

**Activitatea I.4 Studii preliminare si verificari pentru standardizarea set-up-ului experimental; stabilirea protocolului experimental: conditii de cultura celulara, doze, concentratii, timpi, procedura de prelucrare a probelor biologice, setarea si calibrarea aparatelor de masura. (UMF-CD)**

## **1. Introducere**

Progresia ciclului celular este blocata temporar ca raspuns la producerea unor leziuni in molecula de ADN, inhibarea replicarii ADN-ului sau asamblarea incorecta a fusului mitotic, leziuni care pot fi induse de catre radiatiile ionizante sau alti agenti fizici sau chimici. Mecanismele celulare implicate in acest proces de intarziere a ciclului celular sunt coordonate intr-un mod precis de catre puncte de control specifice, care intarzie procesele de crestere si diviziune si permit repararea alterarilor din ADN (Longhese s.a., 1998; Siede, 1995). Punctele de control au doua scopuri principale: de a opri diviziunea celulara atunci cand ADN-ul contine defecte sau cand replicarea ADN-ului este intrerupta, si de a regla sistemele de reparare care ajuta celula sa supravietuiasca.

In celulele de drojdie cu diviziune prin inmugurire au fost caracterizate trei tipuri de raspuns, cunoscute ca puncte de control al defectelor moleculei de ADN in fazele  $G_1/S$ ,  $S$  si  $G_2/M$ , si care depind de faza ciclului celular in care apar aceste alteratii. Lezarea ADN-ului in faza  $G_1$  induce intarzierea aparitiei mugurelui si a intrarii in faza  $S$ , ca raspuns al punctului de control din  $G_1$ . Punctul de control din faza  $S$  este activat de defecte ale ADN-ului in timpul fazei  $S$ , precum si de replicarea sa incompleta, coordonand mecanismele de replicare cu capacitatea de reparare a defectelor din molecula de ADN. Punctul de control din  $G_2$  permite repararea defectelor in cazul in care aceasta nu a fost completa in timpul fazei  $S$  sau poate raspunde la existenta defectelor in ADN sau la rupturi in structurile citoscheletului care apar in faza  $G_2$ . Punctul de control mitotic intarzie initierea anafazei in cazul in care cromozomii nu sunt corect aliniati la placa ecuatoriala a fusului de diviziune. Daca rupturile ADN-ului nu sunt reparate in timp limitat in punctul de control din  $G_2/M$ , celula trece defectuos la stadiul urmator al ciclului celular, printr-un proces numit adaptare (Andreassen s.a., 2003) care poate conduce in mod direct la instabilitate genomica. In celulele de drojdie timpul petrecut in diferitele puncte de control depinde de faza ciclului celular si creste in ordinea  $G_1/S/G_2$ . Timpul maxim permis pentru reparare in  $G_1$  este de 1 ora, in timp ce pentru reparare in  $G_2$  este de 10 ore (Siede, 1995).

Dorim realizarea unor experimente in care sa folosim doua tipuri de radiatii ionizante, protoni si radiatie  $\gamma$ , pentru a investiga efectele radiatiilor asupra proliferarii celulele de tip *Saccharomyces cerevisiae* la o doza fixata, de 200 Gy, cunoscuta in literatura ca inducand o supravietuire celulara de ~25% la drojdii. Datorita faptului ca la aceasta doza un numar semnificativ de celulele iradiate (~25% din total) sunt capabile sa repare leziunile produse, alegerea respectiva permite observarea modului in care este afectata progresia ciclului celular prin iradiere. Pe langa determinarea supravietuirii celulare (care poate fi privita si ca un test al acuratetei masuratorilor), dorim sa estimam: produsul relativ de rupturi dublu-catenare ireparabile produse in molecula de ADN, gradul de acumulare a celulelor in punctul de control  $G_2/M$ , precum si rata si momentul initierii mortii celulare induse prin iradiere. In acest mod vom putea compara efectele celor doua tipuri de radiatii asupra proliferarii celulare la aceeasi doza. In plus, este de mentionat faptul ca pana in prezent nu au mai fost raportate in literatura date similare.

