

ΕθΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

Σ χολή Εφαρμόσμενων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών

ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΚΗΣ

«Ανίχνευση ομαδοποιημένων βλαβών στο DNA ανθρώπινων κυττάρων κατόπιν έκθεσης σε ιοντίζουσα ακτινοβολία»

Διπλωματική εργασία

ΙΦΙΓΕΝΕΙΑ Β. ΜΑΥΡΑΓΑΝΗ

Επιβλέπων: Δρ. Αλέξανδρος Γεωργακίλας, Επ. Καθ. Ε.Μ.Π.

Αθήνα, 2014



EΘΝΙΚΟ MΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

Σ χολή \mathbf{E} φαρμόσμενων \mathbf{M} αθηματικών και $\mathbf{\Phi}$ υσικών \mathbf{E} πιστημών

ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΚΗΣ

«Ανίχνευση ομαδοποιημένων βλαβών στο DNA ανθρώπινων κυττάρων κατόπιν έκθεσης σε ιοντίζουσα ακτινοβολία»

Διπλωματική εργασία της

ΙΦΙΓΕΝΕΙΑΣ Β. ΜΑΥΡΑΓΑΝΗ

Επιβλέπων: Δρ. Αλέξανδρος Γεωργακίλας, Επ. Καθ. Ε.Μ.Π.

Εγκρίθηκε από την τριμελή εξεταστική επιτροπή την Παρασκευή, 11 Απριλίου 2014.

Αλέξανδρος Γεωργακίλας	Γεωργία Τερζούδη	Μυρσίνη Μακροπούλου
Επ. Καθηγητής, Ε.Μ.Π.	Ερευνήτρια Β΄, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε.	Αν. Καθηγήτρια, Ε.Μ.Π.

Copyright © - All rights reserved Ιφιγένεια Β. Μαυραγάνη.

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν στη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς τη συγγραφέα.

•••••

Ιφιγένεια Β. Μαυραγάνη

Διπλωματούχος Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών, Ε.Μ.Π.

© 2014 – All rights reserved

Στη γιαγιά μου

$\mathcal{\Pi}_{ ext{EPIAH}\Psi ext{H}}$

Η έκθεση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία (Ι.Α.) επάγει βλάβες στο κυτταρικό DNA, οι οποίες παρουσιάζουν ποικιλία και αρκετές φορές αυξημένη πολυπλοκότητα. Οι ομαδοποιημένες (σύνθετες) βλάβες του DNA και κυρίως οι δίκλωνες θραύσεις θεωρούνται ως οι περισσότερο επιβλαβείς, καθώς αν δεν επιδιορθωθούν μπορεί να οδηγήσουν σε κρίσιμες συνέπειες για την κυτταρική επιβίωση και αυξημένο κίνδυνο μεταλλάξεων και καρκινογένεσης. Η απόκριση των κυττάρων στις επαγόμενες βλάβες πραγματοποιείται με ενεργοποίηση ενός πολύπλοκου μηχανισμού που τις ανιχνεύει και τις επιδιορθώνει (μονοπάτι απόκρισης σε βλάβη του DNA). Στα σημεία των δίκλωνων θραύσεων η ιστόνη Η2ΑΧ φωσφορυλιώνεται άμεσα. Η φωσφορυλιωμένη ιστόνη γ-Η2ΑΧ, αποτελεί καίριας σημασίας παράγοντα στην απόκριση σε βλάβη του DNA και η οπτικοποίησή της με ανοσοφθορισμό (εστίες γ-Η2ΑΧ) επιτρέπει την εκτίμηση της βλάβης, μιας και υπάρχει σχέση αναλογίας μεταξύ του αριθμού των εστιών και των δίκλωνων θραύσεων. Ως εκ τούτου, οι εστίες γ-Η2ΑΧ μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες της βλάβης, ενώ η σταδιακή μείωσή τους με το πέρας του χρόνου θεωρείται ένδειξη της επιδιόρθωσής της. Σε αυτή την εργασία μελετήθηκε η παρουσία των εστιών γ-Η2ΑΧ σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος, εκτεθειμένα ex vivo σε δόσεις από 0.2 έως 2 Gy ακτινοβολίας-γ και σε καρκινικά κύτταρα MCF-7 εκτεθειμένα σε δόσεις από 0.5 έως 4 Gy. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων υπέδειξαν μια γραμμική συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των επαγόμενων εστιών και της δόσης. Στην περίπτωση των λεμφοκυττάρων κρίθηκε σκόπιμη και η μελέτη της επιδιόρθωσης των βλαβών, η

οποία αποκάλυψε μια εκθετική μείωση του αριθμού των επαγόμενων εστιών συναρτήσει του χρόνου μετά την ακτινοβόληση και πλήρη επιδιόρθωση των βλαβών λίγες ώρες αργότερα. Τέλος, έγινε προσπάθεια αυτόματης καταμέτρησης των εστιών με το λογισμικό Jcount και σύγκρισης των αποτελεσμάτων με την προηγούμενη μέθοδο. Τα αποτελέσματα της διπλωματικής εργασίας ενισχύουν την αντίληψη πως η γ-H2AX μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδοσίμετρο, αλλά και ως βιοδείκτης ακτινοευαισθησίας.

ΛΕΞΕΙΣ - ΚΛΕΙΔΙΑ: ιοντίζουσα ακτινοβολία, δίκλωνες θραύσεις του DNA, επιδιόρθωση βλαβών DNA, φωσφορυλίωση ιστόνης H2AX, εστίες γ-H2AX, ανοσοφθορισμός, λογισμικό Jcount



Ionizing radiation (IR) - induced DNA damage is diverse and sometimes considerably complex. Clustered (complex) DNA damages, especially double strand breaks (DSBs), are considered to be the most deleterious DNA lesions, which, if left unrepaired, may lead to serious consequences for cell survival, potential mutations and carcinogenesis through chromosomal instability. Cellular response to DNA damage starts with the activation of a complex mechanism, developed to detect and repair such lesions (DNA damage response pathway - DDR). Upon DNA DSB induction, the histone H2AX becomes rapidly phosphorylated. This modified form, y-H2AX, is a key factor for DDR (DSB repair) and its visualization by immunofluorescence (γ -H2AX foci) allows the assessment of DNA damage, as there is a direct relationship between foci number and DSB. Thus, y-H2AX foci serve as a sensitive marker of DNA DSB induction, whilst reduction in foci number hours after exposure to IR is an evidence of DNA damage repair. In this study the presence of y-H2AX foci is investigated in human peripheral blood lymphocytes exposed ex vivo to y-rays, in a dose range of 0.2 to 2 Gy, as well as in MCF-7 cells exposed in a dose range of 0.5 to 4 Gy. Experimental results show that y-H2AX foci induce linearly with radiation dose. In the case of lymphocytes, the investigation of DNA damage repair was deemed useful and therefore the analysis of the loss of γ -H2AX foci at various times after y-ray exposure, reveals that the level of y-H2AX foci reduces with time after irradiation and eventually a few hours is the time needed for full recovery of foci induction. Lastly, there was an effort for automatic focus counting with Jcount software. Results from this study amplify evidence that γ -H2AX may be useful for biodosimetry, as well as for the assessment of individual radiosensitivity.

KEYWORDS: ionizing radiation, DNA DSBs, DNA damage repair, histone H2AX phosphorylation, γ -H2AX foci, immunofluorescence, Jcount software



Με την ολοκλήρωση αυτής της διπλωματικής εργασίας, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στον επιβλέποντα καθηγητή μου, Δρ. Αλέξανδρο Γεωργακίλα, για την αμέριστη εμπιστοσύνη που μου έδειξε όχι μόνο στην ανάθεση της παρούσας εργασίας, αλλά και στο γενικότερο συγγραφικό έργο [1, 2]. Τον ευχαριστώ θερμά για τις πολύτιμες γνώσεις που μου μετέδωσε, την άπλετη βοήθεια και στήριξή του, καθώς και για την άψογη συνεργασία μας.

Τα πειράματα της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο του Δρ. Γαβριήλ Παντελιά, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος»- εργαστήριο Υγειοφυσικής του Ινστιτούτου Πυρηνικών και Ραδιολογικών Επιστημών και Τεχνολογίας, Ενέργειας και Ασφάλειας, με υπεύθυνη τη Δρ. Γεωργία Τερζούδη. Θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την υποστήριξη και τη βοήθειά της, καθώς και για όσα μου παρείχε κατά τη διάρκεια της παρουσίας μου στο εργαστήριο. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στη Δρ. Βασιλική Χατζή για το χρόνο που διέθεσε προκειμένου να μου δείξει διάφορες πειραματικές τεχνικές και να μου μεταδώσει πολύτιμες γνώσεις Βιολογίας.

Θέλω να εκφράσω τη βαθιά μου εκτίμηση και στην καθηγήτριά μου Μυρσίνη Μακροπούλου, η οποία μου δίδαξε τα πρώτα μαθήματα Βιοφυσικής και Ιατρικής Φυσικής και ήταν πάντα διαθέσιμη για ό,τι χρειαζόμουν, καθ' όλη τη διάρκεια των προπτυχιακών μου σπουδών στη σχολή Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών.

Επίσης, οφείλω ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτορα Ζαχαρένια Νικητάκη, για την υποστήριξη και την καθοδήγησή της, για τις αμέτρητες ώρες που αφιέρωσε μαζί μου στο εργαστήριο και για τις εύστοχες παρατηρήσεις της στη συγγραφή της εργασίας, καθώς και στα υπόλοιπα μέλη της ομάδας μας, Αναστάσιο Μαγγέλη και Δανάη Λασκαράτου.

Τέλος, να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για τη συνεχή ηθική και υλική στήριξή της και το Χρήστο Χατζηαποστολάκη για τη διαρκή του συμπαράσταση και αγάπη.

Ιφιγένεια Β. Μαυραγάνη

Αθήνα, 2014

$\mathcal{T}_{ ext{epiexomena}}$

Περίληψη	v
Abstract	vii
Ευχαριστίες	ix
Περιεχόμενα	xi

Α. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ - ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

1.1 B	1.1 Βιολογία του κυττάρου3		
1	1.1.1	Εισαγωγή	3
1	1.1.2	Δομή ευκαρυωτικών κυττάρων	4
1.2 T	ο γενε	τικό υλικό5)
1	1.2.1	Εισαγωγή	5
1	1.2.2	Δομή του DNA	6

1.5 Ο κυτταρικός κύκλοςα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΚΤΙΝΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

2.1 Αλληλεπίδραση ιοντίζουσας ακτινοβολίας και βιολογικής ύλης11		
2.1.1	Εισαγωγή11	
2.1.2	Αλληλεπίδραση γ-ακτινοβολίας με την ύλη13	
2.1.3	Στάδια βιολογικής δράσης της ιοντίζουσας ακτινοβολίας15	
2.1.4	Τροποποιητικοί μηχανισμοί δράσης της ιοντίζουσας ακτινοβολίας18	
2.2 Βιολογικά αποτελέσματα σε μοριακό επίπεδο20		
2.2.1	Άμεση δράση20	
2.2.2	Έμμεση δράση – η ραδιόλυση του ύδατος20	
2.2.3	Βλάβες DNA - επιδιόρθωση22	
2.3 Βιολογ	νικά αποτελέσματα σε κυτταρικό επίπεδο26	
2.3.1	Γονιδιακές μεταλλάξεις26	
2.3.2	Χρωμοσωματικές αλλοιώσεις26	
2.3.3	Κυτταρικός θάνατος27	
2.3.4	Νεότερες θεωρήσεις28	
2.4 Βιολογικά αποτελέσματα σε επίπεδο ιστών - οργάνων31		
2.4.1	Καθορισμένα αποτελέσματα33	
2.4.2	Στοχαστικά αποτελέσματα34	
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΣΤΙΩΝ γ-Η2ΑΧ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ		

ΒΛΑΒΩΝ DNA

3.1 Εισαγωγή	37
3.2 Η πρωτεΐνη H2AX	
3.3 Φωσφορυλίωση της Η2ΑΧ	40

3.4 Μέθοδοι ανίχνευσης	41
3.5 Σχηματισμός γ-Η2ΑΧ λόγω ιοντίζουσας ακτινοβολίας και καρκίνος	42
3.6 Εφαρμογές των εστιών γ-Η2ΑΧ	43

Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ - ΠΕΙΡΑΜΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

4.1	1 Σκοπός του πειράματος49		
4.2	Υλικά	και μέθοδοι	50
	4.2.1	Απομόνωση λεμφοκυττάρων	.51
	4.2.2	Καλλιέργεια MCF-7	.53
	4.2.3	Ακτινοβόληση κυττάρων	.54
4.3	Πρωτ	όκολλο πειράματος	.55
	4.3.1	Λεμφοκύτταρα	.55
	4.3.2	MCF-7	.59

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

5.1 Πείραμα απόκρισης στη δόση	61
5.2 Πείραμα επιδιόρθωσης	66
5.3 Επεξεργασία δεδομένων με το λογισμικό Jcount	71
5.4 Μελλοντικές βελτιώσεις	76
5.5 Συμπεράσματα	77

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	79
--------------	----

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ - ΕΙΣΑΓΩΓΗ

кефалаю 1

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

1.1 Βιολογία του κυττάρου

1.1.1 Εισαγωγή

Η κυτταρική θεωρία βοηθά στην περιγραφή της δομής και των ιδιοτήτων της έμβιας ύλης και σύμφωνα με αυτήν, η θεμελιώδης δομική και λειτουργική μονάδα όλων των οργανισμών είναι το κύτταρο. Το κύτταρο μπορεί να οριστεί ως μία συστηματικά οργανωμένη ομάδα μορίων που βρίσκονται σε δυναμική αλληλεπίδραση [3]. Τα κύτταρα περιέχουν μοριακά και βιοχημικά συστήματα υψηλού βαθμού οργάνωσης, τα οποία μπορούν να αποθηκεύουν και να μεταφράζουν πληροφορίες και να συνθέτουν κυτταρικά μεγαλομόρια. Επίσης, έχουν την ικανότητα να μετακινούνται και να μεταβάλλουν τις εσωτερικές αντιδράσεις τους προκειμένου να προσαρμοστούν σε περιβαλλοντικές αλλαγές (ομοιόσταση).

1.1.2 Δομή ευκαρυωτικών κυττάρων

Κάθε κύτταρο αποτελείται από μια ογκώδη κεντρική δομή με χαρακτηριστικό οχήμα, τον πυρήνα και ένα μεγάλο αριθμό μεμβρανικών διαμερισμάτων. Τα κύτταρα αυτά ονομάζονται ευκαρυωτικά (ευ + κάρυον). Περιβάλλονται από πλασματική μεμβράνη και παρουσιάζουν μεγάλο βαθμό εξειδικευμένης διαμερισματοποίησης, η οποία επιτυγχάνεται με ενδοκυτταρικές μεμβράνες και επιτρέπει τη διεξαγωγή βιοχημικών αντιδράσεων [3]. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα ο πυρήνας, που αποτελεί την αποθήκη πληροφοριών του κυττάρου, διαχωρίζεται από το κυτταρόπλασμα με μια διπλομεμβρανική δομή (πυρηνικός φάκελος). Μέσα στον πυρήνα υπάρχουν ινίδια χρωματίνης (DNA, ιστόνες και μη ιστονικές πρωτεΐνες) και ένας ή περισσότεροι πυρηνίσκοι [4].

Στο κυτταρόπλασμα υπάρχουν πολλαπλές δομές και οργανίδια, όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο (Ε.Δ.), η συσκευή Golgi, μιτοχόνδρια , λυσοσωμάτια και ένας αριθμός διαφόρων κυστιδίων. Υπεύθυνος για τις κινήσεις του κυττάρου, αλλά και τον καθορισμό του σχήματος του, είναι ο κυτταρικός σκελετός, ο οποίος αποτελείται από ένα σύστημα ινιδίων (νημάτια ακτίνης, μικροσωλινίσκοι και ενδιάμεσα ινίδια) [5].

Εικόνα 1.1 Αναπαράσταση ενός τυπικού ευκαρυωτικού κυττάρου. Διακρίνονται: 1. Πυρηνίσκος, 2. Πυρήνας, 3. Λείο Ε.Δ., 4. Ριβοσωμάτια, 5. Κυστίδια, 6. Λυσοσωμάτιο, 7. Συσκευή Golgi, 8. Μιτοχόνδριο, 9. Αδρό Ε.Δ., 10. Κυτταροσκελετός, 11.Πλασματική μεμβράνη.



1.2 Το γενετικό υλικό

1.2.1 Εισαγωγή

Τα πυρηνικά οξέα, ριβοζονουκλεϊνικό οξύ (RNA) και δεοξυριβοζονουκλεϊνικό οξύ (DNA), αποτελούν τα μόριααποθήκευσης πληροφορίας των έμβιων όντων. Πρόκειται για μακριά βιοπολυμερή που σχηματίζονται από επαναλαμβανόμενες υπομονάδες, τα νουκλεοτίδια, κύριος ρόλος των οποίων είναι η αποθήκευση και ανάκληση βιολογικών πληροφοριών [5]. Ένα νουκλεοτίδιο αποτελείται από έναν αζωτούχο δακτύλιο (βάση), που συνδέεται με ένα σάκχαρο με 5 άτομα C (πεντόζη: ριβόζη ή δεσοξυριβόζη) και μία ή περισσότερες φωσφορικές ομάδες, συνδεδεμένες στο σάκχαρο. Τα νουκλεϊνικά οξέα που βασίζονται στο σάκχαρο ριβόζη είναι γνωστά ως ριβοζονουκλεϊνικά (RNA) και περιέχουν τις βάσεις αδενίνη (A), ουρακίλη (U), γουανίνη (G) και κυτοσίνη (C), ενώ εκείνα που βασίζονται στη δεοξυριβόζη ονομάζονται δεοξυριβοζονουκλεϊνικά (DNA) και περιέχουν τις βάσεις αδενίνη, θυμίνη (Τ), γουανίνη και κυτοσίνη. Η γραμμική αλληλουχία των νουκλεοτιδίων σε ένα μόριο RNA ή DNA κωδικοποιεί τις γενετικές πληροφορίες του κυττάρου και ευθύνεται για την αποθήκευση και μεταβίβαση πληροφοριών για την πρωτεϊνοσύνθεση. То RNA βρίσκεται στα κύτταρα στη μορφή μιας πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας και συνήθως είναι εφήμερος φορέας μοριακών οδηγιών. Το DNA σχεδόν πάντα υπάρχει στη μορφή ενός δίκλωνου μορίου, αποτελούμενου από 2 πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες με αντιπαράλληλη κατεύθυνση, που συγκρατούνται από δεσμούς υδρογόνου ανάμεσα στις βάσεις τους και λειτουργεί ως μακροπρόθεσμη «αποθήκη» κληρονομικών πληροφοριών.

1.2.2 Δομή του DNA

Η καθοριστικότερη στιγμή στην έρευνα του DNA ήταν αναμφίβολα η ανακάλυψη της δομής του. Τον Απρίλιο του 1953, οι James Watson και Francis Crick προσδιόρισαν το μόριο του DNA ως μία δεξιόστροφα συστρεφόμενη διπλή έλικα δεοξυριβοζονουκλεϊκού οξέος [6], βάσει κρυσταλλογραφικών δεδομένων ακτίνων-Χ που παρείχαν οι Rosalind Franklin και Maurice Wilkins [7, 8]. Πρότειναν ότι το μόριο είναι κατασκευασμένο από μία δίκλωνη δομή νουκλεοτιδίων, με τη μία έλικα να ανέρχεται και την άλλη να κατέρχεται. Οι δύο κλώνοι συγκρατούνται με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των βάσεων, ενώ κάθε κλώνος αποτελείται από νουκλεοτίδια. Στις συνηθισμένες τους δομικές διαμορφώσεις η αδενίνη με τη θυμίνη σχηματίζουν δύο δεσμούς υδρογόνου, ενώ η κυτοσίνη με τη γουανίνη τρεις.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ένζυμα όπως οι πολυμεράσες ενώνουν τα νουκλεοτίδια μεταξύ τους σε μία αλυσίδα, προσδένοντας το σάκχαρο του ενός μορίου στη

φωσφορική ομάδα ενός άλλου, δημιουργώντας ένα μονόκλωνο (singlestranded) μόριο DNA. Λόγω της αστάθειας του μορίου αυτού, είναι σύνηθες το DNA να σχηματίζει ένα δίκλωνο (doublestranded) διαμέτρου μόριο 2 nm, ενώνοντας τις βάσεις του ενός κλώνου με τις βάσεις του άλλου. Η διπλή έλικα συμπληρώνει μία πλήρη περιστροφή κάθε 3,4 nm και δεδομένου ότι η απόσταση μεταξύ δύο διαδοχικών βάσεων είναι 0,34 nm, υπάρχουν περίπου 10 ζεύγη ανά περιστροφή.



Λόγω του καθορισμένου τρόπου ζευγαρώματος των βάσεων, οι δύο αλυσίδες του DNA είναι συμπληρωματικές μεταξύ τους, οπότε η νουκλεοτιδιακή αλληλουχία της μίας αλυσίδας καθορίζει και την αλληλουχία της δεύτερης. Η συμπληρωματικότητα έχει τεράστια σημασία για τον αυτοδιπλασιασμό του DNA, μια ιδιότητα που το καθιστά το καταλληλότερο μόριο για τη διατήρηση και τη μεταβίβαση της γενετικής πληροφορίας [5]. Η αλληλουχία των βάσεων κατά μήκος του μορίου του DNA μεταφέρει τη γενετική πληροφορία του κυττάρου.

