

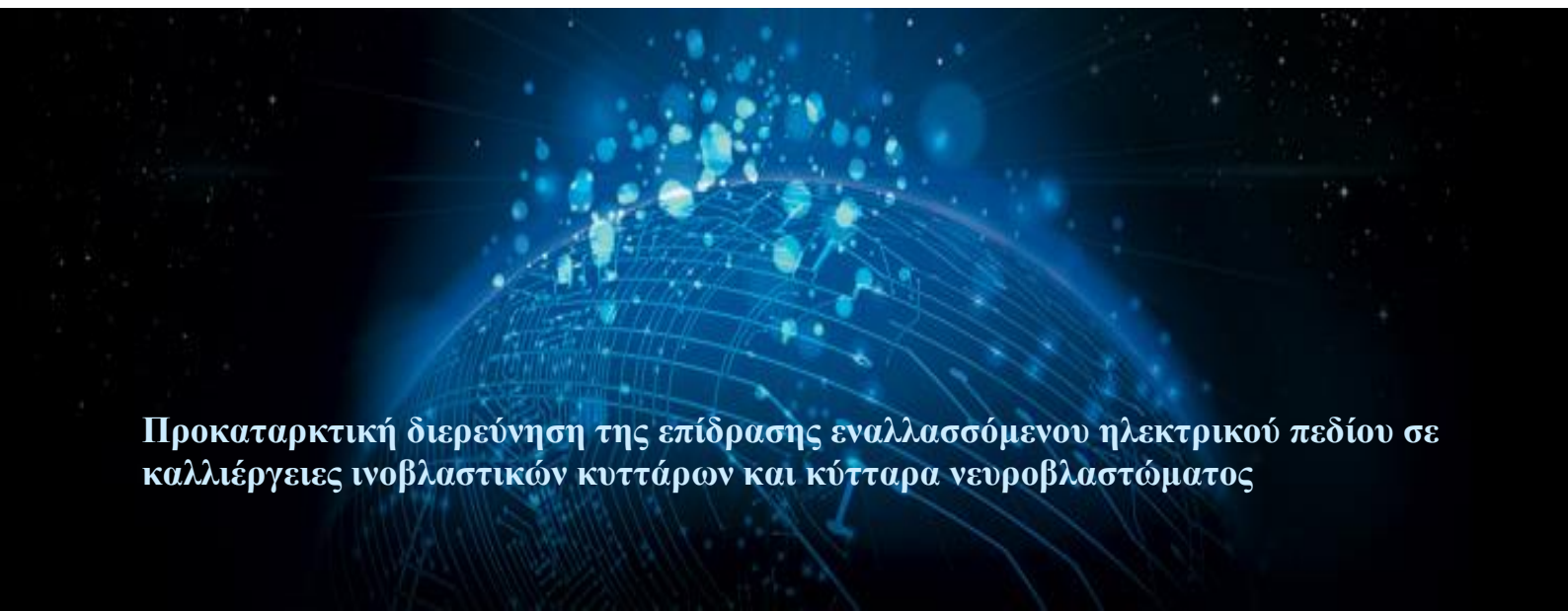
ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ ΣΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



Προκαταρκτική διερεύνηση της επίδρασης εναλλασσόμενου ηλεκτρικού πεδίου σε καλλιέργειες ινοβλαστικών κυττάρων και κύτταρα νευροβλαστώματος

ΕΛΕΝΗ Α. ΣΤΑΜΑΤΟΠΟΥΛΟΥ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΣΠΥΡΙΔΩΝ ΚΙΝΤΖΙΟΣ

ΑΘΗΝΑ, 2016

"Προκαταρκτική διερεύνηση της επίδρασης εναλλασσόμενου ηλεκτρικού πεδίου σε καλλιέργειες ινοβλαστικών κυττάρων και κύτταρα νευροβλαστώματος"

ΕΛΕΝΗ Α. ΣΤΑΜΑΤΟΠΟΥΛΟΥ

Τριμελής Συμβουλευτική και Εξεταστική Επιτροπή:

Κίντζιος Σπυρίδων (επιβλέπων): Καθηγητής Κυτταρο-/Ιστοκαλλιέργειας, Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ηλιόπουλος Ηλίας: Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ντούνη Ελένη: Επίκουρη Καθηγήτρια Γενετικής, Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το επιστημονικό πεδίο που μελετά τις επιπτώσεις της ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας έχει αναπτυχθεί σχετικά πρόσφατα και συνεχίζει να αναπτύσσεται ραγδαία σε παγκόσμια κλίμακα. Καθώς η σύγχρονη χρήση ηλεκτρομαγνητισμού έχει λάβει ανεξέλεγκτες διαστάσεις κρίνεται απαραίτητο η βαθύτερη γνώση αυτού του φαινομένου. Οι μέχρι τώρα επιστημονικές αναφορές έχουν χαρακτηριστεί με έλλειψη συνέπειας στα ευρήματα και αδυναμία συσχέτισης των διαθέσιμων αποτελεσμάτων. Παρά τις εκτεταμένες προσπάθειες για σαφή συμπεράσματα, έως σήμερα δεν έχουν επικρατήσει ξεκάθαροι μηχανισμοί αλληλεπίδρασης ηλεκτρομαγνητικού πεδίου και κυτταρικών οργανιδίων.

Στην εισαγωγική ενότητα της παρούσας εργασίας επιχειρείται μια συνοπτική αναφορά των βασικότερων απόψεων που έχουν επικρατήσει πάνω στη δράση ηλεκτρομαγνητισμού *in vitro* με βιολογικά στοιχεία. Επίσης γίνεται μια σύντομη αναφορά των κυριότερων εννοιών της ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας και του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου, καθώς και των κυριότερων μεθόδων παραγωγής ηλεκτρομαγνητισμού *in vitro*. Βασικός στόχος της πειραματικής διαδικασίας είναι η εξαγωγή τυχόν συμπερασμάτων μέσω μιας προκαταρκτικής μελέτης, με κύτταρα νευροβλαστώματος N2a και ινοβλαστώματος Vero υπό ακτινοβολία παλμικής ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας υψηλών συχνοτήτων (27,12 MHz). Το παρόν πεδίο επάγεται από μια πειραματική συσκευή σε σχήμα δακτυλίου κατασκευασμένη για κλινικές εφαρμογές από το πανεπιστήμιο Πατρών. Περιγράφονται αναλυτικά στην ενότητα των μεθόδων όλες οι διαδικασίες χειρισμού των κυτταρικών σειρών που ακολουθήθηκαν από την απόψυξη, την καλλιέργεια και τον υπολογισμό του αριθμού τους, καθώς και οι τρεις μέθοδοι, η χρωματομετρική μέθοδος MTT, η μέθοδος trypan blue για την καταμέτρηση των νεκρών κυττάρων και η μέθοδος τραύματος δι' αμυχής (scratch - wound assay) για τη μελέτη της μεταναστευτικής ικανότητας. Στο πειραματικό μέρος περιγράφονται αναλυτικά όλα τα βήματα και οι χρόνοι εκτέλεσης των πειραματικών προσπαθειών. Τέλος, βάσει των αποτελεσμάτων δεν διεξήχθησαν ασφαλή συμπεράσματα για τη δράση του παρόντος υψίσυχνου ηλεκτρομαγνητικού πεδίου στις συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές.

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Κυτταρικής Τεχνολογίας υπό την επίβλεψη του καθηγητή Κίντζιου Σπυρίδωνα, τον οποίο ευχαριστώ πολύ για την υποστήριξη και την αποδοχή του στο εργαστήριο. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή Βιοτεχνολογίας Χατζόπουλο Πολυδεύκη για την ευκαιρία πραγματοποίησης του παρόντος μεταπτυχιακού. Δεν θα ήθελα να παραλείψω τον καθηγητή Παπαδόπουλο Γεώργιο για την προθυμία του και το χρόνο του σε διδακτικές διευκρινήσεις. Τέλος ευχαριστώ πολύ όλα τα παιδιά του Εργαστηρίου της Κυτταρικής Τεχνολογίας, την Δρ. Φλαμπούρη Κέλλη, την Δρ. Μαυρίκου Σοφία και τον υποψήφιο διδάκτορα Αποστόλου Φυλακτή για την πολύτιμη βοήθειά τους στο πειραματικό κομμάτι της εργασίας μου, καθώς και τη φίλη μου Τόλια Μαρία για τη διάθεση του χρόνου της και όσοι από τους συγγενείς με βοήθησαν στην ολοκλήρωση της εργασίας μου.

ABSTRACT

The development of the scientific field that studies the consequences of the electromagnetic energy is recent and it is growing rapidly on a global scale. The deeper knowledge of electromagnetism is needed, because of the highly increased usage of it in our days. Because of the deviance in the findings of the scientific reports, correlation between results is not feasible. Despite the extended efforts for outright results, till today there is no clear type of interaction between electromagnetic field and cellular organelles.

At the opening chapter of this particular research there is a summary report on the basic and dominant aspects regarding the *in vitro* effect of the electromagnetism on biological elements. Also, there is a short report on the main concepts of electromagnetic energy and electromagnetic field, as well as the main production methods of electromagnetism *in vitro*. Primary aim of the experimental procedure is the conclusion through a preliminary study of N2a neuroblastoma cells and Vero fibroblast cells under high frequency pulsed radiation of electromagnetic energy (27.12MHz). This field is generated from a ring shaped experimental device that is built by the University of Patra for clinical applications. In the chapter about methods there is a precise description of the management procedures of the cell lines during their defrost, their culture and the calculation of their number, along with three methods, the colorimetric method MMT, the trypan blue method for the measurement of dead cells and the trauma by hack method for the study of the migration ability. In the experimental part there are all the steps that have been used and the run time of all experimental efforts. Finally, according to the results there were not safe conclusions about the effect of the high frequency electromagnetic field on the particular cell lines.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
ABSTRACT.....	4
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	5
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1. Ηλεκτρομαγνητικά (H/M) πεδία.....	11
1.2. Φυσικά και τεχνητά ηλεκτρομαγνητικά (H/M) πεδία.....	11
1.3. Το ηλεκτρομαγνητικό (H/M) φάσμα.....	12
1.4. Βιβλιογραφικά στοιχεία αναφορικά με την επιρροή ηλεκτρομαγνητικού (H/M) πεδίου σε κύτταρα.....	13
1.5. Μηχανισμοί «αντίληψης» των κυττάρων και των κυτταρικών οργανιδίων στην παρουσία ηλεκτρομαγνητικού (H/M) πεδίου.....	14
1.6. Μηχανισμοί δράσης του ηλεκτρομαγνητικού (H/M) πεδίου σε μοριακό επίπεδο.....	17
1.7. Πώς τα κύτταρα αντιδρούν σε ορατό ηλεκτρομαγνητικό (H/M) φάσμα.....	18
1.8. Κυτταρική αντίδραση σε μη ορατό ηλεκτρομαγνητικό (H/M) φάσμα.....	19
1.9. Παραδείγματα έρευνας.....	20
1.10. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός και διαφοροποίηση.....	22
1.11. Συσκευές παραγωγής ηλεκτρομαγνητικού (H/M) πεδίου σε <i>in vitro</i> μελέτες.....	22
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	25
3. ΥΛΙΚΑ.....	26
3.1. Βιολογικό υλικό.....	26
3.2. Εργαστηριακά υλικά.....	26
3.3. Εργαστηριακά μηχανήματα και πειραματικός εξοπλισμός.....	26
4. ΜΕΘΟΔΟΙ.....	28
4.1. Ξεπάγωμα κυττάρων.....	28
4.2. Ανακαλλιέργεια κυττάρων.....	28
4.3. Απομόνωση κυττάρων από φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας.....	29
4.4. Μέτρηση κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer.....	29
4.5. Φασματοφωτομετρική ανάλυση - MTT.....	30
4.6. Χρωστική μικροσκοπίου - Trypan blue.....	31
4.7. Προσομοίωση τραύματος δι' αμυχής - Scratch wound assay.....	31
4.8. Επεξεργασία των πειραματικών μετρήσεων.....	32
5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ.....	33
5.1. 1 ^ο πείραμα - Εφαρμογή της μεθόδου Scratch-wound Assay σε κύτταρα Vero (24h).....	33

5.2.	2 ^ο πείραμα - Εφαρμογή των μεθόδων Scratch-wound assay (24h), MTT και Trypan blue σε κύτταρα Vero (48h) παρουσία Η/Μ πεδίου και τοξικού παράγοντα.....	34
5.3.	3 ^ο Πείραμα - Εφαρμογή της μεθόδου MTT σε κύτταρα Vero σε χρόνο 24h.....	35
5.4.	4 ^ο Πείραμα - Εφαρμογή της μεθόδου MTT σε κύτταρα N2a ανά 30sec και 1h.....	36
5.5.	5 ^ο Πείραμα - Εφαρμογή των μεθόδων MTT και Trypan blue σε κύτταρα N2a (24h).....	37
5.6.	6 ^ο -7 ^ο -8 ^ο Πείραμα - Εφαρμογή των μεθόδων MTT και Trypan blue σε κύτταρα N2a ανά 1h, 1,5h και 24h.....	38
6.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	39
6.1.	Μελέτη της επίδρασης ηλεκτρομαγνητικού πεδίου πάνω σε κυτταρικό πληθυσμό Vero με τη μέθοδο Scratch-wound Assay μετά από 24h.....	39
6.2.	Μελέτη της επίδρασης ηλεκτρομαγνητικού (Η/Μ) πεδίου πάνω σε κυτταρικό πληθυσμό Vero παρουσία τοξικού παράγοντα (H ₂ O ₂) με τις μεθόδους Scratch - wound assay, MTT και Trypan blue.....	41
6.3.	Έλεγχος της κυτταρικής βιωσιμότητας πληθυσμών Vero υπό επίδραση του ηλεκτρομαγνητικού (Η/Μ) πεδίου με τη μέθοδο MTT σε 24h.....	44
6.4.	Μελέτη της κυτταρικής βιωσιμότητας παρουσία ηλεκτρομαγνητικού (Η/Μ) πεδίου σε πληθυσμούς N2a με τη μέθοδο MTT σε χρόνους 30sec και 1h.....	44
6.5.	Μελέτη της επίδρασης ηλεκτρομαγνητικού (Η/Μ) πεδίου σε κύτταρα N2a μετά από 24h επώαση με τη μέθοδο MTT και trypan blue. Η συσκευή είναι τοποθετημένη σε διαφορετική θέση από τα υπόλοιπα πειράματα.....	46
6.6.	Μελέτη της επίδρασης ηλεκτρομαγνητικού (Η/Μ) πεδίου σε κύτταρα N2a μετά από χρόνους 1h, 1,5h και 24h επώασης με τη μέθοδο MTT και Trypan blue.....	47
7.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	52
8.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	57

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

DMEM : Θρεπτικό μέσο κυτταροκαλλιέργειας ζωικών κυττάρων - Dulbecco' s modified Eagle's medium

DMSO : Διμεθυλο-σουλφοξείδιο - Dimethylsulfoxide

ELF EMF : Εξαιρετικά χαμηλής συχνότητας Ηλεκτρομαγνητικό πεδίο - Extremely low frequency Electromagnetic Field

Elisa : Enzyme Linked Immunosorbent Assay

FBS : Ορός εμβρύου μόσχου - Foetal bovine serum

H₂O₂ : Υπεροξείδιο του υδρογόνου - Hydrogen peroxide

N2a : Καρκινικά κύτταρα νευροβλαστώματος - Neuro-2a

PBS : Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών - Phosphate buffered saline

PEMF : Παλμικό ηλεκτρομαγνητικό πεδίο - Pulsed electromagnetic field

Vero : Κυτταρική σειρά από νεφρούς πράσινου Αφρικανικού πιθήκου - African green monkey kidney

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ως γνωστόν η ζωή στη Γη εμφανίστηκε και εξελίχθηκε με την παρουσία γεωμαγνητικού πεδίου. Η σχέση ζωντανών οργανισμών και γεωμαγνητικού πεδίου αιχμαλώτισε το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας από τις αρχές του προηγούμενου αιώνα. Οι πρώτες μελέτες βασίστηκαν στην ικανότητα των αποδημητικών πουλιών να προσανατολίζονται την περίοδο μετανάστευσης. Αργότερα ερευνήθηκαν τα αποτελέσματα ηλεκτρομαγνητικών πεδίων διαφόρων συχνοτήτων και εντάσεων πάνω σε βιολογικά συστήματα. Φαινόμενα όπως ο γεωμαγνητικοτροπισμός καθώς και οι φυσιοπαθολογικές επιδράσεις ηλεκτρομαγνητικών πεδίων έχουν μελετηθεί εκτενώς και εξακολουθούν να μελετώνται [Stavroulakis, 2003].

Ο Galvani και ο Volta στις αρχές του 19^{ου} αιώνα εστίασαν το ενδιαφέρον τους στη νευροφυσιολογία ποδιών από βατράχια, ερευνώντας το νευρικό σύστημα ως ηλεκτρικό. Το 1930 επιστήμονες ασχολήθηκαν με την επίδραση μικροκυματικής ακτινοβολίας πάνω σε φυτικά και ζωικά κύτταρα. Το 1973 μελέτες στη Σοβιετική Ένωση σε εργάτες που δούλευαν κοντά σε υψηλή τάση αύξησαν την ανησυχία των επιστημόνων για αρνητικές συνέπειες αναφορικά με την υγεία. Εξαιτίας αυτής της ανησυχίας στη Σοβιετική Ένωση καθιερώθηκε ένα επίπεδο ασφάλειας έκθεσης πολύ χαμηλότερο από ό,τι στο δυτικό κόσμο. Το επιδημιολογικό έργο της Wertheinner και του Leeper [1979] πάνω στη συσχέτιση μαγνητικών πεδίων και παιδικής λευχαιμίας ταρακούνησε το δημόσιο και επιστημονικό κοινό. Έκτοτε επιστήμονες, ερευνητές, επιδημιολόγοι και μηχανικοί σε παγκόσμια κλίμακα συνεχίζουν να ερευνούν τις πιθανές επιδράσεις από ηλεκτρομαγνητικά πεδία [Kato, 2006].

Επιστήμονες θεωρούν ότι το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο έχει την ικανότητα να αναδειξει κρυμμένες ιδιότητες πολλών βιολογικών στοιχείων. Εκτεταμένες έρευνες σε προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς έδειξαν ότι ο ηλεκτρομαγνητισμός μπορεί να τους επηρεάσει είτε αρνητικά είτε θετικά στην ανάπτυξη, στο μεταβολισμό και στον πολλαπλασιασμό. Κάποια αποτελέσματα είναι δύσκολο να επαναληφθούν λόγω παραμέτρων που δεν δύνανται να καταγραφούν, όπως ο προσανατολισμός του γεωμαγνητικού πεδίου, η κοσμική ακτινοβολία και τα ηλιακά φαινόμενα. Οι προσπάθειες έρευνας μπορούν να διαιρεθούν βάσει ποικίλων εφαρμοζόμενων χαρακτηριστικών των ηλεκτρομαγνητικών πεδίων [Hunt et al., 2009].

Αν και η κλινική εφαρμογή συσκευών παραγωγής ηλεκτρομαγνητικού πεδίου βρίσκεται σε αρχικό στάδιο, τα πολυάριθμα αποτελέσματα εφαρμογής τους έχουν συνδεθεί με τη θεραπεία. Η μαγνητοθεραπεία ξεκίνησε στην Ιαπωνία μετά τον δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο, με κλινικές δοκιμές μαγνητικών και ηλεκτρομαγνητικών πεδίων καθώς φάνηκε ότι μερικές φορές συμβάλλει στην αποθεραπεία καταγμάτων. Κατά τη διάρκεια του 1960-1985 σχεδόν όλες οι Ευρωπαϊκές χώρες κατασκεύαζαν τις δικές τους μαγνητοθεραπευτικές συσκευές που απέδιδαν πολλά είδη κυματομορφών. Το πρώτο βιβλίο με καταγραφή θεραπειών από 33 διαφορετικές παθήσεις ήταν από τον Todorov, 1982. Τις τελευταίες δεκαετίες η θεραπεία μέσω ηλεκτρομαγνητικού πεδίου αυξάνεται σταθερά στη δυτική ιατρική.

Δυστυχώς όμως, δεν έχει δοθεί η δέουσα προσοχή στις μηχανικές λεπτομέρειες των συσκευών, με τις περισσότερες να έχουν σχεδιαστεί χωρίς να ληφθεί υπόψη η φύση ή η απόκριση του κάθε βιολογικού στοιχείου, με αποτέλεσμα να μην αξιοποιείται στο έπακρο η δυναμική τους. Το θεμελιώδες ζήτημα είναι να κατανοηθούν οι βιοφυσικές ιδιότητες των βιολογικών στοιχείων διαφορετικών ιστών που αποκρίνονται κάθε φορά διαφορετικά σε έκθεση ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας [Markov, 2015].

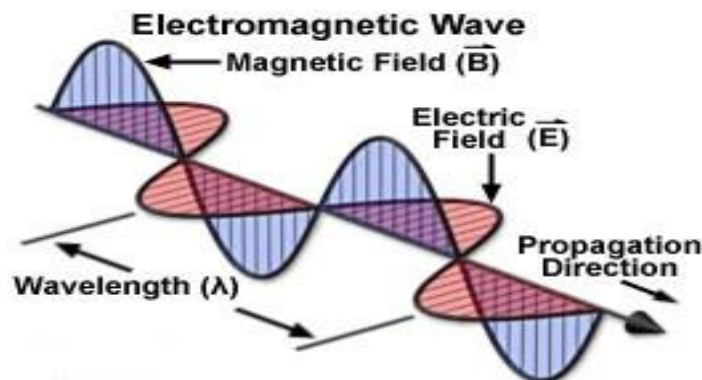
1.1. Ηλεκτρομαγνητικά (H/M) πεδία

Το ηλεκτρομαγνητικό (H/M) πεδίο (Electromagnetic Field-EMF) επεκτείνεται επ' άπειρον στο χώρο και περιγράφει τις ηλεκτρομαγνητικές αλληλεπιδράσεις. Το πεδίο αυτό μπορεί να εκφραστεί ως ο συνδυασμός ενός ηλεκτρικού και ενός μαγνητικού πεδίου.

Όταν ένα φορτίο κινείται δημιουργεί ταυτόχρονα ηλεκτρικό και μαγνητικό πεδίο. Συνεπώς το ηλεκτρικό και μαγνητικό πεδίο αποτελούν δύο εκδηλώσεις του κινούμενου φορτίου, την οποία θεωρούμε ως μια ιδιότητα και την ονομάζουμε ηλεκτρομαγνητικό (H/M) πεδίο. Στις χαμηλές όμως συχνότητες, όπως η συχνότητα των 50Hz, δεν υπάρχει πρακτικά ζεύξη μεταξύ του ηλεκτρικού πεδίου και του μαγνητικού πεδίου, δηλαδή δεν υπάρχει ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, αλλά δύο ανεξάρτητα πεδία, το ηλεκτρικό και το μαγνητικό [Ντεζέλου, 2012].

Τα ηλεκτρικά πεδία δημιουργούνται από διαφορές τάσης: όσο μεγαλύτερη είναι η τάση τόσο ισχυρότερο είναι το πεδίο που δημιουργείται. Τα μαγνητικά πεδία δημιουργούνται όταν υπάρχει ροή ηλεκτρικού ρεύματος: όσο υψηλότερη είναι η ροή του ρεύματος τόσο μεγαλύτερη είναι η ένταση του μαγνητικού πεδίου. Ο τρόπος με τον οποίο φορτία και ρεύματα αλληλεπιδρούν περιγράφεται από τις εξισώσεις Maxwell και το Νόμο της δύναμης Lorentz.

Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά που ορίζουν ένα H/M πεδίο είναι η **συχνότητα του** (f) ή το αντίστοιχο **μήκος κύματος** (λ). Η συχνότητα εκφράζει τον αριθμό των ταλαντώσεων, ή κύκλων ανά δευτερόλεπτο, ενώ το μήκος κύματος δηλώνει την απόσταση μεταξύ δύο διαδοχικών κυμάτων. Όσο υψηλότερη είναι η συχνότητα, τόσο μικρότερο είναι το μήκος κύματος [Γεωργακάκος κ.ά., 1999]. Η συχνότητα ενός ηλεκτρομαγνητικού κύματος εκφράζεται συνήθως σε μονάδες Hertz (Hz). (Ένα Hz ισούται με ένα κύμα ανά δευτερόλεπτο).



Εικόνα 1.1: Τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα είναι συγχρονισμένα ταλαντούμενα ηλεκτρικά και μαγνητικά πεδία τα οποία ταλαντώνονται σε επίπεδα κάθετα μεταξύ τους και κάθετα προς τη διεύθυνση διάδοσης. (πηγή : <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/electromagnetic/>)

Ένα ακόμα χαρακτηριστικό των H/M πεδίων είναι η ενέργεια που μεταφέρουν. Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία είναι η εκπομπή στον χώρο ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας υπό μορφή κυμάτων που ονομάζονται ηλεκτρομαγνητικά κύματα. Τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα είναι συγχρονισμένα ταλαντούμενα ηλεκτρικά και μαγνητικά πεδία τα οποία ταλαντώνονται σε επίπεδα κάθετα μεταξύ τους και κάθετα προς τη διεύθυνση διάδοσης. Διαδίδονται στο κενό με ταχύτητα ίση με την ταχύτητα του φωτός αλλά και μέσα στην ύλη με ταχύτητα λίγο μικρότερη από την ταχύτητα του φωτός.

Στην υψηλή συχνότητα (και άρα στα μικρά μήκη κύματος) η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία μεταφέρει μεγάλη ενέργεια ικανή να προκαλεί ιονισμό της ύλης και αποτελεί μεταλλαξογόνο παράγοντα. Η ακτινοβολία που έχει αυτή τη δυνατότητα ονομάζεται ιονίζουσα ακτινοβολία, σε αντίθεση με τη μη ιονίζουσα η οποία δεν έχει επαρκή ενέργεια για τη διάσπαση βιολογικών δεσμών και συνεπώς την πρόκληση ιονισμού στο μέσον από το οποίο διέρχεται [<http://www.eekt.gr>].

A. Ηλεκτρικό πεδίο

Είναι ο χώρος όπου ασκούνται δυνάμεις σε ηλεκτρικά φορτία. Οι δυναμικές γραμμές ενός ομοιόμορφου ηλεκτρικού πεδίου είναι ευθείες, παράλληλες μεταξύ τους. Όταν τα φορτία συσσωρεύονται σ' ένα σημείο, απωθούν τα ομώνυμα και έλκουν τα ετερόνυμα, αυτή είναι η **ηλεκτρική τάση** (V). Το ηλεκτρικό πεδίο είναι ισχυρότερο κοντά στην πηγή, δεν έχει διεισδυτικό χαρακτήρα και εύκολα μπορεί να εμποδιστεί από κοινά υλικά, όπως το ξύλο και το μέταλλο. Το ηλεκτρικό πεδίο υπάρχει και όταν δεν υφίστανται ροή ρεύματος. Περιγράφεται από την **ένταση** (E) η οποία μετράται σε Volt ανά μέτρο (V/m). Η ένταση εκφράζει το ρυθμό διέλευσης του ηλεκτρικού φορτίου από μια διατομή του αγωγού.

B. Μαγνητικό πεδίο

Είναι ο χώρος όπου ασκούνται δυνάμεις από ηλεκτρικά ρεύματα. Όσο μεγαλύτερη είναι η ένταση του ρεύματος (I), τόσο ισχυρότερο είναι το μαγνητικό πεδίο. Η ένταση του μαγνητικού πεδίου (H) μετριέται σε Amperes ανά μέτρο (A/m) αλλά συνήθως εκφράζεται με τις μονάδες της αντίστοιχης μαγνητικής επαγωγής (B), που είναι το Tesla (T) και το Gauss (G). Η αντιστοιχία τους είναι $1G = 100\mu T$. Οι δυναμικές γραμμές του μαγνητικού πεδίου είναι κλειστές. Το μαγνητικό πεδίο, όπως και το ηλεκτρικό είναι ισχυρότερο κοντά στην πηγή και εξασθενεί με την απόσταση. Ωστόσο διαπερνά εύκολα τα κοινά υλικά και παράγεται μόνο όταν υπάρχει ροή ρεύματος.

Τα ηλεκτρικά και τα μαγνητικά πεδία χαρακτηρίζονται ως στατικά εάν οι εντάσεις τους E και H αντίστοιχα, παραμένουν χρονικά σταθερές. Όταν χαρακτηρίζονται ως μεταβαλλόμενα και ειδικότερα εναλλασσόμενα οι εντάσεις E και H αλλάζουν μέτρο και φορά (πολικότητα) σε σχέση με το χρόνο t κατά περιοδικό τρόπο.

Το ηλεκτρικό πεδίο είναι πάντοτε κάθετο στη διεύθυνση διάδοσης ενώ το μαγνητικό πεδίο είναι κάθετο τόσο στο ηλεκτρικό όσο και στη διεύθυνση διάδοσης. Άλλα μεγέθη που ποσοτικοποιούν την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία είναι η **πυκνότητα ροής ισχύος** που συμβολίζεται με (S) και μετριέται σε βατ ανά τετραγωνικό μέτρο (W/m^2). Υπάρχουν δύο τύποι πεδίων ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας σύμφωνα με την προέλευση τους: το φυσικό και το τεχνητό πεδίο.

