ακρίβεια και την απλότητά του.

α) Παρατηρήσεις σχετικά με την τιμή του λόγου α/β

- Η μικρή τιμή του λόγου α/β παριστάνεται με μεγάλη κυρτότητα στην καμπύλη επιβίωσης (μεγάλη καμπύλη της shoulder region, δηλαδή μεγάλη ικανότητα επιδιόρθωσης της βλάβης και δηλώνει μικρή ευαισθησία στο fractionation της δόσης).
- Η μεγάλη τιμή του λόγου παριστάνεται με μεγάλη γραμμικότητα στην καμπύλη επιβίωσης (μικρή καμπύλη της shoulder region, δηλαδή μικρή ικανότητα επιδιόρθωσης της βλάβης) και δηλώνει μικρή ευαισθησία στο fractionation της δόσης.

β) Βιολογική σημασία λόγου α/β



Εικόνα 2.15 : Απεικόνιση της ανταπόκρισης οξέως αντιδρώντος ιστού και οψίμως αντιδρώντα ιστού στο fractionation της δόσης.

Ο λόγος α/β (Gy) όπως ήδη αναφέρθηκε είναι χαρακτηριστικός για κάθε είδος ιστού και περιγράφει την ευαισθησία του ιστού στον κερματισμό της δόσης. Η ευαισθησία στον κερματισμό είναι μεγαλύτερη στους οψίμως αντιδρώντες ιστούς (βραδεία ανανέωση κυττάρων) από ότι στους οξέως αντιδρώντες (ταχεία ανανέωση κυττάρων) και στους περισσότερους κακοήθεις όγκους. Η διαφορά αυτή έχει ποσοτικοποιηθεί με τον λόγο α/β του LQ μοντέλου. Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται η διαφορά στην ανταπόκριση των οψίμως αντιδρώντων ιστών από τους οξέως αντιδρώντες ιστούς. Αυξάνοντας την δόση ανά συνεδρία η βλάβη που προξενείται από τους οψίμως αντιδρώντες αυξάνεται κατά πολύ περισσότερο σε σχέση με τους οξέως.

Ο λόγος α/β έχει μεγάλες τιμές (≥ 10) για ιστούς όπως η βλεννογόνο και οι κακοήθεις όγκοι ενώ έχει μικρές τιμές (< 5) για ιστούς όπως τα νευρικά κύτταρα ή οι χαμηλής κακοήθειας όγκοι. Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται οι τιμές του λόγου α/β σε ανθρώπινους ιστούς και όγκους. Σε ορισμένα νεοπλάσματα όπως το μελάνωμα, ο προστάτης ή ο μαστός φαίνεται ότι ο λόγος α/β λαμβάνει χαμηλή τιμή της τάξεως από 0,5 Gy έως 4 Gy. Γενικά, για όγκους με υψηλή τιμή α/β , η συνολική δόση αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για τον τοπικό έλεγχο εάν η τιμή α/β είναι χαμηλή, η συνολική δόση αλλά και η δόση ανά συνεδρία καθορίζουν εξίσου το αποτέλεσμα (Dale, 1985).

Οξείες αντιδράσεις	α/β (Gy)	Αναφορά
Δέρμα, ερύθημα	8,8 (6,9-11,6)	Turesson & Thames (1989)
Δέρμα, απολέπιση	12,3 (7,8-18,6)	Bentzen et al. (1988)
Όψιμες αντιδράσεις		
Δέρμα, τηλαγγειεκτασία	2,8 (1,7-3,8)	Turesson & Thames (1989)
Δέρμα, ίνωση	1,7(0,6-2,6)	Bentzen and Overgaard (1991)
Πνεύμονας ,πνευμονίτιδα	4,0(2,2-5,8)	Bentzen et al. (2000)
Μυελός, Μυελίτιδα	<3,3	Dische et al. (1981)
Όγκοι		
Τραχ. μήτρας	<13,9	Watson (1978)
Γλώσσα	7,2	Maciejewski et al.(1989)
Ρινοφάρυγγας	16	Lee et al. (1995)
Δέρμα	8,5	Trott et al. (1984)
Προστάτης	1,5-3	Brenner/Fowler
Μαστός	4	Yarnold/Owen
Μελάνωμα	0,6	Bentzen et al.(1989)

Πίνακας 2.1 : τιμές λόγου α/β σε ανθρώπινους ιστούς και όγκους (Dale, 1985).

Γ) Παράγοντες που επηρεάζουν την καμπύλη κυτταρικής επιβίωσης

α) Κλασματοποίηση δόσης (Dose Fractionation)

Εάν η συνολική δόση κατανέμεται σε “κομμάτια” δόσης ίδιου μεγέθους ανά χρονικά διαστήματα που επιτρέπουν την επιδιόρθωση της μη θανατηφόρας βλάβης μεταξύ των συνεδριών, η shoulder region στην καμπύλη επιβίωσης επαναλαμβάνεται αρκετές φορές. Έτσι, η “ισοδύναμη” καμπύλη κυτταρικής επιβίωσης αποκτά μικρότερη κλίση. Όταν η δόση κατανέμεται σε συνεδρίες, προκειμένου να έχουμε το ίδιο βιολογικό αποτέλεσμα θα πρέπει να αυξηθεί η συνολική δόση. Μειώνοντας τη δόση ανά συνεδρία μειώνουμε και τις βλάβες που προξενούνται στους φυσιολογικούς ιστούς και μάλιστα οι οψίμως αντιδρώντες ιστοί έχουν μεγαλύτερη ευαισθησία στο dose fractionation από τους όγκους και τους οξέως αντιδρώντες ιστούς. Στην fractionated radiotherapy είναι κοινότυπο ότι το μέγεθος της δόσης ανά συνεδρία παίζει μεγάλο ρόλο στην εμφάνιση οψίμων παρενεργειών (Tremi, 2022).

β) Ρυθμός δόσης (dose rate)

Όσο αυξάνεται ο ρυθμός δόσης, αυξάνεται και ο αριθμός των κυττάρων που καταστρέφονται, ενώ οι καμπύλες επιβίωσης χάνουν προοδευτικά την shoulder region και αποκτούν μεγαλύτερη κλίση.

γ) Τιμή της LET (linear energy transfer)

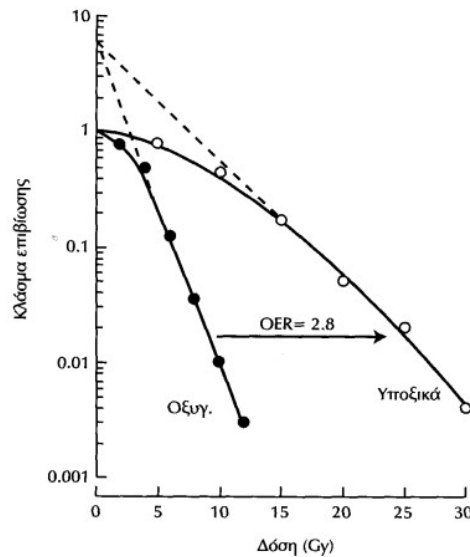
Όσο αυξάνεται η τιμή του LET, αυξάνεται και ο αριθμός των κυττάρων που καταστρέφονται ενώ οι καμπύλες επιβίωσης χάνουν προοδευτικά την shoulder region και αποκτούν μεγαλύτερη κλίση.

δ) Επίδραση οξυγόνου

Η παρουσία οξυγόνου επιτρέπει αύξηση της βλάβης του κυττάρου:

- Αντιδρά με ελεύθερες ρίζες με αποτέλεσμα την αλλαγή της χημικής σύστασης του στόχου.
- Μονιμοποιεί την βλάβη.

Ως λόγος oxygen enhancement ratio (OER) ορίζεται ο λόγος της δόσης που απαιτείται για κάποιο βιολογικό αποτέλεσμα, υπό υποξικές συνθήκες, προς τη δόση που απαιτείται για το ίδιο βιολογικό αποτέλεσμα υπό συνθήκες επαρκούν οξυγονώσεως (Τρέμη, 2022).



Εικόνα 2.16 : Απεικόνιση της καμπύλης επιβίωσης κυττάρων σε συνθήκες επαρκούς οξυγόνωσης/υποξικές συνθήκες.

Δ) Τα 5 R της Ακτινοθεραπείας

Γενικά, όσο αυξάνονται τα πειραματικά δεδομένα διαπιστώνεται η ύπαρξη παραγόντων που επηρεάζουν την κυτταρική επιβίωση μετά από ακτινοβόληση όπως είναι η οξυγόνωση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η ανακατανομή στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Οι παράγοντες αυτού και ο ρόλος τους στην ακτινοβόληση συνοψίζονται ως τα 5 R της Ραδιοβιολογίας, και συγκεκριμένα τα: Repair, Repopulation, Redistribution, Re-oxygenation, Radiosensitivity.

1. Επιδιόρθωση (Repair)

Τα κύτταρα υφίστανται μη θανατηφόρες ακτινικές βλάβες που είναι δυνατόν να επιδιορθωθούν με τη βοήθεια ενζυμικών μηχανισμών εάν το κύτταρο δεν επανακτινοβοληθεί για μερικές ώρες (1-3 ώρες). Εάν τα κύτταρα υποστούν περαιτέρω βλάβη στο DNA πριν προλάβουν να επιδιορθώσουν την προηγούμενη ακτινική βλάβη, τότε είναι δυνατόν οι δύο βλάβες να συνδυαστούν και έτσι η υπο-θανατηφόρα βλάβη γίνεται θανατηφόρα. Στο φαινόμενο της επιδιόρθωσης οφείλεται κυρίως η ύπαρξη της shoulder region στην περιοχή των χαμηλών δόσεων καθώς και η επανάληψη του επί της fractionated ακτινοβόλησης.

2. Επαναποικισμός (Repopulation)

Τα φυσιολογικά κύτταρα που καταστρέφονται από την ακτινοβολία αντικαθίστανται με την βοήθεια των ομοιοστατικών μηχανισμών από τις διαθέσιμες κυτταρικές δεξαμενές κάτι το οποίο επιτυγχάνεται με 3 τρόπους :

- Με μείωση του χρόνου του κυτταρικού κύκλου
- Με αύξηση του κλάσματος υπό αναπαραγωγή (growth fraction)
- Με μείωση του ποσοστού απώλειας κυττάρων (cell loss fraction)

Στο ανθρώπινο δέρμα, η κινητοποίηση των μηχανισμών και ο επαναποικισμός αρχίζει μετά από 3-4 εβδομάδες ενώ στο βλεννογόνο του εντέρου μετά από 10-14 ημέρες. Οι κακοήθεις όγκοι επαναποικίζονται επίσης με μηχανισμούς παρόμοιους με τους ανωτέρω. Μερικοί μάλιστα με τόσο ταχύ ρυθμό που ξεπερνά κάποιες φορές το ρυθμό της καταστροφής τους με αποτέλεσμα την αδυναμία τοπικού ελέγχου του όγκου. Έτσι, το φαινόμενο αυτό παίζει σημαντικό ρόλο στην καταστροφή κακοηθειών και στις οξείες αντιδράσεις των φυσιολογικών ιστών ενώ δεν συνυπολογίζεται στην περίπτωση των οψίμως αντιδρώντων ιστών για το διάστημα των 6-7 εβδομάδων που διαρκεί συνήθως η ακτινοθεραπεία.

3. Ανακατανομή (Redistribution)

Η κυτταρική ακτινοευαισθησία διαφέρει κατά τις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Με την ακτινοβόληση, θανατώνονται εκλεκτικά τα κύτταρα που βρίσκονται σε πιο ακτινοευαίσθητες φάσεις. Αποτέλεσμα των φαινομένων αυτών είναι ο σχετικός συγχρονισμός των υπόλοιπων κυττάρων. Έτσι, αν η επόμενη δόση χορηγηθεί τη στιγμή που τα κύτταρα περνούν όλα μαζί από τη φάση που είναι ακτινοευαίσθητα, τότε επιτυγχάνεται ο μέγιστος δυνατός κυτταρικός θάνατος. Ωστόσο, πρακτικά είναι δύσκολο να προσδιοριστεί η κατάλληλη χρονική στιγμή για να επανακτινοβοληθούν τα κύτταρα, άρα το φαινόμενο ανακατανομής είναι αμφίβολης κλινικής σημασίας. Επίσης, αξιοσημείωτο είναι πως στις δόσεις που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη (1-3Gy), δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στην ακτινοευαισθησία σε συνάρτηση με τη φάση του κυτταρικού κύκλου.

4. Επανοξυγόνωση (Re-oxygenation)

Η κλασματική χορήγηση της ακτινοβολίας επιτρέπει τη σταδιακά καλύτερη οξυγόνωση των κυττάρων του όγκου, αφού βαθμιαία μειώνονται οι διατροφικές απαιτήσεις λόγω της κυτταρικής καταστροφής. Η επανοξυγόνωση αυξάνει την ακτινοευαισθησία των κυττάρων του όγκου, αυξάνει όμως και την αναπαραγωγική και επανορθωτική ικανότητα των κακοηθών κυττάρων.

5. Ενδογενής ακτινοευαισθησία (Intrinsic Radiosensitivity)

Είναι βιολογική παράμετρος που αναφέρεται στο μέγεθος της ανταπόκρισης του όγκου/ιστού μετά από ακτινοβόληση. Η δόση που χρησιμοποιείται επειδή είναι η πιο συνηθισμένη δόση ανά συνεδρία στην ακτινοθεραπεία αλλά και αρκετά μικρή ώστε να περιγραφεί η αρχική κλίση των καμπυλών επιβίωσης. Η ακτινοευαισθησία ενός ιστού σύμφωνα με τον νόμο Bergonie-Tribondeau είναι ανάλογη της μιτωτικής δραστηριότητας και αντιστρόφως ανάλογη του βαθμού διαφοροποίησης των κυττάρων του (Alpen, 1997).

E) Μαθηματικός φορμαλισμός – Βασικές εξισώσεις του LQ Μοντέλου

Όπως προαναφέρθηκε, σύμφωνα με το linear quadratic model, μετά από ακτινοβόληση κυττάρων με δόση D, το ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης δίνεται από τη σχέση:

$$SF = \exp(-\alpha D - \beta D^2), \text{ όπου } \alpha \text{ και } \beta \text{ σταθερές.}$$

Το αρνητικό πρόσημο στην παρένθεση υποδηλώνει τη μείωση της κυτταρικής επιβίωσης με την αύξηση της δόσης.

Το Βιολογικό αποτέλεσμα (E) ορίζεται ως συνάρτηση του ποσοστού επιβίωσης SF:

$$E = - \ln SF = \exp (-\alpha D - \beta D^2)$$

Διαιρώντας την παραπάνω εξίσωση με την σταθερά α , προκύπτει η βιολογική δόση-Biologically Effective Dose (BED), που περιγράφει το βιολογικό αποτέλεσμα ακτινοβολήσης με δόση d:

$$BED = E/\alpha = D \{ 1 + [D / (\alpha/\beta)]\}$$

Για την fractionated αγωγή n συνεδριών δόσης d ($D=nd$), η βιολογική δραστική δόση ισούται με :

$$BED = E/\alpha = nd \{ 1 + [D / (\alpha/\beta)]\}$$

Στον τύπο αυτό, η βιολογικά δραστική δόση είναι ανάλογη της συνολικής φυσικής δόσης $D=nd$ με συντελεστή αναλογίας την παράσταση μέσα στην παρένθεση. Η παράσταση αυτή ονομάζεται σχετική δραστικότητα (Relative Effectiveness-RE) ώστε :

$$BED (Gy) = D (Gy) \times RE \text{ (αδιάστατη ποσότητα)}$$

Η RE λαμβάνει υπόψιν τις φυσικές παραμέτρους μια ακτινοθεραπευτικής αγωγής (πχ δόση ανά συνεδρία/ρυθμός δόσης) αλλά και τις ραδιοβιολογικές παραμέτρους (πχ λόγος α/β). Έτσι αποδεικνύεται ότι :

$$RE = 1 + \{ \text{Βλάβη τύπου B} [\exp(-\beta d^2)] / \text{Βλάβη τύπου A} [\exp(-\alpha d)] \}$$

Η BED ταυτίζεται με τη συνολική φυσική δόση όταν $RE=1$, δηλαδή όταν η δόση χορηγείται με πολλά, πολύ μικρού μεγέθους κλάσματα δόσης (δηλαδή $d \rightarrow 0$). Δηλαδή, η BED αναπαριστά τ φυσική δόση που θα επιφέρει το βιολογικό αποτέλεσμα με το αν η δόση αυτή χορηγούνταν με άπειρες μικρές δόσεις ανά συνεδρία (ή στην περίπτωση συνεχούς ακτινοβολήσης με πολύ χαμηλό ρυθμό δόσης).

Η BED αποτελεί δείκτη αξιολόγησης ενός ακτινοθεραπευτικού σχήματος συγκεκριμένης κλασματοποίησης (έτσι όπως ορίζεται από τη συνολική δόση αλλά και τη δόση ανά συνεδρία) και αφορά συγκεκριμένο ιστό που χαρακτηρίζεται από το λόγο α/β . Από την εξίσωση προκύπτει ότι αν η συνολική φυσική δόση παραμείνει σταθερή, η BED θα αυξηθεί όταν αυξηθεί η δόση ανά συνεδρία και η αύξηση αυτή θα είναι μεγαλύτερη για ιστούς με χαμηλό λόγο α/β σε σχέση με τους ιστούς μεγαλύτερου λόγου α/β (Alpen, 1997).

Κεφάλαιο 3: Μέθοδοι μέτρησης του κυτταρικού

3.1 Εισαγωγή

Στο κεφάλαιο αυτό πραγματεύονται οι διάφοροι μέθοδοι μέτρησης του κυτταρικού θανάτου. Στη διεθνή βιβλιογραφία και σε διάφορα εργαστήρια αναφέρονται πολλές μέθοδοι μέτρησης του κυτταρικού θανάτου μέσω π.χ. μορφολογικής εκτίμησης, ποσοτικής ανάλυσης και ανάλυσης εντοπισμού πρωτεϊνών που σχετίζονται με την απόπτωση, χρήσης κυτταρομετρίας ροής, χρήσης ειδικών δεικτών και μέτρησης βιωσιμότητας (Παπαζαφειρή., 2014). Επιλέξαμε στην εργασία αυτή να περιγράψουμε αρχικά σε μια μέθοδο, την μέθοδο της χρώσης των κυττάρων με Trypan Blue και στη συνέχεια αναφέρεται η μέθοδος της κυτταρομετρίας ροής, η οποία και χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

3.2 Μέθοδος χρώσης κυττάρων με Trypan Blue

Το Trypan Blue είναι μία από τις διάφορες χρωστικές που χρησιμοποιούνται σε διαδικασίες αποκλεισμού χρωστικών ουσιών για μέτρηση κυττάρων τα οποία έχουν επιβιώσει έπειτα από διάφορες διαδικασίες. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην αρχή πως τα ζωντανά (βιώσιμα) κύτταρα δεν απορροφούν συγκεκριμένες βαφές, ενώ αντιθέτως τα νεκρά (μη βιώσιμα) κύτταρα επιτρέπουν τη διέλευση της ουσίας μέσω της διαταραγμένης μεμβράνης. Συνεπώς, η χρώση κάνει ευκολότερη την απεικόνιση της μορφολογίας τους (Μπαλανίκας, 2017).