Κάθε μόριο DNA συμπυκνώνεται δημιουργώντας ένα ξεχωριστό χρωμόσωμα. Αρχικά το DNA πακετάρεται με πρωτεΐνες και σχηματίζει ινίδια χρωματίνης. Βασική μονάδα οργάνωσης της χρωματίνης είναι το νουκλεόσωμα, το οποίο συνίσταται από DNA μήκους 146 ζευγών βάσεων γύρω από ένα οκταμερές ιστονών. Τα ινίδια χρωματίνης αναδιπλώνονται, με τη βοήθεια πρωτεϊνών μη-ιστόνων και σχηματίζουν τα χρωμοσώματα (Εικόνα 1.3). Το σύνολο της γενετικής πληροφορίας που είναι αποθηκευμένο στα χρωμοσώματα ενός οργανισμού, αποτελεί το γονιδίωμά του. Το ανθρώπνο γονιδίωμα περιέχει 3·10⁹ ζεύγη νουκλεοτιδίων, τα οποία είναι οργανωμένα σε 24 χρωμοσώματα (22 διαφορετικά αυτοσωματικά και 2 διαφορετικά φυλετικά).

Το DNA εξυπηρετεί δύο πολύ σημαντικές λειτουργίες, διαβιβάζει πληροφορίες από μία γενιά κυττάρων στην επόμενη (αντιγραφή) και παρέχει την πληροφορία για τη σύνθεση συστατικών (πρωτεΐνες), απαραίτητων για την κυτταρική λειτουργία (μεταγραφή).



Εικόνα 1.3 Βαθμοί συσπείρωσης του DNA: από το χρωμόσωμα στη διπλή έλικα του DNA. (Πηγή: sciencelearn.org.nz)

1.3 Ο κυτταρικός κύκλος

Για να σχηματιστεί ένα λειτουργικό χρωμόσωμα, ένα μόριο DNA δεν αρκεί απλώς να μεταφέρει γονίδια, πρέπει να είναι ικανό και να αντιγράφεται και να μεταβιβάζει αξιόπιστα κάθε αντίγραφό του στα δύο θυγατρικά κύτταρα, κατά την κυτταρική διαίρεση. Οι διεργασίες αυτές συμβαίνουν σύμφωνα με μια ιεραρχική σειρά σταδίων (κυτταρικός κύκλος).

Ως κυτταρικός κύκλος ορίζεται το διάστημα από τη στιγμή της δημιουργίας ενός κυττάρου, μέχρι τη στιγμή του θανάτου του. Στον κύκλο ζωής του κυττάρου διακρίνονται ουσιαστικά δύο περίοδοι: μια περίοδος κατά την οποία το κύτταρο δεν διαιρείται (μεσόφαση) και μία περίοδος διαίρεσης Μ (μίτωση για τα σωματικά κύτταρα και μείωση για τα γαμετοκύτταρα). Αυτός ο κύκλος ζωής του κυττάρου, μεσόφαση-διαίρεση επαναλαμβάνεται σε κάθε κυτταρική γενιά, αλλά η διάρκειά του διαφέρει πολύ στα διάφορα είδη κυττάρων. Υπάρχουν κύτταρα που διαιρούνται πολύ συχνά, όπως τα επιθηλιακά και άλλα που διαιρούνται σπάνια ή καθόλου, όπως τα πολύ διαφοροποιημένα νευρικά κύτταρα.

Κατά τη μεσόφαση, το κύτταρο μεταγράφει ενεργά τα γονίδιά του και συνθέτει πρωτεΐνες. Επίσης, κατά τη μεσόφαση και πριν τη διαίρεση του κυττάρου, το DNA αντιγράφεται και τα χρωμοσώματα διπλασιάζονται. Η μεσόφαση υποδιαιρείται στις επιμέρους φάσεις: G1 (gap 1), S (σύνθεση) και G2 (gap 2). Στη φάση G1 (RNA και πρωτεΐνική σύνθεση) το κύτταρο αυξάνεται σε μέγεθος και αποφασίζεται η περαιτέρω πορεία του. Μπορεί είτε να ακολουθήσει τις επόμενες φάσεις του κύκλου και να διαιρεθεί, είτε να βγει εκτός κύκλου, στη φάση G0 (στη φάση αυτή παραμένουν τα τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα μετά τη διαφοροποίησή τους), είτε να σταματήσει προσωρινά στις φάσεις G1 ή G2 (G1- ή G2-arrest), είτε τέλος να πεθάνει πριν την ολοκλήρωση του κύκλου (να οδηγηθεί σε απόπτωση, δηλαδή στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο). Η επιλογή της πορείας που θα ακολουθηθεί εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το είδος του κυττάρου και το γενετικό πρόγραμμα που θα εκφράσει, αλλά επηρεάζεται σημαντικά και από το κυτταρικό μικροπεριβάλλον.

Πολλά κύτταρα περνούν το μεγαλύτερο ή και όλο το μέρος της ζωής τους στη φάση ηρεμίας (G0) και μπαίνουν σπάνια , ή και ποτέ, σε κυτταρικό κύκλο. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω του μηχανισμού της ομοιόστασης, για έλεγχο του πολλαπλασιασμού. Είναι ενεργά, αλλά εκτός κύκλου. Στο εργαστήριο, προκειμένου να υποχρεωθούν τέτοιου είδους κύτταρα να μπουν σε κύκλο απαιτείται η προσθήκη ενός μιτογόνου παράγοντα, συνήθως φυτοαιμαγλουτινίνης - PHA. Η φάση S είναι η φάση αντιγραφής (σύνθεσης, synthesis - S) του γενετικού υλικού. Η ολοκλήρωση της αντιγραφής του DNA οδηγεί στην τελευταία φάση της μεσόφασης, τη φάση G2, όπου το κύτταρο προετοιμάζεται για τη διαίρεσή του και την είσοδό του στη μίτωση, κατά

την οποία τα χρωμοσώματα συμπυκνώνονται, η έκφραση των γονιδίων σχεδόν σταματά, ενώ αποδομείται το πυρηνικό περίβλημα και σχηματίζεται η μιτωτική άτρακτος από μικροσωληνίσκους και άλλες πρωτεΐνες. Τα συμπυκνωμένα χρωμοσώματα αιχμαλωτίζονται από τη μιτωτική άτρακτο και εν συνεχεία μια πλήρης ομάδα χρωμοσωμάτων μετακινείται προς κάθε άκρο του κυττάρου, ενώ γύρω από κάθε ομάδα σχηματίζεται ένα πυρηνικό περίβλημα. Στο τελικό στάδιο της Μ, το κύτταρο διαιρείται και παράγει δύο θυγατρικά κύτταρα [9].

Ο κυτταρικός κύκλος συνήθως διαρκεί 24-48 ώρες στα περισσότερα κύτταρα θηλαστικών. Σημαντική είναι και η ύπαρξη σημείων ελέγχων (checkpoints: G1/S, S/G2, G2/M) τα οποία, εφόσον λειτουργούν σωστά, δεν επιτρέπουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου στην επόμενη φάση. Έτσι, αν ένα κύτταρο ακτινοβοληθεί στηνSφάση , το σημείο ελέγχου S/G2 δεν θα επιτρέψει τη πρόοδο του κυτταρικού κύκλου στη μίτωση M μέχρι την τελική επιδιόρθωση των βλαβών DNA. Είσοδος του κυττάρουστην M με παραμένουσες βλάβες μπορεί να οδηγήσει σε θραύσεις του γονιδιώματος και χρωμοσωματικές αλλοιώσεις (αστάθεια), αλλά και σε κυτταρικό θάνατο.



Εικόνα 1.4 Φάσεις κυτταρικού κύκλου. Διακρίνονται οι Μ, G1, S και G2. Η Μ συνήθως ακολουθείται από κυτταροκίνηση, κατά την S πραγματοποιείται η αντιγραφή του DNA, ενώ το κύτταρο αναπτύσσεται καθ' όλη τη μεσόφαση (G1, S, G2). Τα σχετικά μήκη των φάσεων που εμφανίζονται εδώ, είναι χαρακτηριστικά των ταχέως αναπαραγόμενων κυττάρων των θηλαστικών. [7]

кефалаю 2

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΚΤΙΝΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

2.1 Αλληλεπίδραση ιοντίζουσας ακτινοβολίας και βιολογικής ύλης

2.1.1 Εισαγωγή

Η ακτινοβολία είναι μορφή ενέργειας, η οποία εκπέμπεται από κάποια πηγή και διαδίδεται στο χώρο με οριακά μεγάλη ταχύτητα. Η ιοντίζουσα ακτινοβολία * (Ι.Α.) είναι ενέργεια ικανή να εισχωρήσει στην ύλη, να προκαλέσει τον ιοντισμό των ατόμων της, να διασπάσει βίαια χημικούς δεσμούς και να προκαλέσει βιολογικές βλάβες σε ζώντες οργανισμούς.

^{*} Στη σχετική επιστημονική βιβλιογραφία ο όρος απαντάται είτε ως «ιοντίζουσα», είτε ως «ιονίζουσα» ακτινοβολία. Ακολουθώντας την ορολογία της Ελληνικής Επιτροπής Ατομικής Ενέργειας στο παρόν κείμενο χρησιμοποιείται ο όρος «ιοντίζουσα».

Μεταφέρεται μέσω ακτίνων-Χ, ακτίνων-γ, β-σωματιδίων, α-σωματιδίων, νετρονίων, πρωτονίων ή και βαρέων ιόντων, όπως πυρήνες αζώτου, άνθρακα, αργού ή άλλων στοιχείων. Ο ιοντισμός ενός ατόμου είναι φυσικό φαινόμενο, που ακολουθεί την αλληλεπίδραση της ακτινοβολίας υψηλής ενέργειας με την ύλη και αφορά στη βίαιη εκδίωξη ενός ηλεκτρονίου από το άτομο, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ζεύγους αντίθετα φορτισμένων ιόντων.

Η διεισδυτικότητα των Ι.Α. στην ύλη εξαρτάται από το είδος της ακτινοβολίας και την ενέργεια που μεταφέρουν. Τα σωμάτια "α" ανακόπτονται από ένα φύλλο χαρτιού, τα σωμάτια "β" από μερικά χιλιοστά πλαστικού, ενώ η υψηλής ενέργειας ακτινοβολία "γ" απαιτεί σχετικά μεγάλα πάχη επιλεγμένων υλικών για να ανακοπεί (π.χ. μολύβδου, σκυροδέματος).

Οι Ι.Α. μπορούν να διαχωριστούν ανάλογα με την ενέργειά τους. Ακτινοβολίες που προκαλούν έντονους ιοντισμούς κατά μήκος της τροχιάς τους σε ένα υλικό (όπως σωματίδια-α, πρωτόνια ή βαρέα ιόντα) καλούνται ακτινοβολίες υψηλής γραμμικής μεταβίβασης ενέργειας (high linear energy transfer high-LET), φυσική ποσότητα που περιγράφει τη μέση ενέργεια που εναποτίθεται ανά μονάδα μήκους της τροχιάς των σωματιδίων στην ύλη και καθορίζει σε σημαντικό βαθμό τις συνέπειες που θα υποστεί το βιολογικό υλικό. Ακτινοβολίες χαμηλής LET (όπως φωτόνια ή ηλεκτρόνια) προκαλούν μικρό αριθμό



Εικόνα 2.1 Ακτινοβολίες (α) χαμηλής LET και (β) υψηλής LET. Και στις δύο περιπτώσεις παράγεται ο ίδιος αριθμός ιοντισμών, δηλαδή η ίδια δόση, αλλά με διαφορετικό αποτέλεσμα.

ιοντισμών και διεγέρσεων ανά μονάδα διαδρομής τους στο υλικό και κατά συνέπεια

λιγότερες βλάβες στους βιολογικούς ιστούς, σε σχέση με της ακτινοβολίες υψηλής LET (βαριά, φορτισμένα σωματίδια).

Η πιθανότητα βλάβης της υγείας σχετίζεται άμεσα με το μέτρο της δόσης της ακτινοβολίας. Η απορροφούμενη δόση D ορίζεται για όλα τα είδη Ι.Α. και για όλα τα υλικά, ως η μέση εναποτεθειμένη ενέργεια ανά μονάδα μάζας του υλικού, σε συγκεκριμένο σημείο:

$$D = \frac{d\overline{\varepsilon}}{dm}$$

Μονάδα της απορροφούμενης δόσης, στο σύστημα SI, είναι το Gray (Gy), το οποίο αντιστοιχεί σε απορροφούμενη μέση ενέργεια ενός Joule avά Kg προσβαλλόμενης ύλης (Joule / Kg).

2.1.2 Αλληλεπίδραση γ-ακτινοβολίας με την ύλη

Η αλληλεπίδραση των φωτονίων με την ύλη πραγματοποιείται κυρίως μέσω τριών φαινομένων: του φωτοηλεκτρικού, του φαινομένου Compton και της δίδυμης (ή τρίδυμης) γένεσης. Μικρότερης σημασίας φαινόμενα αποτελούν η σκέδαση Rayleigh, η σκέδαση Thomson και η φωτοπυρηνική αλληλεπίδραση (photonuclear reaction) [10].

• Φωτοηλεκτρικό φαινόμενο

Η αλληλεπίδραση ενός φωτονίου με το άτομο της ύλης, που έχει ως αποτέλεσμα την εκπομπή ενός από τα τροχιακά ηλεκτρόνια του ατόμου, περιγράφεται ως φωτοηλεκτρικό φαινόμενο. Οι αρχές διατήρησης της ενέργειας και της ορμής

επιβάλλουν το ηλεκτρόνιο να είναι δέσμιο στο άτομο (περίπου το 80% των φωτοηλεκτρικών φαινομένων πραγματοποιούνται με e⁻ της K στοιβάδας). Το φαινόμενο πραγματοποιείται όταν η ενέργεια του φωτονίου είναι μεγαλύτερη της ενέργειας σύνδεσης του e⁻. Το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο παρουσιάζει ισχυρή εξάρτηση από τον ατομικό αριθμό (Z) του υλικού και την ενέργεια των φωτονίων. Στους μαλακούς ιστούς (χαμηλό Z), η πιθανότητα εκπομπής χαρακτηριστικής ακτινοβολίας είναι πολύ μικρή, ενώ σχεδόν όλη η ενέργεια του φωτονίου μεταφέρεται στα e⁻, τα οποία αποδίδουν την ενέργειά τους «τοπικά» στον ιστό [10].

• Φαινόμενο Compton

Για τους βιολογικούς ιστούς, το κυρίαρχο φαινόμενο στο εύρος ενεργειών 100 keV με 10 MeV, αποτελεί το φαινόμενο Compton. Πρόκειται για ανελαστική σκέδαση του φωτονίου με κάποιο «ελεύθερο» e⁻ του υλικού, κατά την οποία μέρος της ενέργειας του φωτονίου σκεδάζεται και η υπόλοιπη μεταφέρεται ως κινητική στο e⁻. Το προσπίπτον φωτόνιο, μετά την κρούση σκεδάζεται σε γωνία 0°-180°, χάνοντας ενέργεια. Αρχικά, το σύστημα περιλαμβάνει ένα ηλεκτρόνιο σε ηρεμία και ένα φωτόνιο με ενέργεια *hv* και ορμή *hv/c*. Στην τελική κατάσταση το ηλεκτρόνιο αποκτά ενέργεια *E* και ορμή *p* σε γωνία *φ*, ενώ το φωτόνιο ενέργεια *hv'* και ορμή *hv'/c* σε γωνία *θ*. Το φαινόμενο είναι σχεδόν ανεξάρτητο του ατομικού αριθμού του υλικού, ενώ η ενεργός του διατομή (πιθανότητα να συμβεί) μειώνεται καθώς η ενέργεια αυξάνεται [11].

Δίδυμη (και τρίδυμη) γένεση

Όταν η ενέργεια του προσπίπτοντος φωτονίου υπερβαίνει τα 1.02 MeV (δύο μάζες ηρεμίας e⁻), το φωτόνιο μπορεί να απορροφηθεί μέσω της δίδυμης γένεσης, με παραγωγή ζεύγους ηλεκτρονίου – ποζιτρονίου:

Προκειμένου να διατηρηθεί η ορμή του συστήματος, τα δύο παραγόμενα σωματίδια κινούνται προς αντίθετες κατευθύνσεις. Το φαινόμενο της δίδυμης γένεσης εξαρτάται από την ενέργεια του φωτονίου και τον ατομικό αριθμό [12].

Κατά την τρίδυμη γένεση, η αλληλεπίδραση πραγματοποιείται στο πεδίο του e- και όχι του πυρήνα, όπως συμβαίνει στη δίδυμη. Έτσι, εμφανίζονται τρία σωματίδια: το ποζιτρόνιο, το παραγόμενο e- και το αρχικό e-. Το κατώφλι ενέργειας για την τρίδυμη γένεση είναι τα 2.04 MeV. Η τρίδυμη γένεση πραγματοποιείται λιγότερο συχνά από τη δίδυμη.



Εικόνα 2.2 Σχετική σημασία των φαινομένων αλληλεπίδρασης φωτονίων και ύλης.

2.1.3 Στάδια βιολογικής δράσης της ιοντίζουσας ακτινοβολίας

Κατά την αλληλεπίδραση Ι.Α. με τα άτομα της ύλης παρουσιάζονται διάφορα είδη βιολογικών αποτελεσμάτων λόγω της απορρόφησης ενέργειας [13]. Ανεξάρτητα από το είδος της Ι.Α., η αλληλεπίδρασή της με την ύλη οδηγεί σε απορρόφηση ενέργειας μέσω ιονισμών και διεγέρσεων ατόμων και μορίων. Ποσοτικά, η ενέργεια που απορροφάται και εκδηλώνεται τελικά με τη μορφή θερμότητας είναι σχετικά μικρή και απολύτως ακίνδυνη βιολογικά, αλλά ποιοτικά το ποσοστό της ενέργειας που θα απορροφηθεί μέσω ιονισμών μπορεί να προκαλέσει πληθώρα χημικών μεταβολών.

Εκτός από τη διάσπαση χημικών δεσμών και την παραγωγή άτυπων μορίων, ο ιοντισμός ενός μορίου (είτε αυτό είναι ένα βιολογικό μακρομόριο, είτε ένα μόριο νερού, το οποίο απαντάται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50% στο κυτταρόπλασμα), μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό δραστικών ελευθέρων ριζών, η οξειδωτική δράση των οποίων προκαλεί περαιτέρω χημικές μεταβολές. Ο όρος ελεύθερη ρίζα αναφέρεται σε ένα ελεύθερο άτομο, μόριο ή συγκρότημα ατόμων, το οποίο φέρει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο και συνεπώς χαρακτηρίζεται από αυξημένη δραστικότητα ανεξαρτήτως εάν είναι ηλεκτρικά ουδέτερο ή φορτισμένο.

Αν και σε κυτταρικό επίπεδο διατίθενται αποδοτικοί μηχανισμοί επιδιόρθωσης ορισμένων βλαβών, οι σπάνιες περιπτώσεις βλαβών που δεν επιδιορθώνονται ορθά, μπορεί να οδηγήσουν σε πληθώρα βιολογικών αποτελεσμάτων, από γονιδιακές μεταλλάξεις και χρωμοσωμικές ανωμαλίες, έως και καθυστέρηση της διαίρεσης, μεταβολικές διαταραχές ακόμα και κυτταρικό θάνατο. Η θανάτωση σημαντικού αριθμού κυττάρων, ιδιαίτερα βλαστικών, οδηγεί στα λεγόμενα άμεσα βιολογικά αποτελέσματα που εκδηλώνονται σε διάστημα εβδομάδων έως μηνών μετά την έκθεση σε Ι.Α., ενώ η τροποποίηση του γενετικού υλικού των κυττάρων μπορεί να οδηγήσει σε απώτερα βιολογικά αποτελέσματα, όπως κληρονομήσιμες βλάβες ή καρκινογένεση, που θα εκδηλωθούν έτη μετά την έκθεση σε Ι.Α.. Έτσι, η βιολογική επίδραση της Ι.Α. μπορεί να διακριθεί στα εξής στάδια: φυσικό, φυσικο-χημικό, χημικό, βιο-χημικό και βιολογικό (κυτταρικό και συστηματικό). Οι διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα σε κάθε στάδιο καθώς και η χρονική κλίμακα αυτών συνοψίζονται στον Πίνακα 2.1 [13-17].

ΣΤΑΔΙΟ	Χρονική κλίμακα	Γεγονότα & Διαδικασίες
Φησικό	asaa faac	Εναπόθεση ενέργειας μέσω ιονισμών και
100000		διεγέρσεων
		αναδιάταξη διεγερμένων και ιονισμένων μορίων,
Φυσικονημικό	fsec - nsec	ρήξη χημικών δεσμών, ραδιόλυση νερού,
I comovilumo		σχηματισμός δραστικών και βραχύβιων
		ελευθέρων ριζών
		παραγωγή άτυπων μορίων, σχηματισμός
Χημικό	nsec - msec	βιολογικών δραστικών ελευθέρων ριζών, βλάβες
		βιολογικών μακρομορίων
	msec - ώρες	ενζυμικές αντιδράσεις, αναστολή
Βιοχημικό		πρωτεϊνοσύνθεσης, αναγνώριση και
		επιδιόρθωση βλαβών
		κυτταρικός θάνατος, μεταλλάξεις, αναστολή
Κυτταρικό	ώρες - μήνες	κυτταρικής διαίρεσης, βλάβες ιστών,
		αποκατάσταση βλαβών ιστών
		ορμονικά αποτελέσματα, ανοσολογικές
Συστηματικό	ιατικό ἑτη	αντιδράσεις, βλάβες αγγείων, λειτουργικές
		βλάβες, καρκινογένεση

Πίνακας 2.1 Στάδια βιολογικής επίδρασης της ιοντίζουσας ακτινοβολίας.

2.1.4 Τροποποιητικοί μηχανισμοί δράσης της Ι.Α.