1.2. Φυσικά και τεχνητά ηλεκτρομαγνητικά (H/M) πεδία

Τα φυσικά H/M πεδία προέρχονται από την ίδια τη φύση και δεν μπορούν να αποφευχθούν από τους ζωντανούς οργανισμούς. Η φυσική ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία χωρίζεται σε στατική και μη στατική. Παράδειγμα είναι η ύπαρξη φυσικού ηλεκτρικού στατικού πεδίου μεταξύ της ιονόσφαιρας και της γης, όπου σε συνθήκες καλοκαιρίας κυμαίνεται από 0,1KV/m έως 0,5KV/m, ενώ σε συνθήκες καταιγίδας από 3KV/m - 20KV/m. Αντίστοιχα το γήινο μαγνητικό πεδίο εξαρτάται από το γεωγραφικό πλάτος και κυμαίνεται από 0,31 έως 0,62 Gauss. Εκτός από τα στατικά της πεδία, η Γη δέχεται και την επίδραση ηλιακών ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων όπου κατά τη διάρκεια των εκλάμψεων εκπέμπει ένα μεγάλο φάσμα

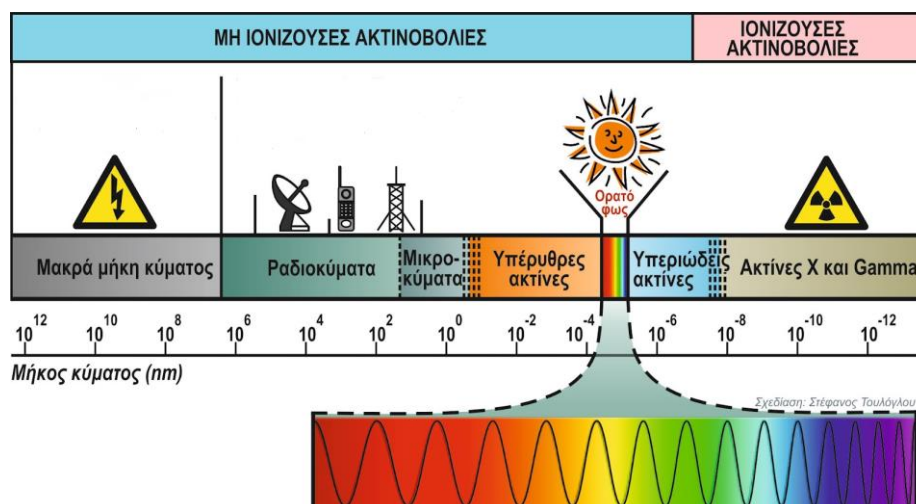
συχνοτήτων, το οποίο περιλαμβάνει τα ραδιοκύματα, το ορατό φως, το υπεριώδες και φτάνει μέχρι την περιοχή των ακτίνων Roentgen.

Τα τεχνητά Η/Μ πεδία είναι δημιούργημα του ανθρώπου. Αυτά καλύπτουν ένα μεγάλο φάσμα συχνοτήτων. Το κυριότερο είναι αυτό του δικτύου της ΔΕΗ, το οποίο είναι 50Hz. Πέρα από αυτό έχουν προστεθεί πεδία υψηλότερων συχνοτήτων της τάξης των MHz από τους υπολογιστές και τις διάφορες οικιακές συσκευές. Άλλα πεδία είναι τα ραδιοτηλεοπτικά πεδία (300KHz-500KHz), των σταθμών κινητής τηλεφωνίας (900MHz) των ραντάρ και των δορυφορικών επικοινωνιών (τάξης GHz).

1.3. Το ηλεκτρομαγνητικό (Η/Μ) φάσμα

Η ταξινόμηση της ακτινοβολίας ως προς τα μήκη κύματος ή τη συχνότητα, καλείται Η/Μ φάσμα. Όλες οι μορφές της Η/Μ ακτινοβολίας συγκροτούν το λεγόμενο Η/Μ φάσμα, ταξιδεύουν με την ταχύτητα του φωτός στο κενό και διαφέρουν στις τιμές της συχνότητας (και του μήκους κύματος). Αν και φαίνεται να υπάρχει διαφορά, τα ραδιοκύματα, τα μικροκύματα, οι ακτίνες X όπως και το ορατό φως είναι όλα ενεργειακά Η/Μ κύματα.

Το Η/Μ φάσμα αποτελείται στην πλειονότητα του από αόρατα κύματα, εκτός από ένα μικρό μέρος της ακτινοβολίας αυτής που μπορεί να εντοπισθεί από το ανθρώπινο μάτι και περιλαμβάνει το ορατό φως που παράγει τα διάφορα χρώματα του ουράνιου τόξου. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.2 ένας βασικός διαχωρισμός του φάσματος περιλαμβάνει δύο μεγάλες κατηγορίες την μη-ιονίζουσα ($\lambda > 100\text{nm}$ ή με συχνότητες $f < 3000\text{THz}$) και την ιονίζουσα ακτινοβολία ($\lambda < 100\text{nm}$) [<http://www.eekt.gr>].



Εικόνα 1.2: Το ηλεκτρομαγνητικό (Η/Μ) φάσμα (πηγή : <http://stefouloglou.blogspot.gr/2012/07/blog-post.html>)

1.4. Βιβλιογραφικά στοιχεία αναφορικά με την επιρροή ηλεκτρομαγνητικού (H/M) πεδίου σε κύτταρα

Οι βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με τον τρόπο που τα εξωτερικά H/M πεδία επιδρούν σε βιολογικά στοιχεία είναι πολυπληθείς (Research Center for Bioelectromagnetic Interaction, 2010). Παρ' όλα αυτά υπάρχει ένα ακαθόριστο συμπέρασμα δεκαετιών όσον αφορά τις επιδράσεις ηλεκτρομαγνητισμού στους ζωντανούς οργανισμούς.

Τα στατικά και χαμηλής συχνότητας πεδία ενδεχομένως να επιδρούν πάνω σε βιολογικά συστήματα μετά από παρατήρηση κάποιας αναδιανομής ιόντων και παραγωγής ασθενούς ρεύματος. Τα βιολογικά αποτελέσματα μαγνητικών πεδίων χαμηλής συχνότητας έχουν αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένης μελέτης, λόγω βαθύτερης διεϊσδυσης σε ιστούς [Adey, 1980, Robinson, 1985, Frey, 1993, Hong, 1995, Marino and Becker, 1997, Portier and Wolfe, 1998, Volpe, 2003, Funk and Monsees, 2006, Funk et al., 2009].

Σε κυτταρικό επίπεδο το χαμηλής έντασης H/M πεδίο μπορεί να επηρεάσει το κύτταρο σε διαφορετικά δομικά του επίπεδα: στους υποδοχείς της μεμβρανικής επιφάνειας αλλάζοντας τη θέση τους και την προσαρμοστικότητα τους, στην κυτταρική μεμβράνη αλλάζοντας τη διαπερατότητα της και τη μηχανική της ακαμψία. Επίσης μπορεί να επέμβει σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες, όπως στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στη διαφοροποίηση [Lisi et al., 2006, Foletti et al., 2009], στη σύνθεση του DNA [Takashi et al., 1986], στη σύνθεση της ATP [Zrimec et al., 2002], στην πρωτεϊνική έκφραση [Goodman and Henderson, 1988], στη μεταβολική δραστηριότητα [Milani et al., 2001] και στην πρωτεϊνική φωσφορυλίωση [Sun et al., 2001].

Οι επιπτώσεις χαμηλής έντασης 30-300 GHz (millimeter wavelength EMFs) σε μοντέλα κυττάρων και ζώων, αν και έχουν μελετηθεί εκτεταμένα παρ' όλα αυτά δεν είναι γενικά αποδεκτές σε δυτικούς επιστήμονες. Ωστόσο κλινικές δοκιμές, ακόμα και σε ανθρώπους, δείχνουν να έχουν θεραπευτικά αποτελέσματα σε πεπτικά έλκη, μετεγχειρητικά τραύματα, πνευμονική φυματίωση και μυοκαρδίτιδα [Pakhomov et al., 1998, Rojavin and Ziskin, 1998, Pakhomov and Murphy, 2000, Fedorov et al., 2003, Betskii and Lebedeva, 2004].

Αξίζει να σημειωθεί ότι έχουν γίνει έρευνες και με χαμηλής έντασης φως και συγκεκριμένα σε κυτταρικό και υποκυτταρικό επίπεδο [Smith, 1991, Hamblin and Demidova, 2006, Hawkins and Abrahamse, 2007]. Με μια σειρά πειραμάτων επιστήμονες έδειξαν ότι χαμηλής έντασης φως μπορεί να επηρεάσει τη δραστηριότητα της Na^+ / K^+ -ATPάσης [Kilanczyk et al., 2002], τη συγκέντρωση του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} [Volotovskii et al., 1993; Alexandratou et al., 2002], τη μιτοχονδριακή συγκέντρωση ATP [Passarella et al., 1984] και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων [Khadra et al., 2005, Tuby et al., 2007].

Επίπεδα έντασης μεσαίων συχνοτήτων (KHz - MHz) κάτω από κατάλληλες συνθήκες μπορούν να σταματήσουν την κυτταρική ανάπτυξη [Giladi et al, 2008] με άμεσες εφαρμογές στη θεραπεία καρκίνου [Kirson et al, 2004, 2009].

Τα αποτελέσματα από υψηλότερης συχνότητας H/M πεδίων σε βιολογικά συστήματα μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε θερμικά και μη. Η έκταση του θερμογεννητικού αποτελέσματος εξαρτάται κυρίως από την ένταση του H/M πεδίου, που συνδέεται με τον ρυθμό ειδικής απορρόφησης (specific absorption ratio, SAR) προφανώς αυξημένη θερμοκρασία να προκαλεί αλλαγές στην κυτταρική λειτουργία και υπερβολική αύξηση της θερμοκρασίας να συνεπάγεται κυτταρικές βλάβες [Cifra et al., 2010].

Αρκετές προγενέστερες μελέτες στον τομέα της Η/Μ έρευνας χαρακτηρίζονται από ελλιπή σχεδιασμό και μια πληθώρα αντικρουόμενων αποτελεσμάτων που περιορίζουν την αξιοπιστία τους. Ένα από τα κυριότερα προβλήματα είναι τα ανεξέλεγκτα μικροθερμικά επεισόδια στα υποκυτταρικά στρώματα ακόμα και υπό ασθενή πεδία. Οι Morissey et al [2008], συμπέραναν με *in vitro* πειραματικό μοντέλο ότι έστω και μια μικρή αύξηση της θερμοκρασίας (0,2 °C) μπορεί να προκαλέσει βιολογικές αλλαγές. Ένας κρίσιμος παράγοντας σχεδιασμού τέτοιων πειραμάτων είναι η ελεγχόμενη δοσιμετρία προς συγκράτηση μικροθερμικών αλλαγών.

Επιπλέον αρκετοί άλλοι μη θερμικοί παράγοντες, όπως η συχνότητα του μεταφερόμενου κύματος, η πολικότητα, η διάρκεια έκθεσης, η συνεχόμενη ή παλμική έκθεση, το σχήμα κυματομορφής του παλμού έκθεσης καθώς και η παρουσία ή η απουσία στατικού μαγνητικού πεδίου μπορούν να παραποιήσουν το αποτέλεσμα μιας έρευνας αν δεν συμπεριληφθούν σωστά στις μετρήσεις του πειράματος [Belyaev et al., 1996, 1998, 2000, Osepchuk and Petersen, 1997, Osepchuk et al., 2002].

Επιπρόσθετα, το στάδιο της κυτταρικής διαφοροποίησης ή αντιγραφής, δυσκολεύουν την αναπαραγωγή ίδιων συμπερασμάτων. Για παράδειγμα, σε εκτεταμένες μελέτες των Grundler και Keilmann πάνω στην επίδραση Η/Μ στον οργανισμό της ζύμης, διαπιστώθηκε είτε διέγερση είτε καταστολή της κυτταρικής ανάπτυξης. Σε συγκεκριμένες συχνότητες έκθεσης περίπου 42 GHz, διεγείρονταν η κυτταρική ανάπτυξη ενώ σε άλλες παρεμποδίζονταν. Το γεγονός αυτό μπορεί να συνδέεται με μια ιδιαίτερη κατάσταση υψηλής αρμονίας του κυττάρου, δηλαδή απόκρισης συντονισμού με το εξωγενές Η/Μ πεδίο. Άλλα παραδείγματα περιγράφουν τις επιδράσεις Η/Μ πεδίων συγκεκριμένων συχνοτήτων ή και συγκεκριμένης πολικότητας [Belyaev et al, 2000]. Έχουν βρεθεί ομοιότητες στην απόκριση κυττάρων σε συγκεκριμένες χαμηλές συχνότητες πεδίων καθώς και σε συγκεκριμένες υψηλές συχνότητες (RF), [Blackman, 1985, Schwartz and Mealing, 1993, Lass et al., 2001, Shcheglov et al., 2002, Ayrapetyan et al., 2009].

1.5. Μηχανισμοί «αντίληψης» των κυττάρων και των κυτταρικών οργανιδίων στην παρουσία ηλεκτρομαγνητικού (Η/Μ) πεδίου

Η αντίδραση κυτταρικών πληθυσμών σε Η/Μ πεδίο σύμφωνα με τον Poo, [1981], συνεπάγεται μια σειρά γεγονότων, με μεταδόσεις σημάτων από την κυτταρική μεμβράνη στο κυτταροσκελετό. Λόγω της υψηλής διηλεκτρικότητας του διπλού λιπιδικού στρώματος, το εξωτερικά εφαρμοζόμενο ηλεκτρικό ρεύμα μάλλον θα εξασθενούσε αισθητά στο εσωτερικό των κυττάρων. Το ερώτημα είναι, αν και με ποιο τρόπο τα κύτταρα αντιλαμβάνονται ένα Η/Μ πεδίο;

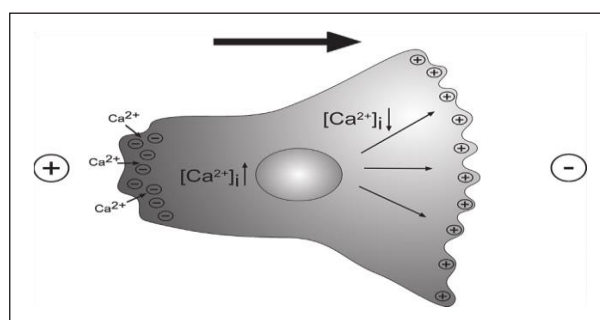
Ένας προτεινόμενος μηχανισμός είναι η ηλεκτροφοριστική κινητικότητα φορτισμένων μορίων στην κυτταρική μεμβράνη [Jaffe, 1977, Poo, 1981]. Σημαντικό ρόλο εδώ παίζει η ηλεκτροώσμωση καθώς συνεχές ηλεκτρικό πεδίο σε αρνητικά φορτισμένη μεμβράνη παράγει μια ροή θετικών ιόντων προς την καθοδική της πλευρά. Ένας αρνητικά φορτισμένος υποδοχέας θα εκδιωχθεί προς την καθοδική πλευρά της μεμβράνης, εάν το ξ δυναμικό του είναι λιγότερο αρνητικό από το ξ δυναμικό της κυτταρικής μεμβράνης, διαφορετικά θα συγκεντρωθεί στην ανοδική πλευρά. Το ξ δυναμικό είναι το δυναμικό ανάμεσα στη στερεή επιφάνεια και στην υγρή. Αυτό έχει παρατηρηθεί σε διάφορα είδη κυττάρων. Παραδείγματα είναι ο υποδοχέας κονκαναβαλίνη Α της λεπτίνης, οι υποδοχείς της ακετυλοχολίνης, επίσης τα θετικά φορτισμένα λιπίδια στην κυτταρική μεμβράνη [Poo, 1981] ή τα λιπίδια και οι επιδερμικοί υποδοχείς ανάπτυξης στα κερατινοκύτταρα [Song et al., 2002]. Συνεπώς μια αναδιανομή των μεμβρανικών μορίων είναι ικανή να ανιχνευτεί από τα εσωτερικά στοιχεία του κυτταροσκελετού και να αλλάξει τη συμπεριφορά τους.

Κάποιοι από τους μηχανισμούς «αντίληψης» των κυττάρων έχουν περιγραφεί και από τους Finkelstein et al., 2004. Οι Finkelstein et al., απέδειξαν ότι τα οργανίδια που εμπλέκονται στη μεταναστευτική κίνηση των κυττάρων υπό ηλεκτρικό πεδίο είναι οι μικροσωληνίσκοι. Οι μικροσωληνίσκοι παρουσία ηλεκτρομαγνητισμού αλληλοεπιδρούν και μεταφέρουν καίρια μόρια της σηματοδότησης όπως το Rho GTPάσης και την πρωτεϊνική κινάση, δημιουργώντας μεταγωγή σήματος.

Το ηλεκτρικό πεδίο σύμφωνα με τους McBain et al. [2003], προκαλεί μια αναδιανομή των υποδοχέων ανάπτυξης ηπατοκυττάρων. Επίσης ενεργοποιεί τα μονοπάτια των μιτογόνων πρωτεϊνικών κινάσων καθοδικά, προκαλώντας κυτταρική μετανάστευση στα επιθηλιακά κύτταρα. Αντίθετα το επιβαλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο σε χονδροκύτταρα, λόγω ενεργοποίησης των ανταγωνιστών της ινοσιτόλης των φωσφολιπιδικών μονοπατιών, βρέθηκε να εμποδίζει την καθοδική μετανάστευση τους [Chao et al., 2000].

Το μεμβρανικό δυναμικό ηρεμίας μη διεγέρσιμων κυττάρων είναι -45mV έως -75mV . Ένα σύνηθες στατικό ηλεκτρικό πεδίο των $1\text{-}10\text{V/cm}$ εφαρμοζόμενο σ' ένα κύτταρο με ακτίνα των $10\mu\text{m}$ υπερπολώνει τη μεμβράνη στην άνοδο ($1,5\text{-}15\text{mV}$) και εκπολώνει την καθοδική πλευρά κατά την ίδια τιμή, αλλάζοντας τα επίπεδα ιόντων ασβεστίου [Poo, 1981, Robinson, 1985, Mycielska and Djamgoz, 2004].

Σε αρκετά κύτταρα η μεταναστευτική τους κίνηση μετά από εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου οφείλεται σε αλλαγές της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης Ca^{2+} . Συγκεκριμένα ένας μηχανισμός που προτάθηκε από τους Mycielska και Djamgoz [2004] είναι ότι από τη στιγμή που το κυτταρόπλασμα στην αντιμέτωπη ανοδική πλευρά γινόταν πιο αρνητικό, μια εσωτερική δύναμη αύξανε τη συγκέντρωση Ca^{2+} στην ανοδική του πλευρά (+) και έτσι μειωνόταν στην αντίστοιχη καθοδική (-). Αυξημένη συγκέντρωση Ca^{2+} στην άνοδο συχνά ενεργοποιεί την κινάση της μυοσίνης φωσφορυλιώνοντας τη ρυθμιστική ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης II. Αυτή με τη σειρά της διεγείρει την ΑΤΡάση της μυοσίνης με αποτέλεσμα τη σύσπαση του κυττάρου. Συνεπώς η ανοδική πλευρά του κυττάρου ευρισκόμενη σε σύσπαση, θα προκαλέσει τη μετακίνησή του κυττάρου προς την κάθοδο. Η παρουσία ηλεκτρικού πεδίου επίσης θα προκαλέσει εκπόλωση της καθοδικής αντιμέτωπης στο πεδίο πλευρά της μεμβράνης με άνοιγμα των ιοντικών καναλιών και ροή Ca^{2+} λόγω διαφοράς δυναμικού.



Εικόνα 1.3: Επίδραση ηλεκτρικού πεδίου πάνω στο μεμβρανικό δυναμικό και στη συγκέντρωση Ca^{2+} . Η ανοδική αντιμέτωπη με το πεδίο πλευρά υπερπολώνεται και οδηγεί σε παθητική ροή Ca^{2+} και σε σύσπαση του κυττάρου με κατεύθυνση την κάθοδο. (πηγή : Funk and Monsees, 2006)

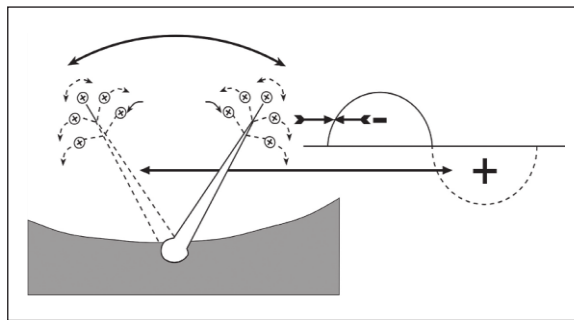
Αν και υπάρχουν πολλές μελέτες που αποδεικνύουν την επίδραση Η/Μ πεδίου στους ιστούς ακόμα υπάρχουν διαφωνίες σχετικά με το πώς το εξασθενημένο μαγνητικό πεδίο μπορεί να «ερεθίσει» το κύτταρο. Για παράδειγμα τα οστεοκύτταρα διεγείρονται σε υπερβολικά χαμηλής έντασης μαγνητικό και ηλεκτρικό πεδίο. Κατ' αυτόν τον τρόπο εγείρονται δύο ερωτήματα: αφενός ποιος κυτταρικός μηχανισμός μπορεί να

μετατρέπει τόσα χαμηλά ποσά ενέργειας σε κυτταρική δραστηριότητα και αφετέρου γιατί ο θερμικός θόρυβος δεν αντιστοιχεί με τα πολύ χαμηλά ποσά ενέργειας του H/M πεδίου.

Μερικοί επιστήμονες θεωρούν τις παραμαγνητικές ιδιότητες των μεταλλικών ιόντων ως τους αισθητήρες του κυττάρου. Μετά από έκθεση σε H/M πεδίο βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα νορεπινεφριδίων και γλουταμίνης σε εμβρυικά κύτταρα πτηνών [Rajendra et al., 2004]. Οι συγγραφείς αυτοί θεωρούν ότι το ένζυμο β-υδρολάση της ντοπαμίνης εξαιτίας της περιεκτικότητας δύο ατόμων χαλκού (με παραμαγνητική συμπεριφορά) ίσως να είναι ο διαμεσολαβητής της σύζευξης H/M πεδίου και κυττάρου.

Η δράση ηλεκτρικού πεδίου πάνω σε κυτταρική επιφάνεια είναι ικανή να επιφέρει αλλαγές στα επιφανειακά φορτία, να μεταβάλλει το σχήμα της και να επηρεάσει τον υποκείμενο κυτταροσκελετό σύμφωνα με τους Peskin et al., 1993. Η σύζευξη ηλεκτρικών στοιχείων στην επιφάνεια του κυττάρου μπορεί να περιγραφεί και με τις δυνάμεις Coulomb. Παράδειγμα η είσοδος μιας μονομερούς ακτίνης ανάμεσα στην κυτταρική μεμβράνη και τον κυτταροσκελετό εκτελείται με άσκηση της δύναμης Coulomb. Εάν η δύναμη Coulomb είναι αρκετή να μετακινήσει μια μονομερή ακτίνη ανάμεσα στην κυτταρική μεμβράνη και στον κυτταροσκελετό, ως επακόλουθο τροποποιείται και το κυτταρικό σχήμα. Αυτές οι αλλαγές αλλοιώνουν τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και οδηγούν σε ενδοκυτταρική σηματοδότηση.

Επίσης προτάθηκε ότι κάποιοι υποδοχείς ή κάποια είδη «κεραιών» της κυτταρικής επιφάνειας λόγω του μήκους των κινούμενων μερών τους, όπου διαθέτουν φορτία στην άκρη τους, καταφέρνουν να συντονιστούν με ποικίλα μήκη συχνοτήτων H/M πεδίου (Εικόνα 1.4). Αυτή η προκαλούμενη κίνηση φορτίων στη μεμβράνη είναι ικανή να ενεργοποιήσει σηματοδοτικά μονοπάτια [Fitzsimmons and Baylink, 1994]. Παράδειγμα, ηλεκτρικό πεδίο ισχύος 0,01 mV/cm είναι ικανό να παράγει ποσότητα φορτίου (πυκνότητας ηλεκτρικού φορτίου 1-10 μ C/m²) ικανής να ενεργοποιήσει το κύτταρο.



Εικόνα 1.4: Συντονισμός του κινούμενου φορτισμένου μέρους ενός βιομορίου (παράδειγμα υποδοχέα) με ημιτονοειδή ηλεκτρομαγνητικά σήματα. (πηγή : Funk and Monsees, 2006)

Από την άλλη πλευρά οι μηχανισμοί που μπορούν να επέμβουν στα ηλεκτρικά φορτία της μεμβράνης δεν είναι δυνατόν να αλλάξουν το «κλασικό» μεμβρανικό δυναμικό. Η διαμόρφωσή του οφείλεται στη συγκέντρωση ιοντικών σωματιδίων επακόλουθο της δράσης διαφόρων ATPασων, πρωτεϊνών-μεταφορέων και ιοντικών διαύλων. Εξωκυτταρικό ηλεκτρικό πεδίο ισχύος 0,01 mV/cm προκαλεί 10nV αλλαγή μεμβρανικού δυναμικού, όμως για να καταφέρει αντίδραση του κυττάρου χρειάζεται τουλάχιστον 100 μ V αλλαγή δυναμικού. Επιπλέον, ένας παραγόμενος θόρυβος (θερμικός) των 100 μ V θα κάλυπτε άνετα το ηλεκτρικό σήμα [Otter, 1998]. Το πρόβλημα του θερμικού θορύβου μπορεί να ξεπεραστεί με μια θεωρητική προσέγγιση των Kruglikov και Dertinger, τον αποκαλούμενο στοχαστικό συντονισμό (Stochastic Resonance), [Kruglikov and Dertinger, 1995]. Σύμφωνα με αυτό το φαινόμενο τα αδύναμα σήματα μπορούν να ενισχυθούν πάνω από 1000 φορές για βελτίωση της ευαισθησίας χρησιμοποιώντας «έμφυτο» θόρυβο.

1.6. Μηχανισμοί δράσης του ηλεκτρομαγνητικού (H/M) πεδίου σε μοριακό επίπεδο

Αυτό που έχει διαπιστωθεί από πειραματικές έρευνες είναι ότι σε πολύ χαμηλά επίπεδα ενέργειας μαγνητικού πεδίου συμβαίνουν συγκεκριμένες βιολογικές αλλαγές. Οι φυσιολογικές βιολογικές λειτουργίες παρατηρείται ότι διεγείρονται σε συγκεκριμένα «παράθυρα» του μαγνητικού πεδίου, όπως για παράδειγμα σε πολύ χαμηλές τιμές μαγνητικής επαγωγής (≤ 1 Gs) και σε συχνότητες (8-10Hz) [Gartzke and Lange, 2002]. Το γεγονός αυτό φανερώνει ότι οι φυσιολογικές λειτουργίες ενεργοποιούνται κάτω από μεταφορά ορισμένων ποσών ενέργειας. Πολλά πειράματα σε απομονωμένα συστήματα κυττάρων απέδωσαν ως τον πρώτο στόχο του H/M πεδίου το σηματοδοτικό μονοπάτι του Ca^{2+} [Carson et al., 1990, Walleczek and Liburdy, 1990, Liburdy et al., 1993, Fitzsimmons et al., 1994, Barbier et al., 1996, Pessina et al., 2001]. Εναλλασσόμενο μαγνητικό πεδίο αυξάνει τα επίπεδα του Ca^{2+} στα περισσότερα είδη κυττάρων [Garson et al., 1990, Lyle et al., 1991, Lindstrom et al., 1993, 1995, Pessina et al., 2001]. Επίσης το μαγνητικό πεδίο είχε την ικανότητα να αναστείλει την σηματοδότηση του Ca^{2+} , αυτό συνοδεύονταν με καθυστέρηση της μεταβολικής δραστηριότητας και παρεμπόδιση του δυναμικού δράσης [Sabo et al., 2002].

Πολλοί ερευνητές υποστηρίζουν δύο μοντέλα που καθιστούν τα H/M πεδία ως ένα είδος ρυθμιστών της μοριακής πληροφορίας. Τα δύο αυτά μοντέλα σχετίζονται με τη ζεύξη του Ca^{2+} και του μαγνητικού πεδίου: το μοντέλο ιοντικού παραμετρικού συντονισμού (ion parametric resonance model) [Lednev, 1999] και το μοντέλο ιοντικής παρεμβολής (ion interference model) [Binhi, 1997].

Το μοντέλο του Lednev στηρίζεται στο φαινόμενο του Zeeman σύμφωνα με το οποίο, το στατικό μαγνητικό πεδίο καταφέρνει να «παρασύρει» σταθερά προσδεδεμένα ιόντα βιομορίων. Κάτω από συγκεκριμένες παραμέτρους του μαγνητικού πεδίου οι δίοδοι ιόντων επιτρέπουν την ανεμπόδιση μετακίνηση σωματιδίων, όπως για παράδειγμα τους υποδοχείς ακετυλοχολίνης. Τα περισσότερα στοιχεία υποδεικνύουν το εξαιρετικά ασθενές H/M πεδίο (ELF EMF) υπεύθυνο για την κινητικότητα του Ca^{2+} και άλλων κατιόντων προσδεδεμένων σε βιομόρια.

Το δεύτερο μοντέλο, του Binhi, βασίζεται στην ικανότητα των προσδεδεμένων Ca^{2+} να αντιλαμβάνονται τα μη γραμμικά ποσά ενέργειας. Παράδειγμα, χάρη στο εξωγενές εξαιρετικά ασθενές H/M πεδίο (ELF EMF) (10-100Hz) σε επιδερμικούς ινοβλάστες, τα ιόντα των πρωτεϊνών του υποστρώματος αντιλαμβάνονται την ύπαρξη ηλεκτρικών στοιχείων ακόμα και ισχύος 0,01mV/cm που παράγεται από το πολικό δεσμό των ηλεκτρονικών στιβάδων του ατόμου. Αποδεικνύεται έτσι ότι τα ηλεκτρικά στοιχεία μπορούν και επηρεάζουν την ιοντική κατάσταση ενέργειας [Binhi and Goldman, 2000].