Κατά την μέθοδο αυτή, πρέπει να παρασκευαστεί ένα εναιώρημα κυττάρων με την ίδια διαδικασία, όπως γίνεται και στην καλλιέργεια, δηλαδή σηκώνοντας τα κύτταρα που πρέπει να μελετηθούν με τη βοήθεια της τρυψίνης. Έπειτα, το εναιώρημα αυτό θα πρέπει να μεταφερθεί σε περιεκτικότητα 0,4 % Trypan Blue ανά 0,5 ml θεραπευτικού υλικού σε δοκιμαστικό σωλήνα και να πραγματοποιηθεί σωστή ανάδευση και το νέο μείγμα παραμένει για 5 λεπτά. Εν συνεχεία, με τη χρήση μιας πιπέτας ή άλλης κατάλληλης συσκευής για μεταφορά μικρής ποσότητας του μείγματος αιωρήματος κυττάρων-Trypan blue, θα πρέπει να τοποθετηθεί σε αμφοτέρους τους θαλάμους του αιμοκυτταρομετρητή το μίγμα. Αγγίζοντας προσεκτικά την άκρη του καλύμματος με το άκρο της πιπέτας, θα πρέπει κάθε θάλαμος να γεμίσει περίπου 5-10 μl και τελικά να γίνει η παρατήρησή του από το μικροσκόπιο. Αφού παρατηρηθεί το μείγμα με τη βοήθεια του μικροσκοπίου, θα πρέπει να μετρηθεί ο αριθμός των βιώσιμων και των μη βιώσιμων κυττάρων τα οποία μάλιστα θα έχουν χρωματιστεί μπλε). Συνήθως, μετά από αυτή τη διαδικασία, πρέπει να υπολογιστεί η σχετική συγκέντρωση βιώσιμων και μη βιώσιμων κυττάρων και το ποσοστό βιώσιμων κυττάρων χρησιμοποιώντας την παρακάτω εξίσωση :

$$\text{Non-viable Cell Count} = [(\text{Number Dead Cells Counted}) / (\text{Total number of cells})] \times 100$$



Εικόνα 3.1 : Απεικόνιση του αιμοκυτταρόμετρου και της εισαγωγής του μείγματος κυττάρων και trypan blue με τη βοήθεια μιας πιπέτας

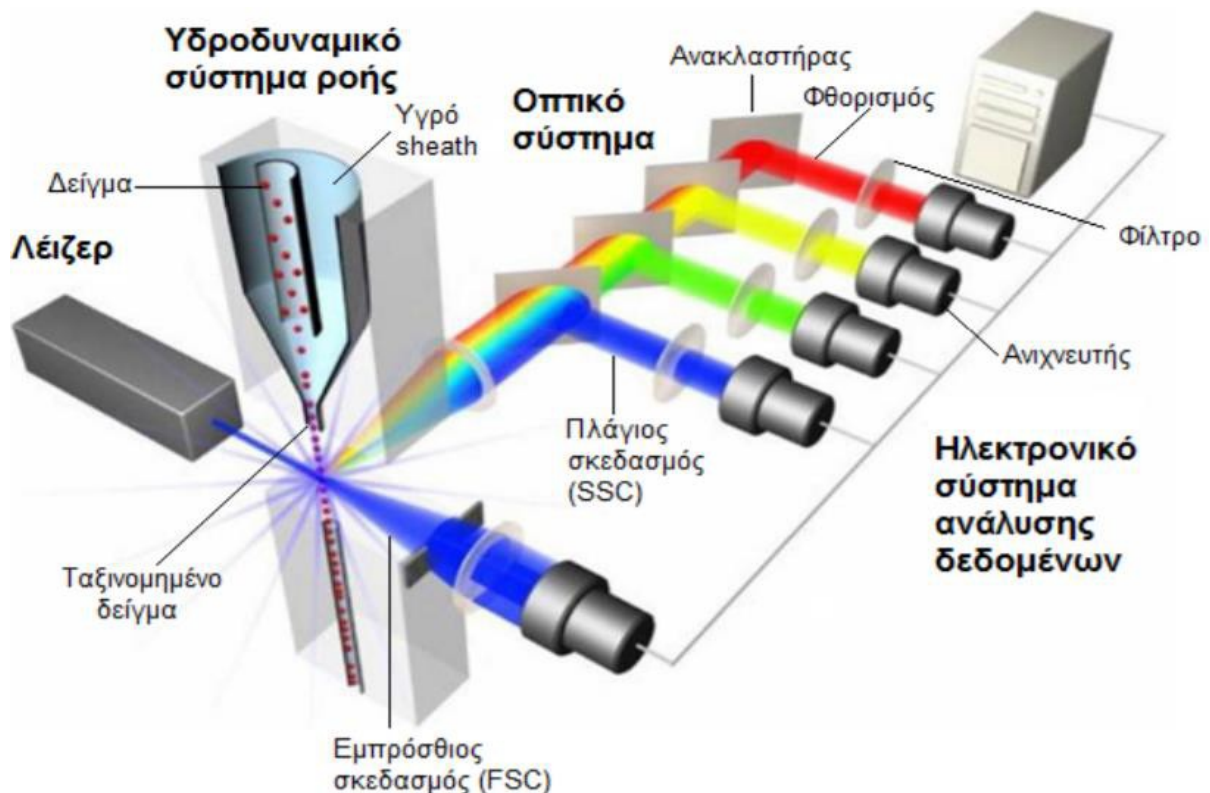
3.3 Μέθοδος Κυτταρομετρίας Ροής

Η μέθοδος η οποία χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία είναι αυτή της κυτταρομετρίας ροής, η οποία διεξήχθη στο Β' Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής στο Αττικό Νοσοκομείο. Η μέθοδος αυτή είναι μια μέθοδος ευρέως γνωστή και χρησιμοποιείται από ολόένα και περισσότερους επιστήμονες ανά τον κόσμο.

3.3.1 Εισαγωγή στην κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία ροής είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση, την ανάλυση και το διαχωρισμό των κυττάρων, τα οποία βρίσκονται σε εναιώρημα. Τα κύτταρα που βρίσκονται διαλυμένα σε κάποιο βιολογικό υγρό, επωάζονται με κατάλληλα αντισώματα, συνδεδεμένα με μια φθορίζουσα ουσία. Το διάλυμα αυτό περνά μέσα από έναν υπερηχητικό αναδευτήρα και βγαίνει από το ακροφύσιο του σε νηματική-ομοαξονική ροή (jet). Παράλληλα, μια δέσμη laser κατάλληλου μήκους κύματος, προσπίπτει κάθετα σε κάθε κύτταρο και ένα σύστημα ανιχνευτών της φωτεινής ακτινοβολίας καταγράφει την πρόσθια και εγκάρσια σκεδαζόμενη ακτινοβολία καθώς και την ακτινοβολία φθορισμού από τα επισημασμένα με τα αντισώματα κύτταρα. Έπειτα, μέσω Η/Υ και με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού, μπορεί να καταγραφεί ένας πληθυσμός ομοειδών σε σχήμα, μέγεθος αλλά και ποιότητα κυττάρων (Μπουρνάκας, 2021).

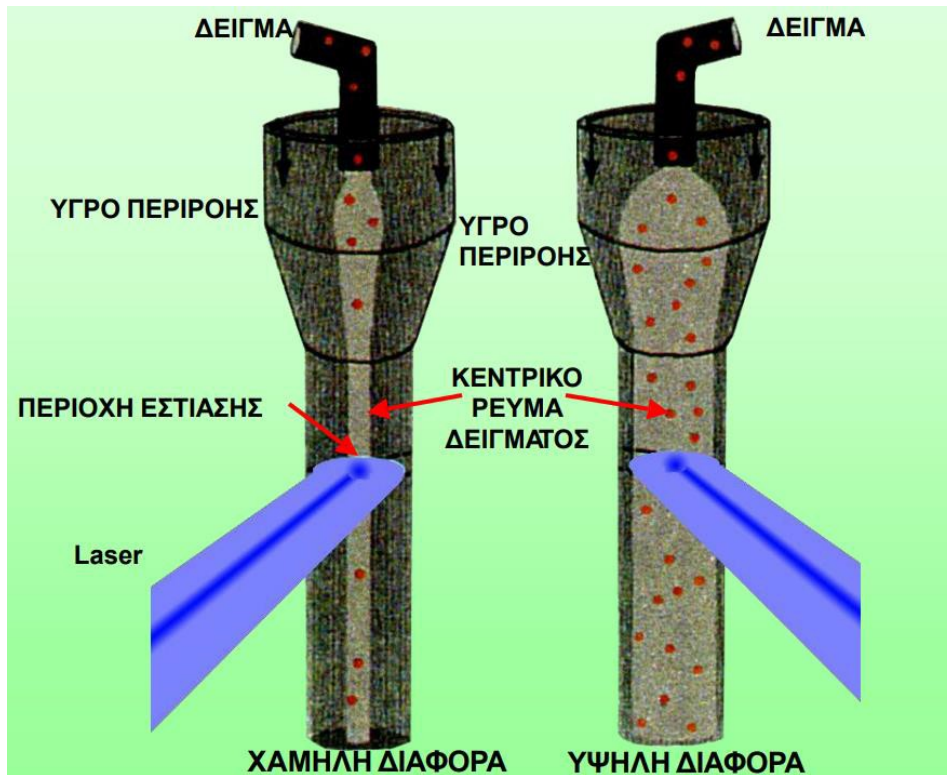
Η διαδικασία της κυτταρομετρίας ροής περιλαμβάνει τρία βασικά συστήματα: το υδροδυναμικό σύστημα ροής, το οπτικό σύστημα και το ηλεκτρονικό σύστημα.



Εικόνα 3.2 : Απεικόνιση των τριών βασικών συστημάτων κυτταρομετρίας ροής

3.3.2 Υδροδυναμικό Σύστημα Ροής

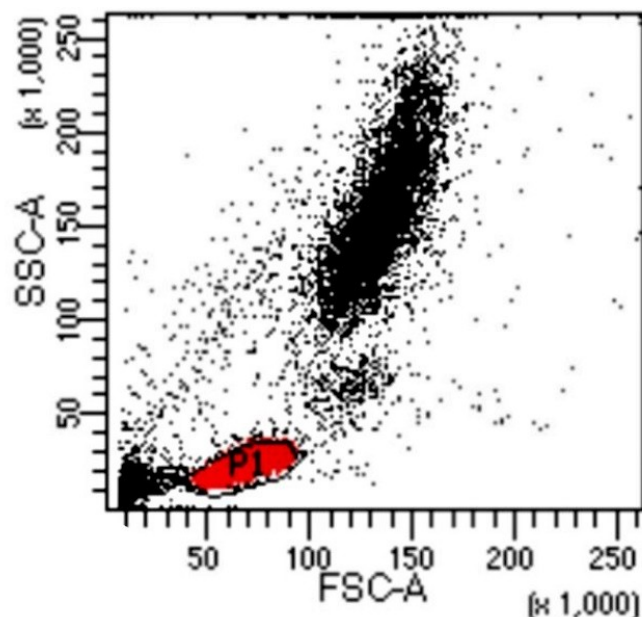
Το υδροδυναμικό σύστημα ροής είναι το πρώτο σύστημα που συντελεί στην διαδικασία της κυτταρομετρίας και η λειτουργία του είναι να μεταφέρει τα κύτταρα από το διάλυμα προς το σημείο που θα γίνει η ακτινοβολή τους. Οι βασικές απαιτήσεις που υπάρχουν για το υδροδυναμικό σύστημα ροής είναι αρχικά η δημιουργία ροής στην οποία τα κύτταρα θα ρέουν ένα προς ένα μπροστά από την δέσμη και όχι κατά συσσωματώματα. Ακόμα θα πρέπει η ροή των κυττάρων να είναι ομοιόμορφη και εστιασμένη στο κέντρο της διαδρομής ενώ θα πρέπει το σύστημα ροής να είναι κατάλληλο ώστε να μην αλλοιώνει τα φυσικά χαρακτηριστικά των κυττάρων, όπως το σχήμα τους και την ακεραιότητά τους. Η εστιασμένη ροή των κυττάρων γίνεται εφικτή μέσω της υδροδυναμικής εστίασης. Για αυτή την τεχνική χρειάζεται το ρευστό δείγμα και μια μεγαλύτερη ποσότητα ενός υδατικού διαλύματος, που ονομάζεται υγρό περιροής (sheath fluid). Το υγρό περιροής είναι ένα ισότονο διάλυμα το οποίο εξασφαλίζει την διατήρηση του σχήματος των κυττάρων. Τα δύο αυτά ρευστά ρέουν με διαφορετικές πιέσεις και με την πίεση του δείγματος να είναι πάντα μεγαλύτερη από του υγρού περιροής. Η διαφορά των πιέσεων ρυθμίζει τον ρυθμό ροής και την διάμετρο του ρεύματος ροής. Οι λόγοι που χρησιμοποιείται η υδροδυναμική εστίαση έναντι μικροκαναλιών, που θα διασφάλιζαν τα ίδια χαρακτηριστικά ροής, είναι τεχνικοί (Goetz & al., 2018). Αρχικά ρυθμίζοντας κατάλληλα τις πιέσεις των δύο υγρών μπορεί να δημιουργηθεί επιθυμητή διάμετρος ροής για κάθε δείγμα που εξετάζουμε και δεν χρειάζεται να κατασκευαστούν κανάλια ροής πολύ μικρών διαστάσεων που θα ήταν τεχνικά δύσκολο και ακριβό. Επίσης μια ακόμη τεχνική δυσκολία από την οποία απαλλάσσει η υδροδυναμική εστίαση είναι ότι στην περίπτωση χρήσης των μικροκαναλιών θα υπήρχε μεγάλη πιθανότητα κάποιων κυττάρων να κολλήσουν και να φράξουν το κανάλι με αποτέλεσμα να διακόψουν την ροή. Ο ρυθμός ροής των κυττάρων μπορεί να ελεγχθεί με δύο τρόπους. Η πρώτη επιλογή, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, είναι ρυθμίζοντας την πίεση στο δείγμα και στο υγρό περιροής. Αυτό μπορεί να γίνει με χρήση αερίων, αέρα ή αζώτου, για την ρύθμιση πιέσεων και για τα δύο ρευστά. Ο δεύτερος τρόπος είναι με τη ογκομετρική είσοδο του δείγματος. Σε αυτή την περίπτωση ο ρυθμός ροής του δείγματος ελέγχεται με χρήση μια σύριγγας. Το εξάρτημα στο οποίο γίνεται τελικά η σύνδεση του δείγματος με το υγρό περιροής λέγεται κυψελίδα ροής και ο ρόλος της είναι να ρυθμίζει τον άξονα ροής, τις διαστάσεις της ροής των δύο υγρών αλλά και το σημείο της υδροδυναμικής εστίασης. Υπάρχουν διάφορα είδη κυψελίδων ροής όπου κάθε ένα από αυτά είναι κατάλληλο για διαφορετικές εφαρμογές. Πολύ σημαντική στον τρόπο κατασκευής των κυψελίδων ροής είναι και η διασφάλιση της ομοιόμορφης ροής. Στην περιοχή που ενώνεται το δείγμα με το υγρό περιροής, η ροή πρέπει να είναι γραμμική ώστε τα δύο ρευστά να μην αναμειγνύονται και να επιτευχθεί η εστίαση (Μπουρνάκας, 2021), (Μιχαλάκης, 2009).



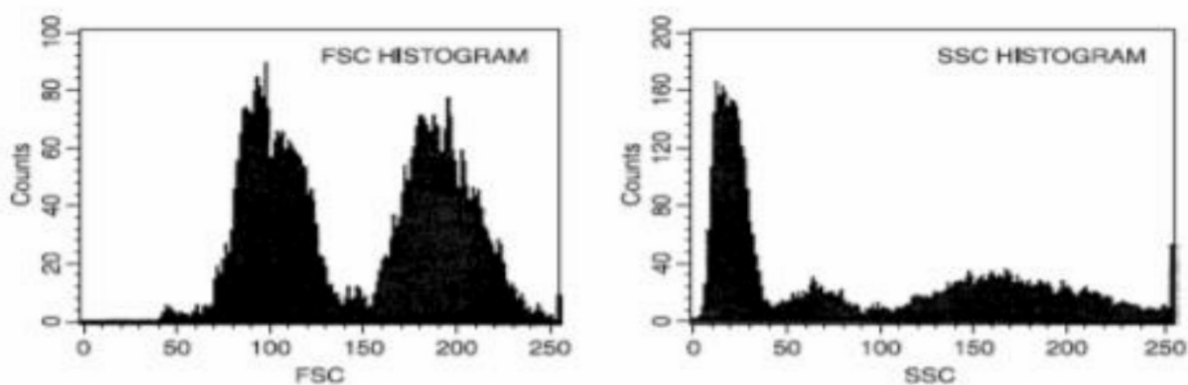
Εικόνα 3.3 : Απεικόνιση υδροδυναμικού συστήματος ροής

3.3.3 Οπτικό Σύστημα

Αφού επιτευχθεί η κατάλληλη ροή των κυττάρων, το επόμενο σύστημα που δρα για την επίτευξη της κυτταρομετρίας είναι το οπτικό. Το οπτικό σύστημα χωρίζεται σε δύο κατηγορίες, τα οπτικά συστήματα διέγερσης και τα οπτικά συστήματα συλλογής. Στα συστήματα διέγερσης κατατάσσονται τα laser και οι φακοί εστίασης ενώ στα συστήματα συλλογής τοποθετούνται οι φακοί συλλογής, τα διχρωμικά κάτοπτρα, τα φίλτρα και οι ανιχνευτές. Η διαδικασία αυτή ξεκινάει με την δέσμη laser η οποία κατευθύνεται και ευθυγραμμίζεται ώστε να διαπερνά κάθετα την ροή των κυττάρων. Η δέσμη είναι κατάλληλα εστιασμένη και διαμορφωμένη ώστε να «στοχεύει» ένα κύτταρο κάθε φορά. Όταν η ακτινοβολία προσπέσει πάνω στο κύτταρο, τότε θα δημιουργηθούν πολλαπλές σκεδάσεις προς όλες τις κατευθύνσεις. Οι σκεδάσεις που θα συλλεχθούν είναι η πρόσθια σκέδαση (forward Scatter FSC) και η πλάγια σκέδαση (Side Scatter SSC) η οποία είναι περίπου στις 90° (Μπουρνάκας, 2021).



Εικόνα 3.4 : Διαγραμματική απεικόνιση του φαινομένου με άξονες την πρόσθια και πλάγια σκέδαση (FSC-A και SSC-A αντίστοιχα) που διακρίνει τους πληθυσμούς κυττάρων βάσει του μεγέθους και της εσωτερικής πολυπλοκότητας αντίστοιχα.