• Φυσικοί παράγοντες

Οι φυσικοί παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται η δράση μιας Ι.Α. είναι το είδος της ακτινοβολίας, η κατάτμηση της δόσης δεδομένης ακτινοβολίας και ο ρυθμός δόσης.

Με το είδος ή ποιότητα της ακτινοβολίας αναφερόμαστε κυρίως στο LET της ακτινοβολίας. Ακτινοβολία με μεγάλο LET (π.χ. ακτινοβολία-α) έχει μεγαλύτερη πιθανότητα να πλήξει τον απειροστών διαστάσεων στόχο του DNA και να προκαλέσει διπλή θραύση στους κλώνους του. Για τη σύγκριση του αποτελέσματος διαφορετικών ειδών ακτινοβολίας έχει οριστεί η σχετική βιολογική αποτελεσματικότητα (Relative Biological Effectiveness - RBE) ως ο λόγος της δόσης μιας ακτινοβολίας υπό δοκιμή, η οποία θα επαγάγει το ίδιο βιολογικό αποτέλεσμα:

 $RBE = \frac{D (standard radiation)}{D(radiation to be examined)}$

Από ἀποψη βιολογικού αποτελέσματος, σημαντικό ρόλο διαδραματίζει επίσης ο τρόπος χορήγησης της δόσης μιας δεδομένης ακτινοβολίας, γεγονός που σχετίζεται με τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς των κυττάρων. Η κλασματική χορήγηση μιας δόσης ἐχει μικρότερο βιολογικό αποτέλεσμα από την εφάπαξ χορήγησή της, καθώς δίνεται χρόνος να δράσουν οι επανορθωτικοί μηχανισμοί. Η αύξηση του ρυθμού δόσης σχετίζεται επίσης με τον περιορισμό της αποτελεσματικότητας των κυτταρικών επιδιορθωτικών μηχανισμών και κυρίως με αύξηση της πιθανότητας διπλής ρήξης (θραύση) στους κλώνους του DNA, λόγω πολλαπλών ιονισμών κατά μήκος της τροχιάς δύο διαφορετικών σωματιδίων ακτινοβολίας.

• Βιολογικοί παράγοντες

Οι βιολογικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη δράση μιας Ι.Α. περιλαμβάνουν τη φάση του κυτταρικού κύκλου και το είδος των κυττάρων. Αν και το κύτταρο είναι ευπρόσβλητο από την Ι.Α. σε όλες τις φάσεις του κύκλου του, η ευαισθησία δεδομένου τύπου κυττάρων ποικίλλει από φάση σε φάση. Οι φάσεις της μεγαλύτερης ευαισθησίας είναι το τέλος της G2 και η μίτωση, ενώ τα κύτταρα είναι σχετικά λιγότερο ευαίσθητα στη φάση της σύνθεσης (S). Αντίστοιχα, οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί της κυτταρικής βλάβης λειτουργούν σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου στη φάση S.

Η σχετική ευαισθησία των κυττάρων καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό και από το είδος τους. Σύμφωνα με το νόμο των Bergonie και Tribondeau η ακτινοευαισθησία του κυττάρου είναι ανάλογη της μιτωτικής του δραστηριότητας και αντιστρόφως ανάλογη του βαθμού διαφοροποίησής του. Εξαίρεση του νόμου αποτελούν τα λεμφοκύτταρα και τα ώριμα ωοκύτταρα[18].

• Χημικοί παράγοντες

Πλήθος χημικών παραγόντων εμφανίζει ενισχυτικό ή ανασταλτικό ρόλο στη βιολογική επίδραση της Ι.Α.. Οι κυριότεροι τροποποιητικοί χημικοί παράγοντες περιλαμβάνουν το μοριακό οξυγόνο, διάφορους δεσμευτές των δραστικών ελευθέρων ριζών, όπως οι θειόλες και διάφορες αντιοξειδωτικές βιταμίνες.

2.2 Βιολογικά αποτελέσματα σε μοριακό επίπεδο

2.2.1 Άμεση δράση

Ως άμεση χαρακτηρίζουμε τη δράση μιας ακτινοβολίας όταν το ίδιο το μόριο που δέχτηκε την ακτινοβόληση υφίσταται τη χημική μεταβολή [15, 16]. Ο όρος αναφέρεται σε αλληλεπιδράσεις της Ι.Α. με άτομα σημαντικών οργανικών πολυμερών μορίων του κυττάρου, όπως ενζυμικές και δομικές πρωτεΐνες, το RNA και κυρίως το DNA [19]. Η άμεση δράση των ακτινοβολιών στα βιολογικά μακρομόρια εκδηλώνεται συνήθως με διάσπαση ή χημική αλλοίωση του μορίου, μέσω θραύσης των χημικών δεσμών. Η απώλεια ενός ατόμου υδρογόνου ή ενός μεθυλίου (-CH3) έχει ως αποτέλεσμα ή την παραγωγή ελεύθερων οργανικών ριζών που μπορεί κατά τη διάχυσή τους να συνδεθούν μεταξύ τους, ή τη διάσπαση του οργανικού μορίου σε δύο μικρότερα σταθερά μόρια. Τα μόρια που δημιουργούνται έχουν διαφορετικές φυσικές και χημικές ιδιότητες από τα αντίστοιχα αρχικά.

2.2.2 Έμμεση δράση - η ραδιόλυση του ύδατος

Ως έμμεση χαρακτηρίζουμε τη δράση μιας ακτινοβολίας όταν το μόριο που υφίσταται τη χημική μεταβολή δεν έχει δεχθεί άμεσα την ακτινοβολία, αλλά μέσω δευτερογενών αντιδράσεων [15, 16]. Συγκεκριμένα, αναφερόμαστε στην πρόκληση βιολογικής βλάβης λόγω της χημικής αντίδρασης σημαντικών οργανικών μορίων του κυττάρου με δραστικές ελεύθερες ρίζες που σχηματίζονται κατά τη ραδιόλυση του νερού [20], την αλληλεπίδραση δηλαδή της ακτινοβολίας με άτομα μορίων νερού, το οποίο αφθονεί στα βιολογικά συστήματα. Δεδομένου ότι ο χρόνος ζωής των ριζών είναι πολύ μικρός (10-5 sec) είναι φανερό πως η μεταβίβαση ενέργειας στα
μακρομόρια θα πρέπει να γίνεται μέσα στο χρόνο αυτό. Έτσι, τόσο η έμμεση όσο και η άμεση δράση των ακτινοβολιών στα μακρομόρια έχει ως αποτέλεσμα την ακαριαία δημιουργία πρωτογενών χημικών μεταβολών στα μακρομόρια αυτά [17].

Από την αλληλεπίδραση Ι.Α. με τα μόρια του νερού παράγονται ιοντισμένα (H₂O⁺) και διεγερμένα (H₂O^{*}) μόρια νερού καθώς και ελεύθερα ηλεκτρόνια (e⁻), τα οποία έλκουν μόρια νερού λόγω της πολικότητάς τους (e⁻aq, καλούμενα και «ενυδατωμένα» ηλεκτρόνια). Τα ιονισμένα μόρια του νερού διασπώνται άμεσα παράγοντας ένα κατιόν υδρογόνου και μια ελεύθερη ρίζα υδροξυλίου (OH⁻), ενώ τα διεγερμένα μόρια (H₂O^{*}) μπορεί αντί να αποδιεγερθούν, να διασπαστούν σε μια ελεύθερη ρίζα υδρογόνου (H⁻) και μια ελεύθερη ρίζα υδροξυλίου (OH⁻).

Σχηματικά:

- $H_2O \rightarrow H_2O^+ + e_{aq} \rightarrow H^+ + OH^+ + e_{aq}$
- $H_2O \rightarrow H_2O^* \rightarrow H^* + OH^*$

Οι ελεύθερες ρίζες υδρογόνου και υδροξυλίου, τα κατιόντα υδρογόνου και τα ενυδατωμένα ηλεκτρόνια που παράγονται, μπορούν ακολούθως μέσω της διάχυσής τους να συμμετάσχουν σε δεκάδες αντιδράσεις μεταξύ τους ή με άλλα μόρια του συστήματος. Σημαντικότερες από αυτές είναι η «αδρανοποίηση» ελευθέρων ριζών, η αντίδραση δύο ριζών υδροξυλίου και ο σχηματισμός ρίζας υπεροξυλίου:

- $H' + H' \rightarrow H_2 \dot{\eta} H' + OH' \rightarrow H_2O \dot{\eta} H^+ + OH' \rightarrow H_2O$
- $OH' + OH' \rightarrow H_2O_2$
- $H' + O_2 \rightarrow HO_2'$



Εικόνα 2.3 Επαγωγή βλάβης στο DNA λόγω έμμεσης (ραδιόλυση ύδατος) και άμεσης δράσης ιοντίζουσας ακτινοβολίας.

2.2.3 Βλάβες DNA - επιδιόρθωση

Το DNA αποτελεί έναν κρίσιμο στόχο για τις βιολογικές επιπτώσεις (κυτταρική θνησιμότητα, μεταλλάξεις, καρκινογένεση) οξειδωτικών διεργασιών, οι οποίες εξαρτώνται από διάφορους φυσικούς και χημικούς παράγοντες, όπως η Ι.Α. και πληθώρα περιβαλλοντικών καρκινογόνων [21]. Μία ακόμα σημαντική πηγή οξειδωτικού στρες των κυττάρων είναι η ενδογενής παραγωγή δραστικών οξειδωτικών ενώσεων και ελεύθερων ριζών οξυγόνου και αζώτου (Reactive Oxygen / Nitrogen Species, ROS/RNS), λόγω της μεταβολικής δραστηριότητας του κυττάρου.

Όσον αφορά στις βιολογικές επιδράσεις της Ι.Α, το DNA αποτελεί το σημαντικότερο ενδοκυτταρικό στόχο, κυρίως λόγω του μεγέθους, της πολυπλοκότητας και της δομής του [15, 19, 22]. Η έκθεση σε Ι.Α. μπορεί να προκαλέσει στο DNA διάφορα είδη βλάβης όπως: αποσύνθεση, θραύση (συνήθως στο φωσφο-διεστερικό δεσμό) του ενός ή και των δύο κλώνων (Single Strand Break - SSB και Double Strand Break - DSB, αντίστοιχα), αλλοιώσεις βάσεων (οξείδωση, μεθυλίωση, αποπουρίνωση, απαμίνωση),

απώλεια βάσης (αβασικά σημεία – AP sites), ενδο-κλωνική, δια-κλωνική ή και διαμοριακή σύνδεση (με άλλα μόρια DNA ή πρωτεϊνών) [5]. Υψηλές δόσεις Ι.Α. προκαλούν κυρίως θραύσεις των κλώνων του DNA (SSB ή/και DSB), ενώ χαμηλές δόσεις Ι.Α. προκαλούν αλλοιώσεις των κλώνων (nicks), όπως αλλοίωση ή/ και απώλεια βάσης ή /και σακχάρεως και αλκαλικώς ευαίσθητα ή/και θερμικώς ευαίσθητα σημεία.

Ανά 1 Gy απορροφούμενης δόσης ακτινοβολίας χαμηλού LET προκαλούνται κατά μέσο όρο περίπου 10⁵ ιοντισμοί ανά κύτταρο (διαμέτρου 10 μm) που οδηγούν, μέσω της άμεσης ή έμμεσης δράσης, σε περίπου 500-1000SSB, 20-30DSB και 1000-2000 βλάβες βάσεων στο DNA (διαμέτρου 2,3 nm), κατά μέσο όρο[23]. Βέβαια, καθημερινά σημειώνονται πάνω από 50-100.000 βλάβες στο DNA των κυττάρων των θηλαστικών, αυθόρμητα ή λόγω της επίδρασης εξωγενών και ενδογενών παραγόντων.



Εικόνα 2.4 Κύρια είδη επαγόμενων βλαβών DNA. [23]

Η βλάβη που συσχετίζεται καλύτερα με τα βιολογικά αποτελέσματα της Ι.Α. και ειδικότερα με τον κυτταρικό θάνατο, είναι οι δίκλωνες θραύσεις του DNA. Ακόμα

και για ακτινοβολίες χαμηλού LET, η αύξηση της απώλειας ενέργειας των δευτερογενών φορτισμένων ηλεκτρονίων στο τέλος της τροχιάς τους μπορεί να οδηγήσει σε σύνθετες ή αλλιώς ομαδοποιημένες βλάβες του DNA (clustered DNA damage) [24], οι οποίες περιλαμβάνουν μία ή περισσότερες δίκλωνες θραύσεις[25], καθώς και αρκετές μονόκλωνες και βλάβες βάσεων. Τέτοιες εστίες σύνθετης βλαβών αντιπροσωπεύουν το 60% εως και 90% της συνολικής βλάβης του DNA κατά την ακτινοβόληση με χαμηλού και υψηλού LET ακτινοβολία αντίστοιχα και είναι πιο δύσκολο να επιδιορθωθούν σε σχέση με μία μεμονωμένη βλάβη [26-28]. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει επίσης μια πιθανώς σημαντική διαφορά μεταξύ της βλάβης στο DNA από Ι.Α. και από άλλους παράγοντες (αυθόρμητες μεταλλάξεις, χημικοί και βιολογικοί παράγοντες), καθώς η πρώτη φαίνεται να είναι κυρίως σύνθετη και εστιασμένη, ενώ η δεύτερη τυχαία κατανεμημένη και σχετικά απλή[25].

Δεδομένου ότι τα κύτταρα διαθέτουν αποτελεσματικούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA, τα βιολογικά αποτελέσματα της Ι.Α. οφείλονται κυρίως στο εξαιρετικά μικρό ποσοστό μη επιδιορθωμένων ή ανεπιτυχώς επιδιορθωμένων βλαβών. Τέτοιοι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί είναι το σύστημα επιδιόρθωσης των αταίριαστων βάσεων (mismatch repair), ο μηχανισμός εκτομής βάσεων/ νουκλεοτιδίων (base / nucleotide excision repair – BER/NER), ο ομόλογος ανασυνδυασμός (homologous recombination – HR) και η μη-ομόλογη σύνδεση άκρων (non-homologous end joining - NHEJ) [5]. Οι δύο τελευταίοι είναι ιδιαιτέρως σημαντικοί, καθώς αποτελούν τους βασικούς μηχανισμούς για την επιδιόρθωση των δίκλωνων θραύσεων του DNA.



Εικόνα 2.5 Επιδιόρθωση δίκλωνων θραύσεων DNA με μη-ομόλογη σύνδεση άκρων (NHEJ) και ομόλογο ανασυνδυασμό (HR).

Ο ομόλογος ανασυνδυασμός είναι μια αργή, αλλά υψηλής πιστότητας επιδιορθωτική διαδικασία, κατά την οποία περιοχές από ομόλογο DNA (συνήθως η αδελφή χρωματίδη) χρησιμοποιούνται ως εκμαγείο για την επιδιόρθωση[29].Η μη-ομόλογη σύνδεση άκρων είναι μια ταχεία, αλλά επιρρεπής σε σφάλματα διαδικασία, κατά την οποία η επιδιόρθωση των δίκλωνων θραύσεων γίνεται με επανένωση των άκρων του DNA, αφού προηγουμένως έχει αφαιρεθεί περιορισμένος αριθμός ζευγών βάσεων[29].

Στην περίπτωση έκθεσης ανθρώπινων κυττάρων σε Ι.Α., ο μηχανισμός που αναμένεται να ενεργοποιηθεί είναι ο NHEJ. Όμως, είναι πλέον αποδεκτό, ότι μπορεί κάλλιστα να ενεργοποιηθεί και ο HR αν π.χ. τα κύτταρα βρίσκονται στην S/G2 φάση του κυτταρικού κύκλου. Παράλληλα μπορεί να ενεργοποιηθούν, αν και εφ'όσον κριθεί απαραίτητο από το κύτταρο, και άλλοι εναλλακτικοί υποστηρικτικοί μηχανισμοί NHEJ (B-NHEJ) [30].

2.3 Βιολογικά αποτελέσματα σε κυτταρικό επίπεδο

2.3.1 Γονιδιακές μεταλλάξεις

Η Ι.Α. αποτελεί μεταλλαξιογόνο παράγοντα, καθώς σε περίπτωση ανεπιτυχούς επιδιόρθωσης των μονόκλωνων θραύσεων προκαλείται αλλαγή στην αλληλουχία των βάσεων του γενετικού υλικού και συνεπώς μετάλλαξη (λόγω αντικατάστασης, ελλείμματος ή ένθεσης βάσεων). Εκτός από χρωμοσωματικές ανωμαλίες, οι μη επιδιορθωμένες δίκλωνες θραύσεις (ή ομαδοποιημένες βλάβες του DNA) μπορούν να οδηγήσουν επίσης σε μετάλλαξη, λόγω ελλείμματος βάσεων, στην περίπτωση που τμήμα του DNA δεν επανασυνδεθεί και παραμείνει ελεύθερο.

Το αποτέλεσμα των μεταλλάξεων ποικίλει και μπορεί να οδηγήσει στην έκφραση μιας τροποποιημένης πρωτεΐνης και την αύξηση ή μείωση των επιπέδων μιας φυσιολογικής πρωτεΐνης [5]. Οι μεταλλάξεις είναι ο κύριος παράγοντας εμφάνισης των στοχαστικών αποτελεσμάτων της ακτινοβολίας και η συχνότητα εμφάνισής τους αυξάνει με τη δόση ακτινοβολίας, αν και σε μεγάλες δόσεις κυριαρχεί ο κυτταρικός θάνατος οπότε ο αριθμός των μεταλλαγμένων κυττάρων μειώνεται. Αξίζει να σημειωθεί πως ο ανθρώπινος μεταβολισμός οδηγεί σε 240.000 μεταλλάξεις στα ανθρώπινα κύτταρα καθημερινά και η απορρόφηση δόσης Ι.Α. προσθέτει σε αυτές μόλις 2000 μεταλλάξεις ανά Gy [31].

2.3.2 Χρωμοσωματικές αλλοιώσεις

Πέραν των μεταλλάξεων, μη επιτυχώς επιδιορθωμένες DSB (ή ομαδοποιημένες βλάβες DNA) μπορεί να οδηγήσουν σε χρωμοσωματικές αλλοιώσεις, οι οποίες

καθίστανται εμφανείς στην επόμενη διαίρεση του κυττάρου, στη φάση της μετάφασης. Οι χρωμοσωματικές ανωμαλίες περιλαμβάνουν ανταλλαγές των θραυσμάτων του DNA μεταξύ διαφορετικών χρωμοσωμάτων, μεταξύ των χρωματίδων του ίδιου χρωμοσώματος ή ακόμα και μεταξύ περιοχών της ίδιας χρωματίδης. Διακρίνονται σε χρωμοσωματικές ανωμαλίες (π.χ. δακτύλιοι και δικεντρικά χρωμοσώματα) και χρωματιδικές ανωμαλίες (π.χ. χρωματιδικές θραύσεις), ανάλογα με το εάν η βλάβη συνέβη κατά τη G1 φάση ή τη G2 φάση, αντίστοιχα (βλάβη κατά την S φάση ή τη μίτωση μπορεί να οδηγήσει και στα δύο είδη) [5]. Η εμφάνιση άτυπων χρωμοσωμάτων σε κύτταρα που πολλαπλασιάζονται μπορεί να οδηγήσει στον κυτταρικό θάνατο. Η ποσοτικοποίηση των χρωμοσωματικών ανωμαλιών σε λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος στην πρώτη μετάφαση μετά την ακτινοβόληση αποτελεί μέθοδο βιολογικής δοσιμετρίας [32], ενώ η ποσοτικοποίηση των χρωματιδικών θραυσμάτων στην πρώτη μετάφαση μετά από in vitro ακτινοβόληση λεμφοκυττάρων στη G2 φάση του κυτταρικού κύκλου, χρησιμοποιείται ως μέθοδος ανίχνευσης αυξημένης ακτινοευαισθησίας σε άτομα του πληθυσμού [33].

2.3.3 Κυτταρικός θάνατος

Η έκταση της βλάβης των χρωμοσωμάτων που θα εκδηλωθεί κατά την πρώτη μίτωση μετά την ακτινοβόληση είναι ο παράγοντας που σχετίζεται καλύτερα με τον κυτταρικό θάνατο [34, 35].

Μετά την απορρόφηση σημαντικής δόσης Ι.Α. και την πρόκληση εκτεταμένης βλάβης στο DNA (καθώς και σε πρωτεΐνες, ένζυμα ή στην κυτταρική μεμβράνη) προκαλείται άμεση νέκρωση του κυττάρου (μη ελεγχόμενος μηχανισμός κυτταρικού

27

θανάτου που δεν συνοδεύεται από βιοχημικούς δείκτες και χαρακτηρίζεται από αύξηση του όγκου του κυττάρου και τελικώς ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης). Χαμηλότερες τιμές δόσης που θα οδηγήσουν σε σχετικά μικρότερη, αλλά μη επιδιορθώσιμη βλάβη του DNA, θα προκαλέσουν άμεση απόπτωση. Η απόπτωση είναι σημαντικός ελεγχόμενος μηχανισμός κυτταρικού θανάτου που θεωρείται μέσο οργανισμών απόρριψη ανεπιθύμητων των πολυκύτταρων για την ή κατεστραμμένων κυττάρων και συνοδεύεται aпò σαφή μορφολογικά χαρακτηριστικά, όπως συμπύκνωση της χρωματίνης και συρρίκνωση του πυρήνα, πτύχωση της κυτταρικής μεμβράνης και συρρίκνωση του κυττάρου [5, 36, 37].