Vom combina testul de excludere a colorantului albastru de metil pentru detectarea celulelor moarte cu testul capacitatii de formare a coloniilor pentru a determina fractia celulelor care supravietuiesc iradierii. Vom face referire la alte rezultate publicate, obtinute din studii pe celule de drojdie iradiate cu raze X, din care s-a dedus ca o singura celula care produce o microcolonie de cinci celule este capabila sa formeze in cele din urma o colonie si poate fi astfel considerata ca supravietuitoare (Grundler si Abmayr, 1983). De asemenea, este cunoscut faptul ca celulele supuse iradierii sunt capabile sa isi revina in mare parte daca sunt mentinute in medii nenutritive inainte de a se efectua cultivarea pe mediu solid, proces numit recuperare in mediu lichid. In absenta factorilor nutritivi, celulele de drojdie isi blocheaza cresterea si intra intr-o faza specializata, numita faza stationara  $G_0$ , in care celulele sunt capabile sa repare leziunile produse de radiatii intr-o masura mult mai mare decat pe parcursul ciclului celular. Recuperarea viabilitatii in timpul tratamentelor cu cultivare tarzie pe mediu solid poate fi atribuita proceselor de reparare a rupturilor ADN dublu-catenare, iar supravietuirea obtinuta prin cultivare tarzie este o masura a produsului relativ de rupturi ADN dublu-catenare care nu pot fi reparate de catre sistemele celulare de reparare (Usami s.a., 2001). In celulele de drojdie recuperarea viabilitatii creste in primele trei zile dupa iradiere si ramane stationara in urmatoarele doua zile, cand toate defectele reparabile au fost eliminate (Usami s.a., 2001).

Toate aceste efecte biologice le vom corela cu proprietatile luminiscentei intarziate a celulelor de drojdie. Luminiscenta intarziate reprezinta emisia de fotoni de catre orice sistem biologic iluminat. Fluxul de fotoni emisi in acest proces este caracterizat de o intensitate extrem de redusa. Atat intensitatea maxima cat si cinetica emisiei de fotoni sunt influentate de starea biologica a sistemului. In ultimele decenii luminiscenta intarziate a fost studiata preponderent in sisteme in stare solida (Galanin, 1996). S-a observat astfel ca in aceste sisteme, procesul este generat de excitarea, urmata de dezexcitare, a unor stari colective. Procesul dispare daca aceste stari sunt inhibitate. Luminiscenta intarziate si fluorescenta sunt doua fenomene distincte. Asa cum a fost discutat recent (Scordino s.a., 2000), luminiscenta intarziate a sistemelor biologice prezinta similaritati remarcabile cu cea a sistemelor in stare solida, astfel incat procesul poate fi explicat prin acelasi mecanism in ambele tipuri de sisteme. In cazul sistemelor biologice, stările colective pot exista ca excitoni sau solitoni moleculari in structurile unidimensionale ale citoscheletului.

## **2. Materiale si metode**

### **Culturile celulare**

Celulele de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* wt ('wild-type') sunt cultivate 12-15 h in mediu YPD lichid (compus din 2% glucoza, 1% extract de drojdie si 2% bactopectona) la 30°C. Celulele sunt aduse in faza de crestere logaritmica prin transfer in mediu YPD proaspat la o concentratie initiala de  $5 \times 10^6$  celule/ml si lasate sa creasca pana la  $\cong 30 \times 10^6$  celule/ml. Celulele sunt apoi transferate in recipiente Petri inchise, echilibrate pe gheata si iradiate la 0°C cu o doza de 200 Gy de protoni sau radiatie  $\gamma$ . Celulele neiradiate (controlul) sunt supuse aceluiasi tratament exceptand faptul ca sunt tinute in afara camerei de iradiere.

Pentru iradierea cu protoni sunt folosite fascicule clinice de protoni accelerati in ciclotronul supraconductor de la LNS-INFN, Catania (Italia), rata dozei fiind 11.76 Gy/min. Fasciculele de protoni sunt modulate pentru a da o distributie uniforma a dozei in tot volumul probei. Energia protonilor este 54.12 MeV la intrare si 15.43 MeV la iesirea din recipientul Petri. Ca dozimetru de referinta a fost adoptata o camera de ionizare plan-paralela PTW 34045 Markus. Masuratorile de doza sunt realizate in apa, conform Agentiei Internationale de Energie Atomica (IAEA) TRS 398. Doza absorbita in apa pe unitatea de monitorizare (cGy/U.M.) este

masurata in izocentru, la o adancime corespunzand medianei fasciculului modulata, avand ca referinta un colimator circular cu diametrul de 25 mm.

Pentru iradierea  $\gamma$  sunt folosite fascicule clinice de fotoni disponibile la Institutul de Radiologie al Universitatii din Catania (Italia). Aici un accelerator liniar (Orion GE) produce fotoni cu spectru bremsstrahlung, energia fotonilor fiind  $<5$  MeV. Rata dozei a fost 3.33 Gy/min. Calibrarea fasciculului de fotoni este realizata plasand o camera de ionizare cilindrica (Farmer 1384, PTW) in PMMA (PolyMethylMethAcrylate). Conditiiile de iradiere, conform Asociatiei Americane de Fizica in Medicina (AAPM) TG 21, sunt: marimea campului  $10 \times 10$  cm<sup>2</sup>, camera de ionizare Farmer plasata in PMMA la o adancime de 5 cm in apa (corespunzand unei adancimi de 4.4 cm in PMMA), distanta de la sursa fasciculului de fotoni la camera de ionizare Farmer de 105 cm, iar distanta de la sursa fasciculului de fotoni la suprafata virtuala de 100.6 cm.

