



ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ
ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ Χ ΣΕ ΙΣΤΟΥΣ ΕΚΤΟΣ
ΤΟΥ ΠΕΔΙΟΥ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΣΗΣ (abscopal effect)

ΠΟΛΛΑΚΗΣ Χ. ΓΕΡΑΣΙΜΟΣ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή: Επ. Καθ Α Γεωργακίλας (Επιβλέπων)

Διευθ.-Καθ. Β.Γοργούλης

Καθ. Ρ. Βλαστού

Σε όσους ήταν δίπλα μου
σε κάθε δυσκολία

Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια υπάρχουν αρκετές ενδείξεις ότι οι ιοντίζουσες ακτινοβολίες επιφέρουν συνέπειες όχι μόνο στα κύτταρα και τους ιστούς που ακτινοβολούνται, αλλά και εκτός του πεδίου ακτινοβολήσεως. Οι συνέπειες της ιοντίζουσας ακτινοβολίας σε μη ακτινοβολημένα κύτταρα είτε στη γειτονιά των ακτινοβολημένων κυττάρων είτε σε απομακρυσμένες περιοχές ονομάζονται bystander και distant ή abscopal effects αντίστοιχα. Οι μηχανισμοί που ευθύνονται για τα φαινόμενα αυτά δεν είναι ακόμη γνωστοί αλλά φαίνεται ότι εμπλέκεται η απελευθέρωση διάφορων παραγόντων όπως κυτοκίνες. Με στόχο να εξεταστούν οι μηχανισμοί που ευθύνονται για το abscopal effect των ιοντίζουσών ακτινοβολιών εξετάστηκαν οι συνέπειες της ακτινοβολήσεως στο έντερο ποντικών που ακτινοβολήθηκαν στο πόδι με ακτίνες-χ 10 Gy και 40 Gy. Εφαρμόζοντας ανοσοϊστοχημεία σε παγωμένους ιστούς βρήκαμε σημαντικά αυξημένα επίπεδα 8-οξογουανίνης (8-oxoG), μάρτυρας οξειδωτικού στρες τόσο στα ακτινοβολημένα με 10 Gy όσο και με 40 Gy ποντίκια σε σχέση με μη ακτινοβολημένα. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα της 8-oxoG στα στρωματικά κύτταρα ήταν 3 και 3,7 φορές και στα επιθηλιακά κύτταρα 7 και 6,4 φορές αυξημένα στα 40 Gy και 10Gy αντίστοιχα σε σχέση με τα μη ακτινοβολημένα. Επίσης, στα ακτινοβολημένα με 10 Gy ποντίκια βρέθηκαν σημαντικά μειωμένα τα επίπεδα της Ki67, μείωση ακόμα πιο εμφανής στα 40 Gy, 2,5 φορές χαμηλότερα, σε σύγκριση με τα μη ακτινοβολημένα. Αυτό υποδεικνύει αυξημένες βλάβες στα κύτταρα που οδηγούν στην αναστολή του κυτταρικού τους κύκλου. Προκαταρκτικά αποτελέσματα δείχνουν αυξημένα επίπεδα κυτταρικής γήρανσης στα εντερικά κύτταρα των ακτινοβολημένων ποντικών. Οι ακτινοβολήσεις και η απομόνωση των ιστών έγιναν στην επιταχυντική διάταξη Australian Synchrotron IMBL του Peter McCallum Institute στο πανεπιστήμιο της Μελβούρνης και στάλθηκαν παγωμένοι στο τμήμα Ιστολογίας-Εμβρυολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ όπου εκτελέστηκαν τα πειράματα.