Αν η δόση της ακτινοβολίας είναι μικρή και οδηγήσει σε περιορισμένη αρχική βλάβη του DNA, δραστηριοποιούνται μηχανισμοί προαγωγής της κυτταρικής επιβίωσης που περιλαμβάνουν ανάσχεση του κυτταρικού κύκλου για την αποτελεσματικότερη δράση των επιδιορθωτικών μηχανισμών και σε περίπτωση επιτυχούς επιδιόρθωσης της βλάβης τα κύτταρα συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται. Αντιθέτως, σε περίπτωση ανεπιτυχούς επιδιόρθωσης, τα κύτταρα μπορεί να συνεχίσουν να πολλαπλασιάζονται ωσότου επέλθει μιτωτική καταστροφή (όρος που περιλαμβάνει κυτταρικούς θανάτους που εκδηλώνονται κατά τη φάση της μίτωσης, είτε οφείλονται σε χρωμοσωματικές ανωμαλίες, είτε όχι) που επιτελείται με καθυστερημένη νέκρωση ή καθυστερημένη απόπτωση [5].

2.3.4 Νεότερες θεωρήσεις

Τα τελευταία χρόνια, έχουν διατυπωθεί και ερευνώνται ορισμένες θεωρίες στον τομέα της ραδιοβιολογίας, οι οποίες αφίστανται του κεντρικού δόγματος ότι τα

βιολογικά αποτελέσματα της έκθεσης σε Ι.Α. προκαλούνται από μη-επιδιορθώσιμες ή ατελώς επιδιορθωμένες βλάβες του DNA, και κυρίως DSB.

• Προσαρμογή απόκρισης στην Ι.Α.

Η υπόθεση της προσαρμογής της απόκρισης στην ακτινοβολία (adaptive response) στηρίζεται σε πειραματικά αποτελέσματα που δείχνουν ότι η ακτινοβόληση συγκεκριμένων συστημάτων αυξάνει την αντοχή τους σε επόμενη ακτινοβόληση [38-44]. Υπάρχουν αρκετά στοιχεία σχετικά με την ενεργοποίηση γονιδίων λόγω της έκθεσης σε χαμηλές δόσεις ακτινοβολίας, που δυνητικά συμμετέχουν σε διάφορες βιολογικές αποκρίσεις (επαναπληθυσμοποίηση, επιδιόρθωση βλάβης, κυτταρικός θάνατος), όμως οι αρμόδιοι οργανισμοί καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η προσαρμογή της απόκρισης δεν είναι γενικό χαρακτηριστικό των κυττάρων *in vivo* και *in vitro* και δεν υπάρχουν συνεπείς ενδείξεις για τη μείωση των ανεπιθύμητων αποτελεσμάτων της ακτινοβολίας.

• Επιγενετικές αποκρίσεις - γονιδιακή αστάθεια

Οι επιγενετικές αποκρίσεις (epigenetic responses) αφορούν σε αποκρίσεις των κυττάρων που παρατηρούνται μετά την ακτινοβόληση, χωρίς να εμφανίζεται άμεση βλάβη του DNA. Ενώ τα κύρια αποτελέσματα από την έκθεση σε ακτινοβολία εμφανίζονται άμεσα (ανακοπή του κυτταρικού κύκλου, θάνατος), ορισμένα κύτταρα που επιβιώνουν μπορεί να εμφανίσουν διαρκώς υψηλό επίπεδο χρωμοσωματικών ανωμαλιών, υποδεικνύοντας έτσι ότι η ακτινοβολία μπορεί να οδηγήσει σε μεγάλης διάρκειας αποτελέσματα που εκδηλώνονται ως γονιδιακή αστάθεια (genomic instability) [45-47]. Μετά την επιδιόρθωση μιας μετάλλαξης, η δημιουργία αστάθειας στη δομή του γονιδιώματος αυξάνει την πιθανότητα επανεμφάνισης της μετάλλαξης στο μέλλον, λόγω κάποιου άλλου έστω και μη ραδιολογικού εξωτερικού αιτίου.

Η γονιδιακή αστάθεια περιλαμβάνει ένα αυξημένο ποσοστό μεταλλάξεων, γονιδιακών ενισχύσεων και κυτταρικού μετασχηματισμού, αρκετές γενιές μετά την έκθεση σε Ι.Α.. Αυτές οι καθυστερημένες αποκρίσεις των κλωνικών απογόνων των ακτινοβολημένων κυττάρων οδηγούν σε χρωμοσωματικές αλλοιώσεις, που είναι το καταληκτικό σημείο της γονιδιακής αστάθειας, λόγω Ι.Α.. Αρκετές μελέτες συνδέουν τη χρωμοσωματική αστάθεια μετά την ακτινοβόληση, με παράγοντες που επάγουν το οξειδωτικό στρες [48-51].

Μη-στοχευμένες βιολογικές επιδράσεις της Ι.Α.

Η σημαντικότερη θεώρηση, που βρίσκεται υπό μελέτη τα τελευταία χρόνια είναι η παρατήρηση ότι ορισμένα κύτταρα σε καλλιέργεια ή στον οργανισμό μπορεί να οδηγηθούν σε θάνατο ή μεταλλάξεις, λόγω βλάβης σε παρακείμενα κύτταρα, χωρίς τα ίδια να έχουν πληγεί από την ακτινοβολία [1, 52] (non-targeted effect). Οι βλάβες στα μη-ακτινοβολημένα, παρακείμενα (bystander) κύτταρα περιλαμβάνουν ανταλλαγές χρωματίδων [53], μικροπυρηνικό σχηματισμό, γονιδιακές μεταλλάξεις και χρωμοσωματική αστάθεια [54, 55], καθώς και ενισχυμένη κυτταρική διαφοροποίηση και έκκριση παραγόντων ανασταλτικών της ανάπτυξης [52, 56].

Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην επαγωγή των βλαβών στα παρακείμενα κύτταρα, σχετίζονται με αυξημένο οξειδωτικό μεταβολισμό και αυξημένα επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species - ROS) και μόρια που συμμετέχουν στη αντίδραση του οργανισμού στις φλεγμονές, όπως η κυκλοοξυγενάση-2 (COX-2). Μια πιθανή εξήγηση του φαινομένου είναι η απόκριση σε σήματα που μεταβιβάζονται από κύτταρα που έχουν πληγεί από την ακτινοβολία μέσω μορίων που είτε εισέρχονται μέσω χασμοσυνδέσεων (gap junctions) [57-60] στην κυτταρική μεμβράνη γειτονικών κυττάρων, είτε διαχέονται στο θρεπτικό μέσο

καλλιέργειας των κυττάρων [1, 61-64]. Τα φαινόμενα αυτά θεωρείται ότι κυριαρχούν ειδικά στις λεγόμενες χαμηλές δόσεις των ακτινοβολιών, δηλαδή σε δόσεις μικρότερες από 0.5 Gy.

2.4 Βιολογικά αποτελέσματα σε επίπεδο ιστών - οργάνων

Η αλληλεπίδραση της ακτινοβολίας με τα κρίσιμα οργανικά μόρια ενός κυττάρου υπόκειται στους νόμους της στατιστικής. Η βλάβη που ενδεχομένως δημιουργηθεί λόγω της αλληλεπίδρασης Ι.Α. και ύλης, πιθανώς να μην επιδιορθωθεί επιτυχώς και να οδηγήσει σε άμεσο κυτταρικό θάνατο, έμμεσο κυτταρικό θάνατο λόγω δυσλειτουργίας του κυττάρου ή της αδυναμίας του να πολλαπλασιαστεί, ή σε μετάλλαξη του DNA του κυττάρου, το οποίο όμως παραμένει βιώσιμο και ικανό να πολλαπλασιαστεί.

Σε χαμηλές δόσεις ακτινοβολίας, η άμεση ή έμμεση θανάτωση ενός κυττάρου ή ακόμη κι ενός μικρού αριθμού κυττάρων σε έναν ιστό ή όργανο του σώματος, δεν αναμένεται να έχει δυσμενή επίπτωση στη λειτουργία του οργάνου [65], μιας και η προκαλούμενη έκπτωση της λειτουργίας αντισταθμίζεται από τον οργανισμό, ενώ τα νεκρά κύτταρα σταδιακά αντικαθίστανται. Εξάλλου χιλιάδες κύτταρα του ιστού ή του οργάνου πεθαίνουν και ανανεώνονται καθημερινά.

Όμως, οι βλάβες που οδηγούν σε τροποποίηση του γενετικού υλικού ενός οιουδήποτε μεμονωμένου σωματικού κυττάρου και δεν επιδιορθώνονται πλήρως, είναι πιθανό να έχουν μακροπρόθεσμα σοβαρή επίπτωση στην υγεία του εκτεθειμένου ατόμου. Κατά τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου, μια μερικώς επιδιορθωμένη βλάβη στο DNA αποτελεί μετάλλαξη που μπορεί να μεταβιβαστεί σε θυγατρικά κύτταρα και να αποτελέσει απαρχή για την εμφάνιση πιθανής κακοήθειας στο απώτερο μέλλον. Στην περίπτωση που η βλάβη συντελεστεί σε αναπαραγωγικό κύτταρο του οργανισμού, τότε είναι πιθανή η τροποποίηση του γενετικού κώδικα και η μεταβίβαση της μετάλλαξης στους απογόνους του εκτεθειμένουεκτεθέντος ατόμου (κληρονομήσιμες βλάβες) [66].

Η δημιουργία μιας κυτταρικής βλάβης, αλλά και η μερική επιδιόρθωσή της είναι τυχαία γεγονότα, συνεπώς μπορούμε να υποθέσουμε ότι ακόμα και για πολύ μικρές δόσεις ακτινοβολίας υπάρχει πάντοτε κάποια μικρή, αλλά πεπερασμένη πιθανότητα εμφάνισης μακροπρόθεσμων δυσμενών επιπτώσεων. Σε πολύ μεγάλες δόσεις και μεγάλους ρυθμούς δόσεων ακτινοβολίας τόσο η ποιότητα, όσο και η έκταση της βλάβης αυξάνει, με αποτέλεσμα τον άμεσο θάνατο μεγάλου πληθυσμού κυττάρων και τη δυσλειτουργία ενός ιστού ή οργάνου. Οι βλάβες αυτές, μορφολογικές και λειτουργικές, είναι συνήθως εκτεταμένες και μη αντιμετωπίσιμες από τους διαθέσιμους κυτταρικούς επιδιορθωτικούς μηχανισμούς, με αποτέλεσμα την άμεση ή βραχυπρόθεσμη εμφάνιση σοβαρών κλινικών συμπωμάτων.

Τα δυσμενή αποτελέσματα στην υγεία ενός ατόμου που εκτίθεται σε Ι.Α. μπορούν να διαχωριστούν σε δύο κατηγορίες, σύμφωνα με τη Διεθνή Επιτροπή Ακτινοπροστασίας (ICRP) :

- α. Καθορισμένα αποτελέσματα (deterministic effects), τα οποία αποκαλούνται και επιβλαβείς αντιδράσεις των ιστών (ICRP 2008). Πρόκειται για κλινικά αποτελέσματα, ανιχνεύσιμα μετά από έκθεση σε μεγάλες καταστροφικές δόσεις ακτινοβολίας, ενίστε πολύ σοβαρά, τα οποία οφείλονται στη θανάτωση ή τη βαρεία δυσλειτουργία μεγάλων πληθυσμών κυττάρων ενός ιστού, και
- β. Στοχαστικά αποτελέσματα (stochastic effects), στα οποία ανήκουν η λευχαιμία, ο καρκίνος και οι κληρονομήσιμες βλάβες και προκύπτουν ως αποτέλεσμα του

πολλαπλασιασμού ενός μεταλλαγμένου από ακτινοβολία, σωματικού (και γενετικού) κυττάρου. Οφείλουν την ονομασία τους στο γεγονός ότι η πιθανότητα εμφάνισής τους, ακολουθεί στατιστικούς νόμους.

Σύμφωνα με την ICRP, σκοπός της ακτινοπροστασίας είναι η παρεμπόδιση των καθορισμένων αποτελεσμάτων και ο περιορισμός της πιθανότητας εμφάνισης των στοχαστικών αποτελεσμάτων, σε αποδεκτά επίπεδα.

2.4.1 Καθορισμένα αποτελέσματα

Τα καθορισμένα (ή άμεσα) αποτελέσματα εμφανίζονται μετά από έκθεση σε δόσεις ακτινοβολίας, μεγαλύτερες των 0.5 Sv έως 1.0 Sv. Πάνω από τις δόσεις αυτές, η εμφάνισή τους είναι αναπόφευκτη, ενώ η σφοδρότητά τους αυξάνει με την αύξηση δόσης. Για την εμφάνιση των καθορισμένων αποτελεσμάτων, απαιτείται η υπέρβαση ενός κατωφλίου – δόσης. Η πιθανότητα της εμφάνισής τους για δόσεις μικρότερες του κατωφλίου - δόσης είναι μηδενική, ενώ με την υπέρβαση του κατωφλίου, η τιμή της πιθανότητας εμφάνισης της βλάβης με την αύξηση δόσης, εκτινάσσεται στο 100%. Η βαρύτητα της βλάβης στον ιστό μετά το κατώφλι κλιμακώνεται ταχύτατα με την αύξηση της δόσης, καθώς εκπίπτει η ικανότητα του ιστού να ανανήψει, λόγω του απεμπλουτισμού του σε ανανεώσιμους πληθυσμούς παρεγχυματικών κύτταρων, που θα αντικαταστήσουν αυτούς που έχουν υποστεί τροποποιήσεις. Αν η προκαλούμενη στο όργανο βλάβη είναι εκτεταμένη και μη αναστρέψιμη, μπορεί να οδηγήσει στην πλήρη καταστροφή του οργάνου, στην καταστροφή του αντιστοίχου συστήματος (π.χ. αιμοποιητικού, κεντρικού νευρικού, πεπτικού), ως και στο θάνατο του οργανισμού. Οι αντιδράσεις των ιστών, στα καθορισμένα αποτελέσματα της Ι.Α., μπορούν να διακριθούν σε πρώιμες και καθυστερημένες [67]. Οι πρώιμες αντιδράσεις ενός ιστού σε δόση ακτινοβολίας μεγαλύτερης από το κατώφλι δόσης, είναι αυτές που εμφανίζονται τις πρώτες ώρες, ημέρες ή και εβδομάδες μετά την ακτινοβόληση (π.χ. ερύθημα), ενώ οι καθυστερημένες αντιδράσεις ενός ιστού, εμφανίζονται μερικούς μήνες ή και έτη μετά την ακτινοβόληση (π.χ. νέκρωση του δέρματος ως αποτέλεσμα της βαρείας απογύμνωσης της επιδερμίδας και της χρόνιας φλεγμονής, αρτηριακές αποφράξεις που οδηγούν σε εν τω βάθει ιστικές νεκρώσεις, εντερικές στενώσεις λόγω βαρείας εξέλκωσης του βλεννογόνου).

Σύμφωνα με την επικρατούσα σήμερα ἀποψη σχετικά με τις αντιδράσεις των ιστών (ICRP-2008), για την περιοχή απορροφούμενης δόσης ἑως 100 mGy, η πιθανότητα οποιοσδήποτε ιστός ή ὀργανο να παρουσιάσει κλινικά εκδηλούμενη αντίδραση είναι μηδενική. Αυτό ισχύει τόσο για χαμηλές ακαριαίες εφάπαξ δόσεις, ὀσο και για χρόνιες χαμηλές δόσεις, εκφρασμένες ως επαναλαμβανόμενες ετήσιες δόσεις.

2.4.2 Στοχαστικά αποτελέσματα

Τα στοχαστικά αποτελέσματα της Ι.Α. είναι αυτά που πιθανόν να εκδηλωθούν μακροπρόθεσμα σε ένα άτομο που εκτέθηκε σε ακτινοβολία. Η πιθανότητα εμφάνισης των στοχαστικών αποτελεσμάτων αυξάνει ευθέως ανάλογα με το μέγεθος της δόσης της ακτινοβολίας που δέχθηκε το σωματικό κύτταρο που μεταλλάχθηκε αρχικά. Για την εμφάνισή τους δεν απαιτείται υπέρβαση κάποιου κατωφλίου – δόσης και η βαρύτητα του αποτελέσματος, για παράδειγμα η εξέλιξη της νόσου μετά την εμφάνισή της, είναι ανεξάρτητη της δόσης της ακτινοβολίας που δέχθηκε το σωματικό κύτταρο που δέχθηκε το σωματικό κύτταρο που αρχικά μεταλλάχθηκε [68, 69].

34

Η βαρύτητα ενός στοχαστικού αποτελέσματος είναι ανεξάρτητη της δόσης, ενώ η εξάρτηση της πιθανότητας εμφάνισης του στοχαστικού αποτελέσματος από τη δόση ακτινοβολίας αποδίδεται με γραμμικό - χωρίς κατώφλι δόσης μαθηματικό πρότυπο (Linear Non Threshold model – LNT). Το διεθνές σύστημα ακτινοπροστασίας (ICRP 103) στηρίζεται στο μαθηματικό γραμμικό πρότυπο LNT [70], σύμφωνα με το οποίο, για λόγους προάσπισης της υγείας, δεχόμαστε ότι οποιαδήποτε δόση ακτινοβολίας, οσοδήποτε μικρή και αν είναι, ενέχει κίνδυνο πρόκλησης καρκίνου, το μέτρο του οποίου είναι ανάλογο του μεγέθους της εν λόγω δόσης.

Οι τύποι καρκίνου που έχουν συνδεθεί με την έκθεση σε Ι.Α. περιλαμβάνουν τη λευχαιμία, το πολλαπλό μυέλωμα, καθώς και τους καρκίνους του μαστού, του θυρεοειδή, των ωοθηκών, του πνεύμονα, της ουροδόχου κύστης, του στομάχου, του Κ.Ν.Σ. (εκτός του εγκεφάλου) και του οισοφάγου. Ένα από τα βασικά ευρήματα της επιδημιολογικής μελέτης, των ατόμων που επέζησαν μετά την έκρηξη των δύο ατομικών βομβών, στη Hiroshima και το Nagasaki είναι η χρονική εμφάνιση των στοχαστικών αποτελεσμάτων. Συγκεκριμένα, ο λανθάνων χρόνος εμφάνισης λευχαιμίας, μετά την έκθεση, είναι περίπου 2 έτη, ενώ η κορύφωση του φαινομένου πραγματοποιείται 7-8 έτη μετά την έκθεση. Όσον αφορά στους καρκινικούς όγκους, ο αντίστοιχος λανθάνων χρόνος εμφάνισης είναι κατ' ελάχιστον 10 έτη, ενώ η κορύφωση της εμφάνισης της νόσου πραγματοποιείται 40-50 έτη μετά την έκθεση.

кефалаю З

ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΣΤΙΩΝ γ-Η2ΑΧ

<u>ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΒΛΑΒΩΝ DNA</u>

3.1 Εισαγωγή

Σε όλα τα κύτταρα εμφανίζονται ενδογενείς και εξωγενείς βλάβες στο DNA. Οι ενδογενείς βλάβες προκαλούνται από το ίδιο το κύτταρο και μπορεί να προκύψουν από καταστάσεις όπως η απόπτωση, η επιδιόρθωση εκτομής (excision repair) ή οι οξειδωτικές βλάβες, ενώ οι εξωγενείς βλάβες προκαλούνται καθώς τα κύτταρα εκτίθενται σε φυσικούς ή χημικούς παράγοντες (ακτινοβολία ή κυτταροτοξικά φάρμακα, αντίστοιχα).

Η εκτίμηση των DSB παρουσιάζει ενδιαφέρον στην ερευνητική κοινότητα, λόγω της προβλέψιμης φύσης τους. Οι θανατηφόρες αυτές θραύσεις των κλώνων του DNA επιτρέπουν την πρόβλεψη τοξικότητας στα κύτταρα ή και το θάνατό τους. Για την ανίχνευση των DSB χρησιμοποιούνται ποικίλες μέθοδοι, όπως η ουδέτερη έκπλυση (neutral elusion), η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή και η μέθοδος κυτταρικού κομήτη (comet assay), αλλά η μέθοδος των γ-H2AX εστιών είναι ιδιαιτέρως ακριβής και παρουσιάζει το πλεονέκτημα της δυνατότητας ανίχνευσης βλαβών σε χαμηλές δόσεις ακτινοβολίας (ως και 0.001 Gy) [71].

Η ευαίσθητη αυτή τεχνική για την ανίχνευση διπλών θραύσεων στο DNA των κυττάρων αποκαλύπτει την παρουσία εστιών γ-H2AX στον πυρήνα πρωτογενών κυττάρων και καρκινικών κυτταρικών σειρών, καθώς και σε ιστούς [72-74]. Οι εστίες αυτές πιστεύεται πως υποδεικνύουν βλάβες προερχόμενες από διάφορα είδη ενδογενούς και εξωγενούς στρες [75].

Τη δημιουργία μιας δίκλωνης θραύσης του DNA ακολουθεί η φωσφορυλίωση εκατοντάδων μορίων ιστόνης H2AX (γ-H2AX) στη χρωματίνη της περιοχής του δίκλωνου σπασίματος. Γενικά, φωσφορυλίωση χαρακτηρίζεται η διαδικασία κατά την οποία μία ή περισσότερες φωσφορικές ομάδες προστίθενται σε ένα μόριο. Η φωσφορυλίωση πρωτεϊνών διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στον έλεγχο πολλών κυτταρικών λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένων της κυτταρικής ανάπτυξης και της διαφοροποίησης. Η οπτικοποίηση μιας φωσφορυλιωμένης περιοχής γίνεται με ειδικά αντισώματα και ο εντοπισμός των πυρηνικών εστιών (foci) γ-H2AX είναι μια ευρέως αποδεκτή και ευαίσθητη μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό των επαγόμενων βλαβών στο DNA, από την ακτινοβολία [76].

Πρόκειται για μια απλή δοκιμασία, αρκετά πιο ευαίσθητη από τις υπόλοιπες τεχνικές στην ανίχνευση δίκλωνων θραύσεων, καθώς μπορεί να τις ανιχνεύσει σε άθικτα

κύτταρα, γεγονός που επιτρέπει την απεικόνιση μέσω φθορισμού και τον φυσικό τους εντοπισμό.