Και τα δύο μοντέλα δουλεύουν με την κυκλοτρονική συχνότητα (cyclotron frequency) που καταφέρνει να επιταχύνει ιόντα, παράδειγμα σαν το Ca^{2+} σε καμπυλωτή πορεία. Τα κινούμενα ιόντα σ' ένα συνεχές μαγνητικό πεδίο, τείνουν να επιταχυνθούν λόγω της δύναμης που ασκείται (δύναμη Lorentz) και έτσι να ενισχυθεί το ενεργειακό τους επίπεδο. Η ενίσχυση αυτή είναι ανάλογη του φορτίου/μάζας και της μαγνητικής συχνότητας του πεδίου. Για ιόντα όπως το Ca^{2+} η συχνότητα που απαιτείται κυμαίνεται μεταξύ 10 και 100Hz [Liboff, 1985].

Είναι σημαντικό να ληφθεί υπόψη ότι η ενέργεια του προσδεδεμένου Ca^{2+} στα οργανικά μόρια υπερέχει του επιπέδου ενέργειας του εξαιρετικά ασθενές H/M πεδίου (ELF EMF). Άρα μεταφορά ενέργειας με κυκλοτρονικό συντονισμό σε μεγαλύτερα βιομόρια είναι δύσκολο να περιγραφεί. Ο Gartzke και ο Lange [2002] για να κλείσουν αυτό το κενό, πρότειναν ότι ομαδοποιημένα ιόντα Ca^{2+} μπορούν μέσω αγωγιμότητας να μεταφερθούν από τα μικρονηματία της ακτίνης στις μικρολάχνες. Κάθε αρνητικά φορτισμένο μικρονημάτιο ακτίνης στις μικρολάχνες έχει 5-6 θέσεις πρόσδεσης για κατιόντα, ιδιαίτερα για τα ιόντα του

Ca^{2+} και Mg^{2+} . Η ακτίνη από τη μια πλευρά παίζει κεντρικό ρόλο στη σηματοδότηση του Ca^{2+} και από την άλλη χάρη στην πολυηλεκτρική φύση της μπορεί να διευκολύνει τη μεταφορά ιόντων. Επομένως η ακτίνη των μικρολαχνών επιτρέπει την είσοδο νεφών Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα μέσα από συγκεκριμένους οδούς μετάβασης. Η ταυτόχρονη μετακίνηση νεφών ιόντων στην ίδια κατεύθυνση υπερβαίνει το επίπεδο θερμικού θορύβου, επομένως το μαγνητικό πεδίο μπορεί να μετακινήσει ομάδες ιόντων και να ενεργοποιηθεί σηματοδοτικά μονοπάτια. Οι μικρολάχνες καθώς και οργανίδια με παρόμοιες δομές όπως τα ποδοσωμάτια, μπορεί να είναι ένα είδος δέκτη ηλεκτρικών σημάτων του H/M πεδίου.

Παρά ταύτα, τα προτεινόμενα μοντέλα των Gartzke και Lange καθώς και τα μοντέλα που βασίζονται στην κυκλοτρονική συχνότητα δεν έχουν ακόμα αποδειχθεί σε ζωντανά κύτταρα.

Οι Fecko et al., [2003] διαπίστωσαν ότι αφού τα πρωτόνια και τα ηλεκτρόνια στο μόριο νερού έχουν σπασμωδική κίνηση (nanometers/picosecond) μπορούν να μετακινούνται το ίδιο και μέσα στους δεσμούς υδρογόνου των πρωτεϊνικών βιομορίων. Επιπλέον οι ομοιοπολικοί δεσμοί σύμφωνα με τους Wenger et al., [2005] λειτουργούν και ως μονοπάτια μεταφοράς ενέργειας. Εδώ έρχεται να προστεθεί και ένα μοντέλο του Blank [2005] που πρότείνει ότι τα ηλεκτρόνια είναι τα κινούμενα φορτία που επηρεάζουν τον ρυθμό ενζυμικών αντιδράσεων. Έτσι εφόσον το H/M πεδίο έχει τη δυνατότητα να στοχεύει σε κρίσιμες βιολογικές παραμέτρους μπορεί να επιταχύνει δυναμικά βιοχημικά συστήματα ή ενζυμικές δραστηριότητες όπως την κυτοχρωμική οξειδάση [Black and Soo, 2003] ή την Na/K-ATPάση [Yoda et al., 1984, Blank, 2005].

Αυτή η άποψη μπορεί να εξηγήσει και γιατί ενώ ένα μεγάλο στατικό μαγνητικό πεδίο δεν επηρεάζει ένζυμα όπως το Na/K-ATPάσης, ενώ το εξαιρετικά ασθενές H/M πεδίο (ELF EMF) μπορεί. Στο εξαιρετικά ασθενές H/M πεδίο (ELF EMF) τα ηλεκτρόνια κινούνται με ταχύτητα 1000m/s και μετακινούνται περίπου 1nm/ps. Αυτή η απόσταση είναι μικρότερη από το πάχος της μεμβράνης όχι όμως των πρωτεϊνών. Κατά συνέπεια το εξαιρετικά ασθενές H/M πεδίο (ELF EMF) διεισδύει στις πρωτεΐνες αλλά δεν μπορεί να τις διαπεράσει, ενώ αντιθέτως το στατικό μαγνητικό πεδίο τις διαπερνά και αλληλεπιδρά με τα κινούμενα ηλεκτρόνια εσωτερικά της μεμβράνης. Από την άλλη πλευρά το ηλεκτρικό πεδίο δεν καταφέρνει να εισχωρήσει στις πρωτεΐνες αλλά μπορεί να αλλάζει την ιοντική κατανομή, επιφανειακά της μεμβράνης. Η διαφορετική αυτή δράση του ηλεκτρικού πεδίου προκαλεί και διαφορετικές αντιδράσεις των ενζύμων της κυτταρικής μεμβράνης από ό,τι το μαγνητικό [Blank, 2005].

1.7. Πώς τα κύτταρα αντιδρούν σε ορατό ηλεκτρομαγνητικό (H/M) φάσμα

Το αποτέλεσμα επίδρασης ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων σε μήκη ορατής ακτινοβολίας πάνω σε βιοσυστήματα είναι πιο αποδεκτό από τους επιστήμονες, εφόσον η ποσότητα ενέργειας που μεταφέρεται είναι σε υψηλότερα επίπεδα από τον θερμικό θόρυβο. Ένα κρίσιμο σημείο για τους μοριακούς βιολόγους είναι να καταλάβουν πώς μερικά έως και δεκάδες φωτόνια ορατού πεδίου μπορούν να αλληλεπιδράσουν με σηματοδοτικά μονοπάτια. Ο Gurmitsch [1959] υποστήριξε ότι μόνο τα συστήματα σε κατάσταση μη ισορροπίας ευαισθητοποιούνται με μικρά ποσά ενέργειας, πράγμα το οποίο συμφωνεί με τις φυσικές ιδιότητες των ζωντανών συστημάτων που βρίσκονται σε μη ισορροπημένη θερμοδυναμική κατάσταση.

Ο Karu [1999] περιέγραψε την ιδιότητα του ενζύμου κυτοχρωμική οξειδάση να λειτουργεί ως «φωτο-υποδοχέας» στα ευκαρυωτικά κύτταρα μετά από έκθεση μονοχρωματικού κόκκινου έως και (IR) υπέρυθρου μήκους κύματος. Επίσης οι Albrecht-Buehler [2010] πρότειναν ότι οι κεντρίολοι των κυττάρων είναι ικανοί να «βλέπουν» την ακτινοβολία κοντά στο υπέρυθρο μήκος κύματος (infra-red). Αυτό οφείλεται στην ειδικά

κάθετα διαμορφωμένη δομή τους που κάνει αυτά τα οργανίδια τα «μάτια» των κυττάρων. Οι Gao et al., [2009] εξήγησαν με μοριακή προσέγγιση πώς η χαμηλής έντασης ακτινοβολία laser επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων μέσω ενεργοποίησης της μιτοχονδριακής αναπνοής και της κυτταρικής σηματοδότησης.

Η Cosic [1997] με μια φυσικομαθηματική προσέγγιση μέσω του μοντέλου Resonant Recognition Model (RRM) συσχέτισε τις προτιμήσεις των πρωτεϊνών να αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένους στόχους μέσω των ηλεκτρομαγνητικών ποσών ενέργειας που εκπέμπονται ή απορροφώνται κατά την αλληλεπίδραση τους. Θεώρησε τα πρωτεϊνικά μόρια ικανά να επιλέγουν στόχους μέσω των ηλεκτρομαγνητικών αλληλεπιδράσεων τους στο ορατό και υπέρυθρο φάσμα.

1.8. Κυτταρική αντίδραση σε μη ορατό ηλεκτρομαγνητικό (H/M) φάσμα

Τα περισσότερα από τα μοντέλα που έχουν προταθεί από τους ερευνητές θεωρούν ότι ο στόχος του H/M πεδίου είναι ένα υποκυτταρικό οργανίδιο ή ένα απλό βιομόριο. Το κυριότερο πρόβλημα είναι να εξηγηθεί πώς η απορρόφηση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας μπορεί να επηρεάσει τα βιοσυστήματα με μηχανισμούς ανεξάρτητους από το θερμικό αποτέλεσμα, καθώς ποσά ενέργειας H/M πεδίου με συχνότητα χαμηλότερη από μερικά THz είναι μικρότερα από τον μέσο θερμικό θόρυβο. Ο θερμικός θόρυβος έχει μια μέση ενέργεια kt (σε θερμοκρασία δωματίου 20 °C, η kt αντιστοιχεί σε 26 meV, όπου είναι η ενέργεια ενός ποσού ενέργειας H/M πεδίου με συχνότητα 6,2 THz και μήκος κύματος 48 μm στο κενό).

Ο Binhi και ο Rubin [2007] προσπάθησαν να εξηγήσουν ότι ο περιορισμός της μέσης ενέργειας kt βασίζεται σε στατιστική φυσική και εφαρμόζεται σε συστήματα κοντά στη θερμική ισορροπία. Σε αυτά τα συστήματα η χαμηλή ένταση και συχνότητα H/M πεδίου δεν μπορεί να αλλάξει τη μέση ενέργεια της κυτταρικής δομής δηλαδή την ενέργεια ταλάντωσης των μορίων που είναι αποθηκευμένη στον βαθμό ελευθερίας. Ο βαθμός ελευθερίας χαρακτηρίζει τον τρόπο που ένα μόριο ή δομή μπορεί να μετακινηθεί, να περιστραφεί ή να δονηθεί. Η ενέργεια που απορροφάται από ένα βαθμό ελευθερίας ενός μορίου μετά από έκθεση H/M πεδίου σε συγκεκριμένη συχνότητα δεν μπορεί να αποθηκευτεί εάν ο βαθμός ελευθερίας είναι συζευγμένος με άλλους βαθμούς όπως σε θερμικά ισορροπημένα συστήματα. Σε αυτή την περίπτωση η ενέργεια που αντιστοιχεί σε αυτήν τη συχνότητα θα αναδιανεμηθεί σε άλλους βαθμούς ελευθερίας και θα χαθεί. Όμως τα βιολογικά συστήματα δεν είναι θερμικά ισορροπημένα. Στην πραγματικότητα είναι θερμοδυναμικώς μακριά από κατάσταση ισορροπίας και κάποιοι από τους βαθμούς ελευθερίας τους είναι αδύναμα συνδεδεμένοι με άλλους ή με το θερμικό περιβάλλον τους. Έτσι ο χρόνος που χρειάζεται η ενέργεια για να αναδιανεμηθεί σε άλλους βαθμούς ελευθερίας και να χαθεί μπορεί να είναι σημαντικά μεγαλύτερος στα μη θερμοδυναμικά ισορροπημένα από τα συστήματα θερμικής ισορροπίας. Πράγματι αυτός ο χρόνος σε μερικά συστήματα μπορεί να είναι μεγαλύτερος και από τη διάρκεια ζωής τους. Συνεπώς δε συνιστά έκπληξη ότι το H/M πεδίο μπορεί να επιφέρει μια σημαντική αλλαγή στην ενέργεια κάποιων βαθμών ελευθερίας πριν την αναδιανομή ή την εξαφάνισή της. Συγκεκριμένα ο Binhi έδειξε ότι ο ηλεκτρομαγνητισμός μπορεί να επιδράσει με παραμαγνητικά νανοσωματίδια αρκετών κυττάρων, από κύτταρα βακτηρίων μέχρι και ανθρώπινα κύτταρα. Για παράδειγμα, τα μεγάλης διάρκειας περιστρεφόμενα μόρια μέσα σε πρωτεΐνες ή τα πρωτόνια με μαγνητική «συμπεριφορά» σε υδατικό περιβάλλον, αποτελούν κάποιους πιθανούς στόχους του μαγνητικού πεδίου.

Από πλευράς μηχανικής, το ακτινοβολούμενο μήκος κύματος θεωρείται να περιέχει τεράστια ποσότητα ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας ώστε να απορροφηθεί από τις «κεραίες» του κυττάρου (τα μοριακά δίπολα).

Παρ' όλο αυτά σύμφωνα με τον Adair [2002] το μεταφερόμενο ποσό ενέργειας σε κυτταρικές δομές μπορεί να μεγεθύνει, εάν υπάρχει κάποιο είδος συντονισμού του H/M πεδίου με τις δονούμενες δομές του κυττάρου. Είναι όμως δυνατόν οι δονήσεις να κρατούν μακροπρόθεσμα μέσα σε παχύρρευστα μέσα όπως το κυτταρόπλασμα;

Οι Preparata et al. [1995], σύμφωνα με την κβαντική ηλεκτροδυναμική θεωρία (Quantum Electrodynamical Theory) υποστήριξαν ότι ο υδάτινος χώρος αυτο-οργανώνεται από ξεχωριστές περιοχές που η καθεμία διατηρεί τη συνοχή της (coherent domains) και από τις περιοχές (incoherent domains) που βρίσκονται ενδιάμεσα των συναφών περιοχών. Επιστήμονες παρατήρησαν ότι σε επίδραση μαγνητικών πεδίων χαμηλών συχνοτήτων έχουν παρατηρηθεί μεγάλου βαθμού συντονιστικά φαινόμενα στις υδάτινες περιοχές που περικλείουν βιομόρια λόγω μη απόσβεσης της ενέργειας συντονισμού. Τα εξωτερικά εφαρμοζόμενα H/M πεδία βρίσκουν σαν πρωταρχικό τους στόχο την αυτο-οργάνωση των υδάτινων περιοχών και έτσι είναι ικανά να επηρεάσουν και τα ενδιάμεσα βιοστοιχεία. [Smith et al., 1987, Grundler and Kaiser, 1992, Zhadin, 2000, Pazur, 2004, Belyaev, 2005a, Lisi et al., 2006, Foletti et al., 2009]. Η επίδραση αυτή του H/M πεδίου δημιουργεί κινούμενο ρεύμα ιόντων μέσα στα βιοστοιχεία που ξεπερνούν τους περιορισμούς του θερμικού θορύβου. Αυτά τα ρεύματα ιόντων μπορούν να δημιουργούνται από H/M πεδία πολύ χαμηλότερα από το κατώφλι της μέσης ενέργειας κτ.

Μια άλλη θεωρία από τους Tsong et al. [Tsong and Astumian, 1986, Markin and Tsong, 1991a,b, Tsong, 1992] ανέφεραν την ηλεκτροδιαμόρφωση με σύζευξη (electro conformational coupling) για κυτταρικά ενζυμικά συστήματα. Σύμφωνα με αυτήν την θεωρία τα ενζυμικά συστήματα της κυτταρικής μεμβράνης είναι ικανά να λαμβάνουν, να επεξεργάζονται και να μεταδίδουν υψηλά και μέτρια περιοδικά δυναμικά όπως τα ηλεκτρικά. Εάν η συχνότητα και η ένταση του εφαρμοζόμενου πεδίου ταιριάζει με τα χαρακτηριστικά των ενζυμικών συστημάτων, μετατρέπουν την ενέργεια του πεδίου σε δυναμικό χημικής ενέργειας.

Οι Stoykon et al. [2004], με ένα υπολογιστικό μοντέλο εξέτασαν ένα μη θερμικό μηχανισμό του H/M πεδίου πάνω σε κύτταρα, με επικέντρωση στο κυτταρικό διάλυο νατρίου μετά από έκθεση σε μικροκύματα. Συμπέραναν ότι ένα εφαρμοζόμενο H/M πεδίο επηρεάζει τη συχνότητα ροής ιόντων νατρίου. Το 2002 ο Goodman και ο Blanck πρότειναν την ύπαρξη ηλεκτρομεταφοράς στο DNA. Χαμηλής συχνότητας H/M πεδίο (ELF EMF) μπορεί να αλληλεπιδρά άμεσα με ηλεκτρόνια του DNA, το οποίο κατόπιν μεταφράζεται σε πρωτεΐνες.

Αρκετές άλλες θεωρίες έρχονται να υποστηρίξουν ότι τα βιομόρια είτε σε απλή μορφή είτε ως σύμπλεγμα, αποτελούν τη μονάδα «υποδοχής» του H/M πεδίου.

1.9. Παραδείγματα έρευνας

i) Εδώ και πολλά χρόνια το παλμικό ηλεκτρομαγνητικό πεδίο (PEMF) εφαρμόζεται ως μέσο θεραπείας καταγμάτων και επιβράδυνσης της οστεοπόρωσης. Ο σκοπός μελέτης των Sun et al. [2005] ήταν να διερευνήσουν τη δράση του ηλεκτρομαγνητισμού πάνω σε μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα από μυελό των οστών (Hunan Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells-BMMSCs). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις των 1000 κυττάρων/cm² και 3000 κυττάρων/cm². Το παλμικό ηλεκτρομαγνητικό πεδίο παρείχε διέγερση επί οχτώ ώρες κάθε μέρα μέσω μιας συσκευής (EBI, L.P., Parsippany, NJ) όπου κάθε burst διάρκειας 4,5ms παρείχε 20 παλμούς των 15Hz. Μετά από 24h το ποσοστό βιωσιμότητας των κυττάρων ανήλθε στο 59% στα δείγματα με συγκέντρωση 1000 κύτταρα/cm² και

στο 40% στα δείγματα με συγκέντρωση 3000 κύτταρα/cm². Υψηλότερος κυτταρικός πολλαπλασιασμός διαπιστώθηκε κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης (20-60%), χωρίς να επηρεαστεί σημαντικά ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης. Πολλά νέα διαιρούμενα κύτταρα με αύξηση της κυτταρικής πυκνότητας εμφανίζονταν 12h-16h μετά την έκθεση του παλμικού ηλεκτρομαγνητικού πεδίου (PEMF). Το συμπέρασμα ήταν ότι ίσως αυτό να οφειλόταν στη μείωση της διάρκειας της φάσης υστέρησης και σε χειραγώγηση του κυτταρικού κύκλου. Όσον αφορά τη διαφοροποίηση τους δεν υπήρξε εμφανής διαφορά σε σχέση με τα δείγματα του μάρτυρα.

ii) Σε μια προσπάθεια ανάδειξης των ευεργετικών θεραπευτικών ιδιοτήτων του μαγνητικού πεδίου οι J. Schimmelpfeng et al. [2005] μελέτησαν την ανάπτυξη νευρικών απολήξεων PC -12 κυττάρων σε συνδυασμό με παράγοντα ανάπτυξης. Κύτταρα από φαιοχρωμοκύττωμα επινεφριδίων αρουραίου (PC -12) καλλιεργήθηκαν μαζί με παράγοντα ανάπτυξης (με την ίδια διαδικασία προετοιμασίας των Blackman et al., 1993). Τα κύτταρα εκτέθηκαν επί οχτώ ώρες για συνολικά έξι ημέρες σε μαγνητικό πεδίο με ημιτονοειδή κυματομορφή 100μT_{rms} /50Hz. Μετά την έλευση του χρονικού διαστήματος μελέτης, δεν κατάφεραν να παρατηρήσουν κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στην ανάπτυξη των νευρικών απολήξεων. Μόνο μια μικρή επιβράδυνση παρατηρήθηκε στην ανάπτυξη των νευρικών απολήξεων σε περιοχή των δειγμάτων που είχαν κατά 10% μειωμένη κάλυψη του πεδίου έκθεσης σε σχέση με τις υπόλοιπες επιφάνειες που υφίστανταν πλήρη έκθεση. Σαν συμπέρασμα έθεσαν ότι ίσως τα νευρικά κύτταρα κατά το πρώιμο στάδιο ανάπτυξης να ελέγχονται από το ενδογενές διαεπιθηλιακό δυναμικό και να επηρεάζονται από διαφορετικές συχνότητες και εντάσεις του H/M πεδίου. Επιπλέον ίσως κάποιες άγνωστες βιοχημικές παράμετροι του μικροπεριβάλλοντος των κυττάρων να επηρέασαν τα αποτελέσματα.

iii) Σε μελέτη των Tonini et al. [2001] πάνω σε κύτταρα νευρικού γλοιοβλαστώματος (NG108-15), μετά από έκθεση μαγνητικού πεδίου 50Hz από συσκευή με πηνία Helmholtz έδειξε ότι α) το ELF EMF διαταράσσει τη δράση πολλών παραγόντων διαφοροποίησης, β) διευκολύνει την αλληλεπίδραση του La³⁺ και Mn²⁺ με την κυτταρική μεμβράνη, γ) διαμορφώνει τον ενδοκυτταρικό μηχανισμό Ca²⁺.

Θεώρησαν ότι μία από τις επιδράσεις του μαγνητικού πεδίου σχετίζεται στο να αποσταθεροποιεί τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαφοροποίησης αλλά και να επιδρά σε μόρια νερού. Διαπίστωσαν ότι ένα μαγνητικό πεδίο 50/60 Hz επεμβαίνει στην κυτταρική διαφοροποίηση με δύο αντίθετους μηχανισμούς. Το ELF EMF είναι ικανό να εμποδίσει παράγοντες διαφοροποίησης με μπλοκάρισμα της μετατόπισης επιφανειακών φορτίων, ενώ ταυτόχρονα να αυξήσει το ενδοκυτταρικό Ca²⁺ μέσω διαύλων K/Ca, και κατά αυτόν τον τρόπο να επανασταθεροποιηθεί ο μηχανισμός διαφοροποίησης. Ανέφεραν ότι το αποτέλεσμα με τους δύο ταυτόχρονους αντίθετους μηχανισμούς ίσως να οφείλεται σε κάποια ιδιαιτερότητα των κυττάρων NG108-15 που μελετήθηκαν.

Ποικίλα στοιχεία ερευνών συνηγορούν στην επίδραση του μαγνητικού πεδίου με τους μεμβρανικούς διαύλους με τα πιο εμφανή αποτελέσματα την κινητικότητα του ενδοκυτταρικού Ca²⁺ και τις περιστασιακά μορφολογικές διαφορές τους [Liburdy et al., 1993, Karabakhtsian et al., 1994, Barbier et al., 1996, Loscher and Liburdy, 1998]. Παρ' όλα αυτά η ακριβής δράση του μαγνητικού πεδίου πάνω στη ρύθμιση του Ca²⁺ είναι ελάχιστα κατανοητή από τους επιστήμονες. Πολλές αναφορές κάνουν λόγο ότι το ELF EMF αυξάνει τη ροή διέλευσης του Ca²⁺ στην κυτταρική μεμβράνη χωρίς να επηρεάζει την ενδοκυτταρική αποθήκευση του [Liburdy, 1992, Karabakhtsian et al., 1994, Fanelli et al., 1999].

iv) Οι Yano et al. [2004] προσπάθησαν να ερευνήσουν αν υπάρχει επίδραση από εξαιρετικά χαμηλής συχνότητας μαγνητικό πεδίο (ELF MF) στον ρυθμό αφομοίωσης CO₂ και στους πρώιμους παράγοντες ανάπτυξης βλαστών ραπανιού (*Raphanus sativus* L). Αμέσως μετά τη φύτευση οι βλαστοί από ραπανάκι

εκτέθηκαν σε 60Hz με $50\mu T_{rms}$ ημιτονοειδή κυματομορφή μαγνητικού πεδίου, και σε 48μT στατικό μαγνητικό πεδίο επί έξι και δεκαπέντε μέρες. Από την πέμπτη μέρα και μετά ο ρυθμός αφομοίωσης CO₂ ήταν χαμηλότερος στα εκτεθειμένα δείγματα σε σχέση με τους μάρτυρες. Το ξηρό βάρος και η περιοχή του κοτηλήδονα την έκτη μέρα καθώς και το ξηρό και νωπό βάρος και η περιοχή του φυλλώματος τη δέκατη πέμπτη μέρα ήταν σημαντικά μικρότερα συγκριτικά με τους μάρτυρες. Σε μια επόμενη προσπάθεια έρευνας, βλαστοί από ραπανάκι μεγάλωσαν για 14 μέρες χωρίς έκθεση μαγνητικού πεδίου. Μετά τη δέκατη τέταρτη μέρα εκτέθηκαν στο ίδιο ELF μαγνητικό πεδίο επί 2 ώρες. Αυτή τη φορά δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στον ρυθμό αφομοίωσης CO₂ σε σχέση με τους μάρτυρες. Αν και δεν έχουν διευκρινιστεί ακόμα οι βιοχημικοί και βιοφυσικοί μηχανισμοί δράσης του ELF EMF, κάποιες θεωρητικές απόψεις υποστηρίζουν ότι εάν το ELF EMF αλλάζει τα επίπεδα ενέργειας του Mg²⁺ κατά τη σύνθεση χλωροφύλλης θα αλλάζει και ο φωτοσυνθετικός ρυθμός.

ν) Τα μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMC) παραμένουν μία από τις καλύτερες επιλογές για *in vitro* μελέτες του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι Stankiewicz et al. [2006] απομόνωσαν ανθρώπινα κύτταρα PBMC για μικροκαλλιέργεια. Κάποια από τα δείγματα εμπλουτίστηκαν με παράγοντα ανάπτυξης φυτοαιματογλουτινίνη (PHA, HA160,4μg/cult.) και κονκαναβαλίνη (Con a, Sigma, 8μg/cult). Σε κατάλληλα διαμορφωμένο επωαστικό θάλαμο οι υπό μελέτη καλλιέργειες εκτέθηκαν κάθε αρχή από τις συνολικά τρεις ημέρες σε ηλεκτρομαγνητικά μικροκύματα (900MHz, 27V/m, SAR 0,024W/kg) επί δεκαπέντε λεπτά. Η συγκεκριμένη επιλογή της χρονικής διάρκειας έκθεσης κάλυψε τις κύριες μεταβολικές δραστηριότητες του κυτταρικού κύκλου (G1, S, G2 φάσεις και μίτωση). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μεταβολική δραστηριότητα των λεμφοκυττάρων και των μονοκυττάρων αυξήθηκε περίπου 20% μετά από έκθεση μικροκυμάτων των 900MHz. Από την άλλη πλευρά, πειραματικές προσπάθειες με μια συνεχή εικοσιτετράωρη έκθεση (24h) [Scarfi et al., 2006] στο ίδιο μήκος κύματος και με τους ίδιους κυτταρικούς πληθυσμούς δεν κατέδειξαν κάποια επίδραση των ραδιοσυχνοτήτων πάνω στη μεταβολική δραστηριότητα.

1.10. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός και διαφοροποίηση

Το Η/Μ πεδίο μπορεί να επηρεάσει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση κυττάρων επηρεάζοντας την έκφραση των αντίστοιχων υπεύθυνων γονιδίων και πρωτεϊνών. Έχει παρατηρηθεί ότι εξωγενές Η/Μ πεδίο μπορεί να καταστείλει ή να διεγείρει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Εξαιρετικά χαμηλής συχνότητας μαγνητικό πεδίο μπορεί να διαφοροποιήσει τα βλαστικά εμβρυϊκά κύτταρα σε μυοκαρδικά υποκινώντας γονίδια που προάγουν την καρδιακή έκφραση [Ventura et al., 2005]. Αντιθέτως στατικό ηλεκτρικό πεδίο (DC EL), (2V/cm) παρεμποδίζει τον πολλαπλασιασμό αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων ή επιθηλιακών κυττάρων κερατοειδούς εμποδίζοντας την G1/S φάση [Wang et al., 2003, 2005]. Και στους δύο τύπους κυττάρων το συνεχές ρεύμα μειώνει σημαντικά την έκφραση της κυκλίνης E, ενώ τα επίπεδα του αναστολέα συμπλόκου E/Cdk2, p27kip1, αυξάνονται. Επιπλέον η εξωκυττάρια δραστηριότητα της κινάσης 1 και 2 αυξάνεται, με ασύμμετρη κατανομή [Song et al., 2002].

1.11. Συσκευές παραγωγής ηλεκτρομαγνητικού (Η/Μ) πεδίου σε *in vitro* μελέτες

Έως σήμερα έχουν περιγραφεί πολλά είδη συσκευών παραγωγής Η/Μ πεδίου για *in vitro* μελέτες. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα συστήματα αφορούν κυκλικούς ή πολυγωνικούς βρόγχους αγωγών σε κυκλική συσπείρωση. Εφαρμόζοντας Η/Μ πεδίο κάποιοι καθοριστικοί παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η

ατμόσφαιρα, το επίπεδο φωτός και οι δονήσεις από τη συσκευή προέλευσης πεδίου μπορούν να επηρεάσουν τα αποτελέσματα. Κατά το σχεδιασμό ενός πειράματος το πεδίο εκπομπής πρέπει να είναι καλά μελετημένο και η συσκευή δεν πρέπει να ασκεί επιπλέον επιρροή στα κύτταρα. Εκτεταμένα έχει χρησιμοποιηθεί το ζεύγος πηνίων Helmholtz, ειδικά σε μελέτες γονιδιακής μεταγραφής [Rao and Kisaalita, 2004].



Εικόνα 1.1: Συσκευή με πηνία Helmholtz για *in vitro* μελέτες (πηγή : <http://www.directvacuum.com/>)

Έως τώρα έχουν δοκιμαστεί τρεις διαφορετικές εκδοχές μεθόδων παραγωγής H/M πεδίου *in vivo* και *in vitro*. Η μέθοδος με εφαρμογή συνεχούς ρεύματος (direct current), η μέθοδος με χωρητική σύζευξη (capacitive coupling) και η μέθοδος με επαγωγική σύζευξη (inductive coupling).