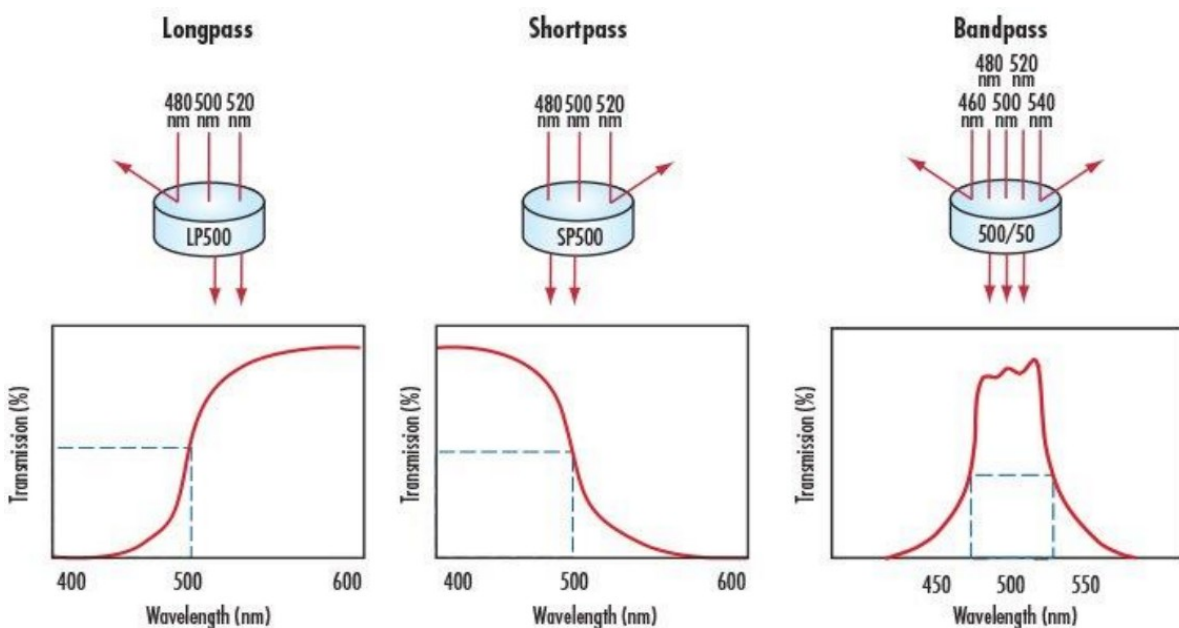


Εικόνα 3.5 : Απεικόνιση FSC & SSC σκεδάσεων

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την σκέδαση του φωτός είναι το μέγεθος του κυττάρου, η μεμβράνη του, το σχήμα του και η τοπογραφία του αλλά και τα εσωτερικά σωματίδια του κυττάρου, ο πυρήνας του και γενικότερα η εσωτερική πολυπλοκότητά του. Η πρόσθια σκέδαση είναι η σκέδαση που λαμβάνουμε στην ίδια ευθεία με την διάδοση της δέσμης laser και παίρνουμε από αυτή πληροφορίες για το μέγεθος του ανιχνευόμενου κυττάρου. Αντίθετα, η πλάγια σκέδαση δίνει πληροφορίες για την εσωτερική πολυπλοκότητά του. Ακόμα, στην πλάγια σκέδαση ανιχνεύεται και φθορίζουσα ακτινοβολία η οποία προέρχεται από φθορίζοντα αντισώματα ή χρωστικές με τις οποίες έχουν κατάλληλα επισημανθεί τα κύτταρα. Για να γίνει η αναγνώριση των

διαφορετικών κυττάρων χρειάζεται να συνδυαστούν κατάλληλα οι μετρήσεις και από την πρόσθια και από την πλάγια σκέδαση.

Περνώντας στα οπτικά συστήματα συλλογής, όπως αναφέρθηκε παραπάνω συλλέγουμε ακτινοβολία σε δύο κατευθύνσεις. Με την βοήθεια φακών συλλογής φωτός, η ακτινοβολία, μετά την αλληλεπίδραση της δέσμης με το κύτταρο, συλλέγεται και ευθυγραμμίζεται ώστε να μεταφερθεί στα φίλτρα και τους ανιχνευτές. Τα οπτικά φίλτρα τοποθετούνται κυρίως στην πλάγια σκέδαση ώστε να διαχωρίσουν τα διάφορα μήκη κύματος της ακτινοβολίας. Υπάρχουν διάφοροι τύποι φίλτρων που χρησιμοποιούνται στην κυτταρομετρία ροής. Αρχικά τα φίλτρα ουδέτερης πυκνότητας (ND) μειώνουν την ένταση της ακτινοβολίας και τοποθετούνται μπροστά από τον ανιχνευτή πλάγιας σκέδασης. Στην συνέχεια, πολύ σημαντικά είναι τα διχρωϊκά κάτοπτρα (dichroic mirror) τα οποία τοποθετούνται σε γωνία 45°, ανακλούν συγκεκριμένο μήκος κύματος το καθένα και επιτρέπουν την διάδοση των υπολοίπων μηκών κύματος της αρχικής ακτινοβολίας. Τέλος έχουμε τα οπτικά φίλτρα που τοποθετούνται κάθετα στην δέσμη και επιτρέπουν τη διάδοση συγκεκριμένων μηκών κύματος. Αυτά χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες, τα φίλτρα διέλευσης ζώνης συχνοτήτων (bandpass filters) τα οποία επιτρέπουν να περάσει ακτινοβολία συγκεκριμένου εύρους, τα φίλτρα μακράς διόδου (long pass filters) όπου επιτρέπουν την ακτινοβολία με μήκος κύματος μεγαλύτερο από μια τιμή και τέλος τα φίλτρα βραχείας διόδου (short pass filter) τα οποία επιτρέπουν την ακτινοβολία με μήκος κύματος μικρότερο από μια συγκεκριμένη τιμή. Με αυτόν τον τρόπο γίνεται εφικτός ο διαχωρισμός μεγάλου εύρους ακτινοβολίας και ανάλυση της ακτινοβολίας που προέρχεται από φθορισμό (Μπουρνάκας, 2021).



Εικόνα 3.6 : Τύποι φίλτρων στα κυτταρόμετρα ροής

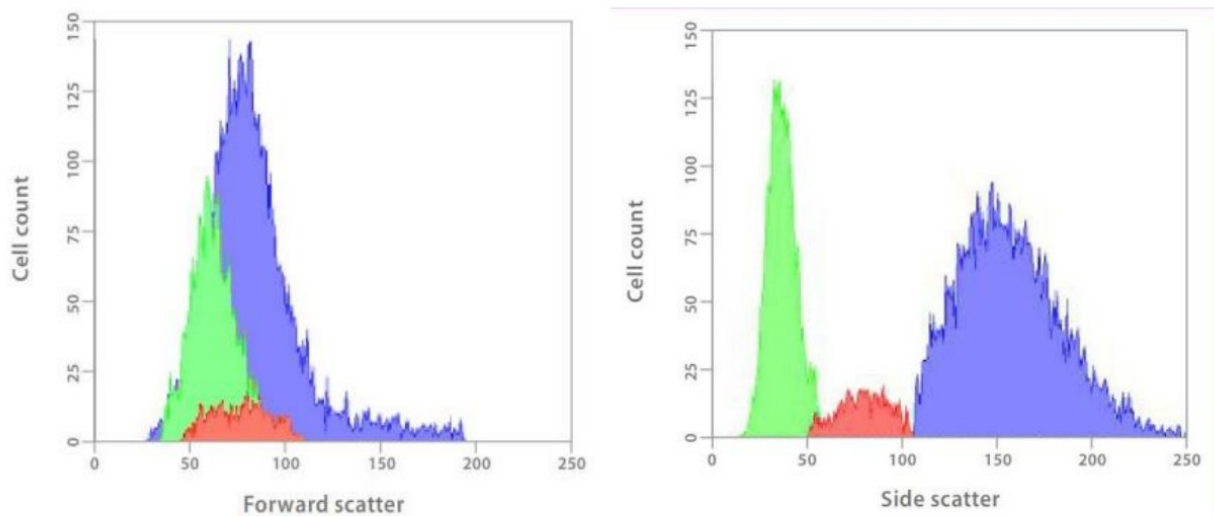
Οι ανιχνευτές που θα λάβουν τελικά την διαχωρισμένη ακτινοβολία, την μετατρέπουν σε ηλεκτρικό σήμα ανάλογο του αριθμού των φωτονίων που έχει προσπέσει σε αυτές. Υπάρχουν δύο κατηγορίες φωτοανιχνευτών. Οι φωτοδιόδοι (PDs) και οι φωτοπολλαπλασιαστές (PMTs). Οι φωτοπολλαπλασιαστές είναι πιο ευαίσθητοι, καθώς ενισχύουν το σήμα, έχουν όμως χαμηλότερη κβαντική απόδοση σε σχέση με τις φωτοδιόδους. Κατ' επέκταση οι φωτοπολλαπλασιαστές χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση ασθενών σημάτων που δημιουργούνται από την πλάγια σκέδαση και τον φθορισμό, ενώ οι φωτοδιόδοι τοποθετούνται για την ανίχνευση ισχυρών φωτεινών σημάτων που δημιουργούνται από την πρόσθια σκέδαση.

Πολύ σημαντικό ρόλο επιπλέον στο οπτικό σύστημα έχουν τα laser. Τα laser αποτελούν τον πιο ακριβό εξοπλισμό όλου του συστήματος κυτταρομετρίας. Τα σύγχρονα συστήματα κυτταρομετρίας ροής μπορούν να ενσωματώσουν μέχρι και επτά ή και περισσότερα laser. Μια σημαντική προδιαγραφή ενός laser για την κυτταρομετρία είναι το σχήμα της δέσμης. Η ιδανική συνθήκη για αυτή την εφαρμογή είναι η δέσμη να έχει Γκαουσιανό προφίλ ρυθμού TEM₀₀. Για την επίτευξη αυτού, πολλές φορές χρησιμοποιούνται και εξωτερικοί κυλινδρικοί φακοί ώστε να μετατρέψουν την δέσμη σε όσο το δυνατόν πιο κυκλική και ενός ρυθμού. Σημαντικό επίσης χαρακτηριστικό αυτών των laser είναι να είναι συνεχής λειτουργίας. Υπάρχει το ενδεχόμενο χρήσης και παλμικών laser με την προϋπόθεση ότι έχουν πολύ μεγάλο ρυθμό επαναληπτικότητας (>10MHz) και μεγάλη διάρκεια παλμού. Τέλος τα laser που χρησιμοποιούνται για κυτταρομετρία ροής θα πρέπει να είναι σταθερά στην ακτινοβολία τους ως προς το χρόνο. Η κατάλληλη επιλογή τύπου laser για την κυτταρομετρική συσκευή, εξαρτάται κυρίως από τον τύπο φθορίζοντων αντισωμάτων ή βαφών που έχουν τοποθετηθεί στο δείγμα και το κατάλληλο μήκος κύματος που θα τα διεγείρει. Το πιο συνηθισμένο laser στην κυτταρομετρία ροής είναι το laser αργού το οποίο εκπέμπει στα 488 nm και διεγείρει πολλές συνθετικές αλλά και φυσικές φθορίζουσες βαφές. Τα περισσότερα συστήματα κυτταρομετρίας χρησιμοποιούν παραπάνω του ενός laser και συνήθως ένα laser που εκπέμπει στο UV στην περιοχή των 300-400 nm αλλά και laser HeNe που εκπέμπει στο κόκκινο (633 nm). Η αυξανόμενη ανάγκη για διεξαγωγή πολυπαραμετρικών αναλύσεων μεγάλης ακρίβειας οδηγεί την ενσωμάτωση όλο και περισσότερων διαφορετικών πηγών laser στο σύστημα. Αυτή η προσθήκη δημιουργεί και πολλά τεχνικά προβλήματα. Σαν λύση αυτών των προβλημάτων έρχονται διάφορες νέες τεχνολογίες οι οποίες συνδυάζουν την ακτινοβολία διαφόρων laser και μια δέσμη που περιέχει όλα τα μήκη κύματος που είναι απαραίτητα για κάθε σύστημα κυτταρομετρίας (Μπουρνάκας, 2021).

3.3.4 Ηλεκτρονικό Σύστημα

Το τελευταίο σύστημα της διάταξης της κυτταρομετρίας ροής είναι το ηλεκτρονικό. Αυτό είναι υπεύθυνο για την μετατροπή από αναλογικά σε ψηφιακά σήματα, την επεξεργασία της ροής φωτονίων από τον ανιχνευτή και την αποθήκευση αυτών των δεδομένων σε κατάλληλη μορφή για την περαιτέρω ανάλυσή τους. Η αποθήκευση των δεδομένων γίνεται με συγκεκριμένο παγκόσμιο πρωτόκολλο αποθήκευσης δεδομένων κυτταρομετρίας το οποίο ονομάζεται “Flow Cytometry Standard” (FCS). Αυτό το πρωτόκολλο αφορά την δομή στην αποθήκευση πληροφοριών και έχει υποχρεωτικά τρεις τομείς. Τον τομέα της κεφαλίδας, του κειμένου και των δεδομένων. Μια βασική τεχνική για την αποθήκευση και την επεξεργασία του μεγάλου όγκου δεδομένων είναι το Data Binning. Το Data Binning είναι μία τεχνική αντιστοίχισης ενός σετ τιμών μεγαλύτερης ακρίβειας σε ένα σετ τιμών μικρότερης ακρίβειας. Αυτή η τεχνική είναι απαραίτητη γιατί ενώ ο ανιχνευτής μπορεί να καταγράψει τιμές τάσης με πολύ μεγάλη ακρίβεια τελικά το σύστημα επεξεργασίας μπορεί να επεξεργαστεί πεπερασμένες τιμές, άρα η κατηγοριοποίηση των τιμών σε πεπερασμένες ομάδες είναι αναπόφευκτος. Όπως αναφέρθηκε και στο οπτικό σύστημα, η ανάλυση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας γίνεται σε δύο κατευθύνσεις, στην πρόσθια και την πλάγια.

Αναλύοντας τα δεδομένα τις πρόσθιας σκέδασης παίρνουμε ένα διάγραμμα που στον y άξονα καταγράφει το πλήθος των κυττάρων ενώ στον x άξονα έχουμε την τιμή τάσης. Η τιμή της τάσης είναι ανάλογη με το μέγεθος του κάθε ανιχνευόμενου κυττάρου. Από τα δεδομένα της πλάγιας σκέδασης έχουμε πάλι ένα διάγραμμα που στον άξονα των y μετράει το πλήθος των κυττάρων και στο άξονα των x τις τιμές των τάσεων που όμως αυτή την φορά η τάση είναι ανάλογη της πολυπλοκότητας στο εσωτερικό των κυττάρων. Η καλύτερη δυνατή απεικόνιση για την αναγνώριση διαφόρων πληθυσμών κυττάρων στο δείγμα είναι ο συνδυασμός της πρόσθιας με την πλάγια σκέδαση (Μπουρνάκας, 2021).



Εικόνα 3.7 : Απεικόνιση πρόσθιας και πλάγιας σκέδασης

3.4 Εφαρμογές Κυτταρομετρίας Ροής

Η κυτταρομετρία ροής βρίσκει εφαρμογές σε μια πληθώρα πεδίων στην Βιοϊατρική, όπως είναι: η Ανοσολογία όπου προσφέρει σε αυτή την μοναδική ικανότητα να αναλύει ταυτόχρονα μεικτούς πληθυσμούς κυττάρων για πολλαπλές παραμέτρους , η Αιματολογία στην οποία μπορεί να επιτευχθεί ακριβή διάγνωση καθώς πολλές από τις αιματολογικές κακοήθειες έχουν μοναδικά ανοσοφαινοτυπικά προφίλ που μπορούν να χαρακτηριστούν από την κυτταρομετρία ροής και η Ογκολογία όπου η κυτταρομετρία μπορεί να αναλύσει την απόπτωση και τον κυτταρικό κύκλο.

Παράλληλα, μελλοντικά με την εξέλιξη της τεχνικής αυτής μπορεί να επιτραπεί η ανάλυση βιοχημικών μορίων ή να εφαρμοστεί σε νέα επιστημονικά πεδία και παθολογικές καταστάσεις όπως η ανίχνευση βακτηρίων ή διάφορων κυτταρικών οργανιδίων. Επιπλέον, μιας και είναι ταχύτατη και δίνει μια αποτελεσματική ανάλυση δεδομένων, μπορεί να εφαρμοστεί στον έλεγχο ποιότητας τροφίμων και νερού. Τέλος, σημαντική είναι η αναφορά στη συλλογή δεδομένων σε περισσότερες γωνίες ως προς τη διεύθυνση διάδοσης της δέσμης laser αλλά και σε πολλά μήκη κύματος, καθώς μπορεί να δώσει πολύ περισσότερες πληροφορίες για το διαχωρισμό και την κατηγοριοποίηση των προς ανάλυση κυττάρων.

Τέλος, υπάρχουν συστήματα κυτταρομετρίας ροής που έχουν την δυνατότητα να διαχωρίζουν τα κύτταρα μετά την ανίχνευσή τους. Κυριαρχούν δύο τρόποι για την επίτευξη του διαχωρισμού αυτού, ο μηχανικός και ο ηλεκτροστατικός. Ο μηχανικός κυτταρο-διαχωριστής βασίζεται σε ένα πιεζοηλεκτρικό έμβολο το οποίο ανάλογα με την τάση μπορεί να διαχωρίσει τα κατάλληλα κύτταρα. Στον ηλεκτροστατικό διαχωριστή δημιουργούνται σταγονίδια σε κάποιο από αυτά περιέχεται το κύτταρο που πρέπει να διαχωριστεί, πιθανά και κάποια επιπλέον, και το ζητούμενο σταγονίδιο φορτίζεται κατάλληλα με διαφορετικό φορτίο από τα υπόλοιπα. Στη συνέχεια με ηλεκτροφόρες πλάκες γίνεται ο διαχωρισμός σε διαφορετικά δοχεία. Με τον τελευταίο μηχανισμό, που είναι και ο πιο διαδεδομένος, μπορεί να γίνει διαχωρισμός μέχρι και τεσσάρων πληθυσμών (Λαλλάς & Ζαφειρόπουλος., 2019).

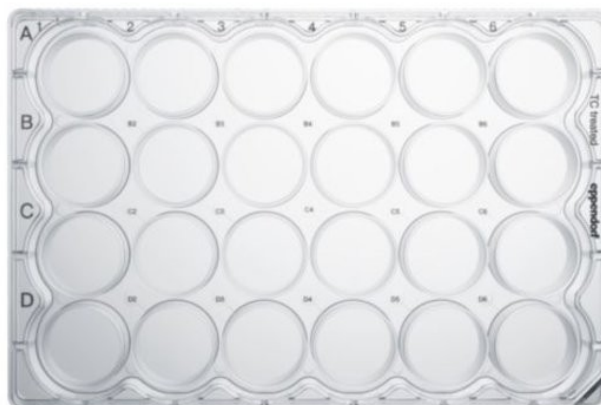
Κεφάλαιο 4 : Πειράματα Ακτινοβόλησης Καρκινικών Κυττάρων με τη Χρήση Νανοδομημάτων Χρυσού

4.1 Εισαγωγή

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της ακτινοευαισθητοποίησης των καρκινικών κυττάρων με τη χρήση των νανοδομημάτων χρυσού (AuNPs). Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη ήταν η SiHa, η οποία απομονώθηκε από θραύσματα ενός πρωτογενούς δείγματος ιστού της μήτρας από μια 55χρονη γυναίκα ιαπωνικής καταγωγής. Η σειρά SiHa είναι από squamous cell carcinoma, το οποίο αποδίδεται ως ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα. Πραγματοποιήθηκαν συγκριτικά πειράματα ακτινοβόλησης για διαφορετικές συγκεντρώσεις κυττάρων με ενέργειες τις τάξεως των keV και των MeV. Στην πρώτη περίπτωση, η ενέργεια που δόθηκε ήταν 27 keV (=80 kVp) η οποία μάλιστα επιλέχθηκε λόγω του φωτοηλεκτρικού φαινομένου αλλά και λόγω της υψηλής πιθανότητας των αλληλεπιδράσεων. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν 150.000 κύτταρα σε κάθε πηγάδι του plate (6 στήλες πηγαδιών σε κάθε plate). Στις στήλες 1 έως 5 εισήχθησαν νανοδομημένα χρυσού (AuNPs) διαμέτρου 50 nm και σχήματος σφαίρας (gold nanospheres).