Η τεχνική αυτή έχει εφαρμοστεί επιτυχώς σε δείγματα αίματος, που λαμβάνεται κατόπιν ακτινοδιαγνωστικής αξονικής τομογραφίας, για την ανίχνευση επαγόμενων βλαβών του DNA και για την εκτίμηση της δόσης ακτινοβολίας που δέχονται τα λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος [77].

3.2 Η πρωτεΐνη Η2ΑΧ

Η Η2ΑΧ αποτελεί βασικό παράγοντα στη διαδικασία επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA. Πρόκειται για μία ποικιλομορφία της ιστόνης Η2Α, μιας εκ των τεσσάρων πρωτεϊνών που σε ζεύγη αποτελούν το οκταμερές ιστονών του νουκλεοσώματος. Συγκεκριμένα, οι πυρήνες ιστόνης, γύρω από τους οποίους είναι τυλιγμένο το DNA αποτελούνται από μεμονωμένες πρωτεΐνες ιστόνης, τις Η2Α, Η2Β, Η3 και Η4 [78]. Η οικογένεια της πρωτεΐνης Η2Α έχει τον μεγαλύτερο αριθμό παραλλαγών, όπως οι H2A1, H2A2, H2AX, H2AZ και πολλές άλλες. Στα ανθρώπινα κύτταρα, η πρωτεΐνη H2AX αποτελεί περίπου το 10% της πρωτεΐνης Η2Α, αλλά ανάλογα με το είδος του θηλαστικού η H2AX μπορεί να κυμαίνεται σε ποσοστά μεταξύ 2% και 25% της συνολικής H2A πρωτεΐνης [76]. Η H2AX δε συγκεντρώνεται σε μια συγκεκριμένη περιοχή του DNA, αλλά ενσωματώνεται τυχαία σε ιστόνες σε ολόκληρο το DNA[79].



Εικόνα 3.1 Το οκταμερές ιστονών του νουκλεοσώματος. Η ιστόνη Η1 παρεμβάλλεται μεταξύ των νουκλεοσωμάτων του DNA και συμβάλλει στη συσπείρωση της δομής του.

3.3 Φωσφορυλίωση της Η2ΑΧ

Μετά την έκθεση σε Ι.Α., στα σημεία των δίκλωνων θραύσεων η ιστόνη Η2ΑΧ φωσφορυλιώνεται άμεσα στη σερίνη 139, συνήθως μέσα σε 1-10min μετά την πρόκληση βλάβης στο DNA[79] και η φωσφορυλιωμένη αυτή πρωτεΐνη ονομάζεται γ-H2AX [73]. Εκατοντάδες πρωτεΐνες Η2ΑΧ φωσφορυλιώνονται στη χρωματίνη της περιοχής ενός DSB και η συγκέντρωσή τους μεγιστοποιείται σε περίπου 30 λεπτά μετά την ακτινοβόληση [79]. Το χρονικό αυτό σημείο είναι το βέλτιστο για τον προσδιορισμό του μέγιστου αριθμού των εστιών γ-H2AX για διάφορους τύπους κυττάρων, με 10-20 εστίες ανά Gy ανά διπλοειδή πυρήνα, και σχετίζεται με τον αριθμό των επαγόμενων δίκλωνων θραύσεων σε αυτό το χρονικό σημείο [80]. Εν συνεχεία η H2AX αποφωσφορυλιώνεται και οι εστίες σταδιακά μειώνονται, ως ένδειξη της επιδιόρθωσης της βλάβης [79, 80].

Στα κύτταρα των θηλαστικών οι πρωτεΐνες ATM (Ataxia Telangiectasia mutated), ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad 3 - related) και DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) είναι υπεύθυνες για την απόκριση της βλάβης του DNA (DDR-DNA Damage Response) [81]. Με βάση προηγούμενες έρευνες, η DNA-PK είναι η πρωτεΐνη η οποία ανιχνεύει τις DSB κατά τη διάρκεια της μη-ομόλογης σύνδεσης άκρων (NHEJ) [82], αλλά η ATM είναι η κύρια πρωτεΐνη που φωσφορυλιώνει την H2AX [81]. Αρκετές πρωτεΐνες επιδιόρθωσης συνεντοπίζονται με τη γ-H2AX, ορισμένες εκ των οποίων συνδέονται άμεσα με τη γ-H2AX.Ετσι, οι εστίες που δημιουργούνται αντιπροσωπεύουν μια συσσώρευση των γ-H2AX, μαζί με εκατοντάδες άλλες πρωτεΐνες που έχουν εντοπιστεί στο σημείο της βλάβης [83].

3.4 Μέθοδοι ανίχνευσης

Οι εστίες γ-Η2ΑΧ μπορούν να απεικονιστούν χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι δείκτες της έκθεσης κυττάρων σε ακτινοβολία είναι κυτταρογενετικές μέθοδοι, όπως οι μικροπυρήνες και μέθοδοι χρωμοσωματικών αλλοιώσεων. Ωστόσο, οι μέθοδοι αυτές χρειάζονται τον κυτταρικό κύκλο για την εκτίμηση της χρωμοσωματικής βλάβης, είναι χρονοβόρες και έχουν περιορισμένη ευαισθησία σε δόσεις μικρότερες του 1 Gy. Η ιστόνη Η2ΑΧ που φωσφορυλιώνεται στην περιοχή μιας δίκλωνης θραύσης του DNA (γ-Η2ΑΧ) μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης των δίκλωνων θραύσεων εντός της χρωματίνης. Η εκτίμηση των εστιών γ-Η2ΑΧ με ανοσοφθορισμό είναι ένα εξαιρετικά ευαίσθητο και ακριβές εργαλείο για την ανίχνευση δίλωνων θραύσεων του DNA σε δόσεις μικρότερες των 100 mGy[84, 85].

Οι γ-Η2ΑΧ εστίες συνήθως ανιχνεύονται και προσδιορίζονται ποσοτικά με φθορισμό, που περιλαμβάνει πρωτεύοντα αντισώματα που εντοπίζουν και προσδένονται στη φωσφορυλιωμένη σερίνη-139 [81] της Η2ΑΧ και δευτερεύοντα, φθορίζοντα αντισώματα, ώστε η οπτικοποίηση των εστιών να είναι δυνατή (Εικόνα 3.2). Ο ανοσοφθορισμός απαιτεί τη χρήση μικροσκοπίου επιφθορισμού, το οποίο επιτρέπει τη μέτρηση των κυττάρων με βλάβη στο DNA, με γυμνό μάτι [83]. Η χρήση του φθορισμού, μπορεί να επεκταθεί και σε άλλες μεθόδους, όπως στο ανοσοστύπωση Western (Western immunoblot) [81] και στην ηλεκτροφόρηση γέλης [79].

Τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού έχουν δοκιμαστεί με τη μέθοδο κυτταρικού κομήτη, η οποία υπό αλκαλικές συνθήκες μπορεί να ανιχνεύσει τόσο μονόκλωνες (SSBs), όσο και δίκλωνες (DSB) θραύσεις του DNA[86]. Η τεχνική αυτή έχει κριθεί γρήγορη, απλή και αξιόπιστη, αλλά η μέθοδος προσδιορισμού των εστιών γ-H2AX

είναι 100 φορές περισσότερο ευαίσθητη στην ανίχνευση των επιπέδων της βλάβης [87]. Επίσης, η κυτταρομετρία ροής μπορεί να δείξει πώς οι βλάβες του DNA σχετίζονται με την κυτταροτοξικότητα των φαρμάκων [88].



Εικόνα 3.2 Αρχή της μεθόδου προσδιορισμού των εστιών γ-Η2ΑΧ με ανοσοφθορισμό. Η Η2ΑΧ φωσφορυλιώνεται άμεσα στο σημείο της επαγόμενης δίκλωνης θραύσης του DNA από Ι.Α. Ένα πρωτεύον αντίσωμα εντοπίζει τη γ-Η2ΑΧ και προσδένεται σε αυτήν, ενώ ένα δευτερεύον αντίσωμα, επισημασμένο με φθορίζουσα χρωστική, προσδένεται στο πρωτεύον (τεχνική sandwich).

3.5 Σχηματισμός γ-Η2ΑΧ λόγω ιοντίζουσας ακτινοβολίαςκαι καρκίνος

Μετά την ακτινοβόληση με Ι.Α. και την άμεση φωσφορυλίωση της Η2ΑΧ, υπάρχει πάντα ένα σταθερό ποσοστό των γ-Η2ΑΧ που σχηματίζονται ανά δίκλωνη θραύση. Για μία δόση 1 Gy ακτίνων-Χ φωσφορυλιώνεται πάντα ένα ποσοστό 1-2% της Η2ΑΧ, ανεξάρτητα από την αναλογία Η2ΑΧ και Η2Α.

Η γ-H2AX είναι ένας ευαίσθητος και πρώιμος δείκτης των δίκλωνων θραύσεων του DNA, *in vitro* και *in vivo* [89]. Η γ-H2AX δε σχηματίζεται μόνο σε καλλιέργειες κυττάρων, αλλά και σε ολόκληρους ζωντανούς οργανισμούς που δέχθηκαν θεραπεία με θανατηφόρες και μη-θανατηφόρες δόσεις Ι.Α. [79]. Οι κυτταρικές σειρές, μπορεί να έχουν διάφορα επίπεδα υποβάθρου της γ-H2AX, για παράδειγμα οι καρκινικές σειρές Caski και SW756 παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα εστιών στο υπόβαθρο [90] και συνεπώς ο αριθμός των γ-H2AX εστιών που σχηματίζονται είναι διαφορετικός. Η διαφορά αυτή μεταξύ των κυτταρικών σειρών δεν έγκειται στον αριθμό των εστιών, αλλά στην έντασή τους [91].

Πρόσφατα, ερευνήθηκε ο ρόλος της Η2ΑΧ στον καρκίνο. Βρέθηκε πως τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν μια τριπλάσια αύξηση στο σχηματισμό γ-Η2ΑΧ [90]. Ως δείκτης για τις βλάβες του DNA, η H2AX βρίσκεται σε υψηλότερα επίπεδα στα καρκινικά κύτταρα, λόγω των αυξημένων ενδογενών βλαβών, αλλά και της κυτταρικής διαίρεσης. Συγκεκριμένα, πειράματα έδειξαν πως η γ-Η2ΑΧ είναι παρούσα σε αυξημένα επίπεδα σε μεγάλο αριθμό ανθρώπινων καρκινικών μοντέλων, όπως καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας [90, 92], κύτταρα μελανώματος [93], καρκίνωμα του παχέος εντέρου, ινοσάρκωμα, οστεοσάρκωμα, γλοίωμα και κύτταρα νευροβλαστώματος [75]. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι τα αυξημένα επίπεδα βλάβης του DNA είναι ένα γενικό χαρακτηριστικό της ανάπτυξης του καρκίνου [75, 90, 92-95]. Επιπλέον, κολονοκύτταρα από ασθενή με ελκώδη κολίτιδα, μία χρόνια φλεγμονώδη νόσο που προδιαθέτει τους ασθενείς σε καρκίνο του παχέος εντέρου, δείχνουν αύξηση στην περιεκτικότητα σε γ-Η2ΑΧ [96]. Για τους λόγους αυτούς, η ανίχνευση της γ-Η2ΑΧ σε ανθρώπινες βιοψίες θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στον έλεγχο πρώιμου καρκίνου και στην παρακολούθηση της θεραπείας του καρκίνου [75].

3.6 Εφαρμογές των εστιών γ-Η2ΑΧ

Η γ-Η2ΑΧ έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως από πολλούς ερευνητές ως εργαλείο εκτίμησης της προσκληθείσας βλάβης του DNA. Η ίδια η πρωτεΐνη, καθώς και οι σχετικές πρωτεΐνες, έχει πολλές πιθανές εφαρμογές για κλινική χρήση [97, 98].

Η χρήση της στη θεραπεία του καρκίνου βρίσκεται, επί του παρόντος, υπό διερεύνηση. Μέσω της ανάλυσης της γ-Η2ΑΧ μπορεί να εξαχθούν χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με την απόκριση καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων στην Ι.Α., μετά από έκθεση σε κλινικά σχετικές δόσεις ακτινοβολίας [99].

Η παρουσία των εστιών γ-Η2ΑΧ μετά την αρχική επαγωγή της βλάβης του DNA, υποδεικνύει πως μέρος της βλάβης παραμένει ανεπιδιόρθωτο. Το γεγονός αυτό καθιστά πιθανή τη χρήση της γ-Η2ΑΧ για την ταχεία εκτίμηση της ακτινοευαισθησίας ατόμων και κυτταρικών σειρών [100, 101], οδηγώντας στον προσδιορισμό ασθενών και κυτταρικών σειρών με ελλατωματική ικανότητα επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA [101-103]. Ο ρυθμός απώλειας των γ-H2AX εστιών εξαρτάται από τον τύπο του κυττάρου, αλλά φαίνεται να είναι πιο γρήγορος σε ακτινοάντοχες κυτταρικές σειρές [104]. Επίσης, η ποσοτικοποίηση των εστιών γ-Η2ΑΧ στους πυρήνες λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος επιτρέπει την εκτίμηση της εφαρμοζόμενης δόσης σε όλο το σώμα, μετά από σύμμορφη ακτινοθεραπεία όγκων σε διαφορετικά σημεία του σώματος [85]. Ως εκ τούτου, η γ-Η2ΑΧ μπορεί να χρησιμοποιηθεί κυρίως ως βιοδοσίμετρο [105] για έκθεση σε Ι.Α. αλλά και πιθανότατα ως προγνωστικός δείκτης της ακτινοευαισθησίας [102, 106] ενός ασθενούς, κάτι που όμως θα πρέπει να αποδειχτεί. Σε συνδυασμό με πιο αποδεκτές τεχνικές ακτινοευαισθησίας, όπως η όπως η λεγόμενη G2 χρωμοσωμική μέθοδος [107], μπορεί να αποτελέσει ένα δυνητικά χρήσιμο εργαλείο για την κλινική ενίσχυση της ακτινοθεραπείας, διαδικασίας που υποδεικνύεται για περίπου το 60% των ασθενών με καρκίνο [108]. Σημαντικό είναι και το αποτέλεσμα πρόσφατης έρευνας που έδειξε πως η αυτόματη καταμέτρηση των εστιών γ-Η2ΑΧ σε λεμφοκύτταρα, παρέχει έγκυρες πληροφορίες για τη δόση της Ι.Α. σε δείγματα αίματος που αναλύθηκαν ως και 16 ώρες μετά την έκθεση [109].

Βέβαια, κρίνεται αναγκαία και η αναφορά όχι μόνο στα πλεονεκτήματα της μεθόδου, αλλά και σε πιθανούς περιορισμούς και προβλήματα που παρουσιάζονται κατά την εφαρμογή της σε κλινικό επίπεδο. Ένα εμφανές πλεονέκτημα της γ-Η2ΑΧ, σε σχέση με άλλους βιοδείκτες κυτταρικής βλάβης, είναι η εξαιρετικά υψηλή ευαισθησία της, η οποία επιτρέπει την ανίχνευση πολύ μικρών μεταβολών στην ακεραιότητα του γονιδιώματος, σε επίπεδο ενός κυττάρου. Ωστόσο, το χαμηλό όριο εξαρτάται y-H2AX ανίχνευσης της αпό αρκετούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του επιπέδου των πυρηνικών εστιών στο υπόβαθρο σε μηστρεσαρισμένα κύτταρα, που σχετίζεται με την αντιγραφή του DNA και την εξέλιξή του μέσω της μίτωσης. Ακόμα, σημαντικό μειονέκτημα της γ-Η2ΑΧ ως βιοδοσίμετρο είναι η μείωση των εστιών με το πέρας λίγων ωρών, λόγω της παρουσίας των επιδιορθωτικών μηχανισμών, καθώς και η εξασθένιση του σήματος φθορισμού, λόγω εξασθένισης των χρωμοφόρων ουσιών.

Β.ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ - ΠΕΙΡΑΜΑ

кефалаю 4

ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

4.1 Σκοπός του πειράματος

Δεδομένου ότι η βλάβη που έχει ενοχοποιηθεί περισσότερο ως προς τα βιολογικά αποτελέσματα της Ι.Α. και ειδικότερα με τον κυτταρικό θάνατο, είναι οι δίκλωνες θραύσεις του DNA, κρίνεται σκόπιμη η διερεύνηση της επαγωγής τους. Ως βιοδείκτες των δίκλωνων θραύσεων μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι εστίες γ-H2AX, μιας και αντιπροσωπεύουν τις βλάβες αυτές ως 1:1[110].

Σκοπός του πειράματος είναι η ανίχνευση των επαγόμενων δίκλωνων θραύσεων στο DNA κυττάρων *ex vivo* και *in vitro*, μετά από έκθεση σε δόσεις 0.2 – 4 Gy ιοντίζουσας ακτινοβολίας, με τη μέθοδο του προσδιορισμού των γ-H2AX εστιών. Πραγματοποιήθηκαν δύο σειρές πειραμάτων ΄ η πρώτη είχε ως στόχο τον προσδιορισμό του αριθμό των επαγόμενων βλαβών συναρτήσει της δόσης ακτινοβολίας και η δεύτερη τον προσδιορισμό του αριθμού των επαγόμενων βλαβών

συναρτήσει του χρόνου μετά την ακτινοβόληση, ώστε να εκτιμηθεί η χρονική εξέλιξη των επιδιορθωτικών μηχανισμών.

4.2 Υλικά και μέθοδοι

Για την εκτέλεση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν δύο είδη κυττάρων: λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος και η καρκινική σειρά MCF-7 (ATCC).

• Τα λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος (μονοπύρηνα κύτταρα) αποτελούν οημαντική πηγή για την αξιολόγηση της απόκρισης βλάβης του DNA σε ένα συγκεκριμένο ασθενή. Αποτελούν δείγμα από μη πολλαπλασιαζόμενα φυσιολογικά κύτταρα ιστού στη G0 φάση μέσα στο σώμα. Ως πηγή λεμφοκυττάρων για την *ex vivo* ανάλυση χρησιμοποιήθηκε φλεβικό αίμα που συλλέχθηκε από δύο υγιείς δότες διαφορετικού φύλου, με φλεβοκέντηση που έλαβε χώρα στο Ιατρείο του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος. Μετά την αιμοληψία, το δείγμα εισήχθη σε ηπαρινισμένο και αποστειρωμένο σωληνάριο χωρητικότητας 10 ml. Η ηπαρίνη είναι ουσία αντιπηκτική, που παρεμποδίζει τη συγκόλληση ή την πήξη των αιμοσφαιρίων.

Τα κύτταρα MCF-7 που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα, ήταν παροχή του Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α., Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» και προέρχονταν από την Αμερικανική Συλλογή Κυτταρικών Σειρών (American Type Culture Collection - ATCC). Η MCF-7 είναι μια κυτταρική σειρά από αδενοκαρκίνωμα μαστού, που απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1970,



Εικόνα 4.1 Κύτταρα MCF7, εικόνα μικροσκοπίου. (Πηγή: atcc.org)

από το μαστικό ιστό μιας 69-χρονης γυναίκας [111]. Γενετικά, η σειρά δεν έχει διατηρηθεί πλήρως. Αρχικά είχε περιγραφεί ως έχουσα καρυότυπο αποτελούμενο από 85 χρωμοσώματα [111], τα οποία έκτοτε έχουν μειωθεί περίπου στα 69, σε αντίθεση με το φυσιολογικό καρυότυπο των 46 χρωμοσωμάτων. Επιπλέον, έχουν σημειωθεί γενετικές διαφορές μεταξύ της κυτταρικής σειράς MCF-7 από το Michigan Cancer Foundation (στο οποίο οφείλει και το όνομά της) και της αντίστοιχης κυτταρικής σειράς της ATCC, γεγονός που δείχνει τη διαφορετική προέλευση των δύο σειρών.

4.2.1 Απομόνωση λεμφοκυττάρων

Προκειμένου να χρησιμοποιηθούν λεμφοκύτταρα για την εκτέλεση του πειράματος, πρέπει πρώτα να επιτευχθεί ο διαχωρισμός τους από τα υπόλοιπα συστατικά του αίματος και η απομόνωσή τους.

Κατά τη διαδικασία απομόνωσης γίνεται χρήση των ακόλουθων διαλυμάτων:

- Πλήρες θρεπτικό μέσο RPMI (εμπλουτισμένο με 10% v/v εμβρυικό ορό μόσχου – FBS, 0.1% πενικιλίνη – στρεπτομυκίνη και 0.1% L-γλουταμίνη)
- Φικόλλη (Biocoll separating solution)

Τα διαλύματα αφήνονται να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου. Η φικόλλη εγχέεται σε δοκιμαστικό σωλήνα, στον οποίο εισάγεται εν συνεχεία το αίμα, με τη βοήθεια πιπέτας. Η αναλογία φικόλλης-αίματος είναι 1:1. Ακουμπώντας το ακροφύσιο της πιπέτας (tip) στην επιφάνεια της φικόλλης εισάγεται μια μικρή ποσότητα αίματος, ώστε να δημιουργηθεί ένα λεπτό φιλμ και ανεβαίνοντας η πιπέτα (ακουμπώντας στο τοίχωμα του δοκιμαστικού σωλήνα), το αίμα αδειάζεται σταθερά

και αργά, προκειμένου να μην αναμιχθεί με το υποκείμενο διάλυμα. Ακολουθεί φυγοκέντριση, προτού το αίμα εισχωρήσει στη φικόλλη, στις 1800 στροφές ανά λεπτό (rpm) για 20 min (επιβράδυνση=1, επιτάχυνση=1).