Η πρώτη μέθοδος (direct current) χρησιμοποιεί βιοσυμβατά ηλεκτρόδια που ενώνονται απευθείας με τον ιστό ή τα κύτταρα. Το ηλεκτρικό πεδίο είναι υψηλά εστιαζόμενο σε συγκεκριμένο σημείο και η ένταση του εξαρτάται από την απόσταση της άκρης του ηλεκτροδίου με τον ιστό. Σε γενικές γραμμές η τάση κυμαίνεται από 1-1,5V και το ρεύμα 5-20μΑ. Μειονεκτήματα της μεθόδου είναι η συγκέντρωση πρωτεϊνών στα ηλεκτρόδια, γεγονός που μειώνει τη δύναμη της ηλεκτρικής διέγερσης. Επίσης για να αφαιρεθούν τα ηλεκτρόδια απαιτείται επιπλέον παρέμβαση. Σε *in vitro* μελέτες επιτυγχάνεται καλός έλεγχος της έντασης του εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου. Από την άλλη μεριά οι βιοχημικές αντιδράσεις όπως η παραγωγή ριζών υδροξυλίου ή η ηλεκτρόλυση μπορεί να δυσκολέψει την εξαγωγή «καθαρών» μετρήσεων του ηλεκτρικού πεδίου.

Σύμφωνα με τη δεύτερη μέθοδο (capacitive coupling) δύο πολύ λεπτά ηλεκτρόδια είναι τοποθετημένα έτσι ώστε να λειτουργούν σαν πλάκες «πυκνωτή». Ανάμεσα τους περιβάλλεται ο ιστός ή τα κύτταρα. Ο βιολογικός ιστός και τα ηλεκτρόδια είναι μεταξύ τους ηλεκτρικά μονωμένα. Το δημιουργούμενο ηλεκτρικό πεδίο είναι δύσκολο διαχειρίσιμο αφού εξαρτάται από τις ιδιότητες του βιολογικού υλικού. Η χρήση αυτής της τεχνικής είναι κλινικά περιορισμένη, λόγω ότι απαιτείται μεγαλύτερη τάση αφού το άνοιγμα στον «πυκνωτή» είναι μεγάλο. Σε *in vitro* περιβάλλον χάρη στη μόνωση ηλεκτροδίων από το μέσο καλλιέργειας, δεν λαμβάνουν χώρα ηλεκτροχημικές αντιδράσεις όπως στη μέθοδο συνεχούς ρεύματος. Τα μονωμένα ηλεκτρόδια λειτουργούν ως «πυκνωτή» και το μέσο καλλιέργειας ως «αντίσταση». Λόγω της ανατομικής του κατασκευής λειτουργεί ως φίλτρο υψηλής τάσης επιτρέποντας μόνο χαμηλές συχνότητες να διαπερνούν το μέσο καλλιέργειας. Άρα είναι καταλληλότερο για ημιτονοειδή σήματα ή για επαναλαμβανόμενα χαμηλής συχνότητας σήματα.

Η πιο συνηθισμένη μέθοδος εφαρμογής ηλεκτρικού πεδίου *in vivo* και *in vitro* είναι με επαγωγική σύζευξη (inductive coupling). Αποτελείται από ένα πηνίο - αγωγό ηλεκτρικού ρεύματος που παράγει μαγνητικό πεδίο. Μόνο χαμηλού πλάτους ηλεκτρικό σήμα χαμηλής συχνότητας μπορεί να διαπεράσει τους ιστούς ή το

μέσο καλλιέργειας. Τα σήματα μπορεί να έχουν ημιτονοειδή, παλμική μορφή και μορφή burst. Ένα σημαντικό πρόβλημα είναι η συνύπαρξη ηλεκτρικού και μαγνητικού πεδίου που μπορούν να προκαλέσουν διαφορετικές βιολογικές επιδράσεις και το παρατηρούμενο αποτέλεσμα να μην είναι τόσο ξεκάθαρο όσο στο μαγνητικό πεδίο από μόνο του ή στο ηλεκτρικό πεδίο [Hess et al., 2014].

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση της επίδρασης Η/Μ πεδίου, σε κύτταρα νεφρικών ινοβλαστών Vero και νευροβλαστώματος N2a. Η πειραματική συσκευή επαγωγής Η/Μ πεδίου διατέθηκε από το Πανεπιστήμιο Πατρών. Η υπό εξέταση συχνότητα του πεδίου ανήκει στο φάσμα των ραδιοσυχνοτήτων (RF). Έγινε προσπάθεια να εκτιμηθούν οι αντιδράσεις καρκινικών κυττάρων (N2a) και φυσιολογικών (Vero). Οι πειραματικές προσπάθειες περιορίστηκαν στη βιωσιμότητα των κυττάρων, στον μεταβολισμό και στον πολλαπλασιασμό (Vero & N2a).

Η πρώτη μέθοδος τραύματος δι' αμυχής (scratch - wound assay) εφαρμόστηκε σε κύτταρα Vero για έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ή της κυτταρικής μεταναστευτικότητας υπό την επίδραση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Στην επόμενη προσπάθεια τα κυτταρικά δείγματα λειτουργούσαν υπό στρεσογόνα κατάσταση και επαναλήφθηκε η μέθοδος τραύματος δι' αμυχής. Οι επόμενες μετρήσεις με τις δύο μεθόδους MTT και trypan blue εξέτασαν την επιρροή του ηλεκτρομαγνητισμού στη βιωσιμότητα και στον μεταβολισμό και των δύο κυτταρικών πληθυσμών, με αλλαγή κάθε φορά της χρονικής περιόδου έκθεσης και της θέσης της συσκευής. Οι μέθοδοι που χειριστήκαμε αναλύονται στα παρακάτω πειράματα.

3. ΥΛΙΚΑ

3.1. Βιολογικό υλικό

Βιολογικό υλικό από την συλλογή ATCC (American Tissue Culture Collection) - Κυτταροκαλλιέργειες σειρών i) Vero και ii) N2a

- i) Κύτταρα Vero: Αθανатоποιημένοι φυσιολογικοί ινοβλάστες από νεφρό αφρικανικού πράσινου πίθηκου (*Cercopithecus aethiops*).
- ii) Κύτταρα N2a: Καρκινικοί νευροβλάστες από εγκέφαλο ποντικού (*Mus musculus*), Neuro-2a.

3.2. Εργαστηριακά υλικά

- i) Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας MEM Dulbecco's - Culture medium
 - 10% v/v DMEM 10×
 - 10% v/v Foetal Bovine Serum (FBS)
 - 3,7% w/v NaHCO₃
 - 1% v/v L-Alanyl-L-Glutamine
 - 1% v/v Antibiotics
 - 0,5% v/v Sodium Pyruvate
 - 73,8% v/v Deionized Sterile Water
- ii) Θρυσίνη/EDTA (0.02% - 0.05% σε PBS χωρίς Ca²⁺)
- iii) DMSO - Dimethyl sulfoxide : Διμεθυλοσουλφοξειδίο
- iv) Trypan blue 0.4% (w/v) σε PBS
- v) PBS - Phosphate buffered saline: Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών/άλατος
- vi) MTT - Διάλυμα MTT 5 mg/ml (5-dimethyl tetrazolium bromide)
- vii) H₂O₂ - Hydrogen peroxide: Υπεροξειδίο του υδρογόνου

3.3. Εργαστηριακά μηχανήματα και πειραματικός εξοπλισμός

- Θάλαμος νηματικής ροής (LaminAir, Holten, Bioline, για προστασία των υπό εξέταση δειγμάτων από επιμολύνσεις).

- Κλίβανος αποστείρωσης - αυτόκαυστο, για την αποστείρωση υλικών, διαλυμάτων (ανθεκτικών σε υψηλές θερμοκρασίες), εργαλείων και σκευών. Η αποστείρωση γίνεται στους 121 °C, σε πίεση 1,2 Atm.
- Μικροσκόπιο Ορατού Φωτός (AxioLab), για παρατηρήσεις και μετρήσεις ορατού πεδίου.
- Ανάστροφο μικροσκόπιο A. Kruss-MBL3200.
- Φασματοφωτόμετρο Infinite M200PRO.
- Υδατόλουτρο, για τη θέρμανση ή διατήρηση σε συγκεκριμένες τιμές θερμοκρασίας διαλυμάτων.
- Φυγόκεντρος (Heraeus Instruments Biofuge 28RS), για τη φυγοκέντρωση διαλυμάτων και το διαχωρισμό επιθυμητών συστατικών.
- Θάλαμος επώασης (Heat Force Incubator, HF90/HF240), για την επίτευξη της βέλτιστης θερμοκρασίας επώασης των καλλιεργειών. Η επώαση γίνεται στους 37 °C και σε ατμόσφαιρα 5% CO₂.
- Φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας των 75cm².
- Αιμοκυτταρόμετρο της πλάκας Neubauer, για υπολογισμό του αριθμού των κυττάρων.
- Μικροπιπέτες (Labmate HT) και πιπέτες Pasteur, για τη μεταφορά υλικών ακόμα και με πολύ μεγάλη ακρίβεια (έως μl).
- Τρυβλία Petri και πλακίδια Elisa, για τη σωστή αποθήκευση των κυττάρων.
- Eppendorfs, τυπάκια για πιπέτες, φάλκον των 15ml, parafilm, ποτηράκια ζέσεως.
- Ψηφιακή μηχανή SONY, για τη λήψη φωτογραφιών από το οπτικό μικροσκόπιο.
- Συσκευή επαγωγής H/M πεδίου με τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

Συχνότητα:	27,12 MHz
Ποκνότητα Ροής Ισχύος:	72 milliWatts/cm²
Συχνότητα παλμού:	1 KHz
Διάρκεια παλμού:	100 microsecond
Πηγή ενέργειας:	Μπαταρία
Μέγεθος κεραίας:	12cm or 8cm
Περιοχή ισχύος:	100cm² of 70cm²
Βάρος:	8 grams
Διάρκεια ζωής της μπαταρίας:	720 hours on/off capability

4. ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1. Ξεπάγωμα κυττάρων

Οι κυτταρικές σειρές είναι αποθηκευμένες μέσα σε κρυο-φιαλίδια στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ σε ειδικό καταψύκτη φύλαξης κυττάρων. Για να αποψυχθούν τα κρυο-φιαλίδια (cryovial), τα οποία περιέχουν ειδικό μέσο για ξεπάγωμα (freezing solution), τοποθετούνται στο υδατόλουτρο για μερικά λεπτά στους $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Εν συνεχεία, το ευθύς ως άνω διάλυμα, των κυττάρων, εκχύνεται στη φλάσκα καλλιέργειας, ομοιόμορφα, αφού έχει προηγηθεί η προσθήκη του θρεπτικού μέσου των 20ml, DMEM/10% FBS. Η φλάσκα τοποθετείται στον θάλαμο επώασης κυττάρων στους $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ και σε ατμόσφαιρα 5% CO_2 . Η ανάπτυξη τους γίνεται σε μονοστοιβαδικές καλλιέργειες.

Μετά από 24 ώρες απορρίπτεται το παλιό θρεπτικό μέσο και ανανεώνεται με νέο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας και αφού περάσουν επιπλέον 24 ώρες από την αλλαγή θρεπτικού μέσου ελέγχεται η πυκνότητα των κυττάρων. Όταν πετυχαίνεται κάλυψη 80-90% της επιφάνειας της φλάσκας γίνεται ανακαλλιέργεια [Παπάζογλου, 2010].

4.2. Ανακαλλιέργεια κυττάρων

Η ανακαλλιέργεια αποσκοπεί στη διατήρηση του προς μελέτην βιολογικού υλικού. Τα κύτταρα ανακαλλιεργούνται κάθε φορά που οι φλάσκες έχουν μεγάλο αριθμό κυττάρων, περίπου 80-90% της επιφάνειας τους. Πρέπει να απομακρυνθούν τουλάχιστον τα μισά, ώστε να μην υπάρξει αναστολή της ανάπτυξης τους και θάνατος. Σε πολλά είδη κυττάρων, όταν παρατηρείται έλλειψη χώρου, αναστέλλεται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και τροποποιούνται οι μεταβολικές τους διαδικασίες. Επομένως, η ανακαλλιέργεια πρέπει να γίνεται σε τακτά χρονικά διαστήματα, ώστε να διασφαλίζεται ο κατάλληλος αριθμός κυττάρων και η ομαλή ανάπτυξη τους [Κίτσου, 2011].

Η διαδικασία της ανακαλλιέργειας σε φλάσκα των 75cm^2 που περιγράφεται παρακάτω, πραγματοποιείται κάτω από το θάλαμο νηματικής ροής (LaminAir) για να επικρατούν έτσι ασηπτικές συνθήκες.

- Αρχικώς γίνεται αναρρόφηση του θρεπτικού μέσου με πιπέτα Pasteur υπό κενό.
- Ξέπλυμα με PBS για την απομάκρυνση νεκρών κυττάρων.
- Αποκόλληση των κυττάρων από το υπόστρωμα με ενζυμική δράση, όταν προστίθεται 1ml θρυψίνη (trypsin).
- Ακολούθως, επώαση για 5 - 10 min στον θάλαμο επώασης ώστε να αποκολληθούν όλα τα κύτταρα.
- Ακολουθεί επαναιώρηση των αποκολλημένων κυττάρων σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας DMEM/10% FBS των 9ml.
- Μεταφορά του εναιωρήματος των κυττάρων σε αποστειρωμένο σωλήνα (φάλλον) των 15ml και φυγοκέντρωση στις 2500 στροφές (rpm) για 5 min στους 25°C .
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου θρεπτικού μέσου με πιπέτα Pasteur και προσθήκη 1ml DMEM/10% FBS.
- Επαναιώρηση του ιζήματος των κυττάρων μέχρι να μην είναι ορατά συσσωματώματα.

- Μεταφορά 10μl από το εναιώρημα των κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer, για τον υπολογισμό του αριθμού των κυττάρων.
- Μετά τον υπολογισμό του αριθμού των κυττάρων ανακαλλιεργείται η κατάλληλη ποσότητα κυττάρων σε φλάσκα με νέο θρεπτικό μέσο DMEM/10% FBS των 20ml.

4.3. Απομόνωση κυττάρων από φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας

Η διαδικασία αυτή εκτελείται κάθε φορά που απαιτείται η απομόνωση του βιολογικού υλικού (κύτταρα) για χρήση, όπως για παράδειγμα στη μέτρηση του αριθμού κυττάρων.

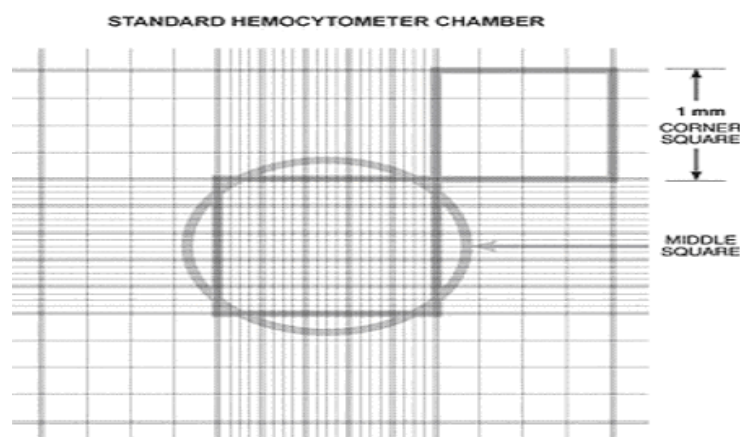
Για την παραλαβή μεμονωμένων κυττάρων γίνεται αρχικώς αποκόλληση αυτών από την επιφάνεια της φλάσκας όπου αναπτύσσονται. Πρώτα αφαιρείται το θρεπτικό μέσο και γίνεται πλύση με PBS. Για να επιτύχει η αποκόλληση προστίθεται ενζυμικό διάλυμα θρυψίνης (trypsin) στα κύτταρα για 5 - 10 min και επωάζονται στους 37 °C και σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ για την πλήρη αποκόλληση τους.

Ακολουθεί επαναιώρηση των αποκολλημένων κυττάρων σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας DMEM/10% FBS των 9ml και φυγοκέντρωση στις 1200 στροφές για 5 min στους 25 °C. Αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθεται νέο θρεπτικό υλικό καλλιέργειας. Στη συνέχεια γίνεται μέτρηση του αριθμού των κυττάρων σε πλάκα Neubauer και διατηρούνται σε εναιώρημα μέχρι το επόμενο στάδιο ακινητοποίησης τους.

4.4. Μέτρηση κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer

Είναι η πιο απλή, άμεση και οικονομική μέθοδος υπολογισμού του αριθμού των κυττάρων που βρίσκονται σε εναιώρημα μετά τη διαδικασία της ανακαλλιέργειας.

Το αιμοκυτταρόμετρο είναι μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρος πλάκα που έχει δύο κατάλληλα επεξεργασμένες λείες επιφάνειες. Κάθε μια από αυτές έχει ένα τετραγωνικό πλέγμα, το οποίο αποτελείται από εννέα κύρια τετράγωνα με μήκος πλευράς 1mm. Το κάθε ένα από αυτά τα τετράγωνα ορίζεται από τρεις παράλληλες γραμμές που απέχουν μεταξύ τους 2.5 μm και χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό εάν τα κύτταρα βρίσκονται μέσα ή έξω από πλέγμα. Επίσης κάθε ένα από τα κύρια τετράγωνα έχει επιπλέον διαβαθμίσεις για να διευκολύνεται η μέτρηση των κυττάρων. Το επίπεδο του πλέγματος βρίσκεται 0.1 mm χαμηλότερα από δύο «ράχες» στις οποίες στηρίζεται η καλυπτρίδα. Υπάρχει μια κοίλη επιφάνεια μεταξύ της εξωτερικής πλευράς κάθε τετραγωνισμένης λείας επιφάνειας και των σημείων που στηρίζεται η καλυπτρίδα. Στην κοίλη αυτή επιφάνεια μεταφέρεται το κυτταρικό εναιώρημα, το οποίο με τριχοειδικά φαινόμενα απλώνεται στην τετραγωνισμένη επιφάνεια [Κίτσου, 2011].

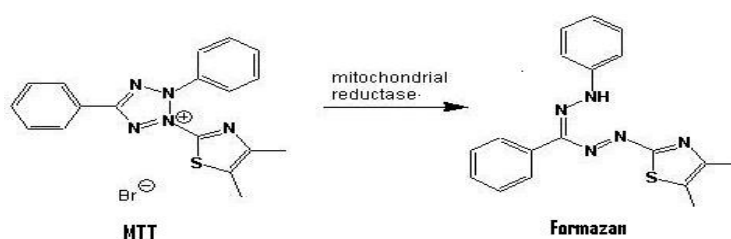


Εικόνα 4.1: Χώρος μέτρησης κυττάρων της πλάκας Neubauer. Σε κύκλο βρίσκεται το κεντρικό τετράγωνο. (Πηγή: http://users.teiath.gr/tieedu/WebTIE/Practical_Works/Aikaterinh_Papazoglou.pdf)

Ο όγκος του κυτταρικού εναιωρήματος σε κάθε ένα από τα εννέα τετράγωνα είναι $0,1 \text{ mm}^3$ ($1 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm}$) ή $1 \times 10^{-4} \text{ ml}$. Έτσι, η συγκέντρωση των κυττάρων στο αρχικό εναιώρημα (σε κύτταρα / ml) είναι: Μέτρηση στο ένα από τα κύρια τετράγωνα $\times 10.000$. Στην πλάκα μεταφέρουμε 10μl εναιωρήματος και υπολογίζεται ο αριθμός των κυττάρων στο 1ml όταν πολλαπλασιαστεί με 10^4 .

4.5. Φασματοφωτομετρική ανάλυση - MTT

Η μέθοδος MTT περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Mosmann το 1983 και βασίζεται στη μετατροπή των αλάτων τετραζολίου σε μη διαλυτά παράγωγα φορμαζάνης. Η τεχνική του MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) είναι μια χρωματομετρική μέθοδος (μετράει χρωματικές αλλαγές) η οποία χρησιμοποιείται, είτε για τη μελέτη του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, είτε για τη μελέτη κυτταροτοξικότητας. Βασίζεται στην ικανότητα των ζωντανών κυττάρων να μετατρέπουν το διαλυτό κίτρινο άλας τετραζολίου (κίτρινη χρωστική) σε αδιάλυτους πορφυρούς κρυστάλλους φορμαζάνης [Μυλωνά, 2013]. Συγκεκριμένα το MTT οξειδώνεται από τις αφυδρογονάσεις των μιτοχονδρίων των ζωντανών κυττάρων και παράγονται πορφυρού χρώματος κρύσταλλοι φορμαζάνης, οι οποίοι συσσωρεύονται στα μιτοχόνδρια του κυττάρου. Η οξείδωση του MTT πραγματοποιείται μόνο όταν τα μιτοχονδριακά ένζυμα είναι μεταβολικώς ενεργά και συνεπώς η παραγωγή κρυστάλλων φορμαζάνης είναι απευθείας ανάλογη του αριθμού βιώσιμων κυττάρων.



Εικόνα 4.2: Το διαλυτό κίτρινο άλας τετραζολίου (MTT) μετατρέπεται σε αδιάλυτους πορφυρούς κρυστάλλους φορμαζάνης (Πηγή: <http://www.biotek.com/resources/articles/quantification-cell-viability-epoch.html>)

Οι κρύσταλλοι της φορμαζάνης που παράγονται, διαλύονται σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) και παράγουν ένα χρωματικό διάλυμα του οποίου η ένταση είναι ανάλογη της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων. Με τη φασματοφωτομετρική ανάλυση (μέγιστη οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 570 nm) εξάγονται συμπεράσματα για τη μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων και κατ' επέκταση για τη μεταβολή της βιωσιμότητάς τους. Επίσης, η μέθοδος είναι κατάλληλη και για τη μέτρηση κυτταροτοξικότητας, αφού ένας κυτταροτοξικός παράγοντας μειώνει την αναγωγή των αλάτων τετραζολίου.

4.6. Χρωστική μικροσκοπία - Trypan blue

Η χρωστική trypan blue (κυανό του τρυπανίου) είναι μικρού μοριακού βάρους, παράγεται από την τολουιδίνη $C_{14}H_{16}N_2$ η οποία είναι οποιοδήποτε από τα τρία μεταμερικά αμιδο-παράγωγα του τολουόλιου ανάλογα της ανιλίνης [Μπαμπούρη, 2013]. Εισέρχεται εύκολα σε κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβη, ενώ τα ζωντανά κύτταρα με συμπαγείς μεμβράνες δεν βάφονται επειδή είναι πολύ επιλεκτικά με τις ενώσεις που θα διαπεράσουν τη μεμβράνη τους. Έτσι τα ζωντανά κύτταρα και τα κύτταρα σε πρώιμο και μεσαίο στάδιο απόπτωσης παραμένουν αχρωμάτιστα, αφού η χρωστική δεν εισέρχεται σε αυτά. Τα νεκρά βαμμένα μπλε παρατηρούνται στο οπτικό μικροσκόπιο και καταμετρούνται. Το χρωστικό διάλυμα Trypan blue είναι φωτοευαίσθητο και φυλάσσεται στο ψυγείο.

4.7. Προσομοίωση τραύματος δι' αμυχήs - Scratch wound assay

Η μέθοδος προσομοίωσης τραύματος δι' αμυχήs είναι ευρέως αποδεκτή για τη μελέτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της κυτταρικής μετανάστευσης [Banerjee, 2014]. Μέσω της μεθόδου αυτής ελέγχεται η ικανότητα των κυττάρων να πολλαπλασιάζονται και ταυτόχρονα να μεταναστεύουν σε διάφορες χρονικές περιόδους και για διάφορες συγκεντρώσεις. Δημιουργείται μια τεχνητή χαραγή στη μονοστοιβάδα της κυτταροκαλλιέργειας και παρατηρείται η συμπεριφορά των κυττάρων σε τακτά χρονικά διαστήματα μελέτης. Είναι αρκετά εύκολη και οικονομική μέθοδος [Liang, 2007]. Επιπλέον μιμείται τη μεταναστευτικότητα κυττάρων *in vivo*. Παρ' όλο αυτά δεν διευκρινίζεται αν το αποτέλεσμα της μεθόδου οφείλεται στη μετακίνηση των κυττάρων ή στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Επιπλέον με τον μηχανικό τραυματισμό των κυττάρων το περιεχόμενο ελευθέρωσης μπορεί να επηρεάσει τη μετακίνησή τους.



Εικόνα 4.3: Μελέτη της κυτταρικής μετανάστευσης σε διάφορους χρόνους με τη μέθοδο scratch-wound assay (Πηγή: προσαρμογή από Moreno-Bueno et al., 2009)

4.8. Επεξεργασία των πειραματικών μετρήσεων

Για τη στατιστική επεξεργασία των πειραματικών μετρήσεων με σκοπό την απεικόνιση των αποτελεσμάτων σε μορφή ιστογράμματος έγινε χρήση του προγράμματος Microsoft Excel 2007, υπολογίζοντας κάθε φορά το τυπικό σφάλμα των μέσων όρων. Με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου Statgraphics έλαβε χώρα ο παραμετρικός στατιστικός έλεγχος (t-test), με σκοπό την ανάδειξη στατιστικής σημαντικότητας μεταξύ των μέσων όρων των δειγμάτων.

5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

- Κάθε φορά πριν ξεκινήσει η πειραματική διαδικασία φροντίζουμε επί 20 λεπτά να ανάβουμε τη λάμπα UV-C και τον αερισμό στον θάλαμο νηματικής ροής, ώστε όσα πειραματικά εργαλεία χρειαστούμε να βρίσκονται κάτω από ασηπτικές συνθήκες και επιπλέον να γίνει αποστείρωση του χώρου εργασίας (θαλάμου). Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται στην έναρξη κάθε πειραματικού χειρισμού της ημέρας.
- Προσέχουμε κάθε φορά να ελέγχουμε τα δείγματά μας για τυχόν μολύνσεις. Αν υπάρξουν, η διαδικασία επαναλαμβάνεται σε οποιοδήποτε βήμα από την αρχή.
- Το κυτταρικό εναιώρημα στην αρχή των πειραμάτων προερχόταν από ανακαλλιέργεια σε φλάσκα με 20 ml θρεπτικό μέσο DMEM/10% FBS.
- Για τη μέτρηση των κυττάρων, προκειμένου να εκτιμηθεί η επιβίωσή τους με τη μέθοδο trypan blue, αναμειγνύεται εναιώρημα κυττάρων με ισότονο διάλυμα trypan blue σε αναλογία 1:1, ώστε η τελική συγκέντρωση της χρωστικής να είναι 0,2%. Κατά τον υπολογισμό του αριθμού των νεκρών κυττάρων, ο αριθμός τους μετρήθηκε σε τρία διαφορετικά τετράγωνα (συμπεριλαμβανόμενο πάντα το κεντρικό τετράγωνο) της πλάκας Neubauer.
- Το ποσοστό θνησιμότητας του κυτταρικού πληθυσμού του δείγματος με την τεχνική του trypan blue υπολογίζεται ως εξής: ολικός αριθμός χρωματισμένων κυττάρων/ολικός αριθμός κυττάρων \times 100.
- Προκειμένου να τοποθετηθεί το πειραματικό πλακίδιο στο φασματοφωτόμετρο, γίνεται κάλυψη των εναπομεινάντων βοθρίων με αποστειρωμένο parafilm ώστε να μην υπάρξει μόλυνση στα υπόλοιπα δείγματα κυττάρων.
- Η επώαση γινόταν στον επωαστικό θάλαμο (Heat Force Incubator) στους 37 °C και σε ατμόσφαιρα 5% CO₂.
- Με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος Image J υπολογίζεται το εμβαδόν των χαραγών στη μονοστοιβάδα κυττάρων κατά τη μέθοδο scratch-wound assay, αφού έχει προηγηθεί φωτογράφιση των δειγμάτων στο ανάστροφο μικροσκόπιο. Το Image J είναι λογισμικό ανοιχτού κώδικα ανάλυσης εικόνας, γραμμένο σε Java και διατίθεται δωρεάν.

5.1. 1^ο πείραμα - Εφαρμογή της μεθόδου Scratch-wound Assay σε κύτταρα Vero (24h)

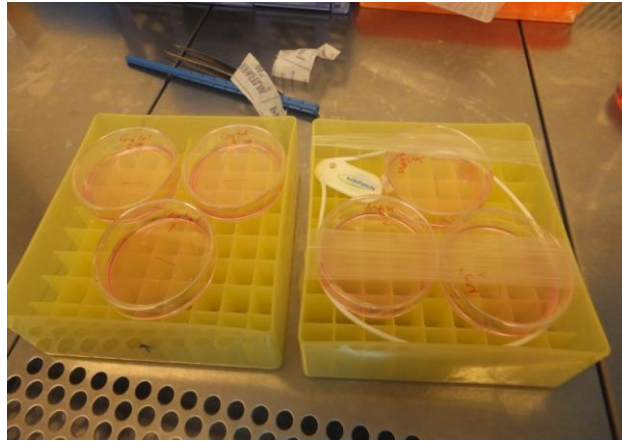
Αφού πρώτα γίνει μέτρηση του κυτταρικού εναιωρήματος, η διαδικασία ξεκινάει με ανακαλλιέργεια κυττάρων σειράς Vero σε φλάσκα καλλιέργειας με θρεπτικό μέσο καλλιέργειας DMEM/10% FBS και επώαση στον επωαστικό θάλαμο.