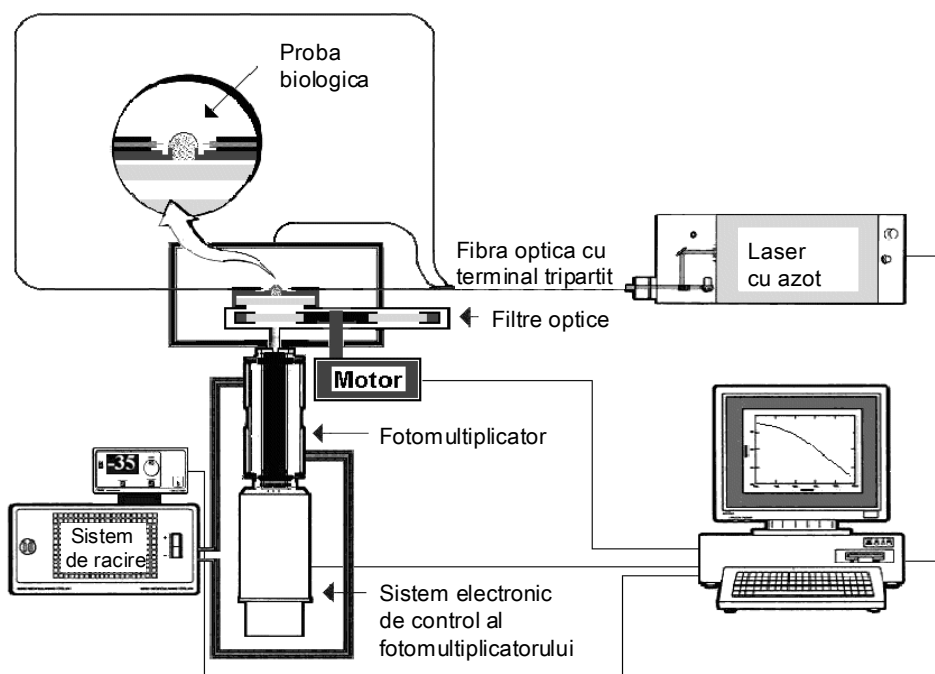
Dupa iradiere, celulele sunt colectate prin centrifugare (1500 g, 2 min.), resuspendate in intr-un mediu minimal (baza-azot fara aminoacizi) la o concentratie finala de  $\approx 80 \times 10^6$  celule/ml, iar suspensia rezultata a fost impartita astfel: o proba de 0.1 ml folosita pentru cultivare imediata pe mediu solid, o proba de 0.75 ml folosita pentru masuratori de luminescenta, o proba de 0.1 ml folosita pentru fotografii si inregistrari ale imaginilor, o proba de 0.11 ml transferata in 25 ml PBS (solutie tampon fosfat-salina) cu antibiotic (numita cultura DP) si o proba de  $\sim 10$  ml diluata de  $\sim 33$  ori in YPD pana la o concentratie finala de  $\approx 2.5 \times 10^6$  celule/ml (cultura K). Suspensiile DP si K sunt mentinute apoi la 30°C cu agitare continua. La diferite momente se preleva probe din cultura K si preparate corespunzator pentru diferitele investigatii (masuratori de luminescenta, test de colorare, fotografiere). Dupa 3-5 zile, celulele din cultura DP sunt numarate si folosite pentru cultivare tarzie pe mediu solid, folosind acelasi procedeu ca si in cazul cultivarii imediate pe mediu solid. Pentru cultivare imediata pe mediu solid, celulele sunt tratate cu ultrasunete 30 s pentru a disocia aglomerarile celulare, apoi se realizeaza dilutii in serie si probe de 0.1 ml continand 200 pana la 700 de celule in YPD sunt imprastiate pe suprafata placilor Petri cu mediu solid YPD-agar, care apoi sunt incubate la 30°C pentru 3 zile. Coloniile sunt apoi numarate, iar supravietuirea calculata prin determinarea valorii medii a rapoartelor numerelor de colonii obtinute cu celulele iradiate si respectiv neiradiate, pentru acelasi numar de celule cultivate pe placa Petri.