Με τη φυγοκέντριση αυτή, επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός του διαλύματος σε ερυθρά αιμοσφαίρια, φικόλλη, λευκά αιμοσφαίρια και πλάσμα (νερό, βιταμίνες, πρωτεΐνες και λιπίδια), έτσι ώστε να καταστεί δυνατή η απομόνωση των λεμφοκυττάρων. Αποτέλεσμα της φυγοκέντρισης είναι η εμφάνιση των λεμφοκυττάρων ως ένας λευκός δίσκος στην επιφάνεια επαφής μεταξύ πλάσματος και φικόλλης.



Εικόνα 4.2 Διαχωρισμός συστατικών αίματος με φυγοκέντριση σε φικόλλη.

Μετά τη φυγοκέντριση γίνεται η απόσπαση των λεμφοκυττάρων, είτε πηγαίνοντας προσεκτικά την πιπέτα απευθείας στην περιοχή, είτε απομακρύνοντας το πλάσμα και τραβώντας τα μετά. Δεν πρέπει να αποσπαστεί ποσότητα φικόλλης μαζί με τα λεμφοκύτταρα. Ακολουθεί η εισαγωγή των λεμφοκυττάρων σε καινούριους δοκιμαστικούς σωλήνες (συνήθως είναι πάνω από ένας, προκειμένου να χωριστούν τα κύτταρα και να εφαρμοστούν διαφορετικές συνθήκες για κάθε πείραμα), οι οποίοι απογεμίζονται με πλήρες μέσο και φυγοκεντρίζονται στις 1500 rpm, για 15 λεπτά (επιβράδυνση=1, επιτάχυνση=1).

Μετά τη φυγοκέντριση επέρχεται απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναιώρηση του ιζήματος (λεμφοκύτταρα). Προστίθεται πλήρες μέσο και ακολουθεί η διαδικασία της ακτινοβόλησης.

4.2.2 Καλλιέργεια MCF-7

Κατά τη διαδικασία της κυτταρικής καλλιέργειας γίνεται χρήση των ακόλουθων διαλυμάτων:

- Πλήρες θρεπτικό μέσο DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), εμπλουτισμένο με 10% FBS, 1% L-γλουταμίνη και 1% αντιβιοτικό πενικιλίνη
 – στρεπτομυκίνη
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών PBS Dulbecco (Phosphate Buffered Saline) με MgCl₂ και CaCl₂
- Διάλυμα τρυψίνης / EDTA

Τα κύτταρα επωάζονται σε επωαστικό κλίβανο (incubator ThermoForma) σε συνθήκες θερμοκρασίας 37° C και παρουσία CO₂ 5%. Η καλλιέργειά τους πραγματοποιείται σε θρεπτικό μέσο μέσα σε φλάσκες των 25ml. Όταν η περιεκτικότητα της φλάσκας σε κύτταρα φτάσει περίπου το 80%, πραγματοποιείται η διαδικασία της ανακαλλιέργειας. Ο προσδιορισμός του βαθμού κάλυψης γίνεται με παρατήρηση στο ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο. Κύτταρα υγιή θεωρούνται αυτά που είναι προσκολλημένα στον πάτο της φλάσκας.

Σε θάλαμο νηματικής ροής, όπου είναι δυνατή η εργασία υπό στείρες συνθήκες, πραγματοποιούνται οι ακόλουθες διεργασίες. Το θρεπτικό υλικό της φλάσκας απομακρύνεται και γίνεται έκπλυση των κυττάρων με PBS, ώστε να αφαιρεθεί πλήρως το θρεπτικό υλικό, το οποίο δρα ανασταλτικά στην ενεργότητα της τρυψινοποίησης. Ακολουθεί η προσθήκη διαλύματος τρυψίνης (προθερμασμένης στους 37°C), αρκετού για να καλυφθεί η επιφάνεια της φιάλης, ώστε να αποκολληθούν τα κύτταρα. Σε αυτό το στάδιο το πώμα της φλάσκας σφραγίζεται και η φλάσκα τοποθετείται στον κλίβανο για περίπου 10 λεπτά, αλλά όχι περισσότερο διότι τίθεται σε κίνδυνο η επιβίωση των κυττάρων. Η αποκόλλησή τους μπορεί να υποβοηθηθεί και με χτύπημα της φιάλης.

Η τρυψίνη απομακρύνεται όταν παρατηρηθεί στο μικροσκόπιο η αποκόλληση των κυττάρων και τότε στα κύτταρα προστίθεται θρεπτικό υλικό, ώστε να ανασταλεί η δράση της τρυψίνης που έχει τυχόν μείνει στη φλάσκα, καθώς είναι αρκετά τοξική για τα κύτταρα. Το περιεχόμενο της φιάλης μεταφέρεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες των 15ml και φυγοκεντρίζεται στις 1300 rpm για περίπου 10 λεπτά. Μετά το τέλος της φυγοκέντρισης, το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα «ξεπλένονται» με PBS.

Τέλος, τα κύτταρα μεταφέρονται σε καινούριες φλάσκες, οι οποίες τοποθετούνται στον κλίβανο με ελαφρώς ανοιγμένο το πώμα και ελέγχονται τις επόμενες ημέρες για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

4.2.3 Ακτινοβόληση κυττάρων

Η ακτινοβόληση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με πηγή κοβαλτίου-60 (60Co) GammaCell 220 Irradiator (Atomic Energy of Canada Ltd, Ottawa, Canada, Ιανουάριος 1974), που βρίσκεται στις εγκαταστάσεις του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» (Εικόνα 4.3).

Πρόκειται για ακτινοβολητή κατηγορίας Ι (θωρακισμένο), όπου η πηγή βρίσκεται εγκιβωτισμένη σε «ξηρό» κατάλληλο δοχείο με θωράκιση από στερεά τοιχώματα. Ο διαθέσιμος, για το ακτινοβολούμενο υλικό, χώρος δεν είναι προσβάσιμος από τον άνθρωπο και είναι θωρακισμένος. Το δείγμα εισάγεται στον ακτινοβολητή και κατέρχεται στο σημείο της πηγής. Οι πηγές κοβαλτίου είναι κυλινδρικές, σε κυκλική

διάταξη ώστε να επιτυγχάνεται η ομοιόμορφη ακτινοβόληση των δειγμάτων. Ο χρόνος για να κατέβει / ανέβει το δείγμα, έχει εκτιμηθεί περίπου στα 7 sec.

Ανάλογα με το πείραμα, τα κύτταρα ακτινοβολήθηκαν σε δόσεις 0.2, 0.5, 1, 2 και 4 Gy με ρυθμό δόσης 0.43 Gy ανά λεπτό. Στην περίπτωση των λεμφοκυττάρων, τα κύτταρα βρίσκονταν σε πάγο, πριν και μετά την ακτινοβόληση. Σημειώνεται ότι στο χώρο του ακτινοβολητή βρίσκονταν και τα κύτταρα τα οποία δε χρειαζόταν να ακτινοβοληθούν (0 Gy - control σωλήνες ελέγχου), προκειμένου οι «δοκιμασίες» στις οποίες υποβάλλονται (όπως η μετακίνηση από το εργαστήριο στο κτίριο του ακτινοβολητή) να είναι όσο το δυνατόν ίδιες για όλα τα κύτταρα.



Εικόνα 4.3 GammaCell 220 Irradiator, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος», με εκτιμώμενο ρυθμό δόσης 0.43Gy/min και χρόνο καθόδου/ ανόδου δείγματος 7sec.

4.3 Πρωτόκολλο πειράματος

4.3.1 Λεμφοκύτταρα

Μετά την ακτινοβόληση, τα λεμφοκύτταρα επωάζονται στον κλίβανο για 20 λεπτά, με τους δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετημένους σε πλάγια θέση και με ελαφρώς ανοιγμένο το πώμα. Μετά την πάροδο του χρόνου αυτού, οι σωλήνες με τα λεμφοκύτταρα μέσα στο θρεπτικό υλικό φυγοκεντρίζονται στις 1400 rpmγια 10 λεπτά. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο διάλυμα απορρίπτεται και γίνεται επαναιώρηση των κυττάρων που βρίσκονται στον πυθμένα του σωλήνα, με χτυπήματα δια των δαχτύλων. Ακολουθεί η εισαγωγή ποσότητας υπότονου διαλύματος (75 mM KCl σε αποσταγμένο νερό) σε αρκετά κλάσματα, μέχρι να απογεμίσει ο σωλήνας. Με την προσθήκη υπότονου διαλύματος, δημιουργείται διαφορά άλατος μέσα και έξω από την κυτταρική μεμβράνη. Τα κύτταρα, για να εξισορροπηθεί η διαφορά αυτή, προσροφούν νερό (λόγω του φαινομένου της ώσμωσης), με αποτέλεσμα να διογκώνονται (και να φαίνονται καλύτερα στο μικροσκόπιο).

Εν συνεχεία, τα κύτταρα φυγοκεντρίζονται στις 1300 rpmγια 10 λεπτά. Το υπότονο απορρίπτεται και εισάγεται καινούριο (περίπου 2 ml), με ταυτόχρονη ανάδευση ώστε τα κύτταρα να είναι ομοιόμορφα κατανεμημένα στο διάλυμα και όχι στον πάτο του δοκιμαστικού σωλήνα.

Έπεται η επίστρωση των λεμφοκυττάρων σε αντικειμενοφόρες πλάκες, με τη βοήθεια ειδικών θηκών (Εικόνα 4.4), στις οποίες εισάγεται μικρή ποσότητα από το διάλυμα υπότονου και λεμφοκυττάρων (περίπου 200μl) σε μία περιορισμένη περιοχή. Με φυγοκέντριση στις 800 rpm για 4 λεπτά, επιτυγχάνεται η προσκόλληση των λεμφοκυττάρων σε συγκεκριμένη περιοχή της αντικειμενοφόρου πλάκας.



Εικόνα 4.4 Διάταξη για την προσκόλληση λεμφοκυττάρων σε αντικειμενοφόρο πλάκα, με φυγοκέντριση.
Η πυκνότητα των κυττάρων ελέγχεται στο μικροσκόπιο. Μία επιθυμητή εικόνα είναι να υπάρχουν αρκετά κύτταρα στο πλακάκι και κοντά το ένα με το άλλο, χωρίς όμως να υπάρχει αλληλοεπικάλυψη. Σε αντίθετη περίπτωση, το διάλυμα πρέπει να αραιωθεί, να φυγοκεντρισθούν τα πλακάκια εκ νέου και να ελεγχθεί πάλι η συγκέντρωση των κυττάρων.

Ακολουθεί η μονιμοποίηση των κυττάρων πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα, με εμβάπτισή τους σε διάλυμα φορμαλδεΰδης 4%, μέσα σε φιαλίδιο με ειδικές θήκες για τα πλακάκια (jar) (Εικόνα 4.5). Τα κύτταρα παραμένουν στη φορμαλδεΰδη για 15-20 λεπτά και στη συνέχεια ξεπλένονται 3 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS). Κάθε έκπλυση γίνεται μέσα στο φιαλίδιο με τις



Εικόνα 4.5 Φιαλίδιο (jar) για την έκπλυση αντικειμενοφόρων πλακών.

ειδικές θήκες για τα πλακάκια, τοποθετημένο πάνω σε αναδευτήρα ελλειπτικής τροχιάς (orbitalshaker) και διαρκεί περίπου 5 λεπτά. Μετά την κάθε έκπλυση, το PBSανανεώνεται. Η ίδια διαδικασία (3 εκπλύσεις x 5 λεπτά) επαναλαμβάνεται και για εμβάπτιση των κυττάρων σε διάλυμα Triton-X 0.25% σε PBS, το οποίο σε μικρές συγκεντρώσεις δρα ως «σαπούνι», ενώ σε μεγάλες δημιουργεί «τρύπες» στις κυτταρικές μεμβράνες και τις καθιστά διαπερατές. Ακολουθεί ένα ξέπλυμα με PBS.

Στη συνέχεια, εισάγεται στα κύτταρα ένα διάλυμα το οποίο αποτρέπει τη μη-ειδική πρόσδεση του αντισώματος (Blocking solution). Ο προσδιορισμός της σύστασης του διαλύματος αυτού αποτελεί γρίφο για κάθε πειραματιστή, γιατί σε μεγάλο ποσοστό, η επιτυχία της μεθόδου έγκειται στη σωστή σύσταση του blocking. Για τα πειράματα που περιγράφονται εδώ η σύσταση ήταν10% BSA (Bovine Serum Albumin), 6% FBS και 0.02% Triton-X. Με υδρόφοβο μελάνι (Liquid Blocker super pan pen) δημιουργούνται κυκλικές περιοχές στα πλακίδια, η οποίες περικλείουν την περιοχή που βρίσκονται προσκολλημένα και μονιμοποιημένα τα κύτταρα, και μέσα σε αυτές εγχέονται περίπου 200μl από το διάλυμα blocking. Εξασφαλίζοντας συνθήκες υγρασίας (τοποθέτηση των πλακιδίων πάνω σε διηθητικό χαρτί, βρεγμένο με αποσταγμένο νερό), τα πλακάκια μεταφέρονται στον κλίβανο, όπου και παραμένουν για 60 λεπτά.

Με το πέρας αυτού του χρόνου, εφαρμόζεται το πρωτεύον αντίσωμα γ-H2AX [pSer139] Antibody (EP854(2)Y) (Novus Biologicals), αραιωμένο σε διάλυμα blocking σε αναλογία 1/1000. Τα κύτταρα επωάζονται στον κλίβανο για 45 λεπτά και ξεπλένονται 3 φορές με PBS, 3 φορές με Triton-X0.1% και ακόμη μία φορά με PBS. Τα πλυσίματα των κυττάρων είναι πολύ σημαντικά για τη βελτιστοποίηση της εικόνας στο μικροσκόπιο φθορισμού. Ακολουθεί εφαρμογή του διαλύματος blocking, επώαση για 60 λεπτά και εισαγωγή του δευτερεύοντος αντισώματος, το οποίο είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο με τη φθορίζουσα χρωστική ροδαμίνη (Rhodamine Red- X Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), Life Technologies). Το αντίσωμα είναι αραιωμένο σε διάλυμα blocking, σε αναλογία 1:4000 και αφήνεται να δράσει για 30 λεπτά. Δεδομένου ότι πρόκειται για φωτοαυαίσθητο αντίσωμα, οι χειρισμοί του και η μετέπειτα επεξεργασία γίνονται σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού.

Ακολούθως, τα πλακίδια υπόκεινται σε διαδικασίες εκπλύσεων (5 λεπτά PBS, 3 x 5 λεπτά Triton-X, 3 x5 λεπτά PBS) και εμβαπτίζονται σε παγωμένη αιθανόλη καθαρότητας 100%. Αφήνονται να στεγνώσουν εντελώς (περίπου για 30 λεπτά), ώστε τα κύτταρα να βρίσκονταισε ένα μόνο επίπεδο, όσο αυτό είναι δυνατό, για καλύτερη μικροσκοπική ανάλυση. Ακολουθεί εφαρμογή 2 mg/ml της μπλε φθορίζουσας χρωστικής DAPI (4'-6-Diamidino-2-Phenylindole) αραιωμένης σε PBS, η οποία είναι

ένας πυρηνικός ιχνηθέτης που δεσμεύεται ισχυρά στις Α-Τ πλούσιες περιοχές του κυτταρικού DNA. Η περιοχή που ορίστηκε με το υδρόφοβο μελάνι επικαλύπτεται από μικρή καλυπτρίδα, η οποία στη συνέχεια στερεοποιείται περιφερειακά με διάφανο βερνίκι. Τα πλακίδια φυλάσσονται προστατευμένα από το φως σε ψύξη μέχρι την ανάλυσή τους στο μικροσκόπιο φθορισμού.

4.3.2 MCF-7

Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε για την κυτταρική σειρά MCF-7, είναι ίδιο με αυτό που περιγράφτηκε για τα λεμφοκύτταρα. Η μόνη διαφοροποίηση βρίσκεται στην επίστρωση των κυττάρων στις αντικειμενοφόρες πλάκες και έγκειται στο γεγονός ότι τα MCF7 είναι κύτταρα που αναπτύσσονται επί της επιφάνειας του δοχείου που τα εμπεριέχει, σε αντίθεση με τα λεμφοκύτταρα. Με το υδρόφοβο μελάνι δημιουργούνται κυκλικές περιοχές στα πλακίδια, οι οποίες οριοθετούν την ανάπτυξη των κυττάρων. Τα πλακίδια αποστειρώνονται εμβαπτιζόμενα σε 100% αιθανόλη και αφού στεγνώσουν σε στείρες συνθήκες, τοποθετούνται μέσα σε τρυβλία, στα οποία εν συνεχεία εισάγεται διάλυμα κυττάρων σε θρεπτικό υλικό DMEM. Τα κύτταρα αφήνονται στον κλίβανο για επώαση και είναι κατάλληλα για τη δοκιμή όταν έχουν φτάσει σε επιφανειακή πυκνότητα 60-80%. Ακολουθεί η διαδικασία της ακτινοβόλησης, επώαση των κυττάρων, η μονιμοποίησή τους και τα υπόλοιπα βήματα που περιγράφτηκαν.

кефалаю 5

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ -

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

5.1 Πείραμα απόκρισης στη δόση

Για το πείραμα αυτό, προετοιμάστηκαν κύτταρα τα οποία ακτινοβολήθηκαν με δόσεις 0.2 – 4 Gy και κύτταρα τα οποία δεν ακτινοβολήθηκαν (control – 0 Gy), αλλά ακολούθησαν τις ίδιες διαδικασίες με τα δείγματα προς ακτινοβόληση. Τα πλακάκια μελετήθηκαν στο μικροσκόπιο για την εκτίμηση των εστιών γ-H2AX, σε σύντομο σχετικά διάστημα μετά την ολοκλήρωση του πρωτοκόλλου, καθώς οι χρωμοφόρες ουσίες εξασθενούν σταδιακά με την πάροδο του χρόνου.

Λεμφοκύτταρα

Στο πείραμα αξιολογήθηκαν λεμφοκύτταρα εκτεθειμένα σε δόσεις 0, 0.2, 0.5, 1 και 2 Gy. Για κάθε συνθήκη και για κάθε δότη μετρήθηκαν στο μικροσκόπιο 200 κύτταρα και εκτιμήθηκε ο μέσος όρος του αριθμού των εστιών (foci) ανά κύτταρο. Ταυτόχρονα, λήφθηκαν φωτογραφίες από το μικροσκόπιο, με τη βοήθεια του λογισμικού ISIS (Metasystems) με σκοπό την αξιολόγηση των εστιών με τη βοήθεια του λογισμικού Jcount. Υπολογίστηκε και η αντίστοιχη τυπική απόκλιση της μέσης τιμής, μέσω του τύπου:

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

, όπου σείναι η τυπική απόκλιση της μίας μέτρησης και η ο αριθμός των μετρήσεων.

Τα αποτελέσματα για κάθε δότη παρατίθενται στους Πίνακες 5.1 και 5.2.

•	Δότης Α		
Gy	Εστίες / κύτταρο	±	Τυπική απόκλιση
0	1,25	±	0,12
0,2	2,32	±	0,71
0,5	3,99	±	0,03
1	8,42	±	0,89
2	14,66	±	1,56

Πίνακας 5.1 Πειραματικά αποτελέσματα και τυπικές αποκλίσεις για τον αριθμό των εστιών ανά κύτταρο σε διάφορες δόσεις, για το δότη Α. Πίνακας 5.2 Πειραματικά αποτελέσματα και τυπικές αποκλίσεις για τον αριθμό των εστιών ανά κύτταρο σε διάφορες δόσεις, για το δότη Β

±

±

±

±

±

±

Τυπική

απόκλιση

0,43

0.14

0,75

0,96

0,05

Δότης Β

Gy

0

0,2

0,5

1

2

Εστίες /

κύτταρο

1,06

2,65

4,70

10,50

17,87

Η γραφική παράσταση των αποτελεσμάτων του πειράματος της μελέτης επαγωγής βλαβών DNA συναρτήσει της δόσης, δείχνουν μια γραμμική αύξηση του αριθμού των εστιών (foci)και για τους δύο δότες, με συντελεστές συσχέτισης R² κοντά στη μονάδα (δηλαδή, η ευθεία παλινδρόμησης προσαρμόζεται καλά στα δεδομένα).Η συμπεριφορά αυτή συμφωνεί με προηγούμενες δημοσιευμένες μελέτες [109, 112, 113].

Ακολουθούν τα αντίστοιχα διαγράμματα.



Διάγραμμα 5.1 Αριθμός εστιών ανά κύτταρο συναρτήσει της δόσης για το δότη Α και εξίσωση ευθείας.



Διάγραμμα 5.2 Αριθμός εστιών ανά κύτταρο συναρτήσει της δόσης για το δότη Β και εξίσωση ευθείας.

Οι τιμές που εκτιμήθηκαν για τον αριθμό των εστιών συναρτήσει της δόσης παρουσιάζουν μικρές αποκλίσεις για τους δύο δότες. Έτσι, μεταξύ των αποτελεσμάτων που λήφθηκαν από το πείραμα κάθε δότη, για τις διάφορες δόσεις, εφαρμόστηκε ο έλεγχοςStudent's t-test με το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης SPSS, προκειμένου να εντοπιστούν τυχόν στατιστικώς σημαντικές διαφορές. Βρέθηκε πως δεν υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές και οι αποκλίσεις των τιμών οφείλονται στον παράγοντα τύχη, με πιθανότητα 95%.





Εικόνα 5.1 Λεμφοκύτταρα εκτεθειμένα σε διάφορες δόσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Διακρίνονται οι εστίες γ-Η2ΑΧ, που αντιπροσωπεύουν τις επαγόμενες δίκλωνες θραύσεις του DNA. Εικόνες μικροσκοπίου, με τη βοήθεια του λογισμικού ISIS (Metasystems).