Εικόνα 4.1 : Απεικόνιση διαφόρων σχημάτων νανοδομημάτων χρυσού. Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι νανοσφαίρες και τα νανοκελύφη.



Εικόνα 4.2 : Απεικόνιση του plate που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια των κυττάρων. Στα πηγάδια 6A, 6B, 6C, 6D δεν εισήχθησαν AuNPs ενώ στα υπόλοιπα εισήχθησαν AuNPs με αντίστοιχες συγκεντρώσεις : 0,5μgr , 2,5 μgr, 5 μgr, 10 μgr και 20 μgr.

Στη συνέχεια, τα κύτταρα αυτά μαζί με τα νανοσωματίδια ακτινοβολήθηκαν στον γραμμικό επιταχυντή με σκοπό να μελετηθεί το ποσοστό επιβίωσής τους.

Στην δεύτερη περίπτωση, η ενέργεια που δόθηκε ήταν αρκετά μεγαλύτερη, στα 6 MeV. Αρχικά, το πείραμα προοριζόταν να γίνει με την εναλλαγή τριών ενεργειών (6,10 & 15 MeV). Ωστόσο, τα 10 και 15 MeV δεν απέδωσαν διότι η μέγιστη αποδοτικότητα της ενίσχυσης της ακτινοευαισθησίας λόγω νανοσωματιδίων προκύπτει στο εύρος του φωτοηλεκτρικού ενώ παράλληλα γνωρίζουμε πως το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο δρα καλύτερα σε ενέργειες τις τάξεως των keV. Επιπλέον, αν και τα 6 MeV είναι αρκετά υψηλότερα από τα keV παρατηρείται ακτινοευαισθησία. Αυτό συμβαίνει διότι η ακτινοβολία του γραμμικού δεν είναι αμιγώς μονοενεργειακή και υπάρχει φάσμα που εμπεριέχει και φωτόνια σε χαμηλές ενέργειες κοντά στο φωτοηλεκτρικό.

Στο πείραμα αυτό, χρησιμοποιήθηκαν νανοσωματίδια διαμέτρου 120 nm σε σχήμα νανοκελύφους (nanoshell) ενώ οι δόσεις που δόθηκαν κατά την ακτινοβολήση είναι 1,2 & 4 Gy. Ομοίως και πάλι, χρησιμοποιήθηκαν 150.000 κύτταρα σε κάθε πηγάδι του plate (6 στήλες πηγαδιών σε κάθε plate) και στις στήλες 1 έως 5 εισήχθησαν νανοσωματίδια χρυσού (AuNPs).

4.2 Καλλιέργεια της Κυτταρικής Σειράς

Αναπτύχθηκαν οι κυτταρικές καλλιέργειες για να διατηρηθούν τα κύτταρα SiHA τα οποία είναι καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της.

Αρχικά τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία κάτω από -130°C , κατά προτίμηση σε υγρό αζώτου, μέχρι να είναι έτοιμα για χρήση. Έπειτα, ξεπαγώθηκε το φιαλίδιο με απαλή ανάδευση σε λουτρό νερού 37°C . Ωστόσο, για να μειωθεί η πιθανότητα μόλυνσης, κρατήθηκε ο δακτύλιος O και το καπάκι έξω από το νερό. Ενώ παράλληλα η απόψυξη πρέπει να είναι γρήγορη (περίπου 2 λεπτά).

Μόλις ξεπαγώσει το περιεχόμενο, αφαιρέθηκε το φιαλίδιο από το λουτρό νερού και απολυμάνθηκε βυθίζοντας ή ψεκάζοντας με 70% αιθανόλη. Όλες οι εργασίες από αυτό το σημείο και μετά εκτελούνταν υπό αυστηρές άσηπτες συνθήκες. Τα περιεχόμενα του φιαλιδίου μεταφέρθηκαν σε φιάλη καλλιέργειας ιστού 75 cm^2 και αραιώθηκαν με το συνιστώμενο πλήρες μέσο καλλιέργειας. Ήταν σημαντικό ωστόσο να αποφευχθεί η υπερβολική αλκαλικότητα του μέσου κατά την ανάκτηση των κυττάρων. Από τον κατασκευαστή προτεινόταν πριν από την προσθήκη του περιεχομένου του φιαλιδίου, το δοχείο καλλιέργειας που περιέχει το μέσο ανάπτυξης να τοποθετηθεί στο εκκολαπτήριο για τουλάχιστον 15 λεπτά, ώστε να μπορέσει το μέσο να φθάσει στο κανονικό του pH (7.0-7.6). Μετά, η καλλιέργεια επώαστηκε στους 37°C στον θάλαμο επώασης (incubator) σε κορεσμένες συνθήκες υγρασίας και παρουσία 5% CO_2 .



Εικόνα 4.3 : Απεικόνιση του θαλάμου επώασης που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια των πειραμάτων

Σε περίπτωση που θα ήταν προτιμότερο να αφαιρεθεί αμέσως ο κρυοπροστατευτικός παράγοντας ή να ληφθεί ένα πιο συμπυκνωμένο εναιώρημα κυττάρων, το εναιώρημα του κυττάρου θα έπρεπε να φυγοκεντρηθεί σε περίπου 125 xg για 5 έως 10 λεπτά. Έπειτα, να απορριφθεί το υπερκείμενο υγρό και επαναιωρηστούν τα κύτταρα με φρέσκο μέσο ανάπτυξης στο λόγο αραιώσης που συνιστάται στις οδηγίες.

Εν συνεχεία, αφού ολοκληρώθηκε η διαδικασία τα απόψυξης, τα κύτταρα ήταν έτοιμα να μπουν σε διαδικασία καλλιέργειας. Έπειτα προστέθηκε 2,0 έως 3,0 ml διαλύματος Trypsin-EDTA στη φιάλη και παρατηρήθηκαν τα κύτταρα κάτω από ανεστραμμένο μικροσκόπιο μέχρι να διασκορπιστεί το κυτταρικό στρώμα (συνήθως εντός 5 έως 15 λεπτών). Για να αποφευχθεί η συσσώρευση, δεν χτυπήθηκε ούτε ανακαινήστηκε η φιάλη και αναμενόταν να αποσπαστούν τα κύτταρα. Τα κύτταρα που είναι δύσκολο να αποσπαστούν μπορούν να τοποθετηθούν στους 37°C για να διευκολυνθεί η διασπορά τους. Στη συνέχεια, προστέθηκε 6,0 έως 8,0 ml πλήρους μέσου ανάπτυξης (DMSO 5% (v/v)) και κύτταρα με ήπια διοχέτευση και εισήχθησαν οι κατάλληλες ποσότητες του εναιωρήματος κυττάρων στα νέα δοχεία καλλιέργειας. Τέλος, οι καλλιέργειες επώαστηκαν στους 37°C.

4.2.1 Διαδικασία επώασης των νανοσωματιδίων

Ο χρόνος επώασης των κυττάρων με νανοσωματίδια χρυσού ποικίλλει. Τα κύτταρα επώαστηκαν με NPs για μερικές ώρες, ώστε να μπορέσουν να τα ενσωματώσουν. Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε ένα τρυβλίο Petri και αφού προσκολλήθηκαν στο υπόστρωμα, το παλιό μέσο στο οποίο βρίσκονταν, απορρίφθηκε και αντικαταστάθηκε με φρέσκο μέσο το οποίο περιέχει NPs. Τα νανοσωματίδια αυτά μπορεί να ήταν σε μορφή σκόνης ή σε υγρό εναιώρημα. Στη συνέχεια, τα νανοσωματίδια επαναιωρήθηκαν σε φρέσκο μέσο ανάπτυξης προκειμένου να φτάσουν την τελική επιθυμητή συγκέντρωση. Ο χρόνος επώασής τους ποικίλλει από 2-4 ώρες έως 24,48 ή 72 ώρες. Ωστόσο, στις περισσότερες έρευνες ακτινοευαισθητοποίησης κυττάρων με νανοσωματίδια χρυσού, επωάζουν τα κύτταρα για περίπου 24 ώρες ενώ οι χρόνοι επώασης 48 και 72 ωρών είναι σπανιότεροι μιας και τα κύτταρα στο μεγάλο αυτό χρονικό διάστημα θα οδηγηθούν σε κυτταρικό θάνατο λόγω έλλειψης θρεπτικού υλικού. Επίσης, σε μεγάλα χρονικά διαστήματα αναμένεται τα νανοσωματίδια να σχηματίσουν συσσωματώματα και ως εκ τούτου η αποτελεσματικότητά τους θα μειωθεί σημαντικά. Στην παρούσα διπλωματική εργασία, ως χρόνος επώασης επιλέχθηκαν οι 24 ώρες.

4.3 Ακτινοβολήσεις κυττάρων με ενέργειες keV

Η ακτινοβολήση των δειγμάτων για τις ενέργειες των keV πραγματοποιήθηκε σε ακτινοσκοπικό μηχάνημα ακτίνων X ενώ η ακτινοβολήση των δειγμάτων για τις ενέργειες των MeV πραγματοποιήθηκε στον γραμμικό επιταχυντή VitalBeam™ του κατασκευαστικού οίκου Varian (Varian, CA, ΗΠΑ) υπό θερμοκρασία δωματίου στο τμήμα Ακτινοθεραπείας του Β' Εργαστηρίου Ακτινολογίας του Νοσοκομείου «Αττικόν».

Πριν την ακτινοβολήση προηγήθηκε η μέτρηση του ρυθμού δόσης με την βοήθεια φορητού δοσίμετρου, που τοποθετείται στο σημείο που θα ακτινοβοληθούν τα δείγματα. Ύστερα από τη βαθμονόμηση της πηγής και αφού εισήχθησαν σε κάθε πηγάδι του πιάτου (Plate) 150.000 κύτταρα, τα δείγματα ακτινοβολήθηκαν με 80 kVp, δηλαδή με περίπου 27 keV ενώ η δόση που τους δόθηκε ήταν αντίστοιχα, 0, 0,5, 1 και 1,5 Gy. Η ενέργεια των 27 keV επιλέχθηκε κυρίως λόγω του φωτοηλεκτρικού φαινομένου που υπερισχύει σε αυτές τις ενέργειες, αλλά και λόγω της υψηλής πιθανότητας αλληλεπιδράσεων.



Εικόνα 4.4 : Εξωτερική και εσωτερική απεικόνιση ενός ακτινοσκοπικού μηχανήματος ακτίνων X

Αρχικά, ακτινοβολήθηκαν τα κύτταρα που είχαν καλλιεργηθεί χωρίς νανοσωματίδια και εν συνεχεία τα κύτταρα που είχαν επωαστεί με νανοσωματίδια χρυσού.

Έπειτα, τοποθετήθηκαν τα κύτταρα στον θάλαμο ακτινοβολήσης, σφραγίστηκε ο θάλαμος, εξήλθαμε από τον θάλαμο όπου βρίσκεται ο γραμμικός επιταχυντής και με τη βοήθεια του χειριστηρίου ξεκίνησε η ακτινοβολήση των δειγμάτων. Η δόση που απορρόφησαν είναι ανάλογη του χρόνου που παρέμειναν τα κύτταρα μέσα στο θάλαμο.

Μετά την ακτινοβολήση, τα κύτταρα πάρθηκαν και μπήκαν στο επωαστήριο των 37°C για 20 με 30 min, ώστε να επιτραπεί η ενεργοποίηση των μηχανισμών που οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο. Τα κύτταρα που τη στιγμή της ακτινοβολήσης ήταν στην μιτωτική φάση, προχώρησαν σε επόμενες φάσεις του κυτταρικού κύκλου τους. Με το πέρας των 20 min, βγήκαν από τον κλίβανο και το θρεπτικό υλικό απορρίφθηκε. Προστέθηκε νέο θρεπτικό υλικό (5 ml) και colcemide σε αναλογία 1:100 δηλαδή στα 5 ml θρεπτικού υλικού βάζουμε 50μl colcemide. Το χρονικό διάστημα αυτό εξαρτήθηκε από τα ίδια τα κύτταρα ή την κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε. Ένας εμπειρικός κανόνας για να γίνει αντιληπτό αν τα κύτταρα ήταν στη μίτωση, ήταν το γεγονός πως ξεκόλλησαν από τον πάτο της φλάσκας και αρχίσαν να επιπλέουν στο θρεπτικό υλικό και έτσι παρατηρήθηκαν με τη βοήθεια του μικροσκοπίου.

Με το πέρας των τριών ωρών στο επωαστήριο και αφού τα κύτταρα έχουν φτάσει πλέον στην μίτωση, βγήκαν και τοποθετήθηκαν στο θάλαμο αποστείρωσης. Στη συνέχεια απορροφήθηκε το υπερκείμενο διάλυμα και μπήκε μέσα σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες. Ξεπλύθηκε με PBS (3 ml) και προστέθηκε κι αυτό. Έπειτα αφού τα κύτταρα δεν είχαν ξεκολλήσει από τον πάτο της φλάσκας, εισήχθη τρυψίνη (0,7ml) και η φλάσκα μπήκε ξανά στο κλίβανο για 10 min. Αφού ξεκόλλησαν τα κύτταρα, πάρθηκαν και αυτά με τη βοήθεια μιας πιπέτας και προστέθηκαν και αυτά μέσα στο υπερκείμενο. Στη συνέχεια, η φιάλη που εμπεριέχει το θρεπτικό υλικό τα κύτταρα και το PBS φυγοκεντρήθηκε. Αφού τοποθετήθηκαν στο μηχάνημα φυγοκέντρισης, ρυθμίστηκαν τις στροφές 1200 rpm (στροφές/s) για 5 min. Παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα είχαν δημιουργήσει στο κάτω μέρος της φιάλης ένα λευκό ίζημα. Απορρίφθηκε το υπερκείμενο διάλυμα, με σκοπό να παραμείνουν στο φιαλίδιο μόνο τα κύτταρα. Κρατώντας τη φιάλη σταθερή, ανακινήθηκε με το χέρι

με σταθερό ρυθμό το κάτω μέρος του γυάλινου σωλήνα ώστε να ξεκινήσει το ίζημα των κυττάρων σιγά σιγά να σπάει. Τέλος, προστέθηκε εκ νέου διάλυμα PBS ενός ml στον σωλήνα και ο κυτταρικός τους θάνατος θα μετρηθεί με την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής.

4.3.1 Συγκριτικές ακτινοβολήσεις κυττάρων με τη χρήση AuNPs

Πραγματοποιήθηκε επώαση των καλλιεργημένων κυττάρων για 24 ώρες με νανοσωματίδια χρυσού. Στα πείραμα των keV Τα νανοσωματίδια χρυσού που χρησιμοποιήθηκαν ήταν διαμέτρου 50 nm και σχήματος σφαίρας (AuNPs nanospheres). Στην 1 εκ των 6 στηλών δεν εισήχθησαν νανοσωματίδια χρυσού (ως control), ενώ στις υπόλοιπες 5 εισήχθησαν νανοσωματίδια με τις παρακάτω συγκεντρώσεις:

0,5 $\mu\text{gr/ml}$
2.5 $\mu\text{gr/ml}$
5 $\mu\text{gr/ml}$
10 $\mu\text{gr/ml}$
20 $\mu\text{gr/ml}$

Σε συνέχεια της εισαγωγής των νανοσωματιδίων στα κύτταρα, τοποθετήθηκαν εκ νέου στον γραμμικό επιταχυντή της Varian και ακτινοβολήθηκαν με ενέργεια 27 keV για δόσεις 0,5 , 1 & 1,5 Gy.

4.4 Ακτινοβολήσεις κυττάρων με ενέργειες MeV

Για την ακτινοβολήση των κυττάρων με ενέργειες MeV επαναλήφθηκε εκ νέου η ίδια διαδικασία με αυτή που περιγράφεται στην παράγραφο 4.3. Η ακτινοβολήση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε υπό θερμοκρασία δωματίου στον γραμμικό επιταχυντή VitalBeam™ του κατασκευαστικού οίκου Varian (Varian, CA, ΗΠΑ) του τμήματος Ακτινοθεραπείας του Β' Εργαστηρίου Ακτινολογίας του Νοσοκομείου «Αττικόν».

Πριν την ακτινοβολήση προηγήθηκε η μέτρηση του ρυθμού δόσης με την βοήθεια φορητού δοσίμετρου, που τοποθετείται στο σημείο που θα ακτινοβοληθούν τα δείγματα. Ύστερα από βαθμονόμηση της πηγής και αφού εισήχθησαν σε κάθε πηγάδι του πιάτου (Plate) 150.000 κύτταρα, τα δείγματα ακτινοβολήθηκαν με 6 MeV, ενώ η δόση που τους δόθηκε ήταν αντίστοιχα, 1, 2 και 4 Gy. Οι δόσεις που επιλέχθηκαν χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη.



Εικόνα 4.5 : Απεικόνιση του γραμμικού επιταχυντή της Varian που βρίσκεται στο Β' Εργαστήριο Ακτινολογίας στο Αττικό Νοσοκομείο.

4.4.1 Συγκριτικές ακτινοβολήσεις κυττάρων με τη χρήση AuNPs

Εισήχθησαν και πάλι στα κύτταρα νανοσωματίδια χρυσού, τα οποία αυτή τη φορά είχαν διαμέτρο 120 nm και σχήμα νανοκελύφους (AuNPs nanoshells) με συγκεντρώσεις :

0,5 µg/ml
2.5 µg/ml
5 µg/ml
10 µg/ml
20 µg/ml

Σε συνέχεια της εισαγωγής των νανοσωματιδίων στα κύτταρα, τοποθετήθηκαν εκ νέου στον γραμμικό επιταχυντή της Varian και ακτινοβολήθηκαν με 6 MeV δίνοντας 1,2 & 4 Gy στα κύτταρα.

4.5 Μέτρηση του κυτταρικού θανάτου με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής

Τα δείγματα μετά την ακτινοβολήση παρέμειναν 30 λεπτά στο θάλαμο επώασης και κατόπιν οδηγήθηκαν για ανάλυση στο κυτταρόμετρο ροής του Β' Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του Νοσοκομείου «Αττικών».

Για να προσδιοριστεί το ποσοστό του κυτταρικού θανάτου μιας καλλιέργειας στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου, επισημαίνεται το DNA των κυττάρων με ιωδιούχο προπίδιο (Propidium Iodide, PI), γίνεται χρώση του DNA με 7-AAD και αναλύεται ο πληθυσμός των κυττάρων με κυτταρομετρία ροής. Πιο συγκεκριμένα, η 7-αμινοακτινομυκίνη D (7-AAD) είναι μια φθορίζουσα χημική ένωση με ισχυρή συγγένεια με το DNA. Ως φθορίζουσα βαφή χρώσης DNA, το

7-AAD χρησιμοποιείται για τον αποκλεισμό μη βιώσιμων κυττάρων σε κυτταρομετρικές αναλύσεις ροής.

Το πρωτόκολλο έχει ως εξής:

Έκπλυση της καλλιέργειας με θρυψίνη και έκθεσή της σε θρυψίνη στον επωαστήρα στους 37°C για 3 λεπτά.

Φυγοκέντρηση του εναιωρήματος των κυττάρων στα 200g για 5 λεπτά.