Pentru determinarea concentratiei celulare s-a utilizat un hemocitometru Thoma cu vizualizare la microscop, folosind cateva picaturi de suspensie dupa o dilutie adecvata a probei si tratamentul acesteia cu ultrasunete. Celulele moarte sunt detectate prin metoda colorarii cu albastru de metil (Iida s.a., 1990). Densitatea celulara, viabilitatea si modificarile morfologice legate de inmugurire sunt examinate cu o camera Logitech QuickCam Pro 4000, conectata la un microscop cu contrast de faza Olympus CK30, dand o marire totala de 8000 de ori. Criteriile de selectie pentru profilul morfologic al mugurelui si distributia fazelor ciclului celular sunt urmatoarele: celule fara mugure pentru faza G<sub>1</sub>, celule cu mugure mic (avand diametrul mai mic decat o treime din diametrul celulei-mama) pentru faza S, celule cu mugure de marime medie pentru perioada initiala si de mijloc a fazei G<sub>2</sub>, si celule cu mugure mare (avand diametrul mai mare decat jumatate din diametrul celulei-mama) pentru sfarsitul fazei G<sub>2</sub> impreuna cu faza M (Muller, 1991).

Inaintea masuratorilor de luminescenta, probe din suspensia celulara de 5-10 ml sunt centrifugate, iar celulele sunt transferate la o concentratie finala  $\sim 80 \times 10^6$  celule/ml in mediu minimal (Iida s.a., 1990) care contine 6.7 g/l baza-azot fara aminoacizi (Sigma-Aldrich) si 10 g/l dextroza (preparat conform protocolului mentionat de producator). 0.2 ml din cultura rezultanta sunt preparati pentru examinare la microscop, iar probe de 150  $\mu$ l sunt utilizate pentru determinari de luminescenta in conditii aerobe, la o temperatura de  $23 \pm 0.5$  °C.

## Spectroscopia de luminescenta intarziata

Pentru a masura luminescenta intarziata a culturilor celulare in studiile prezentate aici, a fost utilizat sistemul ARETUSA “Advanced Research Equipment for fasT Ultraweak lumineScience Analysis” (Tudisco s.a., 2003, 2004). Cu acest sistem se pot detecta fotoni singulari si, in plus, nivelul zgomotului este foarte redus. De asemenea, eficienta colectarii luminii emise de culturile celulare este foarte buna, iar inregistrarea semnalului incepe cu o intarziere mica fata de sfarsitul pulsului de iluminare.



**Fig.1.** Dispozitivul experimental ARETUSA

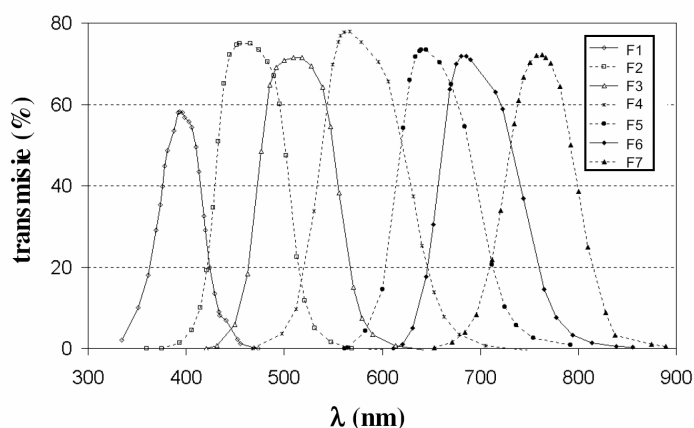
Echipamentul (Fig. 1) a fost realizat astfel incat, desi trebuie folosite probe celulare de volum mic, intensitatea semnalului probei sa fie mult mai mare decat cea a semnalului de fond generat de alte componente ale dispozitivului. Pentru a satisface aceste cerinte, volumul probelor folosite a fost de 150  $\mu\text{l}$ , fiind masurat cu o pipeta de precizie. Proba este plasata pe o suprafata orizontala (fereastră) de cuarț, luand o forma semisferica. Fereastră transmite cca. 95% din lumina incidenta, in domeniul lungimilor de unda cuprinse intre 300 si 700 nm. In aceste conditii nu mai sunt necesare recipiente de plastic sau cuarț pentru a plasa proba, eliminandu-se astfel luminescenta acestora. Totusi, si in aceasta configuratie, o parte din lumina laser este reflectata de proba, ajungand pe capatul de inregistrare a semnalului si generand efecte laterale de luminescenta. Acestea sunt eliminate prin utilizarea unui filtru special (Lot-Oriel 57345), plasat imediat sub fereastră de cuarț. Semnalul de fond, generat atat de dispozitivul de inregistrare cat si de mediul de cultura (cu sau fara adaus de agent chimic) este masurat separat (in probe fara celule). Intensitatea acestui semnal este de ordinul 1% din

intensitatea semnalului total al probei celulare si este scazuta din intensitatea semnalului inregistrat.