Σύγκριση καμπύλης δόσεων λεμφοκυττάρων και MCF-7

Το ίδιο πείραμα εκτελέστηκε και με την καρκινική κυτταρική σειρά MCF-7 για έκθεση σε 0, 0.5, 1, 2και 4 Gy. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον Πίνακα 5.4, ενώ στον Πίνακα 5.3 είναι τα αποτελέσματα του πειράματος για τα λεμφοκύτταρα και για τους δύο δότες, προκειμένου να συγκριθούν οι δύο καμπύλες (Διάγραμμα 5.4).

• Λεμφοκύτταρα (2 δότες)

<mark>G</mark> ұ	Εστίες / κύτταρο	±	Τυπική απόκλιση
0	1,16	±	0,22
0,2	2,49	±	0,40
0,5	4,35	±	0,51
1	9,46	±	0,05
2	16,27	±	1,07

Πίνακας 5.3 Πειραματικά αποτελέσματα για τον αριθμό των εστιών ανά κύτταρο σε διάφορες δόσεις, για λεμφοκύτταρα (μέσος όρος για τους δύο δότες).

• MCF-7

Gy	Εστίες / κύτταρο	±	Τυπική απόκλιση
0	1,20	±	0,62
0,5	15,72	±	0,59
1	22,5	±	1,95
2	37,80	±	1,91
4	64,02	±	2,11

Πίνακας 5.4 Πειραματικά αποτελέσματα για τον αριθμό των εστιών ανά κύτταρο σε διάφορες δόσεις, για MCF-7.



Εικόνα 5.2 Καρκινικά κύτταρα MCF-7 εκτεθειμένα σε διάφορες δόσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Διακρίνονται οι εστίες γ-H2AX, που αντιπροσωπεύουν τις επαγόμενες δίκλωνες θραύσεις του DNA. Εικόνες μικροσκοπίου, με τη βοήθεια του λογισμικού ISIS (Metasystems).



Διάγραμμα 5.4 Καμπύλες δόσεων για λεμφοκύτταρα (2 υγιείς δότες) και καρκινικά κύτταρα MCF-7.

Ως δείκτης για τις βλάβες του DNA, η H2AX βρίσκεται σε υψηλότερα επίπεδα στα καρκινικά κύτταρα[90], λόγω των αυξημένων ενδογενών βλαβών, αλλά και της κυτταρικής διαίρεσης. Είναι γενικά αποδεκτό ότι κύτταρα, τα οποία βρίσκονται σε κυτταρικό κύκλο και πολλαπλασιάζουν το DNA τους, παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα θραύσεων του DNA και της χρωματίνης (replication stress). Επίσης, ο αυξημένος αριθμός χρωμοσωμάτων και γονιδιώματος των MCF-7, λόγω της φάσης του κυτταρικού κύκλου συμβάλλει στο φαινόμενο αυτό, σε αντίθεση με τα λεμφοκύτταρα που βρίσκονται όλα στη G0 φάση.

5.2 Πείραμα επιδιόρθωσης

Για τη μελέτη της επιδιόρθωσης των επαγόμενων βλαβών λόγω της Ι.Α., χρησιμοποιήθηκαν τα λεμφοκύτταρα που συλλέχθηκαν από τους δύο υγιείς δότες. Για το πείραμα προετοιμάστηκαν κύτταρα τα οποία ακτινοβολήθηκαν με 1 Gy και κύτταρα τα οποία δεν έλαβαν δόση ακτινοβολίας (0 Gy). Αμέσως μετά την ακτινοβόληση, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν στον κλίβανο για επώαση, σύμφωνα με το πρωτόκολλο. Προκειμένου να συλλεχθούν δεδομένα για διάφορα χρονικά σημεία (0, 6, 12, 24 και 48 ώρες μετά την ακτινοβόληση και μέχρι τη μονιμοποίηση), ποσοστό κυττάρων έβγαινε από τον κλίβανο σε συγκεκριμένο χρόνο και ξεκινούσε η διαδικασία της μονιμοποίησης και η συνέχεια του πρωτοκόλλου. Το χρονικό σημείο «0 ώρες» αντιπροσωπεύει κύτταρα τα οποία μετά την ακτινοβόληση επωάστηκαν για τον ελάχιστο χρόνο που ορίζει το πρωτόκολλο, δηλαδή 20 λεπτά.

Για κάθε συνθήκη εκτιμήθηκαν οι εστίες 200 πυρήνων και λήφθηκαν φωτογραφίες για επεξεργασία των δεδομένων μέσω του λογισμικού Jcount.

Τα αποτελέσματα που συλλέχθηκαν, μετά από παρατήρηση στο μικροσκόπιο συγκεντρώνονται στον Πίνακα 5.5.

		1 Gy		0 Gy	
Χρονικό σημείο	Δότης	Εστίες ανἁ κὑτταρο	Τυπική απόκλιση	Εστίες ανά κύτταρο	Τυπική απόκλιση
"0" h	А	8,42	0,89	1,25	0,12
0 11	В	8,70	1,28	1,19	0,04
6 h	А	3,28	0,85	1,34	0,19
011	В	3,35	0,42	1,34	0,19
12 h	А	2,46	0,04	1,41	0,08
12 11	В	2,49	0,05	1,21	0,01
24 h	А	1,70	0,01	1,29	0,08
24 11	В	1,55	0,39	1,20	0,11
18 h	А	1,34	0,52	1,24	0,21
40 II	В	1,47	0,19	1,15	0,04

Πίνακας 5.5 Πειραματικά αποτελέσματα για τον αριθμό των εστιών ανά κύτταρο σε διάφορα χρονικά σημεία, για ακτινοβολημένα (1Gy) και μη-ακτινοβολημένα λεμφοκύτταρα (0Gy).

Η γραφική παράσταση των πειραματικών αυτών σημείων επιδεικνύει μια εμφανή μείωση του αριθμού των εστιών, με το πέρας του χρόνου, γεγονός που δικαιολογείται από την ύπαρξη μηχανισμών επιδιόρθωσης (DNA repair).



Εικόνα 5.3 Λεμφοκύτταρα εκτεθειμένα σε 1 Gy ιοντίζουσας ακτινοβολίας, σε διάφορα χρονικά σημεία μετά την ακτινοβόληση. Είναι εμφανής η μείωση των εστιών γ-H2AX, που αντιπροσωπεύουν τις επαγόμενες δίκλωνες θραύσεις του DNA, με το πέρας του χρόνου. Εικόνες μικροσκοπίου, με τη βοήθεια του λογισμικού ISIS (Metasystems).

Η επιδιόρθωση μπορεί να εκτιμηθεί εφαρμόζοντας τον έλεγχοStudent's t-test για κάθε χρονικό σημείο σε σχέση με το επίπεδο των εστιών στα 0 Gy (control), το οποίο εκφράζεται με μία γραμμή στο Διάγραμμα 5.5, μιας και μένει σχετικά σταθερό. Τα επίπεδα σημαντικότητας ερμηνεύονται ως: p<0.05 (*), p<0.01 (**), p<0.001 (***). Ο έλεγχος εφαρμόστηκε και μεταξύ των αποτελεσμάτων που λήφθηκαν από το πείραμα κάθε δότη, για τα διάφορα χρονικά σημεία, αλλά δεν προέκυψαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές.



Διάγραμμα 5.5 Χρονική εξέλιξη του αριθμού εστιών, για τους δύο δότες. Τα επίπεδα σημαντικότητας του ελέγχου t-test, που εφαρμόστηκε για τις τιμές κάθε χρονικού σημείου σε σχέση με το επίπεδο των μη-ακτινοβολημένων κυττάρων (0Gy)εκφράζονται ως p<0.05 (*), p<0.01 (**), p<0.001 (***).

Συμπερασματικά, ο αριθμός των εστιών 48 ώρες μετά την ακτινοβόληση έχει φτάσει σε πολύ χαμηλά επίπεδα και προσεγγίζει κατά πολύ το επίπεδο των εστιών των μηακτινοβολημένων κυττάρων. Βέβαια χρειάζεται περισσότερος χρόνος για την πλήρη επιδιόρθωση των βλαβών.

Στη συνέχεια, υπολογίζεται ο χρόνος στον οποίο ο αριθμός των εστιών ανά κύτταρο

έχει μειωθεί στο μισό, εφαρμόζοντας την καμπύλη εκθετικής μείωσης στα δεδομένα :

$$y = y_0 + A_1 \cdot e^{-x/t_1}$$

, όπου $t_{1/2} = t_1 \cdot \ln(2)$ είναι ο χρόνος ημίσειας ζωής του φαινομένου.

Η εφαρμογή της καμπύλης εκθετικής μείωσης πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα *OriginPro 8* και έδωσε τα ακόλουθα γραφήματα (Διαγράμματα 5.6 και 5.7).



Διάγραμμα 5.6 Καμπύλη εκθετικής μείωσης για τα δεδομένα του δότη Α.



Διάγραμμα 5.7 Καμπύλη εκθετικής μείωσης για τα δεδομένα του δότη Β.

Για τα δεδομένα του δότη Α ο χρόνος ημίσειας ζωής του φαινομένου υπολογίζεται ως 3,72 ± 0,26 ώρες και για τα δεδομένα του δότη Β ως 4,53 ± 0,77 ώρες. Συμπερασματικά, ο αριθμός των εστιών ανά κύτταρο μειώνεται στο μισό περίπου 4 ώρες μετά τη χρονική στιγμή «0 ώρες», κατά την οποία θεωρείται πως παρουσιάζεται ο μέγιστος αριθμός εστιών ανά πυρήνα.

Το αποτέλεσμα συμφωνεί σε γενικές γραμμές με μελέτες που έχουν εκτιμήσει πως οι εστίες γίνονται αρχικά ορατές περίπου στα 3 λεπτά μετά την ακτινοβόληση, αυξάνουν σε μέγεθος μέχρι περίπου τα 30 λεπτά και στη συνέχεια ο αριθμός τους μειώνεται, με ημίσεια ζωή μερικών ωρών [110].Σε άλλη πειραματική μελέτη, ο χρόνος ημίσειας ζωής της μείωσης των εστιών γ-H2AX σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος, έχει εκτιμηθεί ως 3,0 ± 0,6 ώρες [99].

5.3 Επεξεργασία δεδομένων με το λογισμικό Jcount

Για την προτυποποίηση της μεθόδου για μελλοντικά πειράματα έγινε προσπάθεια καταμέτρησης των εστιών γ-H2AX ανά κύτταρο, με τη βοήθεια του λογισμικού Jcount (ευγενική παροχή της Δρ. Olga Martin, Peter MacCallum Cancer Center, Melbourne – Australia).Πρόκειται για ένα σύνθετο λογισμικό με ποικίλες εφαρμογές ακόμα και σε κλινικό επίπεδο [114], το οποίο έχει αναπτυχθεί ειδικά για τον σκοπό αυτό και επιτρέπει τον προσδιορισμό πολλών παραμέτρων.

Η λογική για την αναγνώριση των εστιών φθορισμού βασίζεται στη διερεύνηση των διακυμάνσεων της έντασης εντός μιας μικρής περιοχής της εικόνας.

Οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτά τα πειράματα, μετά από αρκετές δοκιμές ήταν οι:

TH: 11 F/L: 2 HD: 22 TR: 18 Min: 15 S/A: 80/60

, όπου *TH* είναι ο μετασχηματισμός Top-Hat που επιστρέφει όσα στοιχεία (εστίες) είναι πιο φωτεινά από το περιβάλλον τους με βάση μια καθορισμένη τιμή, *F/L*το φίλτρο θορύβου, *HD* (Dome Heigh %) και *TR* (Threshold %) είναι παράμετροι για την εφαρμογή του μετασχηματισμού H-Dome που αφαιρεί όλα τα μέγιστα στην εικόνα εντάσεως το ύψος των οποίων είναι μικρότερο από μία τιμή, *Min* το ελάχιστο μέγεθος της εστίας και *S/A* η ελάχιστη στρογγυλότητα των εστιών x100 και το μέγιστο μέγεθός τους, αντίστοιχα.

Πιο συγκεκριμένα, η παράμετρος top-hat size καθορίζει το μέγεθος της περιοχής εντός της οποίας αναλύονται οι διακυμάνσεις στην ένταση. Ως κέντρο της περιοχής αυτής ορίζεται κάποιο τοπικό μέγιστο της έντασης. Η αύξηση αυτής της παραμέτρου προλαμβάνει τον αποκλεισμό μεγαλύτερων περιοχών.

Select Files			
Select Files	Assign Groups Foci Counting		
Top Hat Settings Image: Apply Top Hat Index SE Rad = 5 SE Size = 97 I1	H-Dome Settings Dome Height, % 22 A Segmentation Colour Threshold, % 18 A Red		
Focus Channel Red Blue Green Average	Normalisation External Normalisation Linear Use Existing Data		
Holes Analysis Auto Fill Small Holes Min Hole Size 20	Shape/Size Settings Min Focus Size, pixels 15 V Apply Shape/Size Max Focus Size, pixels 80 Max Focus Size (Conditional) Min Roundness, x100 60		
I/O Options Distribution Bin Size 1 Close Dialog Box on Start I/O Options Priority Norm Lower Ide	Fod Statistics N Cells Min Max Aver StDev		
File Selection	Ready		

Εικόνα 5.4 Προσδιορισμός παραμέτρων του λογισμικού Jcount για τη μέτρηση εστιών.

• Πείραμα απόκρισης στη δόση

Συγκρίθηκαν οι μετρήσεις που έγιναν μέσω μικροσκοπίου για τα λεμφοκύτταρα των δύο δοτών, με τις μετρήσεις που προέκυψαν μέσω του λογισμικού Jcount σε αντίστοιχες φωτογραφίες που είχαν παρθεί από το μικροσκόπιο.

Οι επιλεγμένες παράμετροι φαίνεται να δουλεύουν καλά σε μικρές δόσεις, αλλά όχι σε μεγάλες (2 Gy). Ο στατιστικός έλεγχος Student's t-test δίνει μία στατιστικώς αρκετά σημαντική διαφορά στη μέτρηση για τα 2 Gy του δεύτερου δότη.





Διάγραμμα 5.8 Σύγκριση μέτρησης αριθμού εστιών ανά κύτταρο μέσω μικροσκοπίου και με τη βοήθεια του λογισμικού Jcount, για το δότη Α.

Διάγραμμα 5.9 Σύγκριση μέτρησης αριθμού εστιών ανά κύτταρο μέσω μικροσκοπίου και με τη βοήθεια του λογισμικού Jcount, για το δότη Β. Στα 2Gy ο στατιστικός έλεγχος t-test δίνει μία στατιστικώς σημαντική διαφορά με p-value=0.0039 < 0.01.

Αυτή η διαφορά που παρουσιάζεται στα 2 Gy οφείλεται σε υποεκτίμηση του αριθμού των εστιών μέσω του Jcount. Σε αυτή τη συνθήκη παρουσιάζονται πολυάριθμες εστίες στους κυτταρικούς πυρήνες, με αποτέλεσμα να επέρχεται κορεσμός και το λογισμικό να αδυνατεί να διαχωρίσει τις εστίες από το περιβάλλον τους, με βάση τις επιλεγμένες παραμέτρους. Η αιτία για την ασυμφωνία αυτή είναι ο μεγάλος χρόνος συλλογής φωτός για τη δημιουργία της εικόνας φθορισμού που έχουμε ορίσει στο λογισμικό που είναι συνδεδεμένο με το μικροσκόπιο (Isis, Metasystems). Η μείωση του χρόνου λήψης φωτογραφίας για μελλοντικά πειράματα θα πρέπει να συνοδευτεί με επανακαθορισμό των παραμέτρων του Jcount (η παράμετρος H-Dome Height να αυξηθεί και η H-Dome threshold να μειωθεί).

Στις ακόλουθες εικόνες, παρουσιάζεται η εκτίμηση των εστιών με τη βοήθεια του Jcount, σύμφωνα με τις επιλεγμένες παραμέτρους.

Jcount



Εικόνα 5.5 Φωτογραφίες μικροσκοπίου με λεμφοκύτταρα εκτεθειμένα σε διάφορες δόσεις ακτινοβολίας και εκτίμηση των εστιών γ-H2AX με το λογισμικό Jcount.

Πείραμα επιδιόρθωσης

Συγκρίθηκαν οι μετρήσεις που έγιναν μέσω μικροσκοπίου για τα λεμφοκύτταρα από τους δύο δότες, με τις μετρήσεις που προέκυψαν μέσω του λογισμικού Jcount σε φωτογραφίες που είχαν παρθεί από το μικροσκόπιο, για τα διάφορα χρονικά σημεία.

Οι επιλεγμένες παράμετροι δουλεύουν αρκετά ικανοποιητικά. Ο έλεγχος Student's t-test δίνει μία στατιστικώς σημαντική διαφορά στις μετρήσεις για το σημείο 0 Gy - 0 ώρες και στους δύο δότες (p-value<0.05).

Ακολουθούν τα αντίστοιχα διαγράμματα.



Διάγραμμα 5.10 Σύγκριση μέτρησης αριθμού εστιών ανά κύτταρο μέσω μικροσκοπίου και με τη βοήθεια του λογισμικού Jcount, για το δότη Α. Στα 0Gy - «0» ώρες ο στατιστικός έλεγχος t-test δίνει μία στατιστικώς σημαντική διαφορά με p-value=0.0417.

Διάγραμμα 5.11 Σύγκριση μέτρησης αριθμού εστιών ανά κύτταρο μέσω μικροσκοπίου και με τη βοήθεια του λογισμικού Jcount, για το δότη Β. Στα 0Gy-«Ο»ώρες ο στατιστικός έλεγχος t-test δίνει μία στατιστικώς σημαντική διαφορά με p-value=0.0318.

48

5.4 Μελλοντικές βελτιώσεις

 Η μείωση του αριθμού των εστιών συναρτήσει του χρόνου μετά την ακτινοβόληση εκφράζεται εφαρμόζοντας στα δεδομένα την εξίσωση εκθετικής μείωσης 2^{ου} βαθμού, που περιέχει τον όρο της ταχείας και τον όρο της αργής εκθετικής μείωσης:

$$y = y_0 + A_1 \cdot e^{-x/t_1} + A_2 \cdot e^{-x/t_2}$$

,με τη βοήθεια του προγράμματος *OriginPro 8*. Στην επεξεργασία των δεδομένων όμως χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση εκθετικής μείωσης 1^{ου} βαθμού, μιας και δεν υπήρχαν αρκετά πειραματικά σημεία στην περιοχή *0-10 ώρες* και υπήρχε αδυναμία στην εφαρμογή της ταχείας εκθετικής μείωσης. Θέτοντας περισσότερα χρονικά σημεία στο πείραμα της επιδιόρθωσης, μπορούν να ληφθούν ακριβέστερα αποτελέσματα.

- Ενδιαφέρον θα παρουσίαζε και η πραγματοποίηση του πειράματος επιδιόρθωσης
 στα καρκινικά κύτταρα MCF-7, για τη σύγκριση της απόκρισής τους με αυτήν
 των λεμφοκυττάρων και την εξαγωγή συμπερασμάτων για τους επιδιορθωτικούς
 μηχανισμούς που λαμβάνουν χώρα σε κάθε περίπτωση.
- Παρά την ευρεία εφαρμογή της ανίχνευσης των εστιών γ-Η2ΑΧ μέσω μικροσκοπίου, η καταμέτρηση είναι επίπονη και επιρρεπής σε ανακρίβειες, ειδικά στην περίπτωση που ο αριθμός των εστιών ανά κύτταρο είναι υψηλός και το μέγεθός τους πολύ μικρός. Συνεπώς κρίνεται σκόπιμη η βελτιστοποίηση των παραμέτρων του λογισμικού Jcount, προκειμένου τα αποτελέσματά του να είναι αξιόπιστα. Η καταμέτρηση των εστιών αυτόματα από το πρόγραμμα, θα καταστήσει πιο γρήγορη την εξαγωγή συμπερασμάτων και η μέθοδος γ-Η2ΑΧ θα μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη βιοδοσιμετρία, ακόμα και για μεγάλους πληθυσμούς.

5.5 Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα της εργασίας αναδεικνύουν τη σημασία της μεθόδου για την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την απόκριση καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων στην Ι.Α., μετά από έκθεση σε σχετικά μικρές δόσεις ακτινοβολίας. Η γ-Η2ΑΧ φαίνεται να αποτελεί έναν πρώιμο και ευαίσθητο δείκτη των επαγόμενων ομαδοποιημένων βλαβών του DNA, ακόμα και σε χαμηλά επίπεδα βλάβης. Ως εκ τούτου, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδοσίμετρο για έκθεση σε Ι.Α. και πιθανότατα ως δείκτης της γονιδιακής αστάθειας και ακτινοευαισθησίας, δεδομένου ότι μπορεί να εξετάσει το ρυθμό και την αποτελεσματικότητα των επιδιορθωτικών μηχανισμών του DNA ως προς τις σύνθετες βλάβες. Το εύρημα του αυξημένου επιπέδου βλαβών στα MCF-7 σε σχέση με τα υγιή, σε συνδυασμό με πειραματικά αποτελέσματα που υποδηλώνουν πως αυτό είναι ένα γενικό χαρακτηριστικό της ανάπτυξης του καρκίνου [75, 90, 92-95], θα μπορούσε να καταστήσει τη γ-H2AX ως σημαντικό δείκτη για τον έλεγχο πρώιμου καρκίνου σε ανθρώπινες βιοψίες. Επίσης, η εκτίμηση της εφαρμοζόμενης δόσης μέσω της ποσοτικοποίησης των εστιών γ-H2AX στους πυρήνες των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος και δεδομένου ότι μεγάλος αριθμός κυττάρων μπορεί να ληφθεί σε μικρό χρονικό διάστημα πριν ή μετά από μία ακτινοθεραπεία, καθιστά σημαντική τη χρήση της γ-Η2ΑΧ ως βιοδοσίμετρο.

