Pécsi Egyetem

Fizika Doktori Iskola

Lézerfizikai, nemlineáris optika és spektroszkópiai program

Az intenzív terahertz impulzusok hatása az Eisenia Andrei gilisztafarok regenerációjára

Ph.D. Tézis

Mahmoud Hasan Abufadda

Felügyelők: Prof. József András Fülöp Assoc. prof. Lászlo Molnár



PÉCS 2021

1. ELŐZMÉNYEK ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A Terahertz Science and Technology az alkalmazások széles skáláját kínálja, és néha az alkalmazások lehetőségei vezérelték az innovatív kutatást ezen a területen. A THz-es alkalmazások főként három területre oszthatók (a kategóriák között van némi átfedés) – THz-es képalkotás, THz-es spektroszkópia és THz-es kommunikáció [1].

Számos tanulmány vizsgálta a THz-sugárzás hatását biomolekulákra, például DNS-re, peptidekre, lipidekre és bizonyos sejtekre, például fibroblasztokra, limfocitákra és epidermális sejtekre, ami ellentmondásos eredményeket eredményezett. Általánosan elfogadott, hogy a THz-hullámok akár termikus, akár nem termikus biológiai hatások révén megváltoztathatják a biomolekulák vagy sejtek aktivitását. Előbbiről kiderült, hogy káros, sejthalált (apoptózis, nekrózis) [2],[3] vagy idegi morfológiai károsodást okoz in vitro kísérletekben [4], besugárzott sejtekben pedig stressz molekulákat (hősokk-fehérjék, DNS-károsodás markerek) expresszálódnak [5].

Ami a biológiai hatásokat illeti, ezeket az ellentmondó eredményeket olyan kísérleti bizonyítékok támasztják alá, amelyek szerint a THz-es sugárzás semleges hatással van a biológiai rendszerekre. Alacsonyabb frekvencia (0,14 THz) vagy teljesítmény (0,45 J/cm²) alkalmazásakor a THz-es sugárzásnak nem volt hatása a humán keratinociták és neuronok differenciálódására, sejtéletképességére [6], [7]. A THz-es sugárzás nem változtatta meg szignifikánsan bizonyos emberi sejtek, mint például a hám- és embrionális őssejtek morfológiáját, adhézióját, proliferációját vagy differenciálódását, és nem befolyásolta a limfociták kromoszómáit sem in vitro [8], ennek ellenére a THz-es sugárzás sejtnövekedést indukálhat. és elterjedése bizonyos expozíciós körülmények között [9]. A neuronális aktivitást vagy elnyomja vagy fokozza a plazmamembrán permeabilitásának [10], [11], a DNS természetes dinamikájának modulálása, következésképpen ezek a bonyolult molekuláris folyamatok befolyásolhatják a génexpressziót és a DNS-replikációt [10], és felgyorsítják a sejtdifferenciálódást és a sejtszintű újraprogramozás [12].

Korábbi tanulmányok megfigyelései arra utalnak, hogy a THz-es sugárzás rendkívül erős és sokoldalú hatással lehet a biológiai rendszerekre, amelyek érzékenyek a besugárzás paramétereire (spektrális eloszlás, teljesítmény, időtartam, elektromos térerősség), valamint a biológiai sugárzás morfológiai és/vagy élettani jellemzőire. célpontok [12]. A giliszták sebészileg eltávolított farokszegmenseinek regenerálása meglehetősen egyszerű in vivo kísérleti eljárás, amelyet a 18. század óta alkalmaznak. A földigiliszták figyelemre méltó képességgel rendelkeznek a hiányzó farokszegmensek regenerálására [13], ezt a folyamatot mind belső, mind külső hatások befolyásolják. Morgan [14] szorgalmazta a regeneráció neuronális függőségét. Bizonyos külső körülmények, mint például a hőmérséklet [15], az ozmotikus stressz [16], és az elektromágneses hullámok, mint a lézer [17], megváltoztathatják a belső tényezők sejtproliferációra, differenciálódásra és szöveti morfogenezisre gyakorolt hatását.