Ca sursa de lumina este folosita o sursa de laser pe baza de azot (Laser Photonics LN 230C), avand lungimea de unda  $\lambda=337$  nm, si o largime a pulsului de 5 ns, cu o energie de  $100\pm 5$   $\mu$ J/puls. Puterea laserului a fost redusa in anumite cazuri, pentru a evita supraincercarea fotomultiplicatorului.

Pentru a asigura o iluminare uniforma a probei, laserul a fost conectat la o fibra optica avand terminalul tripartit, cu cele trei ramificatii orientate in jurul probei la unghiuri egale, de  $120^\circ$ , intre directiile lor.

Analiza spectrala a fost realizata prin intermediul a sapte filtre interferentiale (Lot-Oriel 57510 / 30 / 50 / 90 / 610 / 30 / 50) cu banda larga ( $\sim 80$  nm FWHM, Fig. 2) plasate intr-un dispozitiv circular cu rotatie, intre proba si fotomultiplicator.



Filtrul	$\lambda^{max}$ (nm)	$\lambda_{efectiva}^{max}$ (nm)
1	400	395
2	450	460
3	500	509
4	600	567
5	650	645
6	700	686
7	750	763

Fig. 2. Caracteristicile spectrale ale filtrelor utilizate.

Detectorul utilizat este un tub fotomultiplicator multialcalin (Hamamatsu R-7602-1/Q), selectat pentru numarare de fotoni singulari. Pentru a obtine o reducere semnificativa a curentului intrinsec de intuneric, tubul fotomultiplicator este racit la  $-30^\circ\text{C}$ , folosind un sistem de circulatie cu lichid rece in contact direct cu suprafata sa. Detectorul a fost plasat cat se poate de aproape de proba, astfel incat, din punct de vedere geometric, eficienta totala a acestui tip de aranjament este de aproximativ 8%, cu un ordin de marime mai mare decat cea obtinuta cu majoritatea sistemelor folosite anterior.

Raspunsul in diferitele regiuni spectrale este conditionat de eficienta cuantica a fotomultiplicatorului, a carui putere radianta este maxima pentru  $\lambda$  in jur de 400 nm (Fig. 3). Figura 4 prezinta transmisia efectiva a celor sapte filtre utilizate, luand in considerare eficienta fotomultiplicatorului. Se observa ca eficienta globala de colectare a fotonilor este apreciabil redusa in zona infrarosului apropiat.

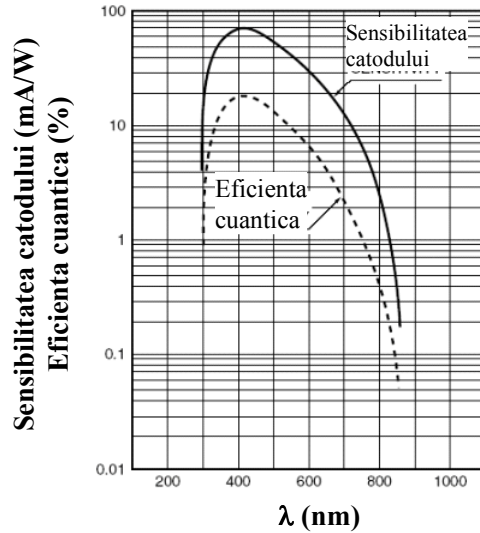


Fig. 3. Eficienta cuantica a fotomultiplicatorului.

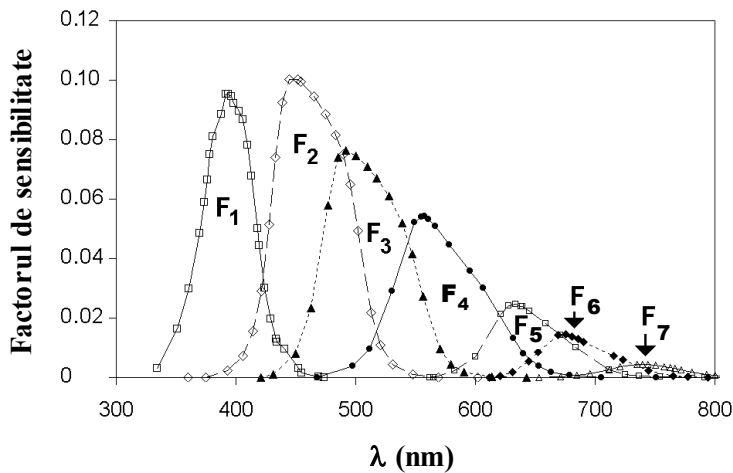


Fig. 4. Raspunsul sistemului in diferite regiuni spectrale. Factorul de sensibilitate reprezinta produsul dintre eficienta cuantica a fotomultiplicatorului si transmisia filtrului respectiv.  $F_j$  indica filtrul folosit.