Όταν τα κύτταρα καλύψουν 80% - 90% της φλάσκας μετά από μικροσκοπική παρατήρηση, απομονώνονται ώστε να γίνει η ποσοτική μέτρηση τους στο αιματοκυτταρόμετρο Neubauer. Μετά από τον υπολογισμό του αριθμού τους γίνεται επίστρωση σε έξι τρυβλία Petri, 10⁶ κύτταρα/τρυβλίο ώστε την επόμενη μέρα της στρώσης να υπάρξει 80%-90% πληρότητα. Αφού διαπιστωθεί στο οπτικό μικροσκόπιο η επιθυμητή πυκνότητα σε όλα τα δείγματα, εφαρμόζεται η μέθοδος scratch-wound assay για μελέτη της κυτταρικής μεταναστευτικότητας.

Σε κάθε ένα από τα τρυβλία μαρκάρουμε μια κόκκινη γραμμή στο εξωτερικό του πυθμένα τους. Το υπερκείμενο θρεπτικό μέσο απομακρύνεται και κατόπιν με ένα tip πιπέτας (μl) χαράσσονται δύο μικρές κάθετες ευθείες στην κόκκινη γραμμή αποκολλώντας τα κύτταρα. Γίνεται πλύση με διάλυμα PBS για να αφαιρεθούν υπολείμματα κυττάρων και συμπληρώνεται πάλι με θρεπτικό μέσο. Λαμβάνονται φωτογραφίες κάτω από το ανάστροφο μικροσκόπιο, επιλέγοντας σε κάθε δείγμα μία από τις δύο χαραγές στο πάνω ή κάτω οπτικό πεδίο που εφάπτεται στην κόκκινη γραμμή.

Κατόπιν τοποθετούνται κλειστά, ανά τρία δείγματα σε δύο πλαστικά πειραματικά κουτιά, με το ένα κουτί να περικλείει τη συσκευή επαγωγής ηλεκτρομαγνητισμού (βλέπε εικόνα 6.1). Τα δύο πειραματικά κουτιά με τα δείγματα τοποθετούνται σε απόσταση τουλάχιστον 10cm μεταξύ τους στον επωαστικό θάλαμο (Heat Force Incubator) προς αποφυγή αλλοίωσης των αποτελεσμάτων.

Μετά από 24h πραγματοποιείται σε επανάληψη η φωτογράφιση στο ανάστροφο μικροσκόπιο στο ίδιο ακριβώς οπτικό πεδίο. Ακολουθεί επεξεργασία των εικόνων στο λογισμικό πρόγραμμα Image J και στατιστική επεξεργασία στο Microsoft Excel.



Εικόνα 6.1: Τοποθέτηση των δειγμάτων σε δύο πειραματικά κουτιά, με τα μισά δείγματα να περικλείονται από τη συσκευή επαγωγής ηλεκτρομαγνητισμού επί 24h.

5.2. 2^ο πείραμα - Εφαρμογή των μεθόδων Scratch-wound assay (24h), MTT και Trypan blue σε κύτταρα Vero (48h) παρουσία H/M πεδίου και τοξικού παράγοντα

Ο αριθμός των κυττάρων Vero έχει διασφαλιστεί μετά από ανακαλλιέργεια και αναμονή πλήρωσης 80% - 90% της μονοστοιβάδας της φλάσκας. Τα κύτταρα απομονώνονται ώστε να γίνει ποσοτική μέτρηση στο αιμοκυτταρόμετρο Neubauer.

Γίνεται επίστρωση τεσσάρων τρυβλίων petri, 10⁶ κύτταρα/τρυβίο σε τελικό όγκο 10 ml DMEM/10% FBS και επώαση στον θάλαμο (Heat Force Incubator) για 24 ώρες. Την επόμενη μέρα με κάλυψη 80% - 90% της επιφάνειας του κάθε τρυβλίου, επαναλαμβάνουμε τη μέθοδο scratch-wound assay για μελέτη της κυτταρικής μεταναστευτικότητας με την ίδια ακριβώς διαδικασία χαραγής γραμμών όπως στο πείραμα 1.

Σε κάθε ένα από τα τέσσερα τρυβλία μαρκάρουμε μια κόκκινη γραμμή στην εξωτερική πλευρά του πυθμένα τους. Το υπερκείμενο θρεπτικό μέσο απομακρύνεται και με ένα tip πιπέτας (μl) χαράσσονται δύο μικρές κάθετες ευθείες στην κόκκινη γραμμή αποκολλώντας τα κύτταρα. Γίνεται πλύση με διάλυμα PBS για να αφαιρεθούν υπολείμματα κυττάρων και συμπληρώνεται πάλι με θρεπτικό μέσο προσθέτοντας και τοξικό παράγοντα (υπεροξειδίου του υδρογόνου-H₂O₂) σε συγκέντρωση 0,1mg/ml. Λαμβάνονται φωτογραφίες κάτω

από το ανάστροφο μικροσκόπιο, επιλέγοντας ένα οπτικό πεδίο στο κάθε δείγμα, όπως περιγράφηκε στο πείραμα 1.

Τα δύο τρυβλία από τα τέσσερα, τοποθετούνται στο πειραματικό κουτί ώστε να περιβάλλονται από τη συσκευή επαγωγής H/M πεδίου και τα υπόλοιπα δύο λειτουργούν σαν μάρτυρες τοποθετημένα εξίσου στο δεύτερο πειραματικό κουτί χωρίς την επίδραση ηλεκτρομαγνητισμού. Τα δύο πειραματικά κουτιά με τα δείγματα τοποθετούνται σε απόσταση τουλάχιστον 10cm μεταξύ τους στον επωαστικό θάλαμο (Heat Force Incubator) προς αποφυγή αλλοίωσης των αποτελεσμάτων.

Την επόμενη μέρα λαμβάνουμε φωτογραφίες (24h) στο ίδιο ακριβώς οπτικό πεδίο του κάθε δείγματος που είχε επιλεγεί κατά την πρώτη φωτογράφιση.

Για τον προσδιορισμό της ταυτόχρονης δράσης της τοξικότητας του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) και της επίδρασης ηλεκτρομαγνητισμού εκτελέστηκε η χρωματομετρική μέθοδος MTT μετά από 48 ώρες καλλιέργειας των κυττάρων Vero. Με πιπέτα γίνεται καλή ανάδευση του θρεπτικού μέσου ώστε να ξεκολλήσουν από τον πυθμένα του τρυβλίου τα κύτταρα. Σε μικροπλακίδιο Elisa 96 βοθρίων μεταφέρεται 0,2ml θρεπτικού μέσου από το κάθε ένα τρυβλίο και ακολουθεί προσθήκη 1/10 του όγκου του θρεπτικού μέσου ανά βοθρίο διαλύματος MTT, δηλαδή 20μl συγκέντρωσης 5mg/ml. Γίνεται επώαση των δειγμάτων για μία ώρα στον επωαστικό θάλαμο (Heat Force Incubator). Ως δείκτης ικανοποιητικού μεταβολισμού του MTT είναι ο σχηματισμός κρυστάλλων φορμαζάνης στο εσωτερικό των κυττάρων.

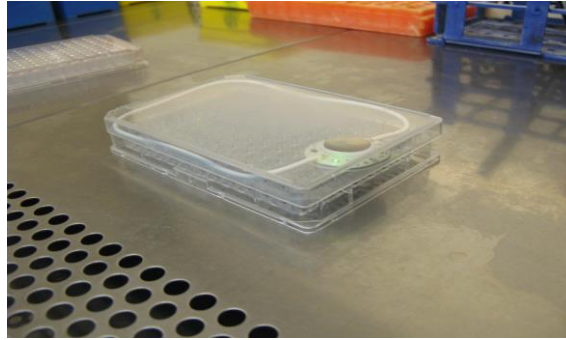
Μετά το πέρας μιας ώρας επώασης ακολουθεί αφαίρεση του θρεπτικού μέσου με πιπέτα και προσθήκη 0,2ml DMSO ανά βοθρίο. Πραγματοποιείται φωτομέτρηση στα 570 nm και εξαγωγή των μετρήσεων με τη χρήση του λογισμικού Magellan 7,1 SP1. Οι μετρήσεις αποθηκεύονται και επεξεργάζονται σε φύλλο του Microsoft Excel.

Συνεχίζοντας με τη μέθοδο trypan blue, υπολογίζεται το ποσοστό θνησιμότητας μετά από 48h. Αφού γίνει καλή ανάδευση του θρεπτικού μέσου σε κάθε τρυβλίο, ώστε να αποκολληθούν τα κύτταρα από τον πυθμένα, μεταφέρεται με μικροπιπέτα 10μl του εναιωρήματος και 10μl της χρωστικής trypan blue σε erpendorfs. Ο αριθμός των κυττάρων σε κάθε δείγμα μετράται σε τρία ανεξάρτητα τετράγωνα του αιμοκυτταρόμετρου Neubauer. Συγκεκριμένα καταμετρούνται τα χρωματισμένα μπλε, που αντιπροσωπεύουν τα νεκρά κύτταρα και τα ζωντανά κύτταρα που παραμένουν χωρίς χρώση. Ακολουθεί επεξεργασία των μετρήσεων με το πρόγραμμα Microsoft Excel.

5.3. 3^ο Πείραμα - Εφαρμογή της μεθόδου MTT σε κύτταρα Vero σε χρόνο 24h

Στο τρίτο πείραμα ελέγχεται η μεταβολική δραστηριότητα κυττάρων Vero μετά από 24h εφαρμογής H/M πεδίου.

Εφόσον ολοκληρωθεί η μέτρηση του κυτταρικού εναιωρήματος με τη βοήθεια της πλάκας Neubauer, κατάλληλη ποσότητα ανακαλλιεργείται σε φλάσκα με 20 ml θρεπτικό μέσο DMEM/10% FBS. Μετά από πλήρωση της φλάσκας καλλιέργειας 80%-90%, γίνεται απομόνωση και μέτρηση του αριθμού των κυττάρων. Ακολουθεί στρώση σε δύο πειραματικά πλακιδία Elisa (24 μικροπλακιδίων), 10^5 κύτταρα/μικροπλακίδιο σε τελικό όγκο 0,5ml θρεπτικό μέσο DMEM/10% FBS. Ακολουθεί επώαση για 24 ώρες στο θάλαμο προκειμένου να προσκολληθούν.



Εικόνα 6.2: Τοποθέτηση της συσκευής στην εσωτερική πλευρά του πόματος του πλακιδίου Elisa.

Μετά από 24h ελέγχεται η μονοστοιβάδα των κυττάρων για κάλυψη της επιφάνειας του πυθμένα. Στο ένα από τα δύο πλακίδια Elisa τοποθετείται η συσκευή επαγωγής H/M πεδίου, στην εσωτερική πλευρά του πόματος κλεισίματος ώστε να βρίσκονται τα δείγματα σε άμεση έκθεση (Εικόνα 6.2). Ακολουθεί επώαση 24h στο θάλαμο και τοποθετούνται σε απόσταση τουλάχιστον 10cm προς έλεγχο της επίδρασης H/M πεδίου.

Μετά τη συμπλήρωση 23h πραγματοποιείται προσθήκη διαλύματος MTT 1/10 του όγκου του θρεπτικού μέσου ανά βοθρίο, δηλαδή 50μl συγκέντρωσης 5mg/ml. Τα πλακίδια τοποθετούνται στον επωαστικό θάλαμο για μία επιπλέον ώρα και κατόπιν ελέγχονται στο μικροσκόπιο για σχηματισμό κρυστάλλων φορμαζάνης. Αφαιρείται το υπερκείμενο με μικροπιπέτα και προστίθεται 0,5ml DMSO ανά βοθρίο. Μετά από ήπια ανακίνηση των μικροπλακιδίων ώστε να μην υπάρχουν κρύσταλλοι φορμαζάνης οι οποίοι δεν έχουν διαλυθεί, πραγματοποιείται φασματοφωτομετρική ανάλυση στα 570nm και τα αποτελέσματα αναλύονται στο λογισμικό πρόγραμμα Magellan 7,1 SP1. Οι μετρήσεις αποθηκεύονται και επεξεργάζονται από το Microsoft Excel.

5.4. 4^ο Πείραμα - Εφαρμογή της μεθόδου MTT σε κύτταρα N2a ανά 30sec και 1h

Αφού έχει εξασφαλιστεί ο κατάλληλος αριθμός κυττάρων N2a με ανακαλλιέργεια γίνεται επίστρωση σε δύο πλακίδια Elisa (24 μικροπλακιδίων), 10^5 κύτταρα/μικροπλακίδιο σε τελικό όγκο 0,5ml θρεπτικό μέσο DMEM/10% FBS. Ακολουθεί επώαση για 24h προκειμένου να προσκολληθούν.

Την επόμενη μέρα μετά από μικροσκοπικό έλεγχο της πυκνότητας ακολουθεί η μέθοδος MTT. Όπως και στα προηγούμενα πειράματα γίνεται προσθήκη διαλύματος MTT 1/10 του όγκου του θρεπτικού μέσου ανά βοθρίο, δηλαδή 50μl συγκέντρωσης 5mg/ml. Στο ένα πλακίδιο Elisa τοποθετούμε όπως και στο τρίτο πείραμα τη συσκευή επαγωγής H/M πεδίου στην εσωτερική πλευρά του πόματος. Ακολουθεί επώαση στον θάλαμο για 30sec. Μετά την πάροδο του μισάωρου αφαιρείται το υπερκείμενο του κάθε βοθρίου και προστίθεται 0,5ml DMSO. Ανακινούνται ελαφρά για τυχόν ύπαρξη αδιάλυτων κρυστάλλων και ακολουθεί φασματοφωτομέτρηση στα 570nm.

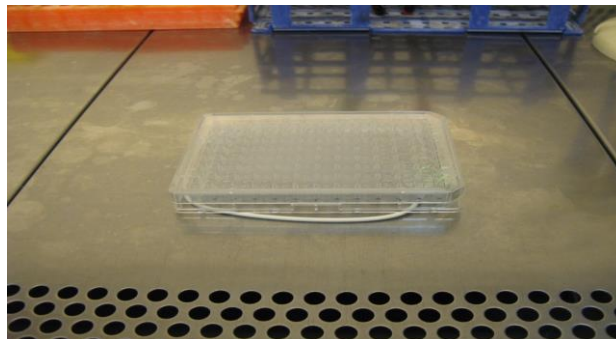
Με την ολοκλήρωση των μετρήσεων σε 30sec επαναλαμβάνεται η μέθοδος MTT για τα υπόλοιπα βοθρία που θα εξεταστούν στη διάρκεια μιας ώρας (1h). Πραγματοποιείται προσθήκη 50μl διαλύματος MTT συγκέντρωσης 5mg/ml στα επόμενα υπό εξέταση δείγματα της 1h. Τα δύο πλακίδια τοποθετούνται στον επωαστικό θάλαμο για 30sec. Κατόπιν ελέγχου στο μικροσκόπιο για σχηματισμό κρυστάλλων φορμαζάνης, αφαιρείται το υπερκείμενο με μικροπιπέτα και προστίθεται 0,5ml DMSO ανά βοθρίο. Μετά από ήπια ανακίνηση των μικροπλακιδίων για διάλυση κρυστάλλων εφόσον δεν έχουν διαλυθεί, πραγματοποιείται φασματοφωτομετρική ανάλυση στα 570nm και χρήση του λογισμικού Magellan 7,1 SP1 για εξαγωγή των μετρήσεων. Οι μετρήσεις αποθηκεύονται και επεξεργάζονται σε φύλλο του Microsoft Excel.

5.5. 5^ο Πείραμα - Εφαρμογή των μεθόδων MTT και Trypan blue σε κύτταρα N2a (24h)

Προκειμένου να ελεγχθεί η επίδραση H/M πεδίου στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων N2a μετά από 24h εφαρμόζεται η μέθοδος MTT και trypan blue.

Σε πειραματικό πλακίδιο Elisa (24 μικροπλακίδια) γίνεται επίστρωση κατάλληλου αριθμού κυττάρων N2a μετά από ανακαλλιέργεια, 10^5 κύτταρα/μικροπλακίδιο με τελικό όγκο 0,5ml θρεπτικού μέσου DMEM/10% FBS. Ακολουθεί επώαση στο θάλαμο για 24 ώρες προκειμένου να προσκολληθούν.

Την επόμενη μέρα ελέγχεται στο ανάστροφο μικροσκόπιο η πυκνότητά τους. Στο ένα από τα πειραματικά πλακίδια Elisa τοποθετείται η συσκευή επαγωγής H/M πεδίου σε διαφορετική θέση αυτή τη φορά, ακριβώς στην κάτω και έξω πλευρά του πλακιδίου Elisa (Εικόνα 5.2). Ακολουθεί επώαση 24h στον θάλαμο (Heat Force Incubator) ώστε να προσκολληθούν οι κυτταρικοί πληθυσμοί.



Εικόνα 5.2: Τοποθέτηση της συσκευής επαγωγής ηλεκτρομαγνητισμού στην κάτω και έξω πλευρά του πλακιδίου Elisa.

Με το πέρας περίπου 23h αφού ελεγχθεί η πυκνότητά τους ξεκινάει η τεχνική MTT. Γίνεται προσθήκη 1/10 του όγκου του θρεπτικού μέσου ανά βοθρίο, δηλαδή 50μl διαλύματος MTT σε κάθε βοθρίο (μικροπλακίδιο) συγκέντρωσης 5mg/ml. Τοποθετούνται στον θάλαμο (Heat Force Incubator) για επώαση μίας ώρας. Κατόπιν αφαιρείται το υπερκείμενο σε κάθε βοθρίο με μικροπιπέτα και προστίθεται 0,5μl DMSO. Στη συνέχεια αναδεύονται ήπια τα μικροπλακίδια για διάλυση τυχόν κρυστάλλων και πραγματοποιείται φασματοφωτομετρική ανάλυση στα 570nm. Η εξαγωγή των μετρήσεων γίνεται με τη βοήθεια του λογισμικού Magellan 7,1 SP1. Οι μετρήσεις αποθηκεύονται και επεξεργάζονται σε φύλλο του Microsoft Excel.

Προκειμένου να εκτιμηθεί το ποσοστό ζωτικότητας των δειγμάτων έγινε χρήση της χρωστικής trypan blue μετά από 24h. Όπως και προηγουμένως αναμειγνύεται εναιώρημα κυττάρων με ισότονο διάλυμα trypan blue σε αναλογία 1:1, ώστε η τελική συγκέντρωση της χρωστικής να είναι 0,2%. Μετά από καλή ανάδευση του θρεπτικού μέσου με πιπέτα στο βοθρίο, μεταφέρεται με μικροπιπέτα 10μl του εναιωρήματος και 10μl trypan blue σε erpendorfs. Ο αριθμός των κυττάρων σε κάθε δείγμα μετράται σε τρία ανεξάρτητα τετράγωνα του αιμοκυτταρόμετρου Neubauer, και υπολογίζονται τα χρωματισμένα μπλε που αντιπροσωπεύουν τα νεκρά κύτταρα και τα ζωντανά με χωρίς χρώση. Ακολουθεί επεξεργασία των μετρήσεων στο πρόγραμμα Microsoft Excel προκειμένου να εκτιμηθεί το ποσοστό θνησιμότητας.

5.6. 6^ο-7^ο-8^ο Πείραμα - Εφαρμογή των μεθόδων MTT και Trypan blue σε κύτταρα N2a ανά 1h, 1,5h και 24h

Στον επόμενο πειραματικό σχεδιασμό μελετήθηκε η επίδραση Η/Μ πεδίου μετά από 1h, 1,5h και 24h σε κύτταρα νευροβλαστώματος N2a με τις μεθόδους MTT και trypan blue.

Μετά από ανακαλλιέργεια κυττάρων N2a και υπολογισμό του αριθμού τους στο αιμοκυτταρόμετρο, γίνεται στρώση σε δύο πλακίδια Elisa (96 μικροπλακίδια) 20^4 και 10^4 κύτταρα/μικροπλακίδιο σε τελικό όγκο 0,2ml θρεπτικό μέσο. Ακολουθεί επώαση στον θάλαμο για 24h ώστε να γίνει προσκόλληση των κυτταρικών πληθυσμών. Ο αριθμός των κυττάρων 20^4 /βοθρίο αντιστοιχεί στις μετρήσεις της 1h και 1,5h και ο 10^4 /βοθρίο σε μετρήσεις των 24h.

Την επόμενη μέρα, μετά από έλεγχο της πυκνότητας τους στο ανάστροφο μικροσκόπιο, τοποθετείται η συσκευή επαγωγής Η/Μ πεδίου στο εσωτερικό πόμα του πλακιδίου Elisa (όπως στα προηγούμενα πειράματα με εξαίρεση το πείραμα 5), ώστε να υπάρξει άμεση έκθεση με την κυτταρική μονοστοιβάδα.

Μετά από μισή ώρα επώασης (30 sec) στον θάλαμο, ακολουθεί η μέθοδος MTT. Όπως και στα προηγούμενα πειράματα γίνεται προσθήκη διαλύματος MTT 1/10 του όγκου του θρεπτικού μέσου ανά βοθρίο, δηλαδή 20μl διαλύματος συγκέντρωσης 5mg/ml. Ακολουθεί επώαση στον θάλαμο για άλλα 30sec για σχηματισμό κρυστάλλων φορμαζάνης. Μετά την πάροδο του μισάωρου, αφαιρείται το υπερκείμενο του κάθε βοθρίου και προστίθεται 0,2ml DMSO. Ανακινούνται ελαφρά για τυχόν ύπαρξη αδιάλυτων κρυστάλλων και ακολουθεί φασματοφωτομέτρηση στα 570nm. Η επεξεργασία των μετρήσεων γίνεται στο λογιστικό πρόγραμμα Magellan 7,1 SP1 και αποθηκεύονται σε φύλλο του Microsoft Excel.

Την ίδια χρονική περίοδο προκειμένου να εκτιμηθεί η βιωσιμότητα, εφαρμόζεται η μέθοδος trypan blue. Μετά από καλή ανάδευση του θρεπτικού μέσου στο βοθρίο με πιπέτα, μεταφέρεται με μικροπιπέτα 10μl του εναιωρήματος και 10 μl trypan blue σε erpendorfs. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται σε όλα τα δείγματα. Ο αριθμός των κυττάρων σε κάθε δείγμα μετράται σε τρία ανεξάρτητα τετράγωνα της πλάκας του αιμοκυτταρόμετρου και υπολογίζονται τα μπλε, χρωματισμένα, που αντιπροσωπεύουν τα νεκρά κύτταρα και τα ζωντανά με χωρίς χρώση.

Μετά την ολοκλήρωση των πρώτων μετρήσεων, αφού έχει επέλθει μία ώρα, πραγματοποιείται η επόμενη μέτρηση με χρόνο 1,5h με τη μέθοδο MTT συμπεριλαμβανομένου μισής ώρας επώασης στον θάλαμο με MTT. Παράλληλα εφαρμόζεται και η μέθοδος trypan blue για μέτρηση του αριθμού των νεκρών και ζωντανών κυττάρων στο κάθε βοθρίο σε διάρκεια 1,5h. Η διαδικασία είναι ακριβώς ίδια με την πρώτη μέτρηση διάρκειας μιας ώρας (1h).

Μετά την πάροδο 23,5h σε κατάσταση επώασης τα κύτταρα υποβάλλονται στη μέθοδο MTT και επαναλαμβάνονται τα βήματα της μεθόδου από την αρχή (όπως είδαμε παραπάνω). Ακολουθεί και η μελέτη της κυτταρικής θνησιμότητας με τη μέθοδο trypan blue μετά από 24h έκθεσης ηλεκτρομαγνητισμού. Τα πειράματα 7 και 8 αποτελούν τις επαναλήψεις του 6^{ου} για επαλήθευση των αποτελεσμάτων.

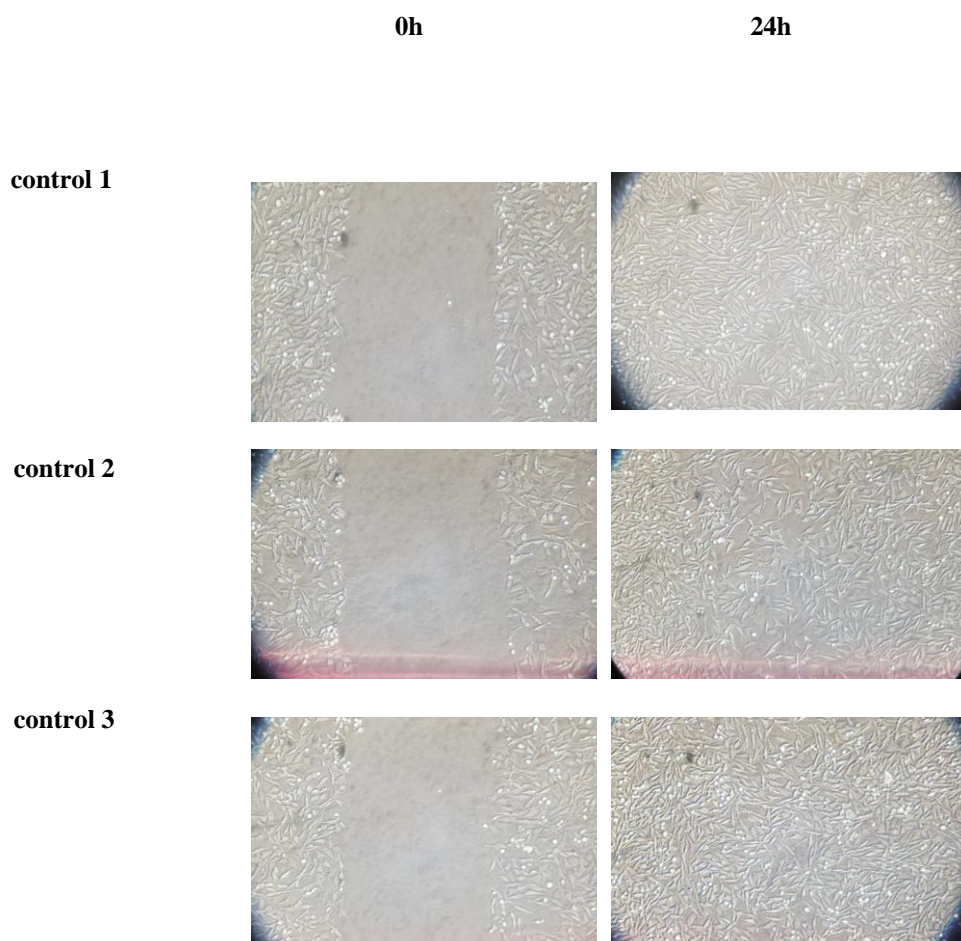
6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

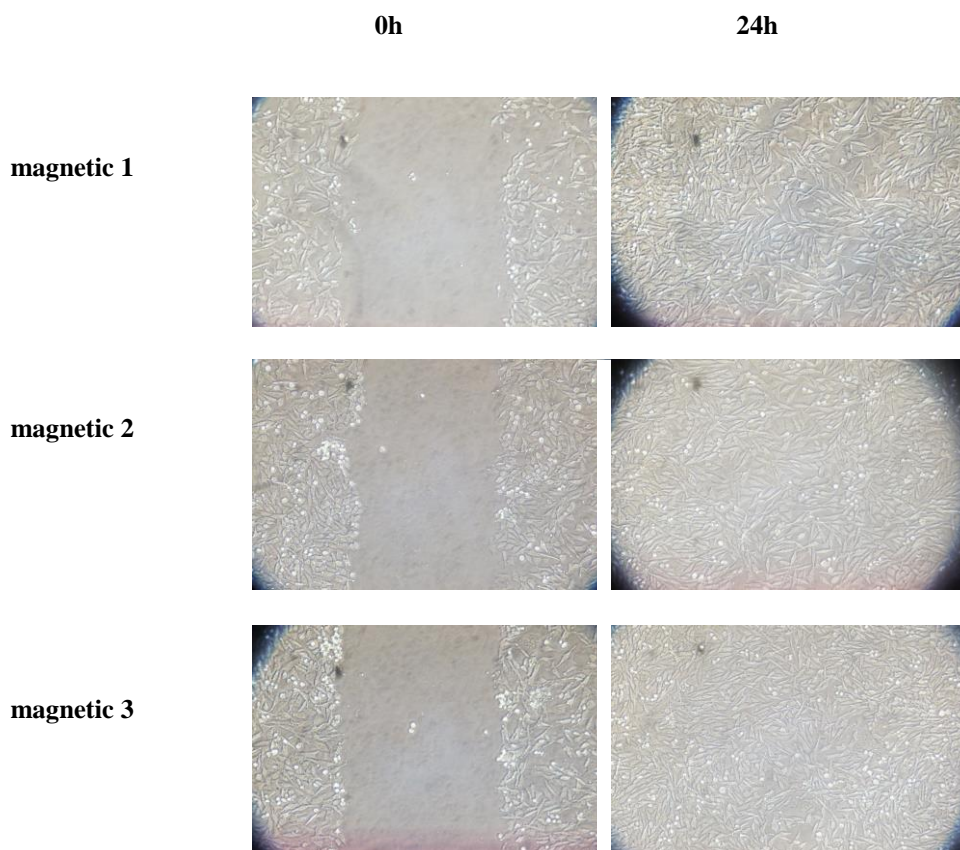
6.1. Μελέτη της επίδρασης ηλεκτρομαγνητικού (H/M) πεδίου πάνω σε κυτταρικό πληθυσμό Vero με τη μέθοδο Scratch-wound Assay μετά από 24h

Η μελέτη της μαζικής κυτταρικής μετανάστευσης μελετήθηκε με τη μέθοδο βιοδοκιμής προσομοίωσης τραύματος δι' αμυχής (scratch-wound assay), παρατηρώντας έως και 24h την προσπάθεια των κυτταρικών πληθυσμών Vero να καλύψουν μια τεχνητή αμυχή.

Κατά την εκτέλεση του πρώτου πειράματος με τη μέθοδο Scratch-wound assay, λάβαμε τις ακόλουθες ψηφιακές φωτογραφίες με το πέρας μια ημέρας με τη βοήθεια του μικροσκοπίου αντίθετης φάσης. Η μέτρηση της επιφάνειας από την τεχνητή αμυχή πραγματοποιήθηκε από το λογισμικό πρόγραμμα image J. Η στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων έγινε με τη χρήση του Microsoft Excel.