A terahertz impulzusok elősegítik a szegmentális megújulást a sejtproliferáció révén, felülírva az *Eisenia andrei* földigiliszta endogén regenerációs mechanizmusát [18], míg a rendszeres kísérleti tervezés több lehetőséget biztosít a fizikai paraméterek főbb hatásainak megragadására. Ennek eredményeként a THz-es impulzusok kiváló lehetőséget biztosítanak a redifferenciálódás, proliferáció és differenciálódás biológiai hatásainak sejtszintű vizsgálatára.

A THz-es impulzusok olyan fizikai jellemzőkkel rendelkeznek, amelyek segíthetnek tisztázni az abszorpciót, a szórást és az átvitelt a biológiai szövetek szintjén. Vizsgálják továbbá a THz impulzusok átvitelét egy szerven (testfalon) és az Eisenia andrei giliszta teljes posztklitellaris szegmensén keresztül. A THz-es impulzus-erőátvitel eredményeit a közeli infravörös (1030 nm) és a zöld (515 nm) impulzusos erőátvitel eredményeivel hasonlították össze. Az 5 μJ energiájú THz-es impulzusok csak kismértékű, körülbelül 0.26 °C-os hőmérséklet-emelkedést okoznak, ami arra utal, hogy a hőhatások kevésbé fontosak a biológiai hatékonyság szempontjából. A tenyésztett sejtekhez alkalmazott 0.3–0.6 THz-es frekvenciatartomány elég gyenge volt ahhoz, hogy a termikus hatásokat figyelmen kívül hagyjuk [9].

Ennek a tanulmánynak az volt a célja, hogy megvizsgálja a nagy intenzitású THz-es impulzusok hatását az E. andrei giliszta standardizált hátsó szegmensének regenerációjára. A szegmensregenerációnak vannak bizonyos diszkrét fázisai, amelyek az extirpáció utáni javítási folyamatot alkotják. További cél volt a THz-es impulzusok és az optikai impulzusok biológiai anyagokkal való kölcsönhatási mechanizmusának bemutatása a mintán keresztül továbbított THz-es impulzusok teljesítményének mérésével. Az izolált szövetekben átvitt zöld fénnyel és közel IR-vel sugárzott THz-es impulzusok abszorpciós

együtthatóit azonos optikai szövet kölcsönhatási körülmények között hasonlítottuk össze, mint például a szövetek víztartalma, szöveti szerkezete, lézerteljesítménye és besugárzási ideje.

2. MÓDSZEREK

1-Α THz-es impulzusok hatását kimetszett Eisenia giliszták a andrei szegmensregenerációs kinetikájára 5 farokszegmens levágásával, majd a giliszták 5 perces egyciklusú THz-es impulzusokkal történő besugárzásával (5 µJ energia, 0,3 THz átlagfrekvencia és 1 kHz) vizsgáltuk. . Ezeket az impulzusokat ultrarövid infravörös lézerimpulzusok optikai egyenirányításával állítottuk elő LiNbO3 kristályban, a hagyományos billent impulzusfront technikával [19]. Ugyanezeket a körülményeket alkalmaztuk a zöld fénnyel (515 nm) besugárzott állatok és a nem besugárzott (kontroll-ál) giliszták összehasonlítására. A megújuló szegmensek számát az egyes állatcsoportokon két, három és négy hét elteltével számoltuk meg (1. ábra).



1. ábra A besugárzási beállítás vázlata. A G csoport E. andrei példányait a zöld lézersugárba helyeztük. A T csoport mintái a THz-es nyaláb fókuszába kerültek. Ebben az esetben a zöld dobozban lévő komponensek eltávolításra kerültek a beállításból. DM: dikroikus tükör, $\lambda/2$: félhullámú retardáló lemez, OAP: tengelyen kívüli parabolatükör,

EFL: effektív gyújtótávolság. A bal alsó betétben egy érzéstelenített giliszta fényképe látható a THz-es besugárzási pozícióban.