Απομάκρυνση της θρυψίνης με ήπια αναρρόφηση.

Προσθήκη PBS.

Φυγοκέντρηση του εναιωρήματος των κυττάρων στα 200g για 5 λεπτά.

Απομάκρυνση του PBS με ήπια αναρρόφηση.

Προσθήκη 70μl DNA-Prep PRL και ήπια δόνηση για 10 sec.

Προσθήκη 5 μl 7-AAD σε 100 μl PBS

Παραμονή των κυττάρων για 30 min σε σκοτεινό μέρος.

Μεταφορά των κυττάρων στη συσκευή FACS (Fluorescence-activated Cell Sorting- ένας εξειδικευμένος τύπος κυτταρομετρίας ροής) όπου γίνεται η μέτρηση.

4.6 Αποτελέσματα ακτινοβολήσεων

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με σκοπό να διαπιστωθεί το ποσοστό επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων με και χωρίς νανοσωματίδια, αλλά και η ακτινοευαισθητοποίηση των καρκινικών κυττάρων όταν εισάγονται σε αυτά AuNPs.

Το ποσοστό επιβίωσης SF υπολογίστηκε από την παρακάτω σχέση:

$$SF (\%) = (\text{Partial } \%) - (\text{Dead } \%) \quad (4.1)$$

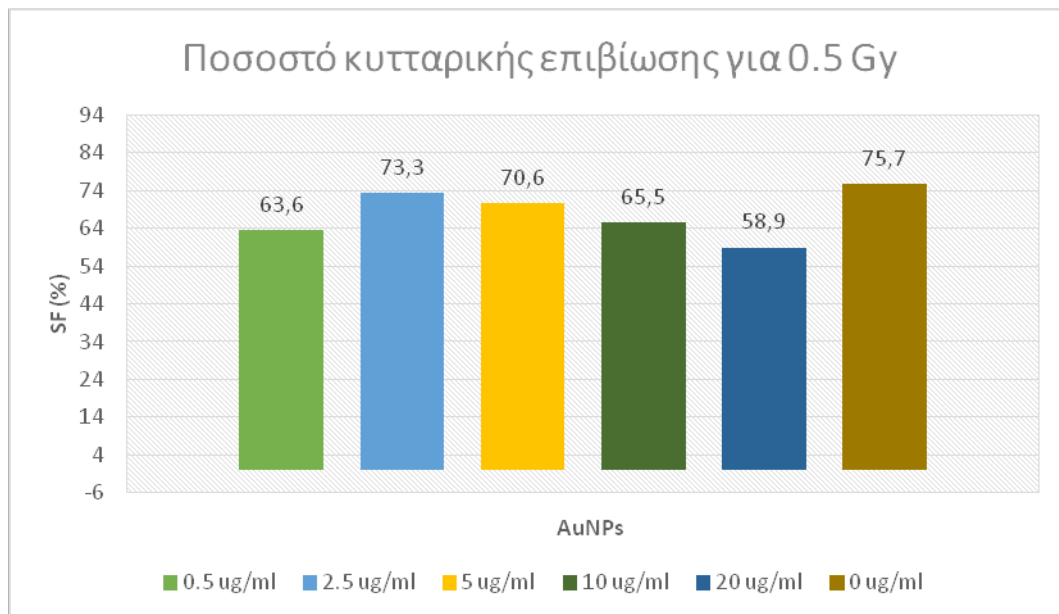
Όπου SF (%) είναι το ποσοστό της κυτταρικής επιβίωσης, Partial (%) είναι το δείγμα το οποίο υπόκειται στη διαδικασία της κυτταρομετρίας ροής (στο δείγμα αυτό εκτός από καρκινικά κύτταρα και νανοσωματίδια μπορεί να βρίσκονται και ήδη νεκρά κύτταρα ή μικρο-υπολείμματα σε κάποιο μικρό ποσοστό, συνεπώς από το 100% του δείγματος αφαιρώντας τα ήδη νεκρά κύτταρα ή μικρο-υπολείμματα παραμένει το ποσοστό του partial) και Dead (%) είναι το ποσοστό του κυτταρικού θανάτου που επήλθε στο εκάστοτε δείγμα.

Αφαιρώντας λοιπόν το dead από το partial, βρίσκεται το πραγματικό ποσοστό επιβίωσης των κυττάρων.

4.6.1 Ακτινοβόληση με ενέργειες keV

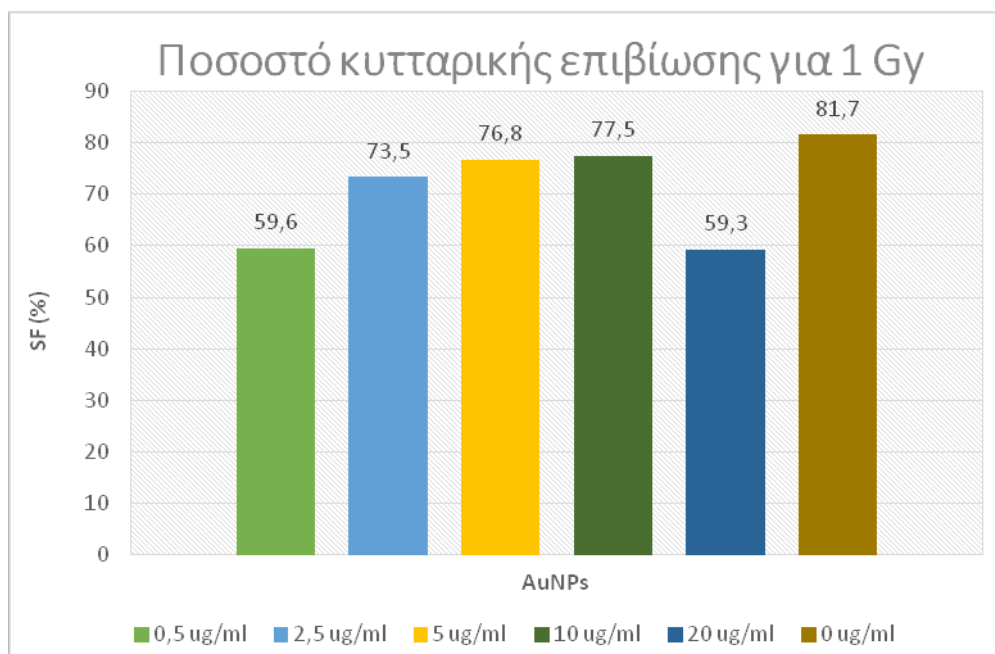
Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζονται τα ποσοστά κυτταρικής επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων συναρτήσει των διαφορετικών συγκεντρώσεων νανοσωματιδίων χρυσού (0 μg/ml-20 μg/ml) για διαφορετικές δόσεις ακτινοβολίας (0,5 Gy-1,5 Gy) για την ενέργεια των 27 keV.

Στο διάγραμμα 4.1 φαίνεται ότι για δόση ακτινοβόλησης 0,5 Gy το μεγαλύτερο ποσοστό επιβίωσης παρατηρείται στο δείγμα που έχει μόνο καρκινικά κύτταρα (συγκέντρωση νανοσωματιδίων χρυσού 0 μg/ml) και είναι 75,7%. Αντιθέτως, το χαμηλότερο ποσοστό επιβίωσης παρατηρείται στο δείγμα με συγκέντρωση νανοσωματιδίων 20 μg/ml και είναι 58,9%. Επιπλέον, στις υπόλοιπες συγκεντρώσεις, τα ποσοστά επιβίωσης κυμαίνονται από 63,6 έως 73,3%. Παρατηρήθηκε λοιπόν πως τα ποσοστά επιβίωσης για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις των νανοσωματιδίων είναι μικρότερα από αυτό για την συγκέντρωση 0 μg/ml, γεγονός το οποίο επιβεβαιώνει την ακτινοευαισθητοποίηση των καρκινικών κυττάρων με τη χρήση νανοσωματιδίων χρυσού για τη δόση 0,5 Gy.



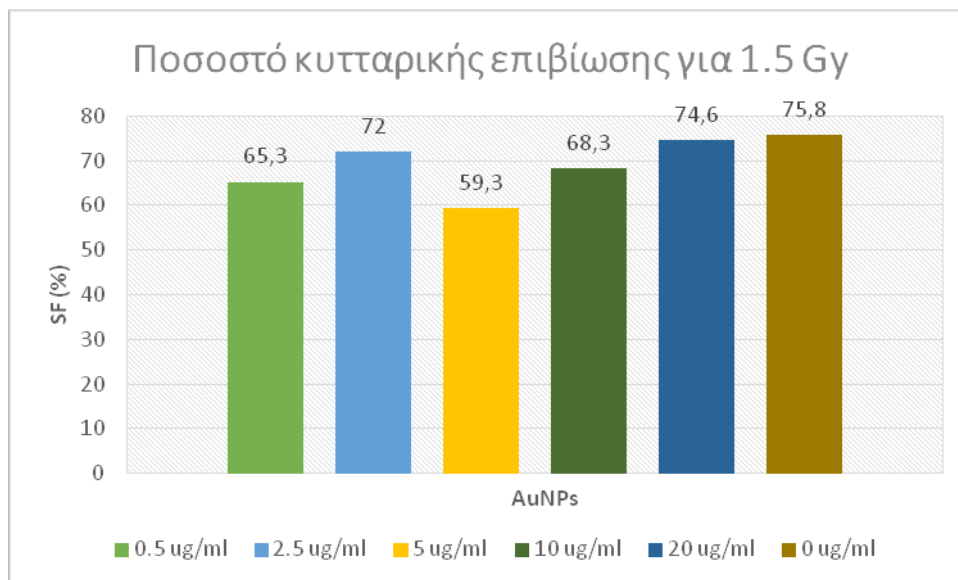
Γράφημα 4.1 : Απεικόνιση ραβδογράμματος του ποσοστού επιβίωσης (SF) συναρτήσει της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων χρυσού στα 0,5 Gy.

Στο διάγραμμα 4.2 φαίνονται τα ποσοστά επιβίωσης για ακτινοβόληση με δόση 1 Gy με συγκεντρώσεις νανοσωματιδίων από 0,5 έως 20 $\mu\text{g/ml}$. Παρατηρείται ότι για δόση ακτινοβόλησης 1 Gy το μεγαλύτερο ποσοστό επιβίωσης είναι 81,7% για συγκέντρωση 0 $\mu\text{g/ml}$. Αντιθέτως, το χαμηλότερο ποσοστό επιβίωσης είναι 59,3 % για συγκέντρωση 20 $\mu\text{g/ml}$. Για τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις νανοσωματιδίων χρυσού παρατηρείται πως τα ποσοστά επιβίωσης κυμαίνονται από 59,6 έως 77,5%.



Γράφημα 4.2: Απεικόνιση ραβδογράμματος του ποσοστού επιβίωσης (SF) συναρτήσει της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων χρυσού στο 1 Gy.

Στο διάγραμμα 4.3 φαίνεται ότι για δόση ακτινοβολήσης 1,5 Gy το μεγαλύτερο ποσοστό επιβίωσης παρατηρείται στο δείγμα που έχει μόνο καρκινικά κύτταρα (συγκέντρωση νανοσωματιδίων χρυσού 0 $\mu\text{g/ml}$) και είναι 75,8%. Αντιθέτως, το χαμηλότερο ποσοστό επιβίωσης παρατηρείται στο δείγμα με συγκέντρωση νανοσωματιδίων 5 $\mu\text{g/ml}$ και είναι 59,3%. Επιπλέον, στις υπόλοιπες συγκεντρώσεις, τα ποσοστά επιβίωσης κυμαίνονται από 65,3 έως 74,6%.



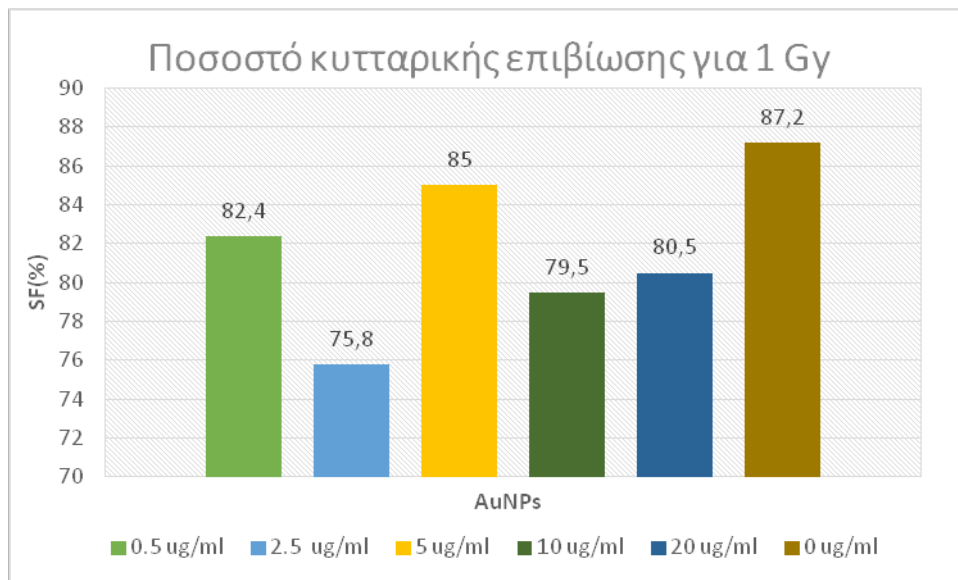
Γράφημα 4.3: Απεικόνιση ραβδογράμματος του ποσοστού επιβίωσης (SF) συναρτήσει της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων χρυσού στο 1,5 Gy.

Όπως προκύπτει, στις ενέργειες KeV παρατηρείται ότι για δόσεις ακτινοβολήσης 0,5 Gy και 1 Gy η μεγαλύτερη ακτινοευαισθητοποίηση των κυττάρων παρατηρείται για συγκέντρωση 0,5 $\mu\text{g/ml}$, ενώ στα 1,5 Gy για 20 $\mu\text{g/ml}$.

4.6.2 Ακτινοβολήση με ενέργειες MeV

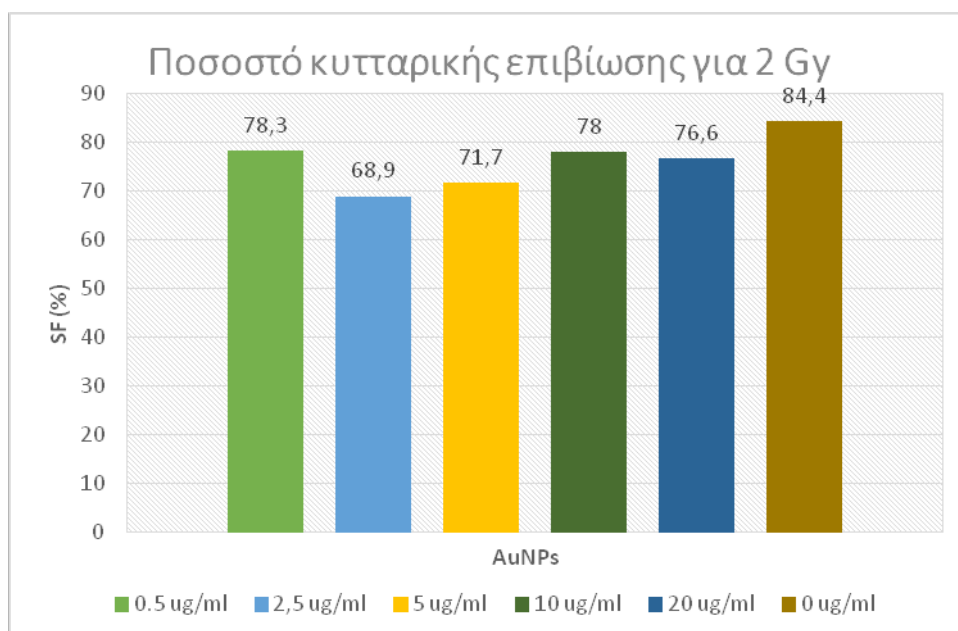
Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζονται τα ποσοστά κυτταρικής επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων συναρτήσει των διαφορετικών συγκεντρώσεων νανοσωματιδίων χρυσού (0 $\mu\text{g/ml}$ - 20 $\mu\text{g/ml}$) στις διάφορες δόσεις ακτινοβολήσης (1 Gy - 4 Gy) για την ενέργεια των 6 MeV.

Στο διάγραμμα 4.4 φαίνεται ότι για δόση ακτινοβολήσης 1 Gy το μεγαλύτερο ποσοστό επιβίωσης παρατηρείται στο δείγμα που έχει μόνο καρκινικά κύτταρα (συγκέντρωση νανοσωματιδίων χρυσού 0 $\mu\text{g/ml}$) και είναι 87,2%. Αντιθέτως, το χαμηλότερο ποσοστό επιβίωσης παρατηρείται στο δείγμα με συγκέντρωση νανοσωματιδίων 2,5 $\mu\text{g/ml}$ και είναι 75,8%. Επιπλέον, στις υπόλοιπες συγκεντρώσεις, τα ποσοστά επιβίωσης κυμαίνονται από 79,5 έως 85%. Παρατηρείται λοιπόν, πως για τα νανοσωματίδια διαμέτρου 120 nm και για συγκεντρώσεις από 0-2,5 $\mu\text{g/ml}$ όσο αυξάνεται η συγκέντρωση, μειώνεται δραστικά το ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης, ενώ για συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 2,5 $\mu\text{g/ml}$ δεν παρατηρείται περαιτέρω μείωση. Το γεγονός μπορεί να οφείλεται στη δημιουργία συσσωματωμάτων στα νανοσωματίδια πάνω από μία ορισμένη συγκέντρωση που εμποδίζει στο να εισέλθει στη μεμβράνη του κυττάρου ικανοποιητικός αριθμός νανοσωματιδίων.



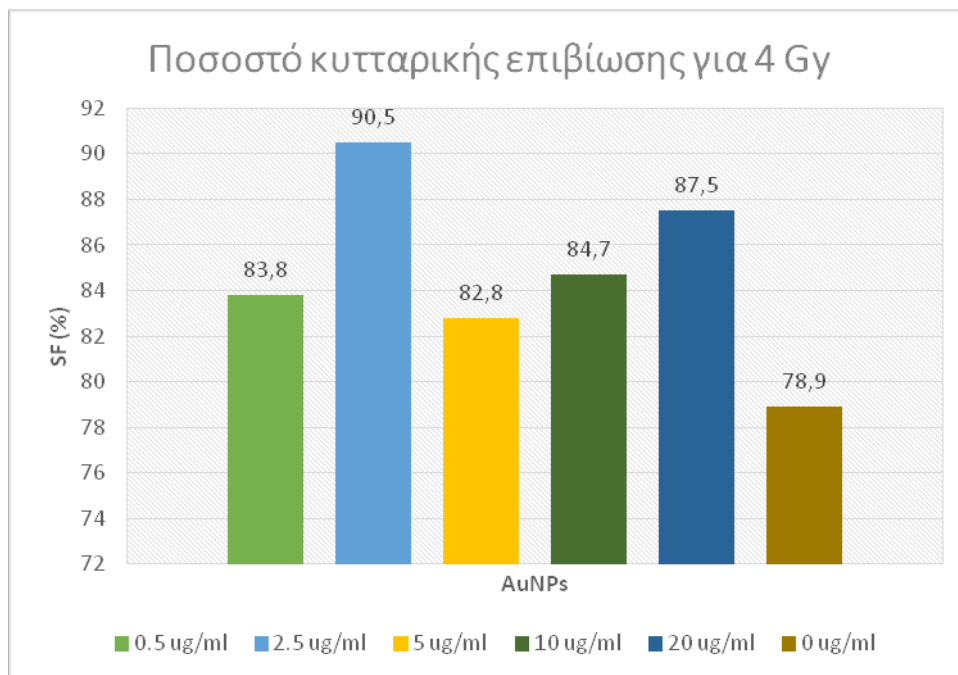
Γράφημα 4.4: Απεικόνιση ραβδογράμματος του ποσοστού επιβίωσης (SF) συναρτήσει της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων χρυσού στο 1 Gy.