Τέλος, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως με την πραγματοποίηση της σειράς πειραμάτων για την παρούσα διπλωματική, καθορίστηκε το πρωτόκολλο της μεθόδου γ-H2AX στο εργαστήριο Υγειοφυσικής του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος», ώστε να είναι διαθέσιμο για τη διεξαγωγή πειραμάτων και από άλλες ερευνητικές ομάδες, καθώς και το ότι έγινε μια πρώτη προσπάθεια αυτοματοποίησης της μεθόδου με το λογισμικό Jcount.

Βιβλιογραφιά

- 1. Hatzi, V.I., D.A. Laskaratou *, I.V. Mavragani *, A.G. Georgakilas et al., *Non-targeted radiation effects in vivo: A critical glance of the future in radiobiology.* Cancer Letters, 2013. **in press**.
- 2. Laskaratou *, D.A., I.V. Mavragani *, and A.G. Georgakilas, *Inflammatory Pathways of Radiation-Induced Tissue Injury*, in *Cancer and Inflammation Mechanisms*, Y. Hiraku, S. Kawanishi, and H. Oshima, Editors. 2014, John Wiley & Sons, Inc. p. 249-269.
- 3. Slack, J.M.W., et al., *Chapter 7 Molecular Biology of the Cell*, in *Principles of Tissue Engineering (Fourth Edition)*. 2014, Academic Press: Boston. p. 127-145.
- 4. Alberts, B., et al., *Molecular Biology of The Cell*. Fourth ed. 2002, New York: Garland Science.
- 5. Alberts, B., et al., *Essential cell biology, Second edition*. 2004: Garland Science.
- 6. Watson, J.D. and F.H.C. Crick, *Molecular Structure of Nucleic Acids*. Nature, 1953. **171**: p. 737-738.
- 7. Franklin, R.E. and R.G. Gosling, *Evidence for 2-Chain Helix in Crystalline Structure of Sodium Deoxyribonucleate.* Nature, 1953. **172**: p. 156-157.
- 8. Wilkins, M.H.F., *The molecular configuration of nucleic acids*, in *Nobel Lecture*. 1962.
- 9. Cooper, G.M., *The Cell: A molecular approach*. 2nd edition ed. 2000: Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- 10. Johns, H.E. and J.R. Cunningham, *The physics of radiology*. Fourth edition ed. 1983: Charles C. Thomas.
- 11. Evans, R.D., *Compton Effect*, in *Corpuscles and Radiation in Matter II / Korpuskeln und Strahlung in Materie II*. 1958, Springer Berlin Heidelberg. p. 218-298.
- 12. Evans, R.D., The Atomic Nucleus. 1955, New York: McGraw Hill.
- 13. Elgazzar, A.H. and N. Kazem, *Biological Effects of Ionizing Radiation*. The Pathophysiologic Basis of Nuclear Medicine, 2006.
- 14. Pizzarello, D.J., *Radiation Biology*. CRP Press, Inc.Florida, 1982.
- 15. Prasad, N., Handbook of Radiobiology. CRC Press. Inc., 1984.
- 16. Κατσώρχης, Τ., Ειδικά θέματα βιολογίας, ed. Επτάλοφος. 1987. 177-185.
- 17. Μαργαρίτης, Ραδιοβιολογία, ed. Επτάλοφος. 1987.
- 18. Bergonié, J. and L. Tribondeau, Interpretation of Some Results of Radiotherapy and an Attempt at Determining a Logical Technique of Treatment / De Quelques Resultats de la Radiotherapie et Essai de Fixation d'une Technique Rationnelle. Rad Res, 1959. **11**(4): p. 587-588.
- 19. Lett, J.T., Damage to cellular DNA from particulate radiations, the efficacy of its processing and the radiosensitivity of mammalian cells. Emphasis on DNA double strand breaks and chromatin breaks. Radiat Environ Biophys, 1992. **31**(4): p. 257-277.
- 20. Steel, G.G., *Basic Clinical Radiobiology*, ed. E.A. Ltd. 2002.

- 21. Georgakilas, A.G., Oxidative stress, DNA damage and repair in carcinogenesis: Have we established a connection? Cancer Lett., 2012. In press: p. doi: 10.1016/j.canlet.2012.03.032.
- 22. Munro, T.R., *Alpha irradiation of parts of single cells in tissue cultures*. Experimental Cell Research, 1958. **15**(3): p. 529-536
- 23. Georgakilas, A.G., P. O'Neill, and R.D. Stewart, *Induction and repair of clustered DNA lesions: What do we know so far?* Rad Res, 2013. **180**(1): p. 100-109.
- 24. Hada, M. and A.G. Georgakilas, *Formation of clustered DNA Damage after high-LET irradiation: A review.* J. Radiat. Res., 2008. **49**: p. 203-210.
- 25. Shikazono, N., et al., *The Yield, Processing, and Biological Consequences of Clustered DNA Damage Induced by Ionizing Radiation.* J. Radiat. Res., 2009. **50**(1): p. 27-36.
- 26. Georgakilas, A.G., *Processing of DNA damage clusters in human cells: Current status of knowledge*. Mol. Biosyst., 2008. **4**: p. 30-35.
- 27. Sutherland, B., et al., *DNA damage clusters induced by ionizing radiation in isolated DNA and in human cells.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000. **97**: p. 103-108.
- 28. Nikjoo, H., et al., *Computational approach for determing the spectrum of DNA damage induced by ionizing radiation*. Radiat. Res., 2001. **156**: p. 577-583.
- 29. Takata, M., et al., Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. EMBO J, 1998. 17: p. 5497 5508.
- 30. Soni, A., et al., *Requirement for Parp-1 and DNA ligases 1 or 3 but not of Xrcc1 in chromosomal translocation formation by backup end joining.* Nucleic Acids Res., 2014.
- Ernst, M., M.E. Freed, and A.J. Zametkin, *Health hazards of radiation exposure in the context of brain imaging research: special consideration for children*. Journal of Nuclear Medicine : Official Publication, Society of Nuclear Medicine, 1998. 39(4): p. 689-698.
- 32. Terzoudi, G.I. and G.E. Pantelias, *Cytogenetic methods for biodosimetry and risk individualization after exposure to ionising radiation*. Radiation Protection Dosimetry, 2006. **122**: p. 513-20
- 33. Terzoudi, G.I., et al., *G2-checkpoint abrogation in irradiated lymphocytes: A new cytogenetic approach to assess individual radiosensitivity and predisposition to cancer.* International Journal of Oncology, 2009. **35**: p. 1223-30.
- 34. Harms-Ringdahl, M., P. Nicotera, and I.R. Radford, *Radiation induced apoptosis*. Mutation Research, 1996. **366**(2): p. 171-9.
- 35. Hendry, J.H. and C.M.L. West, *Apoptosis and mitotic cell death: their relative contributions to normal-tissue and tumor radiation response*. International Journal of Radiation Biology, 1997. **71**: p. 709-719.
- 36. Eriksson, D., et al., *Radiation induced cell deaths*. Targeted Radionuclide Tumor Therapy, 2008.
- 37. Majno, G. and I. Joris, *Apoptosis, oncosis and necrosis: An overview of cell death.* Am. J. Pathol., 1995. **146**: p. 3-15.
- 38. Dieriks, B., et al., Repeated exposure of human fibroblasts to ionizing radiation reveals an adaptive response that is not mediated by interleukin-6 or $TGF-\beta$. Mutat. Res., 2011. **715**(1â \in "2): p. 19-24.
- 39. Matsumoto, H., A. Takahashi, and T. Ohnishi, *Radiation-induced adaptive responses and bystander effects*. Biological Sciences in Space, 2004. **18**: p. 247-254.

- 40. Joiner, M.C., P. Lambin, and B. Marples, *Adaptive response and induced resistance*. Comptes Rendus de l Academie des Sciences Serie Iii, Sciences de la Vie, 1999. **322**(2-3): p. 167-75.
- 41. Wolff, S., *Aspects of the adaptive response to very low doses of radiation and other agents.* Mutation Research, 1996. **358**: p. 135-142.
- 42. Ikushima, T., H. Aritomi, and J. Morisita, *Radioadaptive response: efficient repair of radiation-induced DNA damage in adapted cells*. Mutation Research, 1996. **358**: p. 193-198.
- 43. Mitchel, R.E.J., *Mechanisms of the adaptive response in irradiated mammalian cells.* Radiation Research, 1994. **141**: p. 117-118.
- 44. Shadley, J.D., V. Afzal, and S. Wolff, *Characterization of the adaptive response to ionizing radiation induced by low doses to X-rays to human lymphocytes.* Radiation Research, 1987. **111**: p. 511-517.
- 45. Morgan, W.F., et al., *Genomic instability induced by ionizing radiation*. Rad. Res., 1996. **146**: p. 247-258.
- 46. Suzuki, K., et al., Epigenetic Gene Silencing is a Novel Mechanism Involved in Delayed Manifestation of Radiation-Induced Genomic Instability in Mammalian Cells. Radiat. Res., 2011. **175**(4): p. 416-423.
- 47. Negrini, S., V.G. Gorgoulis, and T.D. Halazonetis, *Genomic instability--an evolving hallmark of cancer*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2010. **11**(3): p. 220-228.
- 48. Martinez-Outschoorn, U.E., et al., Oxidative stress in cancer associated fibroblasts drives tumor-stroma co-evolution: A new paradigm for understanding tumor metabolism, the field effect and genomic instability in cancer cells. Cell Cycle., 2010.
 9: p. 3256-76.
- 49. Georgakilas, A.G., et al. *BRCA1* role in the repair of oxidative clustered DNA damage and chromosomal instability. in Proceedings of the 56th Annual Meeting of the Radiation Research Society. 2010. September 25–29, 2010, Maui, Hawaii, USA: RRS.
- 50. Limoli, C.L., et al., *Persistent, oxidative stress in chromosomally unstable cells.* Cancer Res., 2003. **63**: p. 3107-3111.
- 51. Slane, B.G., et al., Mutation of succinate dehydrogenase subunit C results in increased O2•-, oxidative stress, and genomic instability. Cancer Res., 2006. **66**: p. 7615-7620.
- 52. Mothersill, C. and C. Seymour, *Actions of radiation on living cells in the "post-bystander" era.* Cancer: Cell Structures, Carcinogens and Genomic Instability, 2006: p. 159-177.
- 53. Little, J.B., et al., *Involvement of the nonhomologous end joining DNA repair pathway in the bystander effect for chromosomal aberrations*. Radiat. Res., 2003. **159**: p. 262-267.
- 54. Lorimore, S.A., et al., *Chromosomal instability in unirradiated hemaopoietic cells induced by macrophages exposed in vivo to ionizing radiation*. Cancer Res, 2008. **68**(19): p. 8122-6.
- 55. Morgan, W.F., et al., *Bystander effects in radiation-induced genomic instability*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2002. **504**(1-2): p. 91-100.
- 56. Koturbash, I., et al., *In vivo bystander effect: Cranial X-irradiation leads to elevated DNA damage, altered cellular proliferation and apoptosis, and increased p53 levels in shielded spleen.* Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 2008. **70** p. 554-562.

- 57. Azzam, E.I., et al., Intercellular communication is involved in the bystander regulation of gene expression in human cells exposed to very low fluences of alpha particles [see comments]. Radiation Research, 1998. **150**(5): p. 497-504.
- 58. Zhou, H., et al., *Mechanism of radiation-induced bystander effect: role of the cyclooxygenase-2 signaling pathway.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(41): p. 14641-6.
- 59. Sokolov, M.V., et al., γ -H2AX in bystander cells: not just a radiation-triggered event, a cellular response to stress mediated by intercellular communication. Cell Cycle, 2007. **6**: p. 2210-2212.
- 60. Nagasawa, H., et al., *Involvement of membrane signaling in the bystander effect in irradiated cells*. Cancer Res, 2002. **62**: p. 2531 2534.
- 61. Gerashchenko, B.I. and R.W. Howell, *Cell proximity is a prerequisite for the proliferative response of bystander cells co-cultured with cells irradiated with gamma-rays.* Cytometry, 2003. **56**: p. 71 80.
- 62. Mothersill, C., R.J. Seymour, and C.B. Seymour, *Increased radiosensitivity in cells of two human cell lines treated with bystander medium from irradiated repair deficient cells.* Radiat Res, 2006. **165**: p. 26 34.
- 63. Mothersill, C., et al., *Communication of radiation-induced stress or bystander signals between fish in vivo*. Environ Sci Technol, 2006. **40**(21): p. 6859-6864.
- 64. Singh, H., et al., *Radiation induced bystander effects in mice given low doses of radiation in vivo.* Dose-Response, 2011. **9**(2): p. 225-242.
- 65. Cohen, B.L., *The cancer risk from low-level radiation*. Radiation Dose from Adult and Pediatric Multidetector Computed Tomography, 2007.
- 66. UNSCEAR, Hereditary Effects of Ionizing Radiation. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation Report to the General Assembly with Scientific Annexes. United Nations, New York, NY., 2001.
- 67. Rubio, C.A. and M. Jalnäs, *Dose-time-dependent histological changes following irradiation of the small intestine of rats.* Digestive Diseases and Science, 1996. **41**: p. 392-401.
- 68. Baverstock, K. and A.V. Karotki, *Towards a unifying theory of late stochastic effects of ionizing radiation*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2011. **718**(1-2): p. 1-9.
- 69. Alpen, E.L., *Chapter 12 Stochastic Effects Radiation Carcinogenesis*, in *Radiation Biophysics (Second Edition)*. 1998, Academic Press: San Diego. p. 308-343.
- 70. ICRP, *Publication 103: Recommendations of the ICRP. Annals of the ICRP Volume* 37/2-4. International Commission on Radiological Protection, 2008.
- 71. Lobrich, M., et al., *In vivo formation and repair of DNA double-strand breaks after computed tomography examinations.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2005. **102**: p. 8984-8989.
- 72. Bonner WM, R.C., Dickey JS, Nakamura AJ, Sedelnikova OA, Solier S, Pommier Y., *GammaH2AX and cancer*. Nature Reviews Cancer, 2008. **8**(12): p. 957-67.
- 73. Rogakou, E.P., et al., *Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo.* J. Cell Biol., 1999. **146**(5): p. 905-916.
- 74. Fernandez-Capetillo, O., A. Celeste, and A. Nussenzweig, *Focusing on foci: H2AX and the recruitment of DNA-damage response factors.* Cell Cycle, 2003. **2**: p. 426-426.
- 75. Sedelnikova, O.A. and W.M. Bonner, *GammaH2AX in cancer cells: a potential biomarker for cancer diagnostics, prediction and recurrence.* Cell Cycle, 2006. 5: p. 231-240.

- 76. Kuo, L.J. and L.-X. Yang, *γ*-*H*2*AX A novel biomarker for DNA double-strand breaks*. In Vivo, 2008. **22**(3): p. 305-309.
- 77. Rothkamm, K., et al., *Leukocyte DNA damage after multi-detector row CT: a quantitative biomarker of low-level radiation exposure.* Radiology, 2007. **242**(1): p. 244-251.
- 78. Foster, E.R. and J.A. Downs, *Histone H2A phosphorylation in DNA double-strand break repair*. FEBS J 2005. **272**: p. 3231-3240.
- 79. Rogakou, E.P., et al., *DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139.* J. Biol. Chem., 1998. **273**: p. 5858-5868.
- 80. Leatherbarrow, E.L., et al., *Induction and quantification of gamma-H2AX foci following low and high LET-irradiation.* Int. J. Radiat. Biol., 2006. **82**: p. 111-118.
- 81. Burma, S., et al., *ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA doublestrand breaks.* J. Biol. Chem., 2001. **276**: p. 42462-42467.
- 82. Durocher, D. and S.P. Jackson, *DNA-PK*, *ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme?* Current Opinion in Cell Biology, 2001. **13**(2): p. 225-231.
- 83. Lowndes, N.F. and G.W.-L. Toh, DNA Repair: The Importance of *Phosphorylating Histone H2AX*. Current Biology, 2005. **15**(3): p. R99-R102.
- 84. Rothkamm, K. and M. Lobrich, *Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses.* Proc Natl Acad Sci USA, 2003. **100**: p. 5057 5062.
- Sak, A. and M. Stuschke, Use of γH2AX and other biomarkers of double-strand breaks during radiotherapy. Seminars in Radiation Oncology, 2010. 20(4): p. 223-231.
- 86. Collins, A.R., *The Comet assay for DNA damage and repair: Principles, applications and limitations (Review)*. Molecular Biotechnology, 2004. **26**: p. 249-261.
- Ismail, I.H., T.I. Wadhra, and O. Hammarsten, An optimized method for detecting gamma-H2AX in blood cells reveals a significant interindividual variation in the gamma-H2AX response among humans. Nucleic Acids Research, 2007. 35(5): p. e36.
- 88. Banáth, J.P. and P.L. Olive, *Expression of phosphorylated histone H2AX as a surrogate of cell killing by drugs that create DNA double-strand breaks.* Cancer Research, 2003. **63**(15): p. 4347-4350.
- 89. Rogakou, E.V., et al., *Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX Histone at Serine* 139. J. Biol. Chem., 2000. **275**: p. 9390-9395.
- 90. Banáth, J.P., S.H. Macphail, and P.L. Olive, *Radiation sensitivity*, H2AX phosphorylation, and kinetics of repair of DNA strand breaks in irradiated cervical cancer cell lines. Cancer Res, 2004. **64**(19): p. 7144-9.
- 91. Macphail, S.H., et al., *Expression of phosphorylated histone H2AX in cultured cell lines following exposure to X-rays.* International Journal of Radiation Biology, 2003. **79**(5): p. 351-359.
- 92. Yu, T., et al., Endogenous expression of phosphorylated histone H2AX in tumors in relation to DNA double-strand breaks and genomic instability. DNA Repair, 2006.
 5: p. 935-946.
- 93. Warters, R.L., et al., *Melanoma cells express elevated levels of phosphorylated histone* H2AX *foci.* J Invest Dermatol, 2005. **124**: p. 807-817.
- 94. Bartkova, J., et al., *DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis.* Nature, 2005. **434**(7035): p. 864-870.

- 95. Gorgoulis, V.G., et al., *Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions.* Nature, 2005. **434**(7035): p. 907-913.
- 96. Risques, R.A., et al., *Ulcerative colitis is a disease of accelerated colon aging: evidence from telomere attrition and DNA damage.* Gastroenterology 2008. **135**: p. 410-418.
- 97. Dickey, J.S., et al., *H2AX: functional roles and potential applications.* Chromosoma, 2009. **118**(6): p. 683-692.
- 98. Podhorecka, M., A. Skladanowski, and P. Bozko, *H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy.* Journal of Nucleic Acids, 2010. **2010**.
- 99. Olive, P.L. and J.P. Banath, *Phosphorylation of histone H2AX as a measure of radiosensitivity*. International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics, 2004. **58**(2): p. 331-335.
- 100. Hamasaki, K., et al., *Short-term culture and gammaH2AX flow cytometry determine differences in individual radiosensitivity in human peripheral T lymphocytes.* Environ Mol Mutagen, 2007. **48**: p. 38-47.
- 101. Taneja, N., et al., *Histone H2AX phosphorylation as a predictor of radiosensitivity and target for radiotherapy*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(3): p. 2273-2280.
- 102. Porcedda, P., et al., Impaired elimination of DNA double-strand break-containing lymphocytes in ataxia telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome. DNA Repair (Amst), 2006. 5: p. 904-913.
- 103. Porcedda, P., et al., *Two-tier analysis of histone H2AX phosphorylation allows the identification of Ataxia Telangiectasia heterozygotes.* Radiother Oncol 2009. **92**: p. 133-137.
- 104. Huang, X., et al., Assessment of histone H2AX phosphorylation induced by DNA topoisomerase I and II inhibitors topotecan and mitoxantrone and by the DNA cross-linking agent cisplatin. Cytometry Part A, 2004. **58A**(2): p. 99-110.
- 105. Marchetti, F., et al., *Candidate protein biodosimeters of human exposure to ionizing radiation*. Int J Radiat Biol 2006. **82**: p. 605-639.
- 106. Olive, P.L. and J.P. Banath, *Phosphorylation of histone H2AX as a measure of radiosensitivity*. Int. J. Radiat. Biol. Oncol. Phys., 2004. **58**: p. 331-335.
- 107. Pantelias, G.E. and G.I. Terzoudi, A standardized G2-assay for the prediction of individual radiosensitivity. Radiother. Oncol., 2011: p. doi: 10.1016/j.randoc.2011.09.021
- 108. Perez, C.A., et al., *Principles and practice of radiation oncology*. 2004, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- 109. Roch-Lefèvre, S., et al., Quantification of γ-H2AX foci in human lymphocytes: A method for biological dosimetry after ionizing radiation exposure. Rad Res, 2010. 174(2): p. 185-194.
- 110. Sedelnikova, O.A., et al., *Histone H2AX in DNA damage and repair*. Cancer Biol Ther, 2003. **2**(3): p. 233-235.
- 111. Soule, H.D., et al., *A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma*. Journal of the National Cancer Institute, 1973. **51**(5): p. 1409-1416.
- 112. Redon, C.E., et al., *γ*-*H*2*AX as a biomarker of DNA damage induced by ionizing radiation in human peripheral blood lymphocytes and artificial skin.* Advances in Space Research, 2009. **43**(8): p. 1171-1178.
- 113. Redon, C.E., et al., *The use of gamma-H2AX as a biodosimeter for total-body radiation exposure in non-human primates.* PLoS ONE, 2010. **5**(11): p. 1-8.

114. Ivashkevich, A.N., et al., γH2AX foci as a measure of DNA damage: A computational approach to automatic analysis. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2011. **711**(1-2): p. 49-60.

Ιφιγένεια Β. Μαυραγάνη

© 2014- All rights reserved