2- A besugárzási kísérleteket követően a regenerálódó testrészek mindegyik csoportjából 3-4 eredeti szegmenssel 5-5 állatot kimetszettünk és frissen készített formalin-ecetsav oldatban rögzítettünk, majd Nikon Optiphot-2 fotomikroszkóppal szövettanilag megvizsgáltuk. Ezenkívül statisztikai elemzéseket végeztek egyutas (ANOVA) és Student-féle t-próbával a p-érték kiszámítására a különböző besugárzott állatcsoportokban.

3- A kísérleti állatokat, az Eisenia andrei giliszták (Annelida, Oligochaeta, Lumbricidae) kifejlett (klitelált) egyedeit kézzel válogattuk ki a standard laboratóriumi tenyészállományból[20]. A kiválasztott állatokat csapvízzel megnedvesített papírvattán tartottuk három napig szobahőmérsékleten. A műtéti beavatkozások előtt az állatokat telített szénsavas vízzel érzéstelenítettük, majd egyes különböző méretű mintákból vagy a testfal háti részét, vagy tíz-tizenkét posztklitelláris szelvényt boncoltunk ki.

4- Az átvitt teljesítményméréseket a zöld 515 nm-es és IR 1030 nm-es központi hullámhosszúságú, 180 fs impulzustartamú, 1 mJ impulzusenergiájú, szabályozott intenzitású impulzuslézerre végeztük, amelyet Yb:KGW regeneratív erősítő juttatott IR pozícióba. 1 kHz-es ismétlési frekvenciával működik. A minta előtt egy írisz diafragma körülbelül 2 mm-re csökkentette a nyaláb méretét, amely átmérő kisebb, mint a minta mérete. 515 nm hullámhosszú zöld lézerimpulzusokat állítottak elő az infravörös lézerimpulzusok fázisillesztett második felharmonikus generációjával egy BBO kristályban. A THz átviteli méréseket a Menlo Systems által gyártott Tera K8 modell kereskedelmi időtartományú THz spektrométerével (TDTS) végezték. Csaknem impulzusokat generáltak a TDTS-ben femtoszekundumos egyciklusú THz-es lézerimpulzusokkal megvilágított, torzított fotovezető antennával. A THz-es impulzusokat kollimáltuk, és egy pár TPX lencsével a mintára fókuszáltuk. A szélessávú THz-es impulzusok amplitúdóspektrumának csúcsa körülbelül 0,65 THz volt. A vizsgált erősen elnyelő szövetminták hasznos spektrális tartománya körülbelül 0,2 THz-től 2,0 THz-ig terjedt.

5- Állandósult állapotú hőegyenletet használtak a sugárzás szövetre gyakorolt fűtőhatásának modellezésére és a tiszta vízzel való összehasonlítására. Feltételeztük, hogy a nyaláb a z irányba terjed. Az egyszerűség érdekében a hőmérséklet-ingadozást csak z irányban vettük figyelembe. Egy ilyen közelítés a testfal szövetére alkalmas, ahol a szövet

vastagsága (≤0.33 mm) közel egy nagyságrenddel kisebb, mint az oldalsó mérete (≥2.5 mm) és a fókuszált THz-es nyaláb tipikus mérete (≥2). mm 0.3–0.5 THz-es frekvenciák esetén).

3. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

I. A közelmúltban fejlesztették ki a THz-es sugárzási alkalmazásokat, különösen a képalkotást és a spektroszkópiát; emellett nagy intenzitású THz-es impulzusokat is generált a Pécsi Tudományegyetem Fizika Tanszéke. Ezek a tényezők váltották ki a THz-es impulzusok hatásának vizsgálatát egy speciális állatmodell (Eisenia Andrie) gilisztára, amelyet ebben a kutatásban használtunk. A THz-es impulzusok számos változást okoztak az állat sejtjeiben és szöveteiben, amint az a következő nyilatkozatokban szerepel:

Ez az első olyan kísérlet, amely bebizonyította, hogy az 5 µJ energiájú, 0,30 THz-es átlagos frekvenciájú és 1 kHz-es ismétlési gyakoriságú egyciklusú THz-es impulzusok sejtproliferációt indukálnak (amit a mitotikus sejtek nagy száma jelez) (2c. ábra), és mind a hisztogenezis, mind az organogenezis szignifikánsan nagyobb számú regenerált földigiliszta szegmenst eredményez. A THz-vel kezelt állatokban a legszembetűnőbb változás az új központi idegrendszer és az erek legintenzívebb fejlődése volt (2b. ábra). Ezek az eredmények bebizonyították, hogy a THz-es impulzusok képesek hatékonyan gerjeszteni biológiai folyamatokat, és potenciális orvosi alkalmazásra utalnak. **[S1].**



2. ábra. A kontroll (a) és THz-vel besugárzott giliszták (b-e) regenerált szegmenseinek szövettani jellemzői a 14. posztoperatív napon. Mivel a G csoportba tartozó állatokat ugyanazok a szövettani elváltozások jellemzik, mint a C csoportokat, metszeteiket az ábrán nem mutatjuk be. Rövidítések: ovnc: régi hasi idegszál, rvnc: regenerált ventrális idegzsinór, obw: régi testfal, rbw: regenerált testfal, d: disszepiment, omg: régi középbéli izomszövet rmg: regenerált középbéli izomszövet, bv: véredény, nyilak: mitotikus sejtek, körök: régi hámtestréteg, csillagok: új hámréteg.

II. Ez a tanulmány kimutatta, hogy a különböző szövettípusok, például a bélközéphám, a ventrális idegzsinór, az erek és az izomszövet gyorsan fejlődtek, miután 5 percig THz-es impulzusoknak voltak kitéve. Másrészt ez a tanulmány nem mutatta ki a zöld fény hullámhosszának a regenerált szegmensekre gyakorolt hatását (3. Ábra), és a seb után a szövetekben felhalmozódott blastema sejtek alacsony száma egy meghatározott vizsgált időpontban. **[S1].**



3. ábra: A szegmens regeneráció kinetikája kontroll (ál-exponált) és zöld fénnyel vagy THz-es besugárzással kezelt E. andrei gilisztákban. Az adatok átlag \pm SEM (n=45, *: p < 0,05, **: p < 0,01).

III. Kísérletileg kimutatták, hogy a zöld optikai impulzusok átvitt teljesítménye az exponenciális csillapítás Beer-Lambert törvényét követte minden vastagságra és szövetszerkezetre, a közeli infravörös IR impulzusok ettől jelentősen eltértek, ami a szövetszerkezettől való függésre utal. Míg a THz-es impulzusok abszorpciós együtthatója (126 cm⁻¹) a szöveti struktúrákban több tucatszor magasabb volt, mint az IR abszorpciós együtthatója, és a szövetekben egymást követő zöld fények láthatók (4. ábra).



4. ábra (a) A zöld fény és a THz-es sugárzás mért teljesítményátvitele a mintaszövet vastagságának függvényében. (b) Infravörös fény mért teljesítményátbocsátása a mintaszövet vastagságának függvényében. A zöldnek és az infravörösnek megfelelő vonalak exponenciális illeszkedési görbéket mutatnak. A szaggatott vonal a THz-es adatoknál iránymutató a szem számára. Az üres szimbólum a (b)-ben a test-fal illeszkedést 0,45 mm vastagságra extrapolálva jelzi.

IV. A szövetek szerinti THz-es abszorpciós együtthatót 0,2 THz és 2,5 THz közötti frekvenciatartományban idődomain THz spektroszkópiás mérésekkel határoztuk meg. Az abszorpció 80 cm–1 0,2 THz-nél és 273 cm–1 2,5 THz-nél változik. Továbbá a szöveti abszorpciós tulajdonságok ismerete fontos előfeltétele a sugárzás biológiai hatékonyságának becslésének. Az intenzív pulzáló THz-es sugárzásnak mélyreható biológiai hatása lehet. Annak ellenére, hogy a vizsgálatban figyelembe vett 0,2 THz-től 2,5 THz-ig terjedő tartományban kis, körülbelül 0,1 mm-es behatolási mélységek vannak, globális (nem termikus) biológiai hatások léphetnek fel. **[S2].**