Abstract

During the last years there is a growing body of evidence showing that the effects of ionizing radiation (IR), are not restricted to the irradiated cells, but are also extended out of field. The consequences of IR in non-irradiated cells in the vicinity to directly irradiated ones as well as at distant sites is called bystander and distant or abscopal effect of IR respectively. The underlying mechanisms are still obscure although the release of soluble factors including cytokines is implicated in the effect of IR distantly. In order to interrogate the molecular mechanisms taking place in distant effect, we examined the impact of leg-irradiated treated mice with X-rays with 10Gy and 40Gy on their intestines. By employing immunohistochemistry (IHC) in frozen sections we found significantly increased levels of 8-oxoguanine (8-oxoG), a marker of oxidative stress, in both 10 Gy and 40 Gy irradiated mice in comparison with untreated mice. Specifically, 8-oxoG levels in stroma cells were 3 and 3,7 times and in epithelial cells 7 and 6,4 times elevated in 40Gy and 10Gy respectively in relation to non-irradiated mice. Of note, mice irradiated with 10Gy exhibited markedly reduced Ki67 levels which was further attenuated in mice treated with 40Gy, 2,5 times elevated, versus controls, implying increased cellular damage which leads to cell cycle arrest. Preliminary results reveal the elevated levels of senescence in IR treated mice. Our analysis provides evidence showing that IR fuels an “oxiredox” overload at distant sites with an impact on cell kinetics.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου, Α. Γεωργακίλα που με εμπιστεύτηκε, μου ανέθεσε τη συγκεκριμένη εργασία και με έφερε σε επαφή με πολύ αξιόλογους ανθρώπους ανοίγοντάς μου γέφυρες. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα καθώς με στήριξε κάθε φορά που το χρειάστηκα και όχι μόνο στα θέματα της διπλωματικής μου. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Διευθυντή-Καθηγητή Β. Γοργούλη, ο οποίος με δέχτηκε στο εργαστήριό του και διαμόρφωσε όλες τις προϋποθέσεις ώστε να μπορέσω να ολοκληρώσω τη συγκεκριμένη έρευνα. Ένα απλό ευχαριστήσω δεν αρκεί για τον Ι. Πατέρα, ο οποίος αφιέρωσε πολύ από τον πολύτιμο χρόνο του στο να με κατευθύνει, να με βοηθάει και να απαντάει πάντα με ψυχραιμία στις αλλεπάλληλες και συνεχείς ερωτήσεις μου. Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω θερμά τον Πλάτωνα Σελεμενάκη, την Δέσποινα Μωυσίδου και τους υπόλοιπους συνεργάτες του εργαστήριου οι οποίοι δημιούργησαν ένα ζεστό κλίμα στο εργαστήριο και με βοήθησαν να εξοικειωθώ με τις διάφορες τεχνικές.

Περιεχόμενα

.....	1
1 Εισαγωγικές Έννοιες.....	12
1.1 Ιοντίζουσες Ακτινοβολίες.....	12
1.1.1 Αλληλεπίδραση ιοντίζουσας ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη.	12
1.1.2 Φωτοηλεκτρικό Φαινόμενο	13
1.1.3 Φαινόμενο Compton.....	13
1.1.4 Δίδυμη Γένεση	14
1.2 Στοιχεία Κυτταρικής Βιολογίας	16
1.2.1 Γενετικό Υλικό.....	16
1.2.2 Κυτταρικός Κύκλος.....	17
1.2.3 Αναστολή Κυτταρικού Κύκλου	17
1.3 Λεπτό έντερο ποντικού.....	19
2 Συνέπειες Ιοντίζουσών Ακτινοβολιών στην έμβια ύλη	20
2.1 Μηχανισμοί αλληλεπίδρασης ιοντίζουσας ακτινοβολίας με τη βιολογική ύλη	20
2.2 Βλάβες στο γενετικό υλικό DNA.....	22
2.2.1 Ομαδοποιημένες – Σύνθετες Ομαδοποιημένες Βλάβες DNA	24
2.3 Απόκριση στις βλάβες του DNA. DNA Damage Response (DDR)	25
2.4 Απόπτωση	29
2.5 Κυτταρική Γήρανση.....	30
2.6 Νέκρωση – Φλεγμονή.....	30
3 Μη στοχευμένες επιδράσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας (Non-targeted effects, NTE)	31
3.1 Παρακείμενα αποτελέσματα ιοντίζουσας