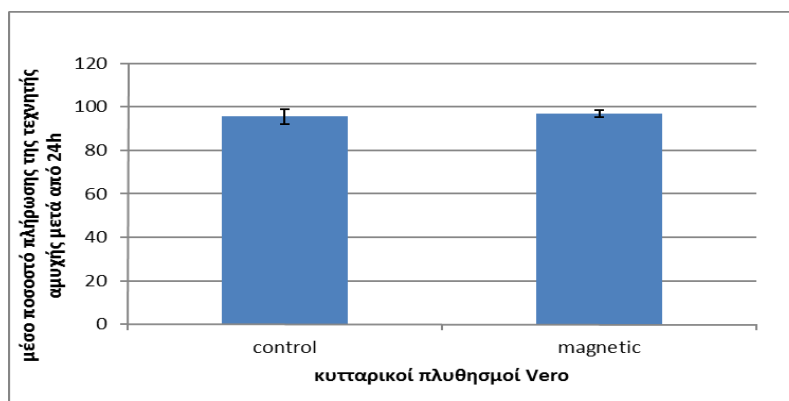
Σε χρόνο 0h αντιστοιχούν οι φωτογραφίες αμέσως μόλις χαράχθηκε η τεχνητή αμυχή και σε 24h αντιστοιχούν οι φωτογραφίες μετά από το πέρας 24 ωρών. Οι εικόνες είναι αντιπροσωπευτικές από δύο ανεξάρτητα πειράματα των έξι δειγμάτων. Τα μισά αντιπροσωπεύουν τους μάρτυρες (control) και τα υπόλοιπα τρία επωάζονται με την παρουσία συσκευής H/M πεδίου (magnetic).





Εικόνα 6.1: Βιοδοκιμή προσομοίωσης τραύματος δι' αμυχής (scratch-wound assay) σε κύτταρα Vero σε χρόνους 0h και 24h αντίστοιχα παρουσία Η/Μ πεδίου. Οι εικόνες είναι αντιπροσωπευτικές από δύο ανεξάρτητα πειράματα των έξι δειγμάτων. Η μεγέθυνση είναι 4×.

Ακολουθεί η διαγραμματική απεικόνιση μετά από επεξεργασία των μετρήσεων υπολογισμού του μέσου ποσοστού πλήρωσης της τεχνητής αμυχής.



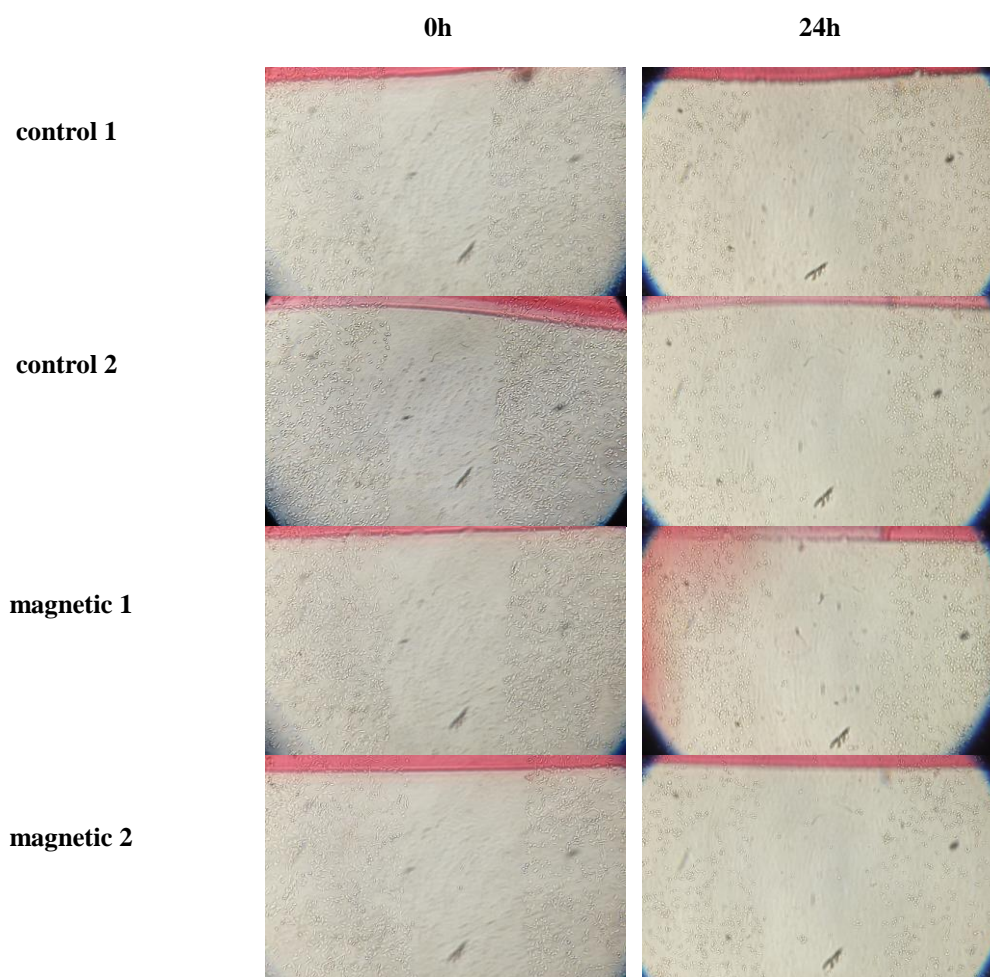
Εικόνα 6.2: Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως η μέση τιμή του ποσοστού πλήρωσης της αμυχής (\pm το τυπικό σφάλμα (SE)) από δύο ανεξάρτητα πειράματα), $n = 3$. Οι κυτταρικοί πληθυσμοί Vero επώαστηκαν παρουσία Η/Μ πεδίου (magnetic).

Το ποσοστό πλήρωσης, όπως παρατηρείται είναι ελάχιστα μεγαλύτερο κατά 1,5% παρουσία Η/Μ πεδίου σε σχέση με τους μάρτυρες. Επειδή όμως $p\text{-value} = 0,73$ οι διαφορές στους μέσους όρους δεν είναι στατιστικά

σημαντικές για επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$ (t-test). Το H/M πεδίο ίσως να συνέβαλε στη γρηγορότερη μετακίνηση του κυτταρικού πληθυσμού ή στον γρηγορότερο πολλαπλασιασμό τους.

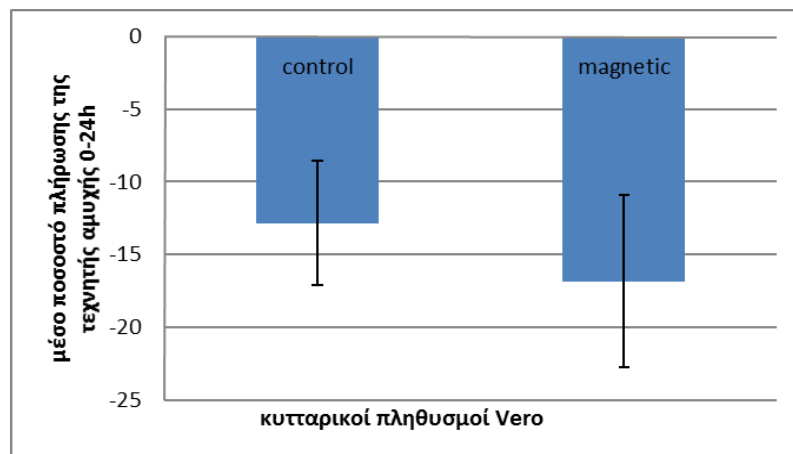
6.2. Μελέτη της επίδρασης ηλεκτρομαγνητικού (H/M) πεδίου πάνω σε κυτταρικό πληθυσμό Vero παρουσία τοξικού παράγοντα (H_2O_2) με τις μεθόδους Scratch - wound assay, MTT και Trypan blue

Ακολούθως μελετήθηκε με τη μέθοδο τραύματος δι' αμυχής (Scratch - wound assay) σε κύτταρα Vero η επίδραση H/M πεδίου παρουσία τοξικού παράγοντα (H_2O_2) συγκέντρωσης 0,1mg/ml. Λάβαμε τις ακόλουθες ψηφιακές φωτογραφίες στη χρονική διάρκεια 0h και 24h. Κατόπιν ακολούθησε η επεξεργασία με το πρόγραμμα image J και η στατιστική επεξεργασία με το Microsoft Excel. Οι εικόνες είναι αντιπροσωπευτικές από δύο ανεξάρτητα πειράματα, τεσσάρων δειγμάτων με δύο δείγματα κυττάρων να αντιπροσωπεύουν τους μάρτυρες (control) και τα υπόλοιπα δύο να επωάζονται με την παρουσία H/M πεδίου (magnetic).



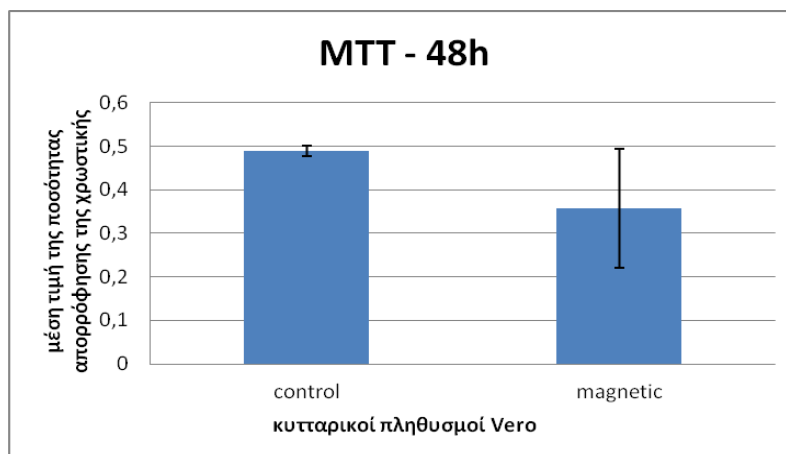
Εικόνα 6.3: Βιοδοκιμή προσομοίωσης τραύματος δι' αμυχής (Scratch - wound assay) σε κύτταρα Vero με χρόνους 0h και 24h παρουσία H/M πεδίου και τοξικού παράγοντα (H_2O_2) συγκέντρωσης 0,1mg/ml. Η εικόνα είναι αντιπροσωπευτική από δύο ανεξάρτητα πειράματα, n=2 . Η μεγέθυνση είναι 4x.

Μετά από επεξεργασία των ψηφιακών εικόνων από το λογισμικό πρόγραμμα image J και της στατιστικής επεξεργασίας των αποτελεσμάτων με τη χρήση του Microsoft Excel όπως είδαμε στο 1^ο πείραμα, λαμβάνουμε την παρακάτω διαγραμματική απεικόνιση του μέσου ποσοστού πλήρωσης της τεχνητής αμυχής σε χρόνο 24h. Οι αρνητικές τιμές του διαγράμματος οφείλεται στο ότι έχουμε επέκταση της τεχνητής αμυχής και όχι πλήρωση, όπως στο πείραμα 1. Η λήψη φωτογραφιών έδειξε ότι παρουσία τοξικού παράγοντα και H/M πεδίου, ο κυτταρικός πληθυσμός μετά από 24h μειώθηκε αισθητά. Δεν είχαμε μετακίνηση των κυττάρων δηλαδή κάλυψη της τεχνητής αμυχής, αντιθέτως η αμυχή απέκτησε μεγαλύτερες διαστάσεις. Η παρουσία H/M πεδίου όπως βλέπουμε από τις μετρήσεις συνέβαλλε στην επιπλέον επέκταση της τεχνητής αμυχής κατά 11% σε σχέση με τους μάρτυρες. Η διαφορά των δύο μέσων όρων δεν εμφανίστηκε με στατιστικά σημαντική διαφορά (p -value=0,64 σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$, t-test).



Εικόνα 6.4: Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό της μέσης τιμής πλήρωσης της τεχνητής αμυχής μετά από επώαση κυτταρικών πληθυσμών Vero 24h παρουσία ηλεκτρομαγνητικού (H/M) πεδίου και τοξικού παράγοντα (H₂O₂) έναντι μάρτυρα παρουσία του ίδιου τοξικού παράγοντα (\pm το τυπικό σφάλμα (SE)) από δύο ανεξάρτητα πειράματα, n=2. Οι στήλες magnetic και control εμφανίζονται με αρνητικές τιμές λόγω επέκτασης της τεχνητής αμυχής.

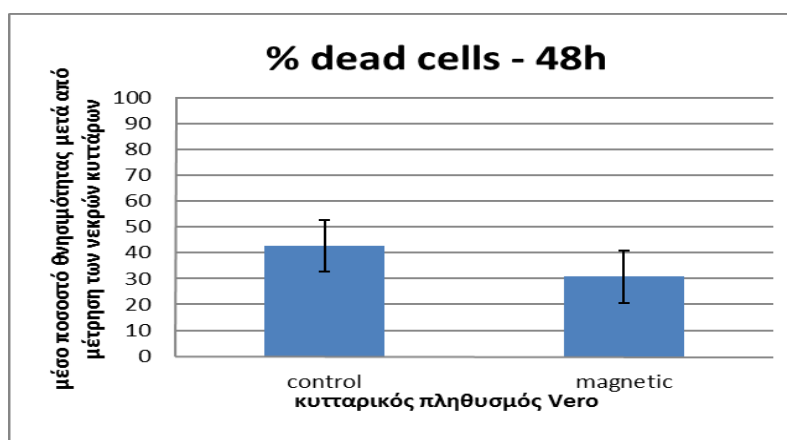
Μετά από 48h ακολούθησε η εκτίμηση της κυτταρικής βιωσιμότητας των κυτταρικών πληθυσμών με βάση τη μέθοδο MTT. Το MTT ανάγεται σε σκούρα μωβ χρωστική (φορμαζάνη) από τα ενεργά μιτοχόνδρια των ζωντανών κυττάρων. Η ένταση του χρώματος είναι γραμμικά ανάλογη με την ποσότητα της φορμαζάνης και κατ' επέκταση γραμμικά ανάλογη με τη δραστηριότητα των μιτοχονδριακών ενζύμων και εν τέλει τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων. Ακολουθεί η διαγραμματική απεικόνιση μετά από επεξεργασία των μετρήσεων φασματοφωτομέτρησης των δειγμάτων. Η στήλη magnetic αντιπροσωπεύει την μέση ποσότητα απορρόφησης της φορμαζάνης μετά από 48h υπό την ταυτόχρονη επίδραση τοξικού παράγοντα και H/M πεδίου και η στήλη control υπό την επίδραση τοξικού παράγοντα.



Εικόνα 6.5: Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως η μέση τιμή της ποσότητας απορρόφησης της φορμαζάνης μετά από 48h επώασης του κυτταρικού πληθυσμού Vero με τοξικό παράγοντα (H_2O_2) και ηλεκτρομαγνητικό (H/M) πεδίο έναντι μάρτυρα παρουσία του ίδιου τοξικού παράγοντα (\pm το τυπικό σφάλμα (SE)), $n=2$.

Παρατηρούμε από την τιμή της απορρόφησης της χρωστικής ότι η μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων Vero μετά από 48h μειώθηκε κατά 37% υπό H/M πεδίο έναντι των μαρτύρων. Οι διαφορές των μέσων όρων δεν εμφανίζονται στατιστικά σημαντικά βάσει του t-test, ($p\text{-value}=0,92$, $\alpha=0,05$). Η ταυτόχρονη παρουσία H/M πεδίου ίσως να συνέβαλλε στην επιπλέον αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης. *Σημείωση:* Στα δείγματα υπό H/M πεδίο (magnetic) υπολογίσαμε μεγάλη τυπική απόκλιση σε σχέση με τους μάρτυρες, λόγω αστοχίας του δείγματος magnetic2.

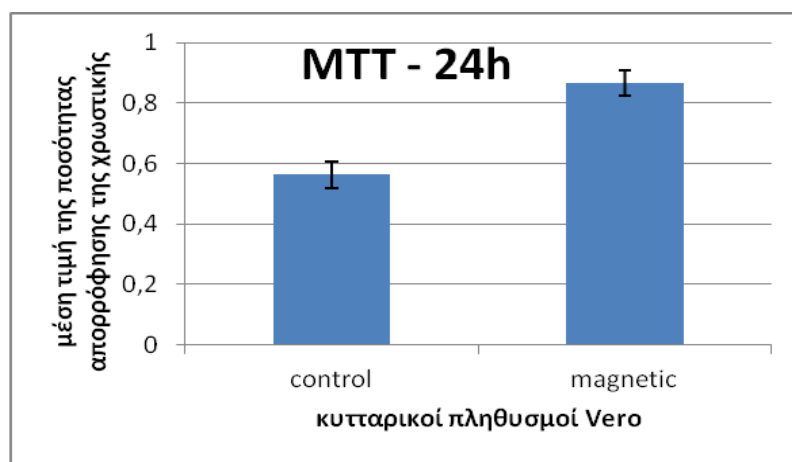
Με τη μέθοδο trypan blue υπολογίστηκε το ποσοστό θνησιμότητας των κυττάρων Vero μετά από 48h. Ο προσδιορισμός του ποσοστού θνησιμότητας έγινε με μικροσκοπική μέτρηση των κυττάρων στο αιμοκυτταρόμετρο μετά από χρώση με trypan blue. Τα ζωντανά κύτταρα δεν χρωματίζονται, ενώ τα νεκρά και όσα έχουν υποστεί βλάβες εμφανίζονται με μπλε χρώμα. Παρουσιάζεται η επί τοις εκατό θνησιμότητα των κυττάρων μετά από 48h επώασης με τοξικό παράγοντα και H/M πεδίο. Κατόπιν του υπολογισμού του μέσου ποσοστού θνησιμότητας φάνηκε να είναι μεγαλύτερο στους μάρτυρες (control) κατά 38% έναντι των magnetic. Τα αποτελέσματα (t-test) σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$ δεν εμφανίζονται στατιστικά σημαντικά, $p\text{-value}=0,49$.



Εικόνα 6.4: Το αποτέλεσμα εκφράζει το μέσο ποσοστό θνησιμότητας μετά από 48h επώασης κυτταρικού πληθυσμού Vero παρουσία ηλεκτρομαγνητικού (H/M) πεδίου και τοξικού παράγοντα (H_2O_2) έναντι μάρτυρα παρουσία του ίδιου τοξικού παράγοντα (\pm το τυπικό σφάλμα (SE)), $n=2$.

6.3. Έλεγχος της κυτταρικής βιωσιμότητας πληθυσμών Vero υπό επίδραση του ηλεκτρομαγνητικού (H/M) πεδίου με τη μέθοδο MTT σε 24h

Στη συνέχεια προκειμένου να εκτιμηθεί η κυτταρική βιωσιμότητα Vero παρουσία H/M πεδίου σε χρόνο 24h εφαρμόστηκε η μέθοδος MTT. Ο αριθμός των δειγμάτων ήταν οχτώ με τα μισά να έχουν επωαστεί υπό H/M πεδίο (magnetic) και τα υπόλοιπα να αποτελούν τους μάρτυρες (control). Μέσω της μεθόδου αυτής ελέγχθηκε η μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων μετά από μέτρηση της απορρόφησης του σχηματιζόμενου συμπλόκου φορμαζάνης. Η συσκευή επαγωγής H/M πεδίου ήταν τοποθετημένη στην εσωτερική πλευρά του πώματος του πλακιδίου Elisa. Ακολουθεί η διαγραμματική απεικόνιση μετά από επεξεργασία των μετρήσεων.

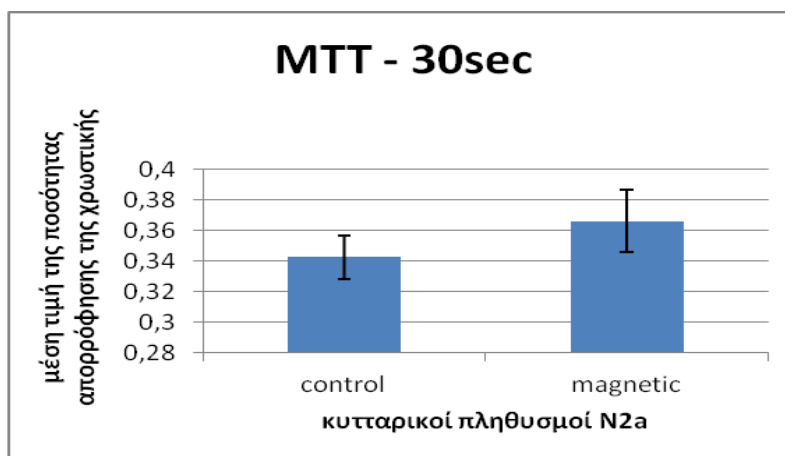


Εικόνα 6.5: Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως η μέση τιμή της ποσότητας απορρόφησης της φορμαζάνης μετά από 24h επώασης κυτταρικού πληθυσμού Vero με H/M πεδίο (\pm το τυπικό σφάλμα (SE)), $n=4$.

Παρατηρήθηκε από τις μετρήσεις ότι η μεταβολική δραστηριότητα κυττάρων Vero παρουσία H/M (magnetic) 24h ήταν αυξημένη κατά περίπου 54% έναντι των μαρτύρων (control). Η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική για $\alpha=0,05$ καθώς και για $\alpha=0,01$, $p\text{-value}=0,0027$, (t-test).

6.4. Μελέτη της κυτταρικής βιωσιμότητας παρουσία ηλεκτρομαγνητικού (H/M) πεδίου σε πληθυσμούς N2a με τη μέθοδο MTT σε χρόνους 30sec και 1h

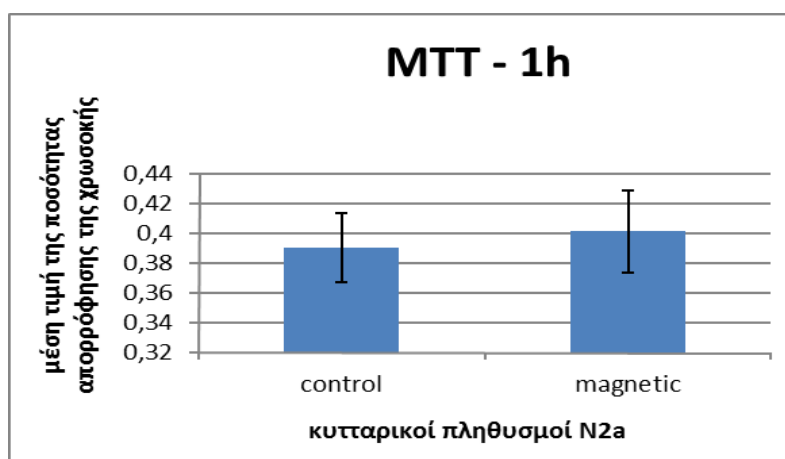
Με την ίδια μέθοδο MTT που ακολουθήσαμε παραπάνω έγινε διερεύνηση του κυτταρικού μεταβολισμού μετά από χρόνους 30sec και 1h έκθεσης H/M πεδίου σε κυτταρικό πληθυσμό νευροβλαστώματος N2a. Ο αριθμός των δειγμάτων είναι 24 με τα μισά υπό την επίδραση του H/M πεδίου (magnetic) και τα υπόλοιπα χωρίς (control). Η συσκευή επαγωγής H/M πεδίου ήταν τοποθετημένη στην εσωτερική πλευρά του πώματος του πλακιδίου Elisa. Αρχικά μετρήθηκε η μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων μετά από 30sec επώασης. Ακολουθεί η διαγραμματική απεικόνιση των μετρήσεων της μέσης ποσότητας απορρόφησης της χρωστικής μετά τη φασματοφωτομέτρηση των δειγμάτων.



Εικόνα 6.6: Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως η μέση τιμή της ποσότητας απορρόφησης της φορμαζάνης μετά από 30sec επώασης κυτταρικού πληθυσμού N2a παρουσία Η/Μ πεδίου (\pm το τυπικό σφάλμα (SE)), $n=12$.

Σύμφωνα με τις μετρήσεις υπολογίστηκε η μέση ποσότητα απορρόφησης του σχηματιζόμενου συμπλόκου φορμαζάνης και βρέθηκε να είναι περίπου 7% μεγαλύτερη στα δείγματα υπό Η/Μ πεδίο (magnetic) σε σχέση με τους μάρτυρες (control). Τα αποτελέσματα σύγκρισης με τον μάρτυρα δεν είναι στατιστικά σημαντικά, p -value=0,34 για $\alpha=0,05$ (t-test). Τα κύτταρα N2a παρουσία Η/Μ πεδίου εμφανίστηκαν ελάχιστα πιο μεταβολικά ενεργά μετά από 30sec.

Ακολουθεί η μέτρηση της μεταβολικής δραστηριότητας σε χρόνο 1h στον ίδιο κυτταρικό πληθυσμό N2a. Από τις μετρήσεις μας δίνεται η παρακάτω διαγραμματική απεικόνιση.



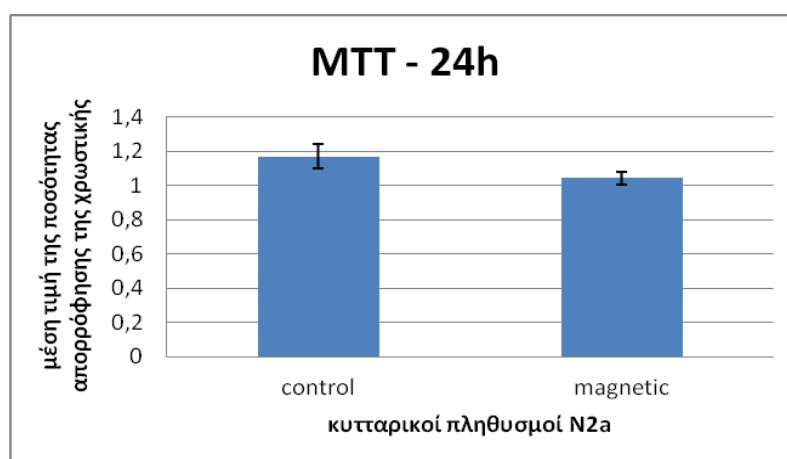
Εικόνα 6.7: Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως η μέση τιμή της ποσότητας απορρόφησης της φορμαζάνης μετά από 1h επώασης κυτταρικού πληθυσμού N2a με ηλεκτρομαγνητικό (Η/Μ) πεδίο (\pm το τυπικό σφάλμα (SE)), $n=12$.

Από τη δεύτερη μέτρηση της μέσης ποσότητας απορρόφησης της φορμαζάνης με την πάροδο 1h τα δείγματα παρουσία Η/Μ πεδίου εμφανίστηκαν αυτή τη φορά πιο μεταβολικά ενεργά κατά 3% σε σχέση με τους μάρτυρες, χωρίς όμως να εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά με τον μάρτυρα για $\alpha = 0,05$. (P -value = 0,76, t-test).

6.5. Μελέτη της επίδρασης ηλεκτρομαγνητικού (H/M) πεδίου σε κύτταρα N2a μετά από 24h επώαση με τη μέθοδο MTT και Trypan blue

Στο πείραμα 5 μελετήθηκε με τη μέθοδο MTT και Trypan blue η επίδραση H/M πεδίου σε κύτταρα N2a μετά από χρόνο 24h. Όπως εξηγήθηκε και στον πειραματικό σχεδιασμό η διαφορά τώρα βρίσκεται στη θέση τοποθέτησης της συσκευής επαγωγής H/M πεδίου, στην κάτω και έξω πλευρά του πλακιδίου Elisa.

Η μέθοδος MTT σύμφωνα με την οποία υπολογίζεται η βιωσιμότητα των κυτταρικών πληθυσμών μέσω των σχηματιζόμενων συμπλόκων φορμαζάνης μετά από 24h επώασης έδωσε το παρακάτω διάγραμμα μετά από επεξεργασία των μετρήσεων.

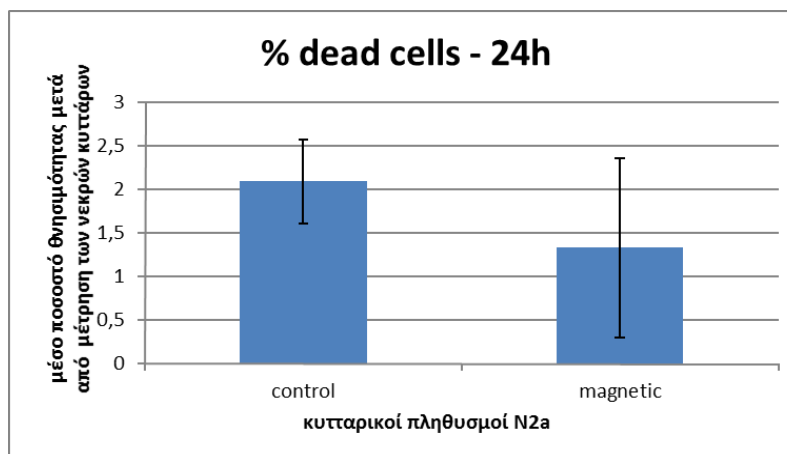


Εικόνα 6.8: Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως η μέση τιμή της ποσότητας απορρόφησης της φορμαζάνης μετά από 24h επώασης κυτταρικού πληθυσμού N2a με H/M πεδίο (\pm το τυπικό σφάλμα (SE)), $n=4$. Η συσκευή H/M πεδίου τοποθετήθηκε στην κάτω και έξω πλευρά του πλακιδίου Elisa.

Παρατηρούμε ότι η αλλαγή θέσης της συσκευής επαγωγής H/M πεδίου επηρέασε τη μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων N2a. Συνολικά τα δείγματα είναι οχτώ, με τα μισά να έχουν επωαστεί υπό H/M πεδίο (magnetic). Σύμφωνα με το ραβδόγραμμα της εικόνας 6.8, οι κυτταρικοί πληθυσμοί magnetic εμφανίστηκαν κατά 11% με μειωμένη μεταβολική δραστηριότητα σε σχέση με τους μάρτυρες (control). Εδώ τα αποτελέσματα λόγω ότι $p\text{-value} = 0,17$ δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0,05$, t-test.