V. Egy egyszerű számítási modell segítségével numerikusan meghatároztuk a kis mennyiségű THz-es impulzusok 5 μJ energiáját és 1 kHz-es ismétlési gyakoriságát (5 mW átlagos teljesítmény), kevesebb, mint 0,41 K THz-es impulzusok hőátadását az adott szövetvastagságra. a hőhatások kevésbé fontosak a biológiai hatékonyságban. Ez drasztikusan eltérő lehet a közelmúltban elérhető mJ szintű THz impulzusenergiáknál **[S2].**

4. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ CIKKEK

- M. Abufadda et al., "Terahertz pulses induce segment renewal via cell proliferation and differentiation overriding the endogenous regeneration program of the earthworm Eisenia andrei," *Biomed. Opt. Express*, vol. 12, no. 4, pp. 1947–1961, 2021, doi: 10.1364/boe.416158 [1].
- M. H. Abufadda et al., "Absorption of Pulsed Terahertz and Optical Radiation in Earthworm Tissue and its Heating Effect," J. Infrared, Millimeter, Terahertz Waves, 2021 [2].
- M. Abufadda, P. Nugraha, S. Li, J. Hebling, J. A. Fülöp, and L. Molnár, "Effects of THz pulses on the regeneration of the earthworm Eisenia Andria," *Conf. Terahertz Sci. Technol. (TST), Berlin, Ger.*, 2018.
- M. Abufadda, A. Erdélyi, G. Krizsán, J. Hebling, J. A. Fülöp, and L. Molnár, "THz pulses stimulate the tail segment regeneration of the earthworm Eisenia Andrei," *Opt. InfoBase Conf. Pap.*, vol. Part F140-CLEO_Europe 2019, no. 137, p. 7281, 2019.

5. Hivatkozások

- [1] J. Sleiman and B. Bousquet, "Terahertz Imaging and Spectroscopy : Application to Defense and Security in front of the examination panel," *Dr. Diss. Univ. Bordeaux*, 2017.
- [2] G. J. Wilmink *et al.*, "In vitro investigation of the biological effects associated with human dermal fibroblasts exposed to 2.52 THz radiation," *Lasers Surg. Med.*, vol. 43, no. 2, pp. 152–163, 2011, doi: 10.1002/lsm.20960.
- G. J. Wilmink *et al.*, "Determination of death thresholds and identification of terahertz (THz)-specific gene expression signatures," *Opt. Interact. with Tissues Cells XXI*, vol. 7562, no. December 2014, p. 75620K, 2010, doi: 10.1117/12.844917.
- J. S. Olshevskaya, A. S. Ratushnyak, A. K. Petrov, A. S. Kozlov, and T. A. Zapara, "Effect of terahertz electromagnetic waves on neurons systems," *Proc. 2008 IEEE Reg. 8 Int. Conf. Comput. Technol. Electr. Electron. Eng. Sib. 2008*, no. February 2014, pp. 210–211, 2008, doi: 10.1109/SIBIRCON.2008.4602607.
- [5] M. R. Scarfi, M. Romanò, R. D. I. Pietro, O. Zeni, and A. Doria, "THz Exposure of Whole Blood for the Study of Biological Effects on Human Lymphocytes," J. *Biol. Phys.*, vol. 29, no. 2, pp. 171–177, 2003.
- [6] N. Bourne, R. H. Clothier, M. D'Arienzo, and P. Harrison, "The effects of terahertz radiation on human keratinocyte primary cultures and neural cell cultures," *ATLA Altern. to Lab. Anim.*, vol. 36, no. 6, pp. 667–684, 2008, doi: 10.1177/026119290803600610.
- [7] R. H. Clothier and N. Bourne, "Effects of THz exposure on human primary keratinocyte differentiation and viability," *J. Biol. Phys.*, vol. 29, no. 2–3, pp. 179– 185, 2003, doi: 10.1023/A:1024492725782.
- [8] R. Williams *et al.*, "The influence of high intensity terahertz radiation on mammalian cell adhesion, proliferation and differentiation," *Phys. Med. Biol.*, vol. 58, no. 2, pp. 373–391, 2013, doi: 10.1088/0031-9155/58/2/373.
- [9] N. Yaekashiwa, H. Yoshida, S. Otsuki, S. Hayashi, and K. Kawase, "Verification of Non-thermal Effects of 0.3–0.6 THz-Waves on Human Cultured Cells," *Photonics*, vol. 6, no. 1, p. 33, 2019, doi: 10.3390/photonics6010033.
- [10] B. S. Alexandrov, V. Gelev, A. R. Bishop, A. Usheva, and K. Rasmussen, "DNA breathing dynamics in the presence of a terahertz field," *Phys. Lett. Sect. A Gen. At. Solid State Phys.*, vol. 374, no. 10, pp. 1214–1217, 2010, doi: 10.1016/j.physleta.2009.12.077.
- [11] S. Z. Tan *et al.*, "Exposure Effects of Terahertz Waves on Primary Neurons and Neuron-like Cells Under Nonthermal Conditions," *Biomed. Environ. Sci.*, vol. 32, no. 10, pp. 739–754, 2019, doi: 10.3967/bes2019.094.
- [12] J. Bock et al., "Mammalian stem cells reprogramming in response to terahertz