In timpul pulsurilor de laser un numar mare de fotoni (de ordinul a  $10^{12}$ ) imprastiati de proba pot ajunge la fotocatod intr-un timp de 1 ns, distrugand ireversibil fotomultiplicatorul. Pentru a preveni acest efect si pentru a garanta un start rapid al achizitiei de semnal, s-a utilizat un sistem electronic de reducere, capabil sa modifice tensiunea electrica aplicata pe primele doua dinode ale fotomultiplicatorului (Tudisco s.a., 2003). Acest dispozitiv electronic permite ca achizitia de semnal sa inceapa la 10  $\mu$ s dupa pulsul de iluminare. Semnalele detectate sunt inregistrate cu un dispozitiv multicanal (Ortec MCS PCI), capabil sa colecteze semnale analogice sau logice ca functie de timp, cu un pas minim de timp de 200 ns.

In jurul probei sunt dispuse o serie de rezistente legate la un alimentator DF315B Power Supply Dual Output (0-30 V, 0-3 A), ceea ce permite varierea temperaturii probei.

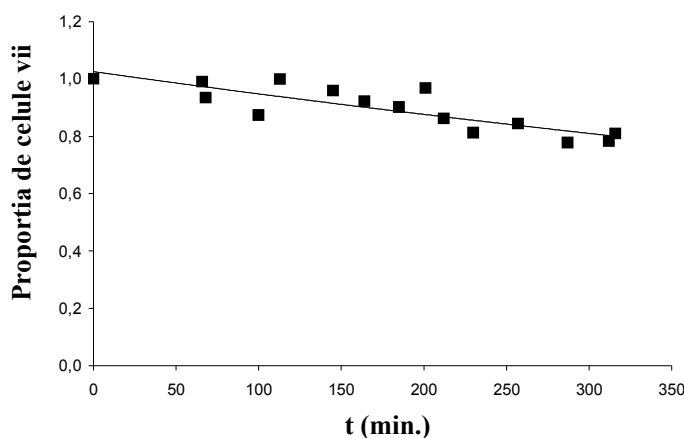
Luminiscenta intarziata depinde de intensitatea luminii cu care este excitat sistemul. Este necesar deci un control constant al intensitatii laserului in timpul masuratorii. In acest scop, o extremitate a fibrei optice este conectata la un dispozitiv (Power meter PD10, Ophir) de masurare a acestei intensitati. S-a determinat ca eroarea introdusa de fluctuatiile intensitatii laserului este de 3-4%.

Aparatul de masura a fost calibrat riguros utilizand materiale a caror stare nu se modifica in timp, in particular fiind ales rubinul. Masuratori sistematice efectuate cu acest sistem arata ca pentru semnale semnificativ mai mari decat semnalul de fond, eroarea de masura in acest caz este de 3-4%.

### 3. Rezultate preliminare

#### Cresterea celulelor normale

Am obtinut ca celulele normale de drojdie cresc in mediu lichid YPD la 30°C cu un timp mediu de dublare de  $90.2 \pm 4.3$  min. ( $n = 4$ ). Prin metoda colorarii cu albastru de metil a fost estimata rata mortii celulare, presupunand ca toate celulele moarte prezente in cultura pentru  $t < 350$  min. sunt exclusiv celule care au fost prezente la momentul inocularii,  $t = 0$ . Timpul mediu de viata obtinut prin acord exponential cu datele obtinute (Fig. 5) este evaluat ca fiind 882 min., ceea ce inseamna ca celulele normale de drojdie mor in medie dupa zece diviziuni, ceea ce justifica aproximatia facuta mai sus.



**Fig. 5.** Supravietuirea celulelor normale in YPD la 30°C. Numarul de celule moarte este scazut din numarul total de celule, iar diferenta este normalizata la numarul initial de celule vii. Linia reprezinta acordul teoretic cu datele prin functie exponentiala.

#### Efecte ale iradierii cu protoni accelerati

In celulele iradiate cu 200 Gy protoni, supravietuirea obtinuta prin cultivare imediata pe

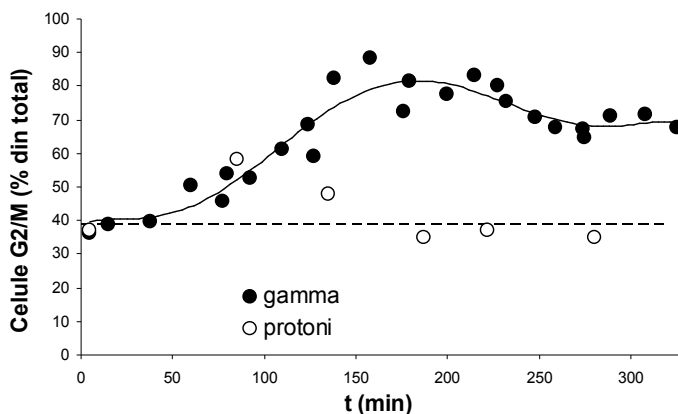
mediu solid, este de cca. 27%. Dintre celulele vii iradiate, numai 27% sunt capabile sa supravietuiasca, sa finalizeze primul ciclu celular si apoi sa se divida normal de mai mult de doua ori. Restul celulelor nu reusesc sa repare eficient, in timpul progresiei ciclului celular, leziunile provocate de radiatie.