Συνεχίζοντας με τη μέθοδο trypan blue στον ίδιο κυτταρικό πληθυσμό, έγινε μέτρηση των νεκρών κυττάρων N2a μετά από χρωματισμό τους με τη χρωστική του διαλύματος trypan blue. Το ποσοστό θνησιμότητας των κυττάρων υπολογίστηκε με τη μέτρηση χρωματισμένων και μη, κυττάρων στο αιμοκυτταρόμετρο. Τα ζωντανά κύτταρα δεν χρωματίζονται ενώ τα νεκρά και όσα έχουν υποστεί βλάβες εμφανίζονται με μπλε χρώμα. Παρουσιάζεται η επί τοις εκατό θνησιμότητα των κυττάρων N2a σε δύο στήλες, η μία μετά από 24h επώασης H/M πεδίου (magnetic) και η άλλη στήλη χωρίς την επίδραση (control) στο παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 6.9).

Με την ολοκλήρωση και της πειραματικής διαδικασίας trypan blue παρατηρούμε ότι το ποσοστό θνησιμότητας είναι μεγαλύτερο 58% στους μάρτυρες (control) έναντι των πληθυσμών υπό επίδραση H/M πεδίου. Τα αποτελέσματα έρχονται σε αντίθεση με τις μετρήσεις μέσω της μεθόδου MTT που διαπιστώθηκε μεγαλύτερη μεταβολική δραστηριότητα (μεγαλύτερος αριθμός ζωντανών κυττάρων) στους μάρτυρες (control). Επειδή $p\text{-value}=0,53$ οι διαφορές των δύο μέσων δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$, t-test.

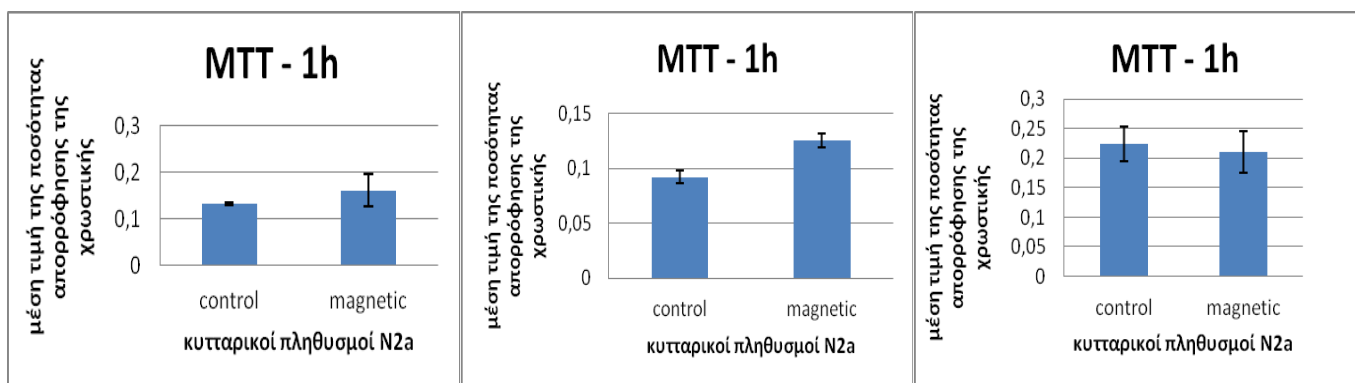


Εικόνα 6.9: Το αποτέλεσμα παρουσιάζεται ως το μέσο ποσοστό θνησιμότητας μετά από 24h επώασης κυτταρικού πληθυσμού N2a παρουσία Η/Μ πεδίου (\pm το τυπικό σφάλμα (SE)), $n=4$. Η θέση της συσκευής επαγωγής Η/Μ πεδίου βρίσκεται στην εξωτερική και κάτω πλευρά του πλακιδίου ακινητοποίησης των κυττάρων.

6.6. Μελέτη της επίδρασης ηλεκτρομαγνητικού (Η/Μ) πεδίου σε κύτταρα N2a μετά από χρόνους 1h, 1,5h και 24h επώασης με τη μέθοδο MTT και Trypan blue

Στα ακόλουθα τρία πειράματα μελετήθηκε η κυτταρική βιωσιμότητα κυττάρων N2a με τη μέθοδο MTT και trypan blue μετά από επώαση Η/Μ πεδίου σε χρόνους 1h, 1,5h και 24h. Η συσκευή επαγωγής Η/Μ πεδίου είναι τοποθετημένη στην εσωτερική πλευρά του πώματος του πλακιδίου Elisa.

Μετά από 1h επώαση κυττάρων N2a παρουσία Η/Μ υπολογίζεται η μεταβολική δραστηριότητα φασματοφωτομετρικά με τη μέθοδο MTT. Στη διαγραμματική απεικόνιση που ακολουθεί βλέπουμε τις μετρήσεις των δειγμάτων (συνολικά οχτώ) μετά από επώαση των μισών υπό Η/Μ πεδίο (magnetic) και των υπολοίπων τεσσάρων να αποτελούν τους μάρτυρες (control). Η ένταση του χρώματος απορρόφησης της χρωστικής είναι γραμμικά ανάλογη με τη δραστηριότητα των μιτοχονδριακών ενζύμων και εν τέλει του αριθμού των ζωντανών κυττάρων. Ακολουθούν οι διαγραμματικές απεικονίσεις σε χρόνο 1h από τις τρεις πειραματικές προσπάθειες του 6^{ου}, 7^{ου}, 8^{ου} πειράματος αντίστοιχα.

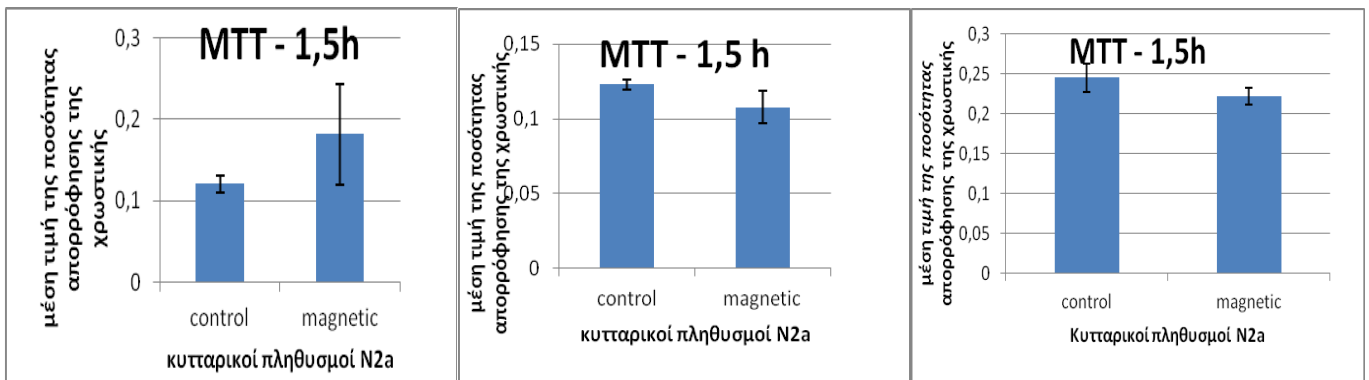


Εικόνα 6.10: Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως η μέση τιμή της ποσότητας απορρόφησης της φορμαζάνης μετά από 1h επώασης κυτταρικού πληθυσμού N2a με Η/Μ πεδίο (\pm το τυπικό σφάλμα (SE)), $n=4$. Τρεις επαναλήψεις με την ίδια πειραματική διαδικασία.

Παρατηρούμε ότι στα δύο πρώτα διαγράμματα του 6^{ου} και 7^{ου} πειράματος η μεταβολική δραστηριότητα ήταν αυξημένη στα δείγματα παρουσία Η/Μ πεδίου (magnetic) κατά περίπου 21% (p -value=0,42, για επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$ δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους τα δείγματα magnetic και

control, t-test) και 36% στους κυτταρικούς πληθυσμούς magnetic αντίστοιχα (p -value=0,0087, για επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$ παρουσιάσουν στατιστική σημαντική διαφορά μεταξύ τους τα δείγματα magnetic και control, t-test). Αντιθέτως στο τελευταίο (8^ο) η διαφορά αντιστρέφεται και βλέπουμε μεγαλύτερη μεταβολική δραστηριότητα κατά 10% στους μάρτυρες (control), p -value=0,77, για επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$ δεν παρουσιάσουν στατιστική σημαντική διαφορά μεταξύ τους, t-test.

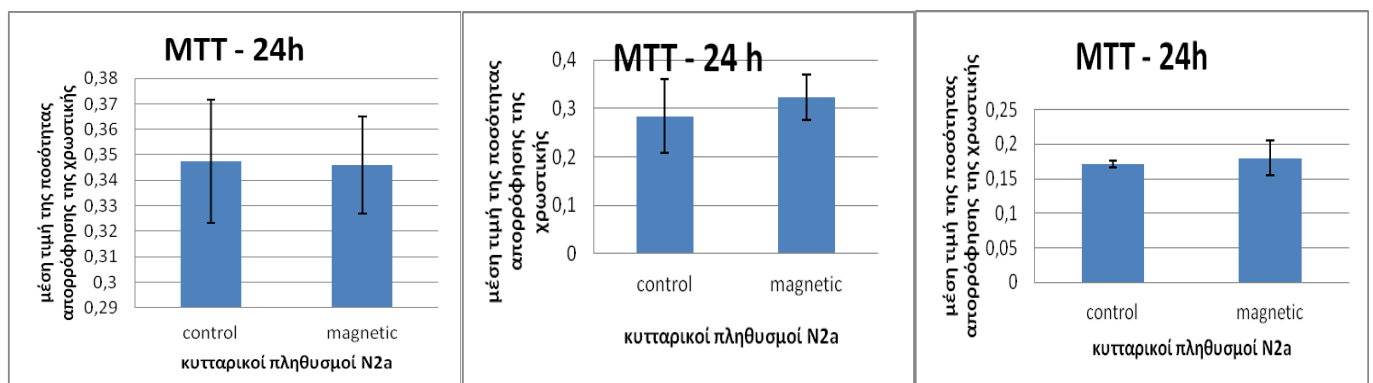
Ακολουθούν οι μετρήσεις με τη μέθοδο MTT για τη χρονική διάρκεια 1,5h. Σύμφωνα με τις μέσες τιμές απορρόφησης ποσοτήτων φορμαζάνης έχουμε τα ακόλουθα διαγράμματα των τριών πειραματικών προσπαθειών.



Εικόνα 6.11: Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως η μέση τιμή της ποσότητας απορρόφησης της φορμαζάνης μετά από 1,5h επώασης κυτταρικού πληθυσμού N2a με H/M πεδίο (\pm το τυπικό σφάλμα (SE)), $n=4$. Τρεις επαναλήψεις με την ίδια πειραματική διαδικασία.

Παρατηρούμε ότι μετά την πάροδο 1,5 ώρας στο πρώτο διάγραμμα (6^ο πείραμα) έχουμε μια αύξηση της ποσότητας φορμαζάνης 50% στα δείγματα magnetic έναντι των μαρτύρων. Στατιστικά δεν παρουσιάζουν σημαντική διαφορά οι δύο μέσοι όροι αφού p -value=0,37 για $\alpha=0,05$, t-test. Στα επόμενα δύο η αύξηση της μέσης ποσότητας φορμαζάνης αντιστρέφεται και είναι 14% μεγαλύτερη (7^ο) στα δείγματα των μαρτύρων έναντι των δειγμάτων υπό H/M πεδίο (p -value=0,23, για $\alpha=0,05$ δεν είναι στατιστική η διαφορά των μέσων όρων, t-test) και κατά 9% αντίστοιχα στο 8^ο πείραμα (δεν εμφανίζονται στατιστικά σημαντικά οι διαφορές των μέσων όρων αφού p -value=0,3 για $\alpha=0,05$, t-test).

Τέλος ακολουθούν οι μετρήσεις με τη μέθοδο MTT για τη χρονική διάρκεια 24h. Σύμφωνα με τις μετρήσεις απορρόφησης ποσοτήτων φορμαζάνης έχουμε τα ακόλουθα διαγράμματα των τριών πειραματικών προσπαθειών με το πέρασμα μια ημέρας.

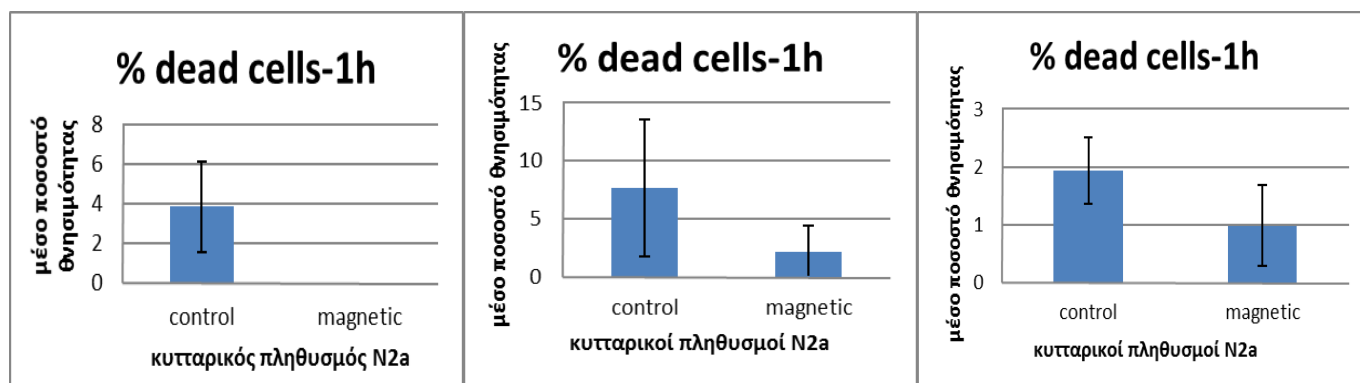


Εικόνα 6.12: Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως η μέση τιμή της ποσότητας απορρόφησης της φορμαζάνης μετά από 24h επώασης κυτταρικού πληθυσμού N2a με H/M πεδίο (\pm το τυπικό σφάλμα (SE)), $n=4$. Τρεις επαναλήψεις με την ίδια πειραματική διαδικασία.

Μετά την πάροδο 24h επώασης υπό Η/Μ πεδίο (6^ο πείραμα) οι μάρτυρες έχουν κατά 0,3% αύξηση της ποσότητας φορμαζάνης (p-value=0,96 για $\alpha=0,05$ δεν εμφανίζονται στατιστικά σημαντικά οι διαφορές των μέσων όρων, t-test) ενώ αντιθέτως στο 7^ο (p-value=0,96 για $\alpha=0,05$ δεν εμφανίζονται στατιστικά σημαντικά οι διαφορές των μέσων όρων, t-test) και 8^ο πείραμα (p-value =0,66 για $\alpha=0,05$ δεν εμφανίζονται πάλι στατιστικά σημαντικά οι διαφορές των μέσων όρων, t-test) τα δείγματα magnetic υπερτερούν κατά 14% και 6% αντίστοιχα έναντι των δειγμάτων control.

Ακολούθως η μέθοδος trypan blue βοήθησε στον υπολογισμό της κυτταρικής θνησιμότητας μετά από 1h, 1,5h και 24h. Ο προσδιορισμός του ποσοστού θνησιμότητας των κυττάρων N2a έγινε μετά από μέτρηση των νεκρών-χρωματισμένων κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο. Τα ζωντανά κύτταρα δεν χρωματίζονται, ενώ τα νεκρά και όσα έχουν υποστεί βλάβες εμφανίζονται με μπλε χρώμα. Παρουσιάζεται η επί τοις εκατό θνησιμότητα των κυττάρων μετά από 1h, 1,5h και 24h επώασης Η/Μ πεδίου με διαγραμματική απεικόνιση.

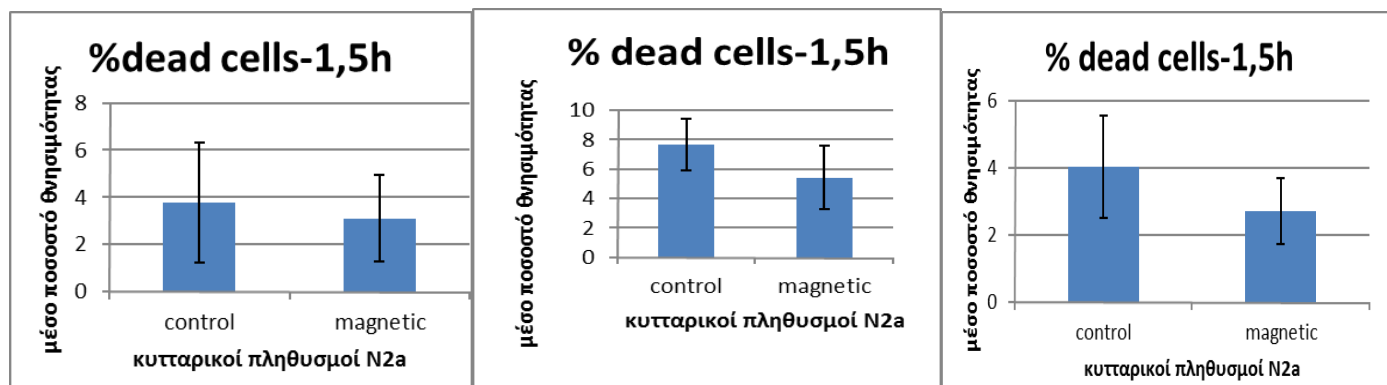
Παρακάτω βλέπουμε τα διαγράμματα από μετρήσεις του μέσου ποσοστού θνησιμότητας στην διάρκεια 1h παρουσίας ηλεκτρομαγνητικού (Η/Μ) πεδίου.



Εικόνα 6.13: Το αποτέλεσμα παρουσιάζεται ως το ποσοστό θνησιμότητας μετά από 1h επώασης κυτταρικού πληθυσμού N2a παρουσία ηλεκτρομαγνητικού (Η/Μ) πεδίου (\pm το τυπικό σφάλμα (SE)), n=4. Τρεις επαναλήψεις με την ίδια πειραματική διαδικασία.

Σύμφωνα με τις μετρήσεις του 6^{ου} πειράματος το ποσοστό θνησιμότητας στα κύτταρα N2a παρουσία Η/Μ πεδίου (%magnetic) ήταν μηδενική μετά από 1h, σε επίπεδο σημαντικότητα $\alpha = 0,05$ δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά των μέσων όρων (p-value = 0,14, t-test). Ακολούθως στο 7^ο και 8^ο πείραμα το ποσοστό θνησιμότητας στους μάρτυρες (control) έναντι των δειγμάτων υπό την επιρροή του Η/Μ πεδίου παρουσίασε αύξηση κατά 250% (με p-value=0,42, σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$ δεν εμφανίζονται με στατιστική διαφορά οι δύο μέσοι όροι, t-test) και 95% (p-value=0,34, σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$ πάλι δεν εμφανίζονται στατιστικά σημαντική η διαφορά των μέσων όρων) αντίστοιχα. Και στις τρεις προσπάθειες τα αποτελέσματα συμφωνούν ότι η επίδραση Η/Μ πεδίου ενίσχυσε τη βιωσιμότητα των κυτταρικών πληθυσμών κατά σημαντικό ποσοστό.

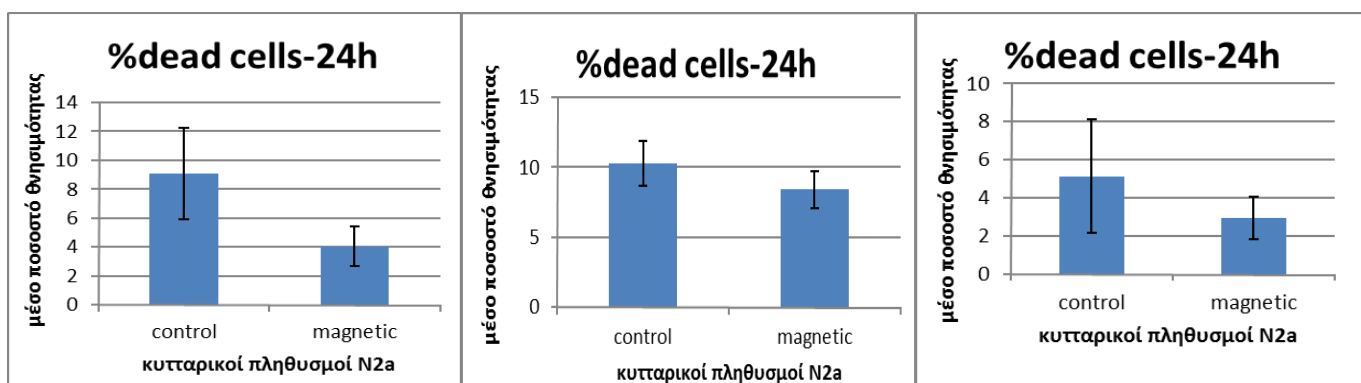
Συνεχίζοντας λαμβάνουμε τις μετρήσεις στην διάρκεια 1,5h ώστε να διαπιστώσουμε αλλαγές στη δράση του Η/Μ πεδίου. Σύμφωνα με τις τρεις επαναλήψεις των πειραμάτων μας ακολουθούν τα παρακάτω διαγράμματα.



Εικόνα 6.14: Το αποτέλεσμα παρουσιάζεται ως το ποσοστό θνησιμότητας μετά από 1,5h επώασης κυτταρικού πληθυσμού N2a παρουσία Η/Μ πεδίου (\pm το τυπικό σφάλμα (SE)) $n=8$. Τρεις επαναλήψεις με την ίδια πειραματική διαδικασία.

Μετά από 1,5h παρουσία Η/Μ πεδίου στο 6^ο, 7^ο και 8^ο πείραμα είχαμε παρόμοια αποτελέσματα με τη διάρκεια 1h που μελετήθηκε προηγουμένως. Οι κυτταρικοί πληθυσμοί που αποτελούσαν τους μάρτυρες (control) εμφανίστηκαν με αυξημένο ποσοστό νεκρών κυττάρων. Έτσι σύμφωνα με τα αποτελέσματα του 6^{ου} πειράματος το ποσοστό θνησιμότητας των μαρτύρων (control) ήταν κατά 21% αυξημένο έναντι των πληθυσμών υπό Η/Μ πεδίο (p -value=0,6, με $\alpha=0,05$ δεν είναι στατιστικά σημαντική η διαφορά) ενώ στο 7^ο (p -value=0,75, με $\alpha=0,05$ πάλι δεν είναι στατιστικά σημαντική η διαφορά) και 8^ο πείραμα (p -value=0,49, με $\alpha=0,05$ δεν είναι στατιστικά σημαντική η διαφορά) αυτό το ποσοστό αύξησης κυμάνθηκε 41% και 48% αντίστοιχα.

Τέλος μετά από 24h επώασης παρουσία Η/Μ πεδίου ακολουθούν τα επόμενα διαγράμματα του 6^{ου}, 7^{ου} και 8^{ου} πειράματος του ποσοστού θνησιμότητας.



Εικόνα 6.15: Το αποτέλεσμα παρουσιάζεται ως το ποσοστό θνησιμότητας μετά από 24h επώασης κυτταρικού πληθυσμού N2a παρουσία Η/Μ πεδίου (\pm το τυπικό σφάλμα (SE)) $n=8$. Τρεις επαναλήψεις με την ίδια πειραματική διαδικασία.

Παρατηρώντας τις μετρήσεις μας στο 6^ο πείραμα μετά από 24h επώασης το κυτταρικό ποσοστό θνησιμότητας του μάρτυρα (control) εμφανίστηκε με αύξηση 120% σε σχέση με τα δείγματα παρουσία Η/Μ πεδίου (magnetic). Η διαφορά των μέσων δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά διότι p -value=0,2, για $\alpha=0,05$, t-test. Στο 7^ο πείραμα η αύξηση αυτή ήταν 22% (p -value=0,4, σε $\alpha=0,05$ δεν είναι στατιστική η διαφορά των μέσων όρων, t-test) και στο 8^ο πείραμα 75% (p -value=0,51, πάλι σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$ δεν είναι στατιστική η διαφορά των μέσων όρων, t-test). Αν και η αύξηση της κυτταρικής θνησιμότητας των μαρτύρων παρουσιάστηκε με διακύμανση τιμών κατά την μέτρηση των τριών

πειραματικών προσπαθειών, συμφωνούν στο ότι η επίδραση του Η/Μ πεδίου ενίσχυσε την κυτταρική βιωσιμότητα.

7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η σημερινή έρευνα εξωγενούς Η/Μ πεδίου *in vitro* έχει αποδώσει μια πληθώρα στοιχείων με πολλά αντικρουόμενα συμπεράσματα. Πολλά ερωτήματα που έχουν τεθεί εδώ και δεκαετίες παραμένουν ακόμα αδιευκρίνιστα, όπως επί παραδείγματι, η διαφορετική αντίδραση ίδιων κυτταρικών πληθυσμών υπό διάφορες συχνότητες και χρόνους έκθεσης ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας. Ακόμα δεν έχουν εξακριβωθεί από την επιστημονική κοινότητα οι βραχυπρόθεσμες ή οι μακροπρόθεσμες επιδράσεις της Η/Μ ενέργειας σε βιολογικά συστήματα. Τα πολλά αντικρουόμενα και αντιφατικά πειραματικά αποτελέσματα με ελλιπή συσχέτιση περιορίζουν τα κοινώς αποδεκτά από τους επιστήμονες [Kamal et al., 2012].

Η αδυναμία της μη επανάληψης των αποτελεσμάτων μιας πειραματικής έρευνας αποδίδεται σε παράγοντες όπως ο χρόνος έκθεσης, η ένταση και η συχνότητα της ακτινοβολίας, το είδος (στατικό ή εναλλασσόμενο) του πεδίου και το είδος της κυματομορφής έκθεσης. Επιπλέον η διαφοροποίηση των αποτελεσμάτων οφείλεται και στη βιολογική κατάσταση και το είδος των κυττάρων. Οι επιστημονικές έρευνες των προηγούμενων δεκαετιών είχαν εστιάσει το ενδιαφέρον τους σε Η/Μ πεδία χαμηλών συχνοτήτων κυρίως λόγω της πολυπλοκότητας κατασκευής συσκευών επαγωγής για υψηλότερες συχνότητες. Η επιλογή του συστήματος επαγωγής ηλεκτρομαγνητισμού σε *in vitro* μελέτες είναι καθοριστικός παράγοντας, δεδομένου ότι ρυθμίζει τον ρυθμό ειδικής απορρόφησης (SAR), δηλαδή την ενέργεια που απορροφάται από το βιολογικό σύστημα και την ομοιογένεια της ακτινοβολούμενης δόσης. Απαιτείται για αξιόπιστα αποτελέσματα να έχει μελετηθεί λεπτομερώς το σύστημα επαγωγής και οι συνθήκες κάτω από τις οποίες εκτελούνται οι μετρήσεις.

Στην πειραματική μας προσπάθεια έγινε μια αρχική εκτίμηση της επίδρασης ενός παλμικού Η/Μ πεδίου 27,21 MHz *in vitro*. Το συγκεκριμένο μήκος κύματος χρησιμοποιείται σε πολλές κλινικές εφαρμογές με θετικά αποτελέσματα στην αποκατάσταση βλαβών του αρθρικού χόνδρου [Hinman et al., 2002]. Το υπό μελέτη μήκος κύματος ανήκει στις ραδιοσυχνότητες (RF), όπου αποτελεί και το πιο καλά μελετημένο μήκος από τους ερευνητές. Αρκετές μελέτες πάνω σε υψηλές συχνότητες Η/Μ πεδίου δείχνουν ότι μπορούν να επέμβουν στον ομοιοστατικό μηχανισμό των κυττάρων [Tokalov and Gutzeit, 2004], ή στη βελτίωση της πρωτεϊνοσύνθεσης (το μαγνητικό πεδίο αλλάζει την ιοντική κατανομή της κυτταρικής μεμβράνης επηρεάζοντας σηματοδοτικά μονοπάτια) [Dimberg, 1995]. Επίσης έχουν αποδοθεί θετικά αποτελέσματα και στη μεταβολική δραστηριότητα κυττάρων καθώς και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό [Ciombor et al., 2002, Fiovani et al., 2002, Indouraine et al., 2001].

Μέχρι σήμερα δεν έχει διευκρινιστεί η ακριβής δράση του παλμικού Η/Μ πεδίου (PEMFs) σε κυτταρικούς πληθυσμούς. Υπάρχει περιορισμένος αριθμός μελετών από PEMFs σε κύτταρα και ακόμα μικρότερος σε πληθυσμούς μη οστεοβλαστικών κυττάρων [Lohman et al., 2000, 2003, Diniz et al., 2002, Sakai et al., 2006, Selvamurugan et al., 2007]. Οι Diniz et al. [2002] υπέδειξαν με χρήση PEMF σε πρώιμα στάδια οστεοβλαστικών κυττάρων την επιτάχυνση της κυτταρικής διαφοροποίησης και του πολλαπλασιασμού. Το ίδιο αποτέλεσμα συμπέραιναν και οι Chang et al. [2004]. Επιπρόσθετα σε καλλιέργεια χονδροκυττάρων διαπιστώθηκε ότι το χαμηλής συχνότητας και έντασης PEMF διεγείρει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό κατά τις πρώτες έξι ημέρες. Αντιθέτως, όταν εφαρμόστηκε PEMF υψηλής συχνότητας η διέγερση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού περιορίστηκε στις τρεις πρώτες μέρες. Επιπλέον, το PEMF (75 Hz, 2.3 mT) με χρονική παλμική διάρκεια 1.3 ms μπορεί να βοηθήσει στην αποθεραπεία αρθρικού χόνδρου μετά από μεταμόσχευση αυτόλογων χονδροκυττάρων [Kamal, 2012].