Στη συνέχεια, στο διάγραμμα 4.5 φαίνεται ότι για δόση ακτινοβολήσης 2 Gy το μεγαλύτερο ποσοστό επιβίωσης παρατηρείται στο δείγμα που έχει μόνο καρκινικά κύτταρα (συγκέντρωση νανοσωματιδίων χρυσού 0 μg/ml) και είναι 84,4%. Αντιθέτως, το χαμηλότερο ποσοστό επιβίωσης παρατηρείται στο δείγμα με συγκέντρωση νανοσωματιδίων 2,5 μg/ml και είναι 68,9%. Επιπλέον, στις υπόλοιπες συγκεντρώσεις, τα ποσοστά επιβίωσης κυμαίνονται από 71,7% έως 78,3%. Συμπερασματικά, εκτός της ακτινοευαισθητοποίησης των καρκινικών κυττάρων με την παρουσία νανοσωματιδίων χρυσού, οι διακυμάνσεις που παρουσιάζονται στο ποσοστό επιβίωσης μπορεί να οφείλονται στη δημιουργία συσσωματωμάτων στα AuNPs. Η ακτινοευαισθησία των καρκινικών κυττάρων ενισχύεται με την χρήση των NPs. Αυξανόμενη της συγκέντρωσης δεν παρατηρείται αναγκαία αύξηση της ακτινοευαισθησίας. Αυτό οφείλεται στις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις των NPs, δηλαδή η δημιουργία συσσωματωμάτων. Αυτό οδηγεί σε αύξηση του μεγέθους τους και κατ'επέκταση αναστέλλεται η είσοδος τους μέσα στο κύτταρο, γεγονός το οποίο μειώνει την ενίσχυση της ακτινοευαισθησίας.



Γράφημα 4.5 : Απεικόνιση ραβδογράμματος του ποσοστού επιβίωσης (SF) συναρτήσει της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων χρυσού στα 2 Gy.

Τέλος, στο διάγραμμα 4.6 φαίνεται ότι για δόση ακτινοβολίας 4 Gy το μεγαλύτερο ποσοστό επιβίωσης παρατηρείται στο δείγμα που έχει συγκέντρωση νανοσωματιδίων χρυσού 2,5 μg/ml και είναι 90,5%. Αντιθέτως, το χαμηλότερο ποσοστό επιβίωσης παρατηρείται στο δείγμα με συγκέντρωση νανοσωματιδίων 0 μg/ml και είναι 78,9%. Επιπλέον, στις υπόλοιπες συγκεντρώσεις, τα ποσοστά επιβίωσης κυμαίνονται από 82,8% έως 87,5%. Παρατηρήθηκε λοιπόν πως τα ποσοστά επιβίωσης για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις είναι παραδόξως μεγαλύτερα από αυτό για την συγκέντρωση 0 μg/ml, γεγονός το οποίο αντιτίθεται την ακτινοευαισθητοποίηση των καρκινικών κυττάρων με τη χρήση νανοσωματιδίων χρυσού για τη δόση των 4 Gy. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι σε τόσες μεγάλες δόσεις ακτινοβολίας δημιουργούνται περισσότερα θραύσματα στην διπλή έλικα του DNA των κυττάρων (Double Strand Breaks, DSDs) από ότι στις μικρότερες δόσεις (π.χ στα 2 Gy), όπου πιθανά να επικρατούν θραύσματα στη μονή έλικα του DNA (Single Strand Breaks, SSBs). Συνεπώς, ο χρόνος μετά την ακτινοβολία μπορεί να ευθύνεται για το γεγονός πως στο συγκεκριμένο πείραμα παρατηρούνται inconsistent αποτελέσματα για τις μεγάλες δόσεις των 4 Gy ή μπορεί να απαιτείται περισσότερος χρόνος για να εκφραστεί ο αποπτωτικός θάνατος των κυττάρων πέρα των 30 λεπτών που επιλέχθηκε στα πειράματά μας.



Γράφημα 4.6: Απεικόνιση του ραβδογράμματος του ποσοστού επιβίωσης (SF) συναρτήσει της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων χρυσού στα 4 Gy.

Όπως προκύπτει, στις ενέργειες MeV παρατηρείται ότι για δόσεις ακτινοβολίας 1 Gy και 2 Gy η μεγαλύτερη ακτινοευαισθητοποίηση των κυττάρων παρατηρείται για συγκέντρωση 2.5 μg/ml ενώ στα 4 Gy για 0 μg/ml.

4.7 Καμπύλες Επιβίωσης

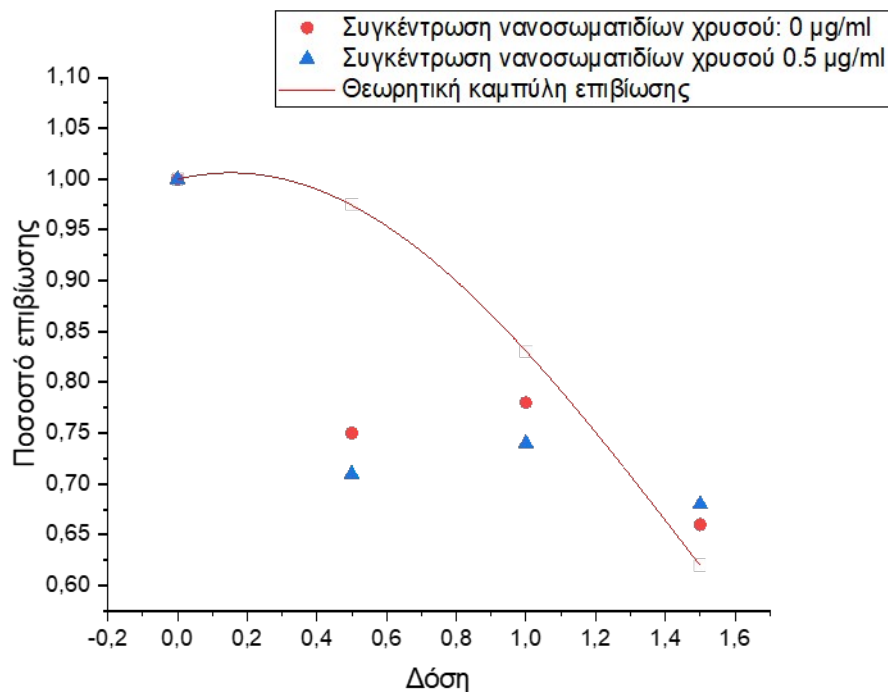
Εν συνεχεία, υπολογίστηκε η θεωρητική καμπύλη επιβίωσης συναρτήσει των δόσεων που δόθηκαν στα καρκινικά κύτταρα για τις αντίστοιχες προαναφερθείσες συγκεντρώσεις των νανοσωματιδίων χρυσού. Για την εξαγωγή της καμπύλης αλλά και για τα πειραματικά σημεία χρησιμοποιήθηκε η εκθετική εξίσωση:

$$SF = \exp(-\alpha D - \beta D^2) \quad (4.2)$$

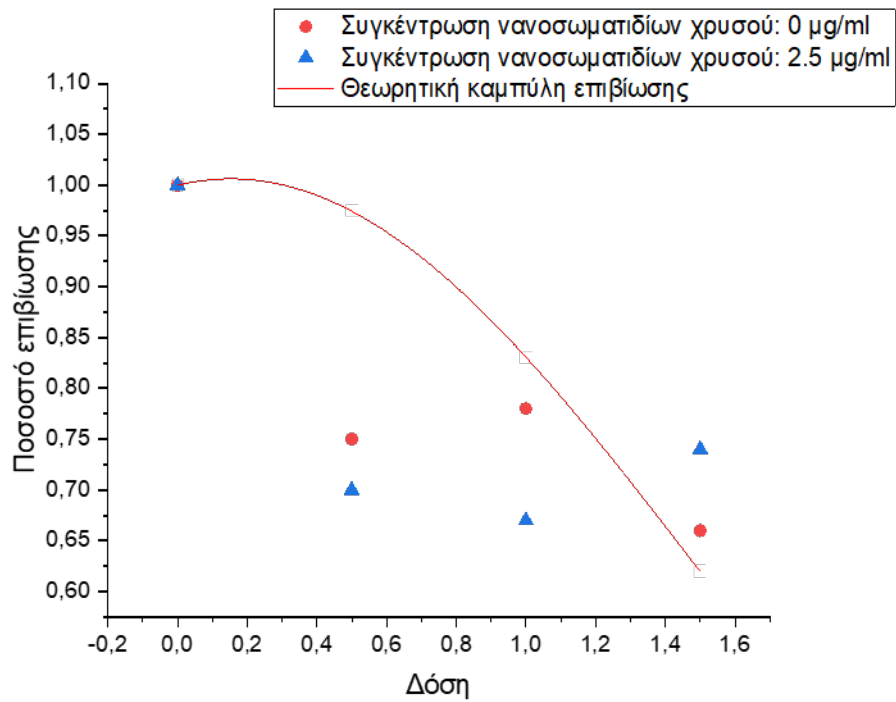
Όπου α σταθερά η οποία περιγράφει την αρχική κλίση της καμπύλης επιβίωσης του κυττάρου και αντιπροσωπεύει την βλάβη που προέρχεται από ένα single hit event και β η σταθερά η οποία περιγράφει την quadratic συνιστώσα του κυτταρικού θανάτου και αντιπροσωπεύει την βλάβη από ένα single event ενώ D είναι η αντίστοιχη δόση που δίνεται στα δείγματα.

4.7.1 Καμπύλες Επιβίωσης για keV

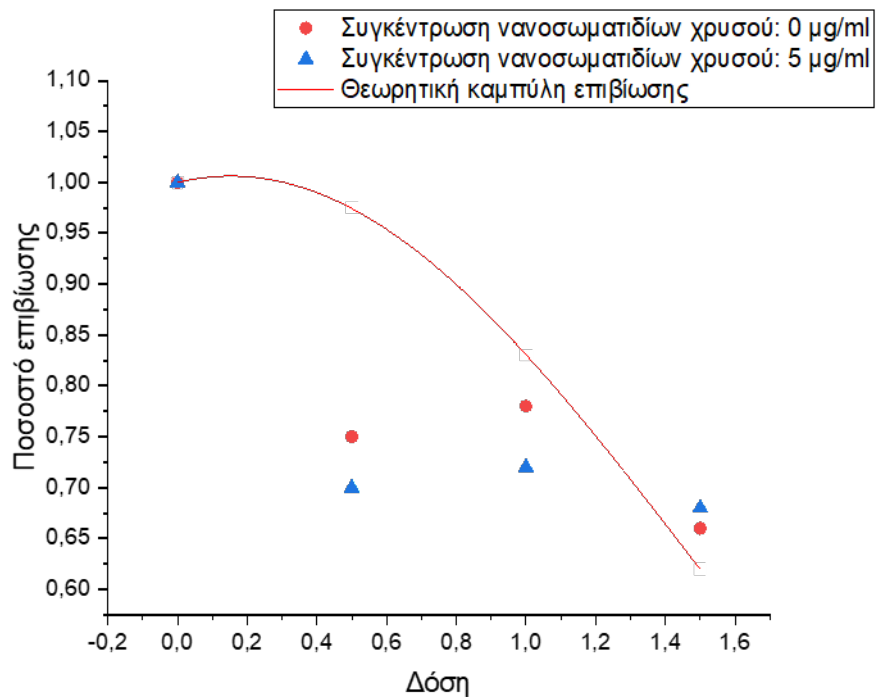
Στα παρακάτω γραφήματα απεικονίζεται η θεωρητική καμπύλη επιβίωσης (Marloes & al., 2018) συναρτήσει των δόσεων 0, 0,5, 1 και 1,5 Gy. Επιπλέον, στα γραφήματα αυτά εισήχθησαν και τα σημεία των πειραματικών καμπυλών έπειτα από ακτινοβολήση των καρκινικών κυττάρων (κόκκινα σημεία) αλλά και έπειτα από ακτινοβολήση αυτών με νανοσωματίδια χρυσού στις αντίστοιχες και προαναφερθείσες συγκεντρώσεις (μπλε σημεία). Τα παρακάτω γραφήματα αφορούν τα πειράματα που διεξήχθησαν για ενέργειες 27 keV.



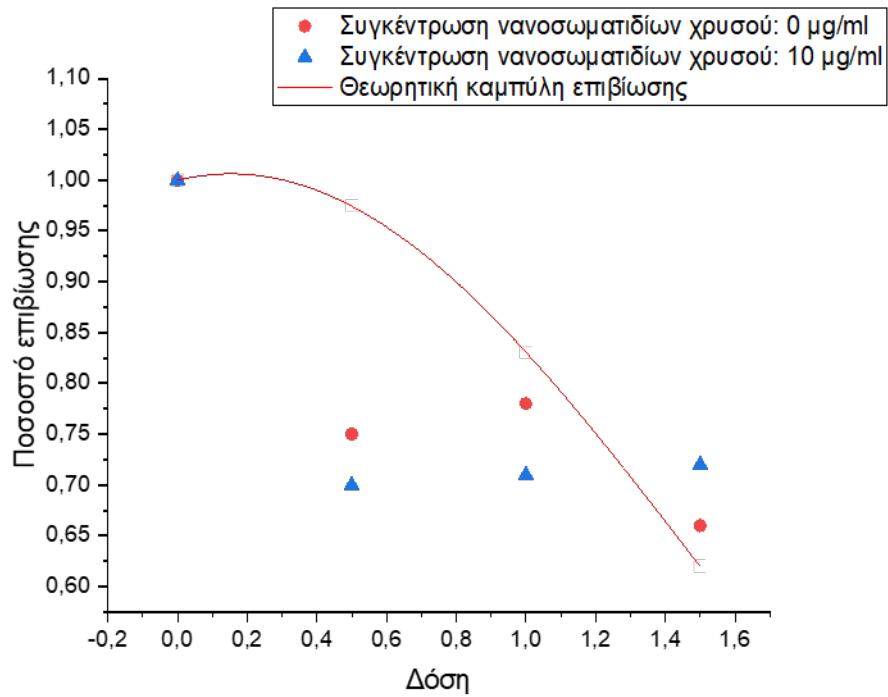
Γράφημα 4.7: Απεικόνιση της θεωρητικής καμπύλης επιβίωσης και των σημείων της πειραματικής καμπύλης επιβίωσης συναρτήσει των δόσεων 0, 0,5, 1 & 1,5 Gy που δόθηκαν για νανοσωματίδια χρυσού συγκεντρώσεως 0,5 μgr/ml.



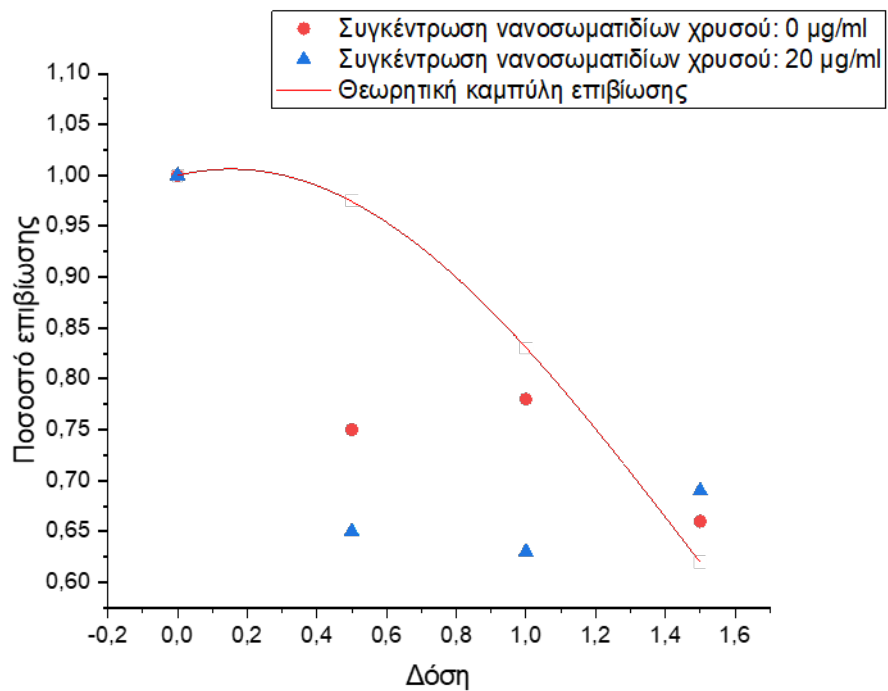
Γράφημα 4.8: Απεικόνιση της θεωρητικής καμπύλης επιβίωσης και των σημείων της πειραματικής καμπύλης επιβίωσης συναρτήσει των δόσεων 0, 0,5, 1 & 1,5 Gy που δόθηκαν για νανοσωματίδια χρυσού συγκέντρωσης 2,5 µgr/ml.



Γράφημα 4.9 : Απεικόνιση της θεωρητικής καμπύλης επιβίωσης και των σημείων της πειραματικής καμπύλης επιβίωσης συναρτήσει των δόσεων 0, 0,5, 1 & 1,5 Gy που δόθηκαν για νανοσωματίδια χρυσού συγκέντρωσης 5 µgr/ml.



Γράφημα 4.10 : Απεικόνιση της θεωρητικής καμπύλης επιβίωσης και των σημείων της πειραματικής καμπύλης επιβίωσης συναρτήσει των δόσεων 0, 0,5, 1 & 1,5 Gy που δόθηκαν για νανοσωματίδια χρυσού συγκέντρωσης 10 µgr/ml.

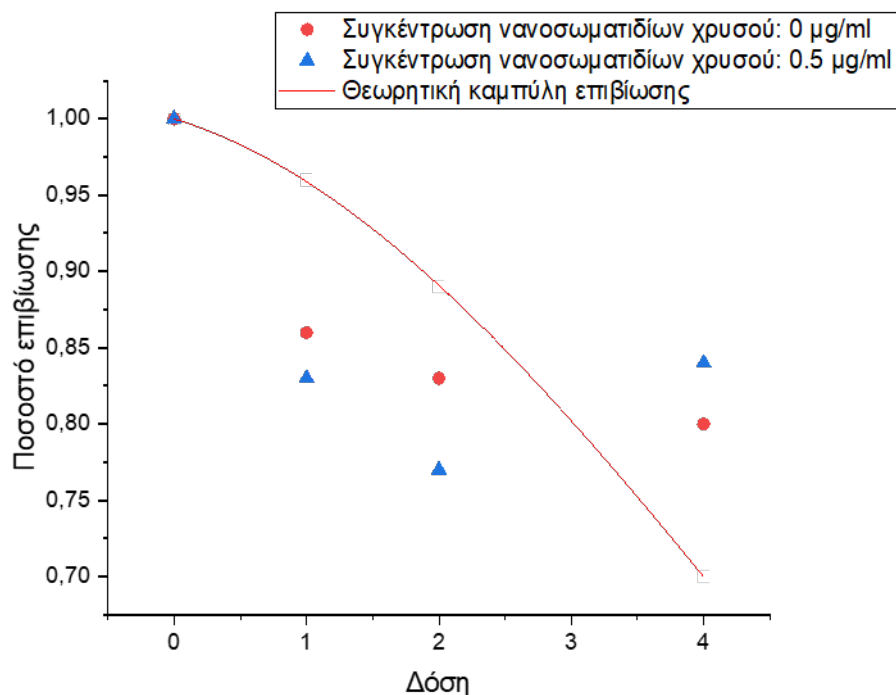


Γράφημα 4.11 : Απεικόνιση της θεωρητικής καμπύλης επιβίωσης και των σημείων της πειραματικής καμπύλης επιβίωσης συναρτήσει των δόσεων 0, 0,5, 1 & 1,5 Gy που δόθηκαν για νανοσωματίδια χρυσού συγκέντρωσης 20 µgr/ml.