Dupa 85 min. de la iradiere fractia celulelor aflate in  $G_2/M$  prezinta o crestere pana la 57%, in comparatie cu valoarea normala de 37% in culturi normale aflate in crestere exponentiala, ajunge apoi la 30% pentru  $t = 135$  min. si revine la nivelul normal pentru  $t > 150$  min. (date prezentate in Fig. 6). In concluzie, punctul de control din  $G_2/M$  este mentinut activ in timpul primelor 2,5 ore de la iradiere, intrucat acumularea celulelor cu mugure mare in cultura iradiata corespunde celulelor blocate temporar in punctul de control din  $G_2/M$  (Vialard s.a., 1998).

### Efecte ale radiatiei $\gamma$

La o doza absorbita de 200 Gy, am obtinut ca celulele iradiate cu radiatie  $\gamma$  se opresc progresiv in  $G_2/M$ , obtinandu-se o proportie maxima de celule cu mugure mare, de cca. 80% din totalul celulelor, la 180 min. dupa iradiere (Fig. 6). Proliferarea celulara este intrerupta pentru  $\cong 130$  min. in urma iradierii, celulele acumulandu-se in punctul de control din  $G_2/M$  in primul ciclu celular si incepand sa se divida atunci cand toate leziunile produse de radiatii sunt reparate.

Acumularea celulelor in punctul de control din  $G_2/M$  este mai accentuata in cazul radiatiei  $\gamma$  decat la iradierea cu protoni, fractia maxima de celule cu mugure mare fiind de aproximativ 82% si 57%, obtinute la cca. 180 min. si, respectiv, 85 min. (Fig. 6). Acest rezultat sugereaza ca protonii afecteaza in mai mare masura decat radiatia  $\gamma$  mecanismele celulare de reparare a rupturilor ADN-ului, o cauza posibila fiind inactivarea unui numar mai mare de gene. Spre deosebire de radiatia  $\gamma$ , care produce ionizari cu o distributie spatiala relativ uniforma, protonii produc mai multe ionizari, care sunt mai localizate (clusteri de ionizari), astfel incat leziunile sunt cu mult mai severe (mai multe fragmentari ale ADN-ului produse in secventa unei singure gene).



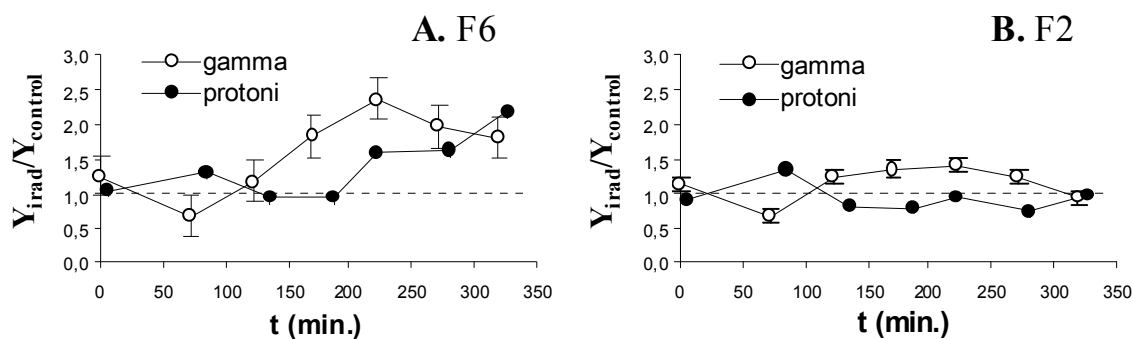
**Fig. 6.** Blocarea in punctul de control din  $G_2/M$  in urma iradierii cu protoni induce o crestere tranzitorie a fractiei de celule aflate la sfarsitul fazei  $G_2$  sau in mitoză (% din numarul total de celule din suspensie), spre deosebire de distributia uniforma in conditii normale (linia punctata reprezinta media obtinuta in culturile celulare neiradiate). Datelor obtinute pentru radiatia  $\gamma$  li se asociaza o functie polinomiala (curba continua).