Το υπό μελέτη μήκος κύματος, από θεωρητικές και πειραματικές μελέτες, ανήκει στη μη ιονίζουσα ακτινοβολία και είναι γνωστό ότι είναι αδύνατο να προκαλέσει άμεσα διάσπαση του DNA. Θεωρητικά, τα ραδιοκύματα (RF) επηρεάζουν έναν μεγάλο αριθμό από κυτταρικά στοιχεία, κυτταρικές διεργασίες και

κυτταρικά συστήματα. Αυτός είναι και ο λόγος που η επιστημονική έρευνα έχει επικεντρωθεί στη λειτουργία της κυτταρικής μεμβράνης, στη γονιδιακή έκφραση και στα σηματοδοτικά μονοπάτια. Μια σειρά από μελέτες που δημοσιεύθηκαν από τους Sarkar et al, [1994] και τους Lai and Singh [1995, 1996], ανέφεραν ότι το PEMF 2,45 GHz σε εγκεφαλικά κύτταρα ποντικού συντελούσε σε ρήξη του DNA και δρούσε ανασταλτικά κατά τη διάρκεια επιδιόρθωσης. Η βλάβη του DNA, όπως είναι γνωστό, είναι το πρωταρχικό βήμα καρκινογένεσης και νευροεκφυλιστικών ασθενειών.

Μια σημαντική παράμετρος που μελετάται συχνά είναι η αλλαγή της κυτταρικής πολλαπλασιαστικής ικανότητας υπό στρεσογόνο κατάσταση. Όσον αφορά την έρευνα σε επίδραση Η/Μ ακτινοβολίας υψηλών συχνοτήτων πάνω στον ρυθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού δεν έχουν αποδοθεί ξεκάθαρα συμπεράσματα. Οι Cleary et al [1996] μετά από έκθεση 2,45 GHz (SAR>25 W/kg) σε κυτταρική σειρά T-λεμφοκυττάρων διαπίστωσαν σημαντική αύξηση του αριθμού των κυττάρων, σε αντίθεση με τους Vijayalaxmi et al [2001] που δεν παρατήρησαν κάποια διαφορά στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, είτε με συνεχή έκθεση στα 2,45 GHz (12.5 W/kg SAR) είτε με διακοπτόμενη στα 847,74 MHz (SAR≈5 W/kg). Επίσης, οι Carpi et al [2004a, 2004b] δεν πέτυχαν καμία σημαντική διαφορά στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ούτε στην απόπτωση ούτε στο μιτοχονδριακό μεμβρανικό δυναμικό μετά από έκθεση 900 MHz σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα.

Επιστήμονες εδώ και χρόνια υπέθεταν ότι η αύξηση της θερμοκρασίας μετά από έκθεση Η/Μ ήταν η μόνη αλλαγή που παρατηρούνταν [Adair and Black, 2003, Tuschl et al., 2006]. Παρά ταύτα υπάρχουν κάποιες μελέτες που επισημαίνουν έναν σημαντικό αριθμό κυτταρικών δραστηριοτήτων υπό σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας ύστερα από ακτινοβολία ραδιοσυχνότητας [Pacini et al., 2002, Lee et al., 2005, Nikolova et al., 2005, Del Vecchio et al., 2009]. Οι Velizarov et al., [1999] ισχυρίστηκαν ότι μετασχηματισμένα επιθηλιακά κύτταρα κάτω από ακτινοβολία 960 MHz σε διάφορες εντάσεις και χρονικές περιόδους μετέβαλλαν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό τους χωρίς να παρατηρηθεί αλλαγή στη θερμοκρασία.

Οι υψηλές συχνότητες έχουν ξεκινήσει να χρησιμοποιούνται και σε ιατρικές εφαρμογές, όπως στην αποκατάσταση καταγμάτων και στην καταπολέμηση καρκινικών όγκων [Wu et al., 2006, Van Wieringen et al., 2009, Franckena et al., 2009]. Ο Warren [1933] ήταν από τους πρώτους που εφάρμοσε υψηλές και υπέρυθρες συχνότητες Η/Μ ενέργειας στην καταπολέμηση καρκίνου. Με την πάροδο των χρόνων και την καλύτερη κατανόηση της Η/Μ θεωρίας η αντιμετώπιση καρκινικών κυττάρων μέσω έκθεσης Η/Μ ενέργειας έγινε περισσότερο αποδεκτή. Η Η/Μ ενέργεια μικροκυματικών και υψηλών συχνοτήτων μπορεί να προκαλέσει τοπικά ελεγχόμενη αύξηση της θερμοκρασίας με στόχο τη θανάτωση καρκινικών κυττάρων [Storm, 1981].

Τα καρκινικά κύτταρα σε θερμοκρασία 41-45 °C παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία σε σχέση με τα φυσιολογικά. Σε μοντέλα *in vitro* και *in vivo* έχει καταγραφεί μη αναστρέψιμη κυτταρική βλάβη και περιορισμός της αύξησης του καρκινικού όγκου σε θερμοκρασία 42-45 °C. Αντιθέτως, τα φυσιολογικά κύτταρα θανατώνονταν όταν αυξάνονταν η θερμοκρασία μετά από έκθεση Η/Μ κατά έναν τουλάχιστον επιπλέον βαθμό (σε σχέση με τα καρκινικά) και σε διπλάσια χρονική διάρκεια έκθεσης. Αυτό συνέβαινε λόγω του γεγονότος ότι τα καρκινικά κύτταρα καθίστανται αρκετά ευπαθή υπό αυξημένη θερμοκρασία λόγω περιορισμένης οξυγόνωσης.

Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να επηρεαστούν από συχνότητες δεκάδων έως εκατοντάδων MHz και χωρίς να δημιουργηθεί θερμικό φαινόμενο [Holt, 1977]. Αυξανόμενος αριθμός μελετών έρχονται να ενισχύσουν την αντικαρκινική δράση Η/Μ ενέργειας σε συγκεκριμένο «παράθυρο» συχνοτήτων, εξηγώντας όμως μονομερώς τις βιολογικές αλλαγές. Αυτή η διαφοροποίηση στο συγκεκριμένο «παράθυρο» συχνοτήτων, αν και δεν έχει αναλυθεί μέχρι τώρα, μπορεί να οφείλεται σε αλλαγή της ηλεκτρικής αγωγιμότητας καρκινικών κυττάρων λόγω φαινομένων συντονισμού με την Η/Μ ενέργεια [Holt and Nelson, 1985, Holt, 1988, Trotter et al., 1996, Holt, 1997, Kirson et al., 2004].

Στην παρούσα εργασία οι δύο κυτταρικές σειρές που πειραματιστήκαμε προέρχονται από διαφορετικούς ιστούς και διαφορετικής παθογένειας, τα καρκινικά κύτταρα νευροβλαστώματος (N2a) και τα φυσιολογικά αθανατοποιημένα κύτταρα ινοβλαστών από νεφρό (Vero), ώστε τα αποτελέσματα να βοηθήσουν στη μελέτη με βάση τον ιστό και τη βιολογική κατάσταση των κυτταρικών σειρών. Οι Sabo et al. [2002] επισήμαναν ότι η επίδραση H/M ακτινοβολίας εξαρτάται από το είδος των κυτταρικών πληθυσμών.

Στην πειραματική μας προσπάθεια, μελετήθηκε η αλλαγή στην πολλαπλασιαστική και μεταβολική ικανότητα καθώς και το ποσοστό θνησιμότητας των κυττάρων που πιθανόν να οφείλονται στο συγκεκριμένο H/M πεδίο. Οι μέθοδοι που βοήθησαν στην εκτίμηση της βιωσιμότητάς τους το MTT και η trypan blue δεν συμφωνούσαν πάντα μεταξύ τους σε κάθε πειραματική προσπάθεια. Το MTT είναι μια έμμεση μέθοδος που στηρίζεται σε μετρήσεις απορρόφησης και μετράει μεταβολική δραστηριότητα που δεν συνδέεται απαραίτητα με τη βιωσιμότητα. Ενώ γενικά θεωρείται ότι η οπτική απορρόφηση στη μέθοδο MTT είναι ευθέως ανάλογη με τη βιωσιμότητα των κυττάρων, η σχέση που συνδέει απορρόφηση με επιβίωση μπορεί να μην είναι απόλυτα γραμμική [Riss, 2014]. Μερικά κύτταρα μπορεί να είναι υγιή, αλλά με περιορισμένη μεταβολική δραστηριότητα. Η ευαισθησία της μεθόδου ρυθμίζεται από την εκάστοτε κατάσταση των κυττάρων, τον αριθμό των κυττάρων καθώς και του μέσου καλλιέργειας [Nikzad et al., 2014].

Αρχικά η εργασία επικεντρώθηκε στη μελέτη της μαζικής μετανάστευσης ινοβλαστοκυττάρων Vero. Εφαρμόστηκε μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική, η βιοδοκιμή προσομοίωσης τραύματος δι' αμυχής (scratch-wound assay). Μετά από 24h το H/M πεδίο σε κύτταρα ινοβλαστών Vero διέγειρε κατά ένα πολύ μικρό ποσοστό (1,5%) τη μετανάστευση ή τον πολλαπλασιασμό των κυτταρικών πληθυσμών. Όταν προκαλέσαμε στρεσογόνο περιβάλλον στα κύτταρα υπό παρουσία τοξικού παράγοντα (H_2O_2) και με την πάροδο 24h, το H/M πεδίο συνέβαλλε ελάχιστα (11%) χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά στην επέκταση της τεχνητής αμυχής. Ίσως η επιπρόσθετη παρουσία ενός H/M πεδίου να προκάλεσε την επιπλέον θανάτωση κυτταρικών πληθυσμών. Αν και τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές, βλέπουμε ότι ίσως το H/M πεδίο να ευθύνεται είτε για διέγερση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των Vero (στην πρώτη περίπτωση), είτε για αναστολή της ανάπτυξής τους ή και θανάτωση (στη δεύτερη περίπτωση με την επιπρόσθετη επιρροή τοξικού παράγοντα). Ωστόσο με τη μέθοδο scratch-wound assay δεν διευκρινίζεται κατά πόσο το αποτέλεσμα οφείλεται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ή απλώς στην κινητικότητα των κυττάρων.

Σύμφωνα με τη μέτρηση της μεταβολικής δραστηριότητας (MTT) η ταυτόχρονη δράση H/M πεδίου και τοξικού παράγοντα μείωσε τη μεταβολική δραστηριότητα των κυτταρικών πληθυσμών μετά από 48h κατά 37%. Όταν όμως μετρήθηκε ο αριθμός των νεκρών κυττάρων το ποσοστό θνησιμότητας ήταν αυξημένο στους μάρτυρες κατά 38%. Τα αποτελέσματα της μεθόδου MTT δεν επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα της δοκιμασίας με το trypan blue. Ενώ η διεύρυνση της τεχνητής αμυχής ίσως να φανερώνει μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα υπό την επίδραση H/M πεδίου, τα αποτελέσματα όμως δεν ήταν σύμφωνα όταν καταμετρήθηκε ο αριθμός των νεκρών κυττάρων σε 48h. Και στις δύο περιπτώσεις η στατιστική ανάλυση δεν έδωσε σημαντικές διαφορές.

Προχωρώντας στη μελέτη πάλι με κύτταρα ινοβλαστών Vero μετά από 24h επώασης παρουσία H/M πεδίου, βελτιώθηκε κατά το ήμισυ περίπου (54%) η μεταβολική δραστηριότητα με σημαντική στατιστική διαφορά. Ίσως λοιπόν η ηλεκτρομαγνητική ενέργεια του πεδίου να προώθησε τα κύτταρα σε επιπλέον μεταβολική ενεργότητα. Όταν μελετήθηκε πάνω σε κύτταρα νευροβλαστώματος N2a σε περιορισμένα χρονικά διαστήματα των 30sec και 1h είχαμε πάλι κάποια συμφωνία. Τα δείγματα υπό την επίδραση του H/M πεδίου έστω και σε μικρό ποσοστό εμφανίστηκαν πιο ενεργά μεταβολικά. Μετά από 30sec το ποσοστό αύξησης κυμάνθηκε 7% και στην 1h 3%. Αν και είναι αρκετά μικρή η διαφορά των ποσοστών αύξησης, σε σχέση με τους μάρτυρες, ίσως η παρουσία ηλεκτρομαγνητισμού να είναι η αιτία ενεργοποίησης του κυτταρικού μεταβολισμού.

Όταν μετακινήθηκε η θέση της συσκευής τα υπό εξέταση κύτταρα N2a δεν ακολούθησαν την ίδια γραμμή στη μεταβολική δραστηριότητα με τα κύτταρα Vero. Η τοποθέτηση του πεδίου στην κάτω και έξω πλευρά του πλακιδίου ακινητοποίησης μετά από 24h μείωσε τη μεταβολική δραστηριότητα, ίσως τον αριθμό των κυττάρων κατά 11%. Με βάσει τα αποτελέσματα των μετρήσεων του μέσου ποσοστού θνησιμότητας, ο αριθμός των κυττάρων υπό την επίδραση του H/M πεδίου εμφανίστηκε με 58% μεγαλύτερη βιωσιμότητα έναντι των μαρτύρων. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των δύο μετρήσεων παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει ανάλογη συμφωνία, αφενός το H/M πεδίο μείωσε τον μεταβολισμό των κυττάρων, αφετέρου ενίσχυσε την κυτταρική βιωσιμότητα. Στην προκειμένη περίπτωση αν συγκρίνουμε τις δύο μεθόδους η εναλλακτική θέση του H/M πεδίου έδωσε διαφορετικά αποτελέσματα. Στη δεδομένη περίπτωση το H/M πεδίο παρεμβάλλονταν από το πλακίδιο ακινητοποίησης και η θέση της συσκευής δεν επέτρεπε άμεση επαφή με τους κυτταρικούς πληθυσμούς. Όπως είναι γνωστό ο ηλεκτρισμός δεν μπορεί να διαπεράσει πολλά κοινά υλικά όπως παράδειγμα το πλαστικό. Τα μαγνητικά πεδία από την άλλη, διαπερνούν τα περισσότερα υλικά και είναι έτσι περισσότερο δύσκολο να απομονωθούν, όπως και σε αυτή την περίπτωση η συμπεριφορά των κυττάρων μπορεί να καθορίστηκε από τη μαγνητική δράση του πεδίου.

Όταν μελετήθηκε η αντίδραση των κυττάρων N2a μετά από 1h, 1,5h και 24h δεν υπήρξε συμφωνία στις τρεις επαναλήψεις. Κατά τη διάρκεια 1h, η μέση μεταβολική δραστηριότητα παρουσιάστηκε αυξημένη στα δείγματα υπό H/M πεδίο των δύο πειραμάτων εκ των τριών. Μελετώντας μετά από 1,5h, ενώ στο 6^ο πείραμα παρουσιάστηκε κατά 50% αυξημένος ο μεταβολισμός των κυττάρων, στο 7^ο και 8^ο πείραμα τα αποτελέσματα διαφοροποιήθηκαν σε αντίθετη κατεύθυνση. Στις 24h παρουσία ηλεκτρομαγνητισμού βάσει της φασματοφωτομετρικής μεθόδου (με εξαίρεση το 6^ο πείραμα) ο μέσος κυτταρικός μεταβολισμός εμφανίστηκε με μεγαλύτερες τιμές στο 7^ο και 8^ο πείραμα κατά 14% και 6%. Σε αυτό το σημείο αν συγκρίνουμε την επίδραση 24h εξωγενούς H/M πεδίου στα κύτταρα Vero (πείραμα 3), όπου ο μεταβολισμός ενεργοποιήθηκε κατά σημαντικό ποσοστό, στα κύτταρα N2a η μεταβολική δραστηριότητα δεν ήταν ξεκάθαρη στις τρεις προσπάθειες. Λόγω του γεγονότος ότι οι τιμές των μέσων όρων (6^ο, 7^ο και 8^ο πείραμα) δεν είχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, ίσως αρνητικοί παράγοντες να επηρέασαν την εξαγωγή «καθαρών» μετρήσεων.

Με σκοπό να διαπιστώσουμε αν το συγκεκριμένο H/M πεδίο (27,12MHz) επηρέασε τη θνησιμότητα των κυττάρων υπολογίσαμε με τη βοήθεια του trypan blue το μέσο ποσοστό νεκρών κυττάρων. Σε μία ώρα έκθεσης του πεδίου το μέσο ποσοστό θανάτωσης εμφανίστηκε ακόμα και 250% μεγαλύτερο στους μάρτυρες. Στην 1,5h πάλι οι κυτταρικοί πληθυσμοί απουσία H/M πεδίου είχαν το μεγαλύτερο ποσοστό θανάτου έως και 48%. Με το πέρασμα 24h εξακολούθησε να επικρατεί μεγαλύτερη θνησιμότητα στους μάρτυρες φτάνοντας έως και 120% όπως είδαμε στην 6^η πειραματική προσπάθεια. Βασιζόμενοι στη μέθοδο trypan blue, ίσως το εν μελέτη πεδίο να προάγει την κυτταρική βιωσιμότητα, εφόσον σε όλες τις μετρήσεις μας οι μάρτυρες εξακολουθούσαν να εμφανίζονται με τη μεγαλύτερη θνησιμότητα. Ενώ ο υπολογισμός της κυτταρικής θνησιμότητας σε όλα τα υπό μελέτη χρονικά διαστήματα υπέδειξε κάποια συμφωνία, η μέτρηση του μεταβολισμού και επακόλουθα ίσως ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων με τη μέθοδο MTT δεν μας οδήγησε σε ασφαλή συμπεράσματα.

Συμπερασματικά, η πειραματική διαδικασία στο συγκεκριμένο επιβαλλόμενο πεδίο ραδιοσυχνότητας (27,12 MHz) δεν κατάφερε να μας διευκρινίσει αν η επιρροή του δεδομένου H/M πεδίου στα κύτταρα άλλαξε τη συμπεριφορά τους. Λόγω ασυμφωνίας των αποτελεσμάτων και απουσία στατιστικής σημαντικότητας απαιτείται να επαναληφθούν όλες οι πειραματικές διαδικασίες για τουλάχιστον τέσσερις φορές. Το γεγονός ότι οι περιορισμένοι χρόνοι εκτέλεσης των μετρήσεων δεν μας βοήθησαν να συμπεράνουμε αν το παρόν H/M πεδίο της συσκευής αλλάζει τον μεταβολισμό ή το χρόνο ζωής των κυττάρων, θα ήταν συνετό να μελετηθούν οι κυτταρικοί πληθυσμοί σε μεγαλύτερους χρόνους από 24h. Μια μακροπρόθεσμη μελέτη του εν λόγω H/M πεδίου ίσως να διευκρινίζει, αν και κατά πόσο μπορεί να επέμβει στον μεταβολισμό και τη βιωσιμότητα των κυτταρικών σειρών Vero και N2a.

Μελετώντας κυτταρικούς πληθυσμούς είναι απαραίτητο να ληφθεί υπόψιν ένας αριθμός από αρνητικούς παράγοντες που μπορούν να μεταβάλλουν τα πειραματικά αποτελέσματα. Σε μελέτες που γίνονται πάνω σε υψηλές συχνότητες εξαιτίας της μεγάλης ευαισθησίας του κυτταρικού περιβάλλοντος είναι σημαντικό να διατηρείται η θερμοκρασία και το μέσον καλλιέργειας σταθερά, να μην παράγεται μηχανική δόνηση από τη συσκευή επαγωγής H/M πεδίου και να έχει υπολογιστεί ο ακριβής ρυθμός ειδικής απορρόφησης (SAR) των κυττάρων. Επιπλέον ακόμα και όταν μελετάται ο ίδιος κυτταρικός πληθυσμός με το ίδιο μέσο καλλιέργειας και σε ίδιες πειραματικές συνθήκες είναι δυνατόν η υπό εξέταση παράμετρος να διαφέρει ακόμα και σε σημαντικό βαθμό.

Οι βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με τις επιδράσεις H/M ακτινοβολίας συνεχίζονται να αυξάνονται σε παγκόσμια κλίμακα και οι επιστήμονες ευελπιστούν με την ανάπτυξη των βιοτεχνολογικών μέσων και της τεχνολογίας, να εξετάζονται με μεγαλύτερη λεπτομέρεια οι μικροαντιδράσεις κυττάρων και γονιδίων. Μέχρι στιγμής δεν έχουν κολλήσει πολλά κομμάτια του παζλ και προσδοκάται με την εντατικοποίηση των ερευνών να απαντηθούν ουσιώδη ζητήματα ώστε να υπάρξει εποικοδομητική αξιοποίηση της H/M ενέργειας και να περιοριστεί η τυχόν γενοτοξική δράση της.

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Banerjee P. et al., 2014. *Investigation into the cyto-protective and wound healing properties of cryptic peptides from bovine Achilles tendon collagen*. Chemico-Biological Interactions, doi:10.1016/j.cbi.2014.01.002.
- Blank M., 1995. *Effects of low frequency magnetic fields on Na,K-ATPase activity*, Bioelectrochemistry and Bioenergetics, Pages 267–273, doi:10.1016/0302-4598(95)05032-4.
- Cifra M. et al., 2010. *Electromagnetic cellular interactions*. Prog Biophys Mol Biol 105(3):223-46. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2010.07.003
- Funk R. and Monsees T, 2006. *Effects of Electromagnetic Fields on Cells : Physiological and Therapeutical Approaches and Molecular Mechanisms of Interaction*. Cells Tissues Organs, 182:59-78.
- Funk R. et al., 2008. *Electromagnetic effects – From cell biology to medicine*. ScienceDirect, doi:10.1016/j.proghi.2008.07.001
- Gabriel C., 1998. *Biological Effects of RF and Microwaves*. Sage journals, doi: 10.1177/002029409803100602
- Gaetani R. et al., 2009. *Differentiation of human adult cardiac stem cells exposed to Extremely Low Frequency Electromagnetic Fields*. Cardiovascular Research (2009) 82, 411–420 doi:10.1093/cvr/cvp067 82(3):411-20
- Gambi N., 2010. *Experimental Studies on Electromagnetic Fields Effects on Biological Targets: Simulation and Dosimetry*. Δικτυακός τόπος: http://amsdottorato.unibo.it/2472/1/Gambi_Naimj_Tesi.pdf.
- Harishkumar M. et al., 2013. *Revealing the Mechanism of in Vitro Wound Healing Properties of Citrus tamurama Extract*, Hindawi Publishing Corporation, Volume 2013, Article ID 963457, 8 pages.
- Hess R. et al., 2014. *A Novel Approach for In Vitro Studies Applying Electrical Fields to Cell Cultures by Transformer-Like Coupling*. Cell Biochem Biophys, doi: 10.1007/s12013-012-9388-4
- Hosain K. et al., 2012. *Effects of Electromagnetic Fields on Mammalian Cells*, International Journal of Electrical and Computer Engineering (IJECE), Vol.2, No.2, April 2012, pp. 267~276, ISSN: 2088-8708
- Hunt R. et al., 2009. *Electromagnetic Biostimulation of Living Cultures for Biotechnology, Biofuel and Bioenergy Applications*, Molecular Sciences, doi:10.3390/ijms10104515.
- Kamal H. et al., 2012. *Effects of Electromagnetic Fields on Mammalian Cells*, International Journal of Electrical and Computer Engineering (IJECE), Vol.2, No.2, pp. 267~276
- Kato M., 2006. *Electromagnetics in Biology*. Hicom, Japan: Springer

- Ledda M. et al., 2010. *Extremely-low frequency magnetic field modulates differentiation and maturation of human and rat primary and multipotent stem cells*, National Research Council INMM. Eur. J. Oncol. Library, vol.5.
- Liang C. et al., 2007. *In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro*, Nature Publishing Group, doi:10.1038/nprot.2007.30.
- Markov M., 2015. *Electromagnetic fields in biology and medicine*. Boca Raton, CRC Press
- Markov M., 2007. *Expanding Use of Pulsed Electromagnetic Field Therapies*. Electromagnetic Biology and Medicine, 26: 257–274, doi:10.1080/15368370701580806
- Moreno-Bueno G. et al., 2009. *The morphological and molecular features of the epithelial-to-mesenchymal transition*. Nature Protocols 4, 1591 - 1613, doi:10.1038/nprot.2009.152
- Miyakoshi J., 2013. *Cellular and Molecular Responses to Radio-Frequency Electromagnetic Fields*. Proceedings of the IEEE, Vol. 101, No. 6.
- Nikzad S. et al., 2014. *Dose-response modeling using MTT assay: a short review*. Life Science Journal 2014;11(9s):432-437.
- Repacholi M., 2010. *Non-Ionizing Electromagnetic Radiation in the Radiofrequency Spectrum and its Effects on Human Health*. Latin American Experts Committee on High Frequency Electromagnetic Fields and Human Health, Scientific Review. Δικτυακός τόπος: <http://www.edumed.org.br/lasr2008/en>.
- Riss, T., 2014. *Is Your MTT Assay Really the Best Choice?* Promega Corporation, Scientific Style and Format, 7th edition.
- Schimmelpfeng J. et al., 2005. *Neuronal outgrowth of PC-12 cells after combined treatment with nerve growth factor and a magnetic field: influence of the induced electric field strength*. Bioelectromagnetics, 26(1):74-7.
- Scenihr, 2006. *Preliminary Opinion on Possible effects of Electromagnetic Fields (EMF) on Human Health*. Scientific committee on emerging and newly identified health risks.
- Stankiewicz et al., 2006. *Immunotropic influence of 900 MHz microwave GSM signal on human blood immune cells activated in vitro*. Electromagnetic Biology and Medicine, doi:10.1080/15368370600572961
- Stavroulakis P., 2003. *Biological effects of Electromagnetic Fields*. Berlin, Springer Science & Business Media
- Štolfa Š. et al., 2007. *Effects of Static Magnetic Field and Pulsed Electromagnetic Field on Viability of Human Chondrocytes in vitro*. Physiol. Res. 56 (Suppl. 1): S45-S49.
- Tsai et al., 2007. *Pulsed Electromagnetic Fields Affect Osteoblast Proliferation and Differentiation in Bone Tissue Engineering*, Bioelectromagnetics, doi:10.1002/bem.20336.

- Yarrow et al., 2004. *A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods*, BMC Biotechnology, doi:1186/1472-6750-4-21.
- Zhadin M., 2014. *On mechanism of combined extremely weak magnetic field action on aqueous solution of amino acid*, Institute of Cell Biophysics of RAS, Eur. J.Oncol. Library, vol 5.
- Αθανασάκη Ε. κ.ά., 2013. *ΕΙΔΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ*, δικτυακός τόπος : <http://www.biology.uoc.gr/courses/BIOL300/documents/biol300.pdf>
- Γεωργακάκος Π. κ.ά., 1999. *Φυσική Γενικής Παιδείας Γ' τάξης Γενικού Λυκείου*. ΑΘΗΝΑ, ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ ΕΚΔΟΣΕΩΣ ΔΙΔΑΚΤΙΚΩΝ ΒΙΒΛΙΩΝ.
- Καμπύλη Ν. & Μαρούλης Σ., 2005. *Επιδράσεις της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στον άνθρωπο και στο περιβάλλον*. Δικτυακός τόπος: <http://nefeli.lib.teicrete.gr>
- Κίτσου Π., 2011. *Η Συνδεκάνη-3 διαμεσολαβεί τις βιολογικές δράσεις της HARP*, δικτυακός τόπος: <http://nemertes.lis.upatras.gr>
- Κωνσταντίνου Φ., 2005. *Μετρήσεις έντασης ακτινοβολίας από κεραίες κινητής τηλεφωνίας, Πρακτικά Ημερίδας: Επιδράσεις της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στην υγεία: μύθοι και πραγματικότητα*, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών.
- Λυμπεράτου Δ., 2012. *Ο Ρόλος της Αντι-Οιστρογονικής Θεραπείας στο Μεταστατικό Δυναμικό των Καρκινικών Κυττάρων Μαστού*. Δικτυακός τόπος: <http://nemertes.lis.upatras.gr/jspui/bitstream/10889/5782/1/dipl.pdf>
- Ντελέζου, Α., 2012. *Μετρήσεις ηλεκτρομαγνητικών πεδίων*, δικτυακός τόπος : [http://nemertes.lis.upatras.gr/jspui/bitstream/10889/5321/3/Nimertis_Ntelezos\(ele\).pdf](http://nemertes.lis.upatras.gr/jspui/bitstream/10889/5321/3/Nimertis_Ntelezos(ele).pdf)
- Παπάζογλου Α., 2010, *Ανακαλλιέργεια κυττάρων*. Εργασία πρακτικής: Νο 2. Δικτυακός τόπος: http://users.teiath.gr/tieedu/Web_TIE/Practical_Works/Aikaterinh_Papazoglou.pdf
- Πετρή Α., 2013. *Διερεύνηση μηχανισμών συνδυαστικής δράσης φωτός, φωτοευαίσθητων ουσιών και φυσικών αντιοξειδωτικών σε μοντέλα νεοπλασιών και ανάπτυξης οπτικών μεθόδων*. Δικτυακός τόπος: <http://hdl.handle.net/123456789/8211>.

Δικτυακοί τόποι:

- http://www.eng.ucy.ac.cy/ece331/notes/notes_03_sv.pdf
- <http://www.metal.ntua.gr/uploads/4701/1182/chap5.pdf>
- <http://eeae.gr>
- <http://gate.iesl.forth.gr/~kafesaki/Modern-Physics/various/emspectrum.html>
- https://el.wikipedia.org/wiki/Ηλεκτρομαγνητικό_φάσμα
- http://www.vodafone.gr/portal/resources/media/AboutUs/CorporateResponsibility/WHO_What_are_electromagnetic_fields_EL.pdf

- <http://light.physics.auth.gr/enc/radiation.html>
- <http://www.eekt.gr>
- <http://1iek-peiraia.att.sch.gr/2-hlektrikiko%20pedio.pdf>