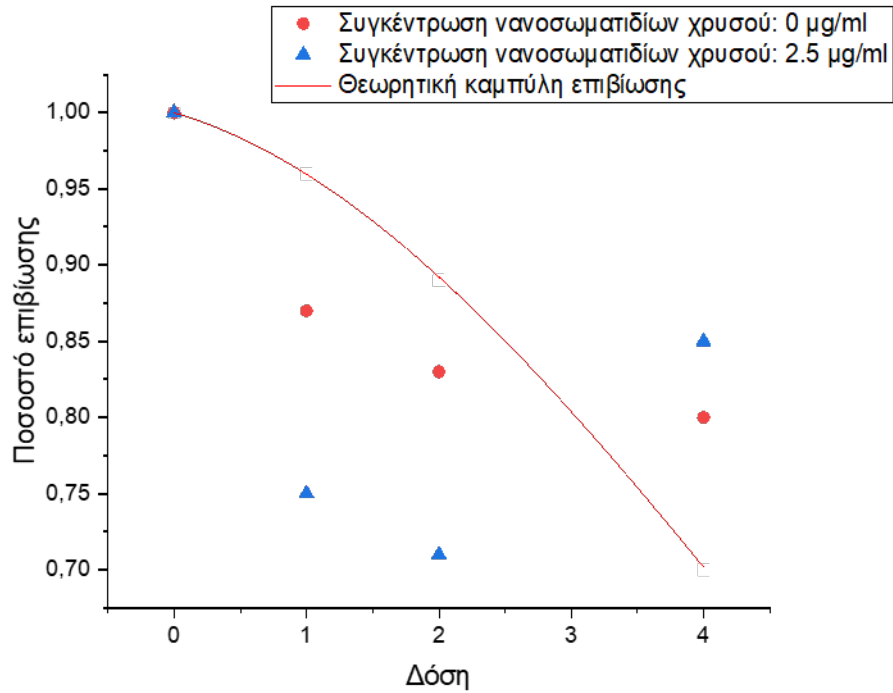
Από τις πειραματικές καμπύλες παρατηρείται ότι με την παρουσία των νανοσωματιδίων χρυσού τα καρκινικά κύτταρα γίνονται πιο ακτινοευαίσθητα και το ποσοστό επιβίωσής τους μειώνεται. Ωστόσο, παρατηρείται πως για την δόση των 1,5 Gy το ποσοστό επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων είναι μικρότερο από αυτό με την παρουσία νανοσωματιδίων. Συνεπώς για ενέργειες της τάξεως των keV, μπορεί να θεωρηθεί πως η καταλληλότερη δόση ακτινοβολήσης είναι το 1 Gy με συγκέντρωση νανοσωματιδίων χρυσού τα 20 $\mu\text{g/ml}$. Παράγοντες όπως ο χρόνος και οι συνθήκες επώασης των κυττάρων χωρίς και με τα νανοσωματίδια, η συγκέντρωση των νανοσωματιδίων, ο βαθμός συσσωμάτωσής τους, ο χρόνος επώασης τους που μεσολαβεί μετά την ακτινοβόλησή τους και πριν από την μέτρησή τους στο κυτταρόμετρο ροής επιδρούν στην έκφραση του αποπτωτικού θανάτου των κυττάρων και στην αξιολόγηση του ποσοστού επιβίωσής τους.

4.7.2 Καμπύλες Επιβίωσης για MeV

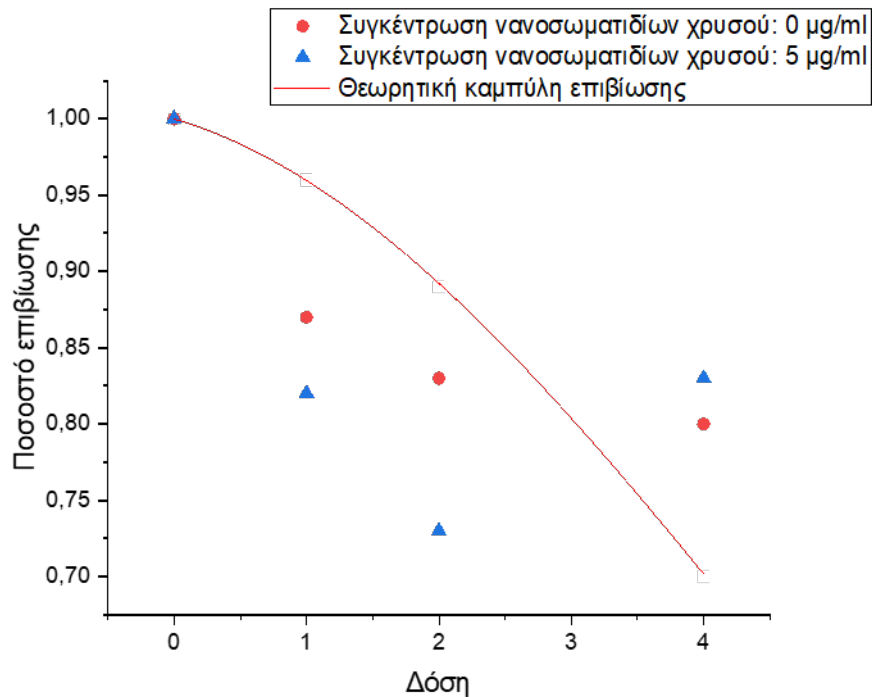
Στα παρακάτω γραφήματα απεικονίζεται εκ νέου η θεωρητική καμπύλη επιβίωσης (Marloes & al., 2018) συναρτήσει των δόσεων 0, 1, 2 και 4 Gy. Επιπλέον, στα γραφήματα αυτά εισήχθησαν και τα σημεία των πειραματικών καμπυλών έπειτα από ακτινοβόληση των καρκινικών κυττάρων (κόκκινα σημεία) αλλά και έπειτα από ακτινοβόληση αυτών μαζί με νανοσωματίδια χρυσού στις αντίστοιχες και προαναφερθείσες συγκεντρώσεις (μπλε σημεία). Τα παρακάτω γραφήματα αφορούν τα πειράματα που διεξήχθησαν για ενέργειες 6 MeV.



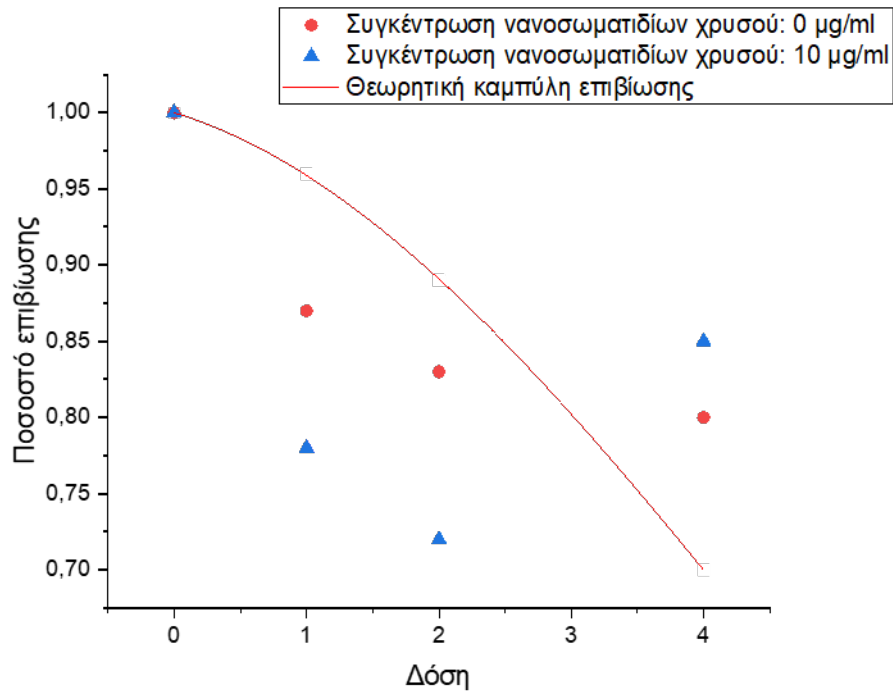
Γράφημα 4.12 : Απεικόνιση της θεωρητικής καμπύλης επιβίωσης και των σημείων της πειραματικής καμπύλης επιβίωσης συναρτήσει των δόσεων 0, 1, 2 & 4 Gy που δόθηκαν για νανοσωματίδια χρυσού συγκέντρωσης 0,5 $\mu\text{g/ml}$.



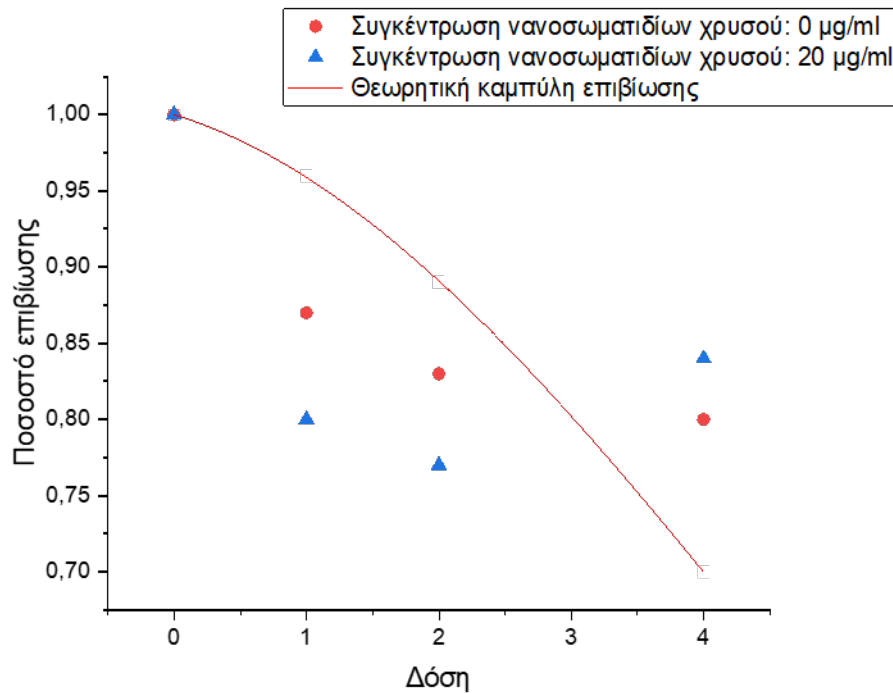
Γράφημα 4.13 : Απεικόνιση της θεωρητικής καμπύλης επιβίωσης και των σημείων της πειραματικής καμπύλης επιβίωσης συναρτήσει των δόσεων 0, 1, 2 & 4 Gy που δόθηκαν για νανοσωματίδια χρυσού συγκέντρωσης 2,5 µgr/ml.



Γράφημα 4.14 : Απεικόνιση της θεωρητικής καμπύλης επιβίωσης και των σημείων της πειραματικής καμπύλης επιβίωσης συναρτήσει των δόσεων 0, 1, 2 & 4 Gy που δόθηκαν για νανοσωματίδια χρυσού συγκέντρωσης 5 µgr/ml.



Γράφημα 4.15 : Απεικόνιση της θεωρητικής καμπύλης επιβίωσης και των σημείων της πειραματικής καμπύλης επιβίωσης συναρτήσει των δόσεων 0, 1, 2 & 4 Gy που δόθηκαν για νανοσωματίδια χρυσού συγκέντρωσης 10 µg/ml.



Γράφημα 4.16 : Απεικόνιση της θεωρητικής καμπύλης επιβίωσης και των σημείων της πειραματικής καμπύλης επιβίωσης συναρτήσει των δόσεων 0, 1, 2 & 4 Gy που δόθηκαν για νανοσωματίδια χρυσού συγκέντρωσης 20 µg/ml.

Παρατηρείται πως τα σημεία της πειραματικής καμπύλης μόνο για τα καρκινικά κύτταρα είναι υψηλότερα από αυτά με την παρουσία νανοσωματιδίων χρυσού, δηλαδή υπάρχει μεγαλύτερο ποσοστό επιβίωσης κυττάρων άρα μικρότερος κυτταρικός θάνατος, και επιβεβαιώνεται η

ακτινοευαισθητοποίηση των καρκινικών κυττάρων με τη χρήση νανοσωματιδίων χρυσού. Τα καρκινικά κύτταρα γίνονται πιο ακτινοευαίσθητα και το ποσοστό επιβίωσής τους μειώνεται υπό την παρουσία νανοσωματιδίων χρυσού, κάτι το οποίο φαίνεται στο παραπάνω γράφημα. Επιπλέον, παρατηρείται πως για την δόση των 4 Gy το ποσοστό επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων είναι μικρότερο από αυτό με την παρουσία νανοσωματιδίων (για όλες τις συγκεντρώσεις, δηλαδή από 0,5 έως 20 µg/ml). Η εμφάνιση του μικρότερου ποσοστού επιβίωσης για δείγματα που περιέχουν μόνο καρκινικά κύτταρα πιθανότατα να οφείλεται στο γεγονός πως οι πολύ υψηλές δόσης (πχ 4 Gy) πιθανότατα να πλήττουν εντονότερα την διπλή έλικα του DNA των κυττάρων. Αντιθέτως, σε χαμηλότερες δόσεις όπως αυτή του 1 Gy πιθανότατα να δημιουργούν θράυσματα στην μονή έλικα του DNA. Συνεπώς, για τα κύτταρα χωρίς νανοσωματίδια σε αρκετά υψηλές δόσεις μπορεί να προκληθεί το αντίθετο από το αποτέλεσμα που αναμένεται. Επιπλέον, για νανοσωματίδια διαμέτρου 120 nm μπορεί να δημιουργηθούν συσσωματώματα στα AuNPs, γεγονός που εμποδίζει στο να εισέλθει στη μεμβράνη του κυττάρου ικανοποιητικός αριθμός νανοσωματιδίων.

Η δημιουργία των συσσωματωμάτων μπορεί να οφείλεται στην έκθεση σε υψηλή συγκέντρωση ιόντων όταν έρχονται σε επαφή με βιολογικά μέσα, δηλαδή στα καρκινικά κύτταρα του πειράματός μας. Η συσσώρευση των νανοσωματιδίων μπορεί να επηρεάσει ποσοτικά την κυτταρική πρόσληψη και/ή την κυτταρική κατανομή με βάση τις φυσικοχημικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων.

Τέλος, παρατηρείται πως η συγκέντρωση η οποία παρουσιάζει τον μεγαλύτερο κυτταρικό θάνατο, άρα και το μικρότερο ποσοστό επιβίωσης κυττάρων, είναι αυτή των 2,5 µg/ml για τη δόση των 2 Gy. Συνεπώς για ενέργειες της τάξεως των MeV, μπορεί να θεωρηθεί πως η καταλληλότερη δόση ακτινοβολίας είναι τα 2 Gy με συγκέντρωση νανοσωματιδίων χρυσού τα 2,5 µg/ml.

4.8 Υπολογισμός RER (Radiation Enhancement Ratio)

Με σκοπό να περιγραφούν και να συγκριθούν οι ραδιοβιολογικές επιδράσεις διαφόρων πειραματικών συνθηκών, όλες οι ραδιοβιολογικές έννοιες ορίζονται χρησιμοποιώντας την αναλογία δόσεων (καλά καθορισμένη για όλους τους τύπους ακτινοβολίας). Πιο συγκεκριμένα ο λόγος αυτός χρησιμοποιείται για το χαρακτηρισμό της ραδιοβιολογικής επίδραση των νανοσωματιδίων συγκρίνοντας τα διαφορετικά επίπεδα επιδράσεων μετά από μια δεδομένη δόση ακτινοβολίας (Τρέμη, 2022). Ως εκ τούτου, ο λόγος ενίσχυσης ακτινοβολίας (RER_{xGy}) έχει οριστεί ως ο λόγος του ποσοστού επιβίωσης χωρίς και με AuNPs για μια συγκεκριμένη δόση:

$$RER_{xGy} = SF_{xGy,cont} / SF_{xGy,NP} \quad (4.3)$$

Η συγκεκριμένη παράμετρος έχει το πλεονέκτημα ότι απεικονίζει άμεσα το μέγεθος της διακύμανσης της βιολογικής απόκρισης που προκαλείται από τα AuNPs σε ένα συγκεκριμένο επίπεδο δόσης. Επιπλέον, το RER_{xGy} αναφέρεται στη βιβλιογραφία και ως Sensitizer Enhancement Ratio (SER) αλλά και ως παράγοντας ενίσχυσης δόσης- Dose Enhancement Factor (DEF).

Έτσι, χρησιμοποιώντας την παραπάνω σχέση υπολογίστηκε το RER για τις προαναφερθείσες συγκεντρώσεις AuNPs και τις δόσεις 0,5, 1 και 1,5 Gy για τις ενέργειες των KeV και για τις δόσεις 1, 2 και 4 Gy για τις ενέργειες των MeV. Στους παρακάτω πίνακες, φαίνεται το RER για την ενέργεια των 27 keV αλλά και για αυτή των 6 MeV αντίστοιχα.

Πίνακας 4.1 : Στον πίνακα αυτό αναγράφεται η τιμή του RER που υπολογίστηκε για τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις AuNPs στις δόσεις 0,5, 1 & 1,5 Gy.

	0.5 Gy	1 Gy	1,5 Gy
0.5 ug/ml	1.05	1.06	1.06
2.5 ug/ml	1.07	1.16	1.07
5 ug/ml	1.07	1.11	1.03
10 ug/ml	1.07	1.10	1.09
20 ug/ml	1.15	1.23	1.05

Πίνακας 4.2 : Στον πίνακα αυτό αναγράφεται η τιμή του RER που υπολογίστηκε για τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις AuNPs στις δόσεις 1, 2 & 4 Gy.

	1 Gy	2 Gy	4 Gy
0.5 ug/ml	1,02	1,07	1.02
2.5 ug/ml	1.12	1.16	1.01
5 ug/ml	1.03	1.12	1.03
10 ug/ml	1.07	1.14	1.00
20 ug/ml	1.06	1.09	1.03

Συμπεράσματα

Από την παραπάνω πειραματική μελέτη επιβεβαιώνεται η αρχική υπόθεση, περί ενίσχυσης της δόσης της ακτινοβολίας με την χρήση των νανοσωματιδίων χρυσού. Με βάση τα πειράματα που διεξήχθησαν, αποδεικνύεται πως τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν, γίνονται πιο ακτινοευαίσθητα όταν επωάζονται με νανοσωματίδια χρυσού. Ωστόσο, ο μηχανισμός δράσης των νανοσωματιδίων στην ακτινοευαίσθητικοποίηση των κυττάρων είναι πολυπαραγοντικός. Η συγκέντρωση των νανοσωματιδίων, ο βαθμός συσσωμάτωσής τους, ο αριθμός των νανοσωματιδίων που τελικά εισέρχονται στο κύτταρο, η δόση ακτινοβολίας, ο χρόνος επώασής καθώς και ο χρόνος που απαιτείται για να εκφραστεί η βλάβη ή ο αποπτωτικός θάνατος του κυττάρου επηρεάζουν το ποσοστό επιβίωσης των κυττάρων.