## Efecte ale radiatiei asupra luminiscentei intarziate

Emisia de fotoni este determinata de anumite marimi independente, si anume: numarul initial de stari excitate, probabilitatea ca o stare sa emita un foton intr-o secunda si distributia starilor care emit radiatie cu rate diferite. In cele ce urmeaza vom descrie emisia fotonica prin dependenta temporala a intensitatii  $I(t)$  a luminii emise (adica numarul de fotoni emisi in unitatea de timp), produsul total  $Y$  (o marime proportionala cu numarul total de fotoni emisi, sau, echivalent, cu numarul total de stari excitate la  $t = 0$ ), probabilitatea de emisie caracteristica populatiei dominante de stari si proportia acestor stari dominante relativa la numarul total de stari excitate. Ultimele doua marimi sunt calculate pentru regiunea dominanta a emisiei (primele 55  $\mu$ s dupa stimularea laser) in care scaderea intensitatii este aproximata ca fiind exponentiala in timp (aproximatie explicata mai jos).

Am observat un efect interesant, caracterizat de emisia mai pronuntata a luminii cu lungimea de unda  $\lambda_{emis} = 645$  nm de catre cultura celulara dupa iradiere (atat cu radiatie  $\gamma$  cat si cu protoni), la momente ( $t > 120$  min.) in care proportia celulelor-mama scade considerabil in cultura (<10% la sfarsitul experimentului).



**Fig. 7.** Cresterea produsului total al emisiei corespunzator componentelor spectrale F6 ( $\lambda_{emis} = 645$  nm) si F2 ( $\lambda_{emis} = 460$  nm) ale luminii emise de celulele iradiate ( $Y_{irad}$ ) relativ la valoarea corespunzatoare celulelor neiradiate ( $Y_{control}$ ) la diferite momente dupa iradiere. Fiecare valoare a produsului total al emisiei este normalizat la numarul de celule din proba respectiva.

In timp ce atat in celulele iradiate cu protoni cat si in cele iradiate cu radiatie  $\gamma$ , emisia de lumina cu lungime de unda de 645 nm prezinta in medie o crestere consistenta fata de valoarea obtinuta cu celulele neiradiate (Fig. 7A), emisia de lumina cu lungime de unda de 460 nm are o alta evolutie, cu variatii relativ mici in jurul valorii de referinta, pentru ambele tipuri de radiatii ionizante (Fig. 7B).

### Bibliografie

- Andreassen, P.R., Lohez, O.D., Margolis, R.L. 2003. G<sub>2</sub> and spindle assembly checkpoint adaptation, and tetraploidy arrest: implications for intrinsic and chemically induced genomic instability. *Mutation Res.* **532**: 245–253
- Galanin, M.D. 1996. Luminescence of Molecules and Crystals. Cambridge International Science Publishing, Cambridge

- Grundler, W., Abmayr, W. 1983. Differential inactivation analysis of diploid yeast exposed to radiation of various LET. I. Computerized single-cell observation and preliminary application to X-ray treated *Saccharomyces cerevisiae*. *Radiat. Res.* **94**: 464-479
- Iida, H., Yagawa, Y., Anraku, Y. 1990. Cell cycle control by Ca<sup>2+</sup> in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **265**: 13391-13399
- Longhese, M.P., Clerici, M., Lucchini, G. The S-phase checkpoint and its regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Res.* **532**: 41-58
- Muller, E.G.D. 1991. Thioredoxin deficiency in yeast prolongs S phase and shortens the G1 interval of the cell cycle. *J. Biol. Chem.* **266**: 9194-9202
- Scordino A, Triglia A, Musumeci F. 2000. Analogous features of delayed luminescence from *Acetabularia acetabulum* and some solid state systems. *J. Photochem. Photobiol. B* **56**: 181-186
- Siede, W. 1995. Cell cycle arrest in response to DNA damage: lessons from yeast. *Mutation Res.* **337**: 73-84
- Tudisco S, Musumeci F, Scordino A, Privitera G. 2003. Advanced research equipment for fast ultraweak luminescence analysis. *Rev. Sci. Instr.* **74**: 4485-4490
- Tudisco, S., Scordino, A., Privitera, G., Baran, I., Musumeci, F. 2004. *Nucl. Instr. Methods Phys. Res. A* **518**: 463-464
- Usami, N., Yokoya, A., Ishizaka, S., Kobayashi, K. 2001. Reparability of lethal lesions produced by phosphorus photoabsorption in yeast cells. *J. Radiat. Res.* **42**: 317-331
- Vialard, J.E., Gilbert, C.S., Green, C.M., Lowndes, N.F. 1998. The budding yeast Rad9 checkpoint protein is subjected to Mec1/Tell1-dependent hyperphosphorylation and interacts with Rad53 after DNA damage. *EMBO J.* **17**:5679-5688.