radiation," *PLoS One*, vol. 5, no. 12, pp. 8–13, 2010, doi: 10.1371/journal.pone.0015806.

- [13] E. Varhalmi *et al.*, "Expression of PACAP-like compounds during the caudal regeneration of the earthworm Eisenia fetida," *J. Mol. Neurosci.*, vol. 36, no. 1–3, pp. 166–174, 2008, doi: 10.1007/s12031-008-9125-z.
- [14] A. T. H. Morgan, "Regeneration and Liability to Injury Author (s): T. H.
 Morgan Published by: American Association for the Advancement of Science Stable URL: http://www.jstor.org/stable/1629549," *Adv. Sci.*, vol. 14, no. 346, pp. 235–248, 2010.
- [15] V. Takacs, L. Molnar, B. Klimek, A. Gałuszka, A. J. Morgan, and B. Plytycz, "Exposure of Eisenia andrei (Oligochaeta; Lumbricidea) to cadmium polluted soil inhibits earthworm maturation and reproduction but not restoration of experimentally depleted coelomocytes or regeneration of amputated segments," *Folia Biol.*, vol. 64, no. 4, pp. 275–284, 2016, doi: 10.3409/fb64_4.275.
- [16] K. Hamana, H. Hamana, and T. Shinozawa, "Alterations in polyamine levels of nematode, earthworm, leech and planarian during regeneration, temperature and osmotic stresses," *Comp. Biochem. Physiol. -- Part B Biochem.*, vol. 111, no. 1, pp. 91–97, 1995, doi: 10.1016/0305-0491(94)00222-G.
- [17] A. Amaroli *et al.*, "The effects of photobiomodulation of 808 nm diode laser therapy at higher fluence on the in vitro osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells," *Front. Physiol.*, vol. 9, no. FEB, pp. 1–11, 2018, doi: 10.3389/fphys.2018.00123.
- [18] M. Abufadda *et al.*, "Terahertz pulses induce segment renewal via cell proliferation and differentiation overriding the endogenous regeneration program of the earthworm Eisenia andrei," *Biomed. Opt. Express*, vol. 12, no. 4, pp. 1947– 1961, 2021, doi: 10.1364/boe.416158.
- [19] J. Hebling, G. Almasi, I. Kozma, and J. Kuhl, "Velocity matching by pulse front tilting for large area THz-pulse generation," *Opt. Express*, vol. 10, no. 21, p. 1161, 2002, doi: 10.1364/oe.10.001161.
- [20] L. Molnár, P. Engelmann, I. Somogyi, L. L. Mácsik, and E. Pollák, "Cold-stress induced formation of calcium and phosphorous rich chloragocyte granules (chloragosomes) in the earthworm Eisenia fetida," *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.*, vol. 163, no. 2, pp. 199–209, 2012, doi: 10.1016/j.cbpa.2012.06.005.
- [21] M. H. Abufadda *et al.*, "Absorption of Pulsed Terahertz and Optical Radiation in Earthworm Tissue and its Heating Effect," *J. Infrared, Millimeter, Terahertz Waves*, 2021.