Πιο αναλυτικά, για τα πειράματα που διεξήχθησαν για ενέργεια της τάξεως των keV, η καταλληλότερη συγκέντρωση νανοσωματιδίων χρυσού διαμέτρου 50 nm για δόση 0,5 και 1 Gy είναι τα 20 μg/ml για την οποία εμφανίστηκε το μικρότερο ποσοστό επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων. Αντιθέτως, για τη δόση του 1,5 Gy το χαμηλότερο ποσοστό επιβίωσης παρουσιάστηκε στη συγκέντρωση των 5 μg/ml. Επιπλέον, για τα πειράματα που διεξήχθησαν για ενέργεια της τάξεως των MeV για νανοσωματίδια χρυσού διαμέτρου 120 nm, φαίνεται πως το χαμηλότερο ποσοστό επιβίωσης παρουσιάστηκε στα 2,5 μg/ml για τις δόσεις του 1 και 2 Gy ενώ για την δόση των 4 Gy, το χαμηλότερο ποσοστό επιβίωσης παρατηρήθηκε στην συγκέντρωση 0μg/ml. Συμπερασματικά λοιπόν, τόσες μεγάλες δόσεις ακτινοβολίας πιθανόν να δημιουργούν περισσότερα θραύσματα στην διπλή έλικα του DNA των κυττάρων (Double Strand Breaks, DSDs) από ότι στις μικρότερες δόσεις (όπως το 1 ή τα 2 Gy). Στις χαμηλότερες δόσεις πιθανότατα επικρατούν θραύσματα στη μονή έλικα του DNA (Single Strand Breaks, SSBs) όπως προαναφέρθηκε. Άρα, πιθανώς να απαιτείται περισσότερος χρόνος για να εκφραστεί ο αποπτωτικός θάνατος των κυττάρων πέρα των 30 λεπτών που επιλέχθηκε στα πειράματά μας.

Με βάση τα πειράματα που διεξήχθησαν για τις ενέργειες των keV συμπεραίνεται πως η καταλληλότερη δόση κρίνεται πως είναι αυτή του 0,5 Gy για συγκέντρωση νανοσωματιδίων χρυσού 20 μg/ml όπου επέρχεται ο μεγαλύτερος κυτταρικός θάνατος σε καρκινικά κύτταρα SIHA. Για τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για ενέργεια της τάξεως των MeV, συμπεραίνεται πως η καταλληλότερη δόση είναι αυτή των 2 Gy για συγκέντρωση νανοσωματιδίων χρυσού 2,5 μg/ml. Στην συγκέντρωση αυτή παρατηρείται το μικρότερο ποσοστό επιβίωσης για τα καρκινικά κύτταρα. Ωστόσο, χρειάζεται περαιτέρω έρευνα για να διασαφηνιστεί η ακριβής δόση με την οποία θα πρέπει να ακτινοβολούνται τα δείγματα, η ιδανική συγκέντρωση νανοσωματιδίων χρυσού και ο ιδανικός χρόνος παραμονής τους στο κύτταρο. Έπειτα, η εφαρμογή σε ανθρώπινους οργανισμούς θα συνδράμει στην θεραπεία καρκινικών όγκων.

Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας συμπεραίνεται πως με περαιτέρω ερευνά πάνω στον τομέα αυτόν, μπορεί να δημιουργηθεί ένα μοντέλο θεραπείας, έτσι ώστε με την μεγαλύτερη δυνατή δόση να επέρχεται περισσότερος κυτταρικός θάνατος σε καρκινικά κύτταρα και παράλληλα μικρότερος στα υγιή. Ωστόσο, πρώτα θα πρέπει να γίνει πληθώρα *in vitro* και *in vivo* πειραμάτων ώστε να εισαχθεί η έρευνα αυτή στην κλινική ρουτίνα. Συνεπώς, ανοίγονται νέοι δρόμοι για βελτίωση της θεραπείας του καρκίνου με την χρήση ακτινοβολιών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adams FH, Norman A, Mello RS, et al.: “Effect of radiation and contrast media on chromosomes”, Preliminary report. *Radiology*, 823-826 (1977).

Alexis F., Pridgen E., L. K. Molnar, O. C. Farokhzad, “Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles”, *Molecular Pharmaceutics* VOL. 5, NO. 4, 505–515 (2008).

Alpen Edward L.: “Radiation Biophysics” 4-101, (1997).

Attix F. H. *Introduction to Radiological Physics and Radiation Dosimetry*, Book 624 pages, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim (see pages 1-15, 203-230), (2004).

Biegała M, Hydzik A: “Analysis of dose distribution at organs at risk in patients with prostate cancer treated with the intensity modulated radiation therapy and arc-technique” *Journal of Medical Physics*. 198–204, (2016).

Brown B. H., Smallwood R., Barber D.C., Lawford P.V., Hose D. R., *Medical Physics and Biomedical Engineering*, 674-702 (1999).

Brun E, Sanche L, Sicard-Roselli C.: “Parameters governing gold nanoparticle X-ray radiosensitization of DNA in solution”, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 128-134 (2009).

Carruth A.: *Clinical applications of photodynamic therapy*, (1998).

Dale R.G.: “The application of the linear quadratic dose effect equation to fractionated and protracted radiotherapy”, *Br. J. Radiol.* 58, 515-528 (1985).

Di Ventra M., S. Evoy, J. R. Heflin, “Introduction to Nanoscale Science and Technology”, Springer, Boston MA, (2004).

Dougherty, T.J., Gomer, C.J., Henderson, B.W., et al., *Photodynamic therapy*, *J Natl Cancer Inst* (1998).

Galvin JM, Ezzell G, Eisbrauch A, Yu C, Butler B, Xiao Y, et al. "Implementing IMRT in clinical practice: A joint document of the American Society for Therapeutic Radiology and Oncology and the American Association of Physicists in Medicine", *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 1616-1634, (2004).

Gautherie M., “Biologic basis of oncologic thermotherapy” Springer, NY, pp. 1-72, (1990).

Grillone Agostina, Gianni Ciofani : *Magnetic nanotransducers in Biomedicine*, (2017).

Hall EJ & Wu CS: "Radiation-induced second cancers: the impact of 3D-CRT and IMRT". *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 83–88, (2003).

Herold DM, Das IJ, Stobbe CC, et al. gold microspheres: "A selective technique for producing biologically effective dose enhancement." *Int J Radiat Biol*, 1357-1364 (2000).

Ho C.C., A. Keller, J.A. Odell, R.H. Ottewill, Preparation of monodisperse ellipsoidal polystyrene particles, *Colloid Polym Sci* 271:469-479, (1993).

https://en.wikipedia.org/wiki/Molecular_imaging

<https://euon.echa.europa.eu/el/future-of-nanomedicines>

<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/hyperthermia>

Ijff, M., van Oorschot, B., Oei, A. L., Krawczyk, P. M., Rodermond, H. M., Stalpers, L. J. A., Kok, H. P., Crezee, J. & Franken, "Enhancement of Radiation Effectiveness in Cervical Cancer Cells by Combining Ionizing Radiation with Hyperthermia and Molecular Targeting Agents", *Int. J. Mol. Sci.*, 19, 2420; doi:10.3390/ijms19082420, (2018).

IRPA, Recommendations for minor updates to the IRPA 1985 guidelines on limits of exposure to laser radiation. International Non-Ionizing Radiation Committee of the International Radiation Protection Association. *Health physics* 54 573-4, (1988).

Jeremic B, Aguerri AR, Filipovic N.: "Radiosensitization by gold nanoparticles", *Clin Transl Oncol*, 593-601, (2013).

Jiang Xingya, Bujie Du, Yingyu Huang, Mengxiao Yu & Jie Zheng: "Cancer Photothermal Therapy with ICG-Conjugated Gold Nanoclusters", *Bioconjug Chem.* 20; 31(5): 1522–1528. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.0c00172. (2020).

Karunaratne D. Nedra, "Nanotechnology in medicine", *J. Natn.Sci.Foundation Sri Lanka* 35(3): pp. 149-152, (2007). DOI: <http://doi.org/10.4038/jnsfsr.v35i3.2012>

Katarzyna Pala, Anna Serwotka, Filip Jelen, Piotr Jakimowicz and Jacek Otlewski, Tumor-specific hyperthermia with aptamer-tagged superparamagnetic nanoparticles, (2014).

Kato H.: *History of photodynamic therapy--past, present and future* (1996).

Koo O.M., Rubinstein I., Onyuksel H., "Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review", *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, Volume 1, Issue 3, Pages 193-212, (2005).

Kumar Chatterjee Dev, Parmeswaran Diagaradjane and Sunil Krishnan, "Nanoparticle – mediated hyperthermia in cancer therapy", *Ther Deliv.* 1; 2(8): 1001–1014, (2011).

Larson TA, Joshi PP, Sokolov K., “Preventing protein adsorption and macrophage uptake of gold nanoparticles via a hydrophobic shield” *ACS Nano*, 82-90, (2012).

Lee Jae-Hyun, Jung-Tak Jang, Jin-sil Choi, Seung Ho Moon, Seung-Hyun Noh, Ji-Wook Kim, Jin-Gyu Kim, Il-Sun Kim, Kook In Park, Jinwoo Cheon: Exchange-coupled magnetic nanoparticles for efficient heat induction, *Nature Nanotechnology*, vol. 6, (2011).

Lee S. M., S. N. Cho, J. Cheon, “Anisotropic Shape Control of Colloidal Inorganic Nanocrystals”, *Advanced Materials*, 15, No. 5, March 4, pp. 441-444, (2003).

Liu W_T., Nanoparticles and Their Biological and Environmental Applications, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 102, No. 1, 1–7. DOI: 10.1263/jbb.102.1 (2006).

Maenosono S, S. Saita: “Theoretical assessment of FePt nanoparticles as heating elements for magnetic hyperthermia”, *IEEE TRANSACTIONS ON MAGNETICS*, VOL. 42, NO. 6, JUNE 2006, pp. 1638-1642, (2006).

Matsudaira H, Ueno AM, Furuno I.: “Iodine contrast medium sensitizes cultured mammalian cells to X rays but not to gamma rays”, *Radiat Res* 144-148, (1980).

McMahon SJ, Prise KM, Currell FJ: “Comment on ‘implications on clinical scenario of gold nanoparticle radiosensitization in regard to photon energy, nanoparticle size, concentration and location’”. *Phys Med Biol*, 287-290, (2012).

Newbold K, Partridge M, Cook G, Sohaib SA, Charles-Edwards E, Rhys-Evans P, Harrington K, Nutting C.: “Advanced imaging applied to radiotherapy planning in head and neck cancer: a clinical review” *British Journal Radiology*. 554-61 (2006).

Ngwa W, Korideck H, Kassis AI, et al.: “In vitro radiosensitization by gold nanoparticles during continuous low-dose-rate gamma irradiation with I-125 brachytherapy seeds” *Nanomedicine*, 25-27, (2013).

Nikjoo H., S. Uehara, and D. Emfietzoglou, “Interaction of radiation with matter”, Book Pages 364, Taylor & Francis, Boca Raton, FL, DOI <https://doi.org/10.1201/b12109> (2012).

Peer D., J. M. Karp, S. Hong, et al., “Nanocarriers as an Emerging Platform for Cancer Therapy”, *Nature Nanotechnology* 2(12):751-60, DOI: 10.1038/nnano.2007.387 (2007).

Praetorius NP, Mandal TK.: “Engineered nanoparticles in cancer therapy. Recent Pat Drug Deliv Formul”, 37-51 (2007).

Radomski Marek Witold, Yuri Volkov: *Magnetic nanoparticles in cancer theranostic*, (2015).

Rawat M., Singh D., Saraf S., S. Swarnlaata, *Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs*, *Biol. Pharm. Bull.* 29(9) 1790—1798 Vol. 29, No. 9, (2006).

Ren, Guoqiang : "carbon nanotube", *Encyclopedia Britannica*, (2018).

Robert A. Freitas Jr., “Nanomedicine”, Volume I: Basic Capabilities, ISBN 1-57059-645-X, 523 pages, (1999).

Teoh M, Clark CH, Wood K, Whitaker S, Nisbet A: Volumetric modulated arc therapy: a review of current literature and clinical use in practice”, *The British Journal of Radiology*. 967–996 (2011).

Tomoyuki Araya, Kazuo Kasahara, Shingo Nishikawa, Hideharu Kimura and Masaki Fujimura, Antitumor effects of inductive hyperthermia using magnetic ferucarbotran nanoparticles on human lung cancer xenografts in nude mice, (2013).

Tremi Ioanna: “Biological Response of Human Cancer Cells to ionizing radiation in combination with AuNPs” Doctoral Thesis, 9-64 (2022).

Wang M & Thanou M., “Targeting nanoparticles to cancer” *Pharmacol. Res.*, 90-99 (2010).

Wang Ying, Zhiyong Tang, Nicholas A.Kotov: “Bioapplication of nanosemiconductors”, *nanotoday*, 20 May, ISSN:1369 7021 © Elsevier Ltd (2005).

Weibo Cai, Ting Gao, Hao Hong, Jiangtao Sun, “Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology”, *Nanotechnology, Science and Applications* 1, pp. 17–32, (2008).

Yan Hao, Wenting Shang, Xiaodan Sun, Lingyun Zhao, Jingyun Wang, Zhiyuan Xiong, Jie Yuan, Ranran Zhang, Qianli Huang, Kun Wang, Baohua Li, Jie Tian, Feiyu Kang, Si-Shen Feng., ““All-in-One” Nanoparticles for Trimodality Imaging-Guided Intracellular Photo-magnetic Hyperthermia Therapy under Intravenous Administration” *Wiley Online Library, Adv. Funct. Mater.* 28, 1705710 12 pages, DOI: 10.1002/adfm.201705710 (2018).

Zhao, B., Yin J, Bilski PJ, et al., Enhanced photodynamic efficacy towards melanoma cells by encapsulation of Pc4 in silica nanoparticles. *Toxicol Appl Pharmacol* (2009).

Zheng Y, Hunting DJ, Ayotte P, et al.: “Radiosensitization of DNA by gold nanoparticles irradiated with high-energy electrons”, *Radiat. Res.*, 19-27, (2008).

Zhigao Jing Zhou, Lu Xingjun, Zhu Xuejiao, Wang Yi, Liao Zhanfang, Ma Fuyou Li, NIR photothermal therapy using polyaniline nanoparticles (2013)

Γεωργακίλας Αλέξανδρος, Ιοντίζουσες Ακτινοβολίες : Βιολογικές επιπτώσεις, βλάβες DNA, επιδιορθωτικοί μηχανισμοί, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, 1-106, (2020).

Γεωργίου Ευάγγελος, Ιατρική Φυσική : “Διαγνωστικές και θεραπευτικές εφαρμογές των ακτινοβολιών”, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών, τόμος 1, κεφάλαιο 2, 66-73 (2013).

Διάφας Α., Σ. Καλαμπαλίκης, Α. Δενδρινού-Σαμαρά, Α. Γούλας, Α. Κακαβούτη-Δούδου, Β. Καραμπατάκης, *Νανοτεχνολογία και εφαρμογές της στην Ιατρική*, *Panoptis Journal*, (2014).

Δουζένης Απόστολος, Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία: Δημιουργία Νανοσωματιδίων Χρυσού προερχόμενα από αερολύματα, την επικάθιση τους σε επιφάνειες και μελέτη της συμπεριφοράς τους, 15-19 (2021).

Ευσταθόπουλος Ευστάθιος, Η Νανοϊατρική στη Διάγνωση και Θεραπεία Νευρολογικών παθήσεων, (2018).

Καραϊορθανίδης Αθανάσιος: Δοσιμετρική Σύγκριση Τεχνικών ακτινοθεραπείας Διαμορφούμενης Έντασης στον Καρκίνο του Πνεύμονα (τροποποίηση τιμών ηλεκτρονικής πυκνότητας του όγκου-στόχου), 23-32, 42-48 (2019).

Κυπαρισσίδης Κ., Ο. Καμμόνα και Σ. Χαϊτίδου, Εφαρμογές Νανοτεχνολογίας στην Ιατρική, *Intellectum* 4, 5-20 (2008) .

Λουκά Χ. Μαργαρίτη, Ραδιοβιολογία “ Ακτινοβολίες και ζωή” 153-156 (1996).

Λαλλάς Γιώργος & Π. Ζαφειρόπουλος: “Κυτταρομετρία Ροής - Κυτταρικός Διαχωρισμός”, 1-55, <https://kyttarometria.gr/ekpraideftiko-yliko/> (2016).

Λιασκώνη Αθηνά : Ευαίσθητα στο pH πολυμεροσώματα φέροντα σωματίδια χρυσού ως φορείς ελεγχόμενης χορήγησης πακλιταξέλης, Πανεπιστήμιο Πατρών (2016).

Μιχαλάκης Ιωάννης: Διδακτορική Διατριβή με τίτλο «Διερεύνηση του μηχανισμού του κυτταρικού θανάτου που προκαλείται από τη συνδυασμένη δράση ταξανών και υπερθερμίας», 81-83 (2009).

Μπακογλίδης Κωνσταντίνος: Μαγνητική Υπερθερμία: Επίδραση δομικών και μαγνητικών χαρακτηριστικών στη θερμική απόκριση μαγνητικών νανοσωματιδίων . (2011).

Μπαλανίκας Ευάγγελος-Διπλωματική Εργασία: Ενίσχυση της Επίδρασης Ιοντίζουσας Ακτινοβολίας με τη Χρήση Νανοσωματιδίων Χρυσού, 10-21, 25-36, (2017).

Μπουρνάκας Χρήστος: “Κυτταρομετρία Ροής: Αρχές και Εφαρμογές στη Σύγχρονη Ιατρική Ακρίβειας και τις Κυτταρικές Θεραπείες” , Διπλωματική Εργασία, Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο - ΕΑΠ, 16-29, (2021).

Παπαδημητρίου Κωνσταντίνος, Ξενάκης Κωνσταντίνος: Εφαρμογές της Νανοτεχνολογίας στην Ιατρική, (2016).

Παπαζαφείρη Π.: Απόπτωση-Ανοσολογία, Μεταπτυχιακό δίπλωμα εξειδίκευσης, Κλινική Βιοχημεία, Μοριακή Διαγνωστική (2014).

Τρέμη Ιωάννα: Διδακτορική Διατριβή με τίτλο «Μελέτη της Βιολογικής Απόκρισης Ανθρώπινων Καρκινικών Κυττάρων στις Ιοντίζουσες Ακτινοβολίες σε Συνδυασμό με Νανοσωματίδια Χρυσού», p.1-14, 72-92, ΕΜΠ (2022).

Φάσλα Θάλεια: Πτυχιακή Εργασία με τίτλο “Δοσιμετρική Μελέτη του Εννολικού Πνευμονικού Ιστού Κατά την Ακτινοθεραπεία Νεοπλασιών του Θώρακα”, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης - ΑΠΘ, 9-38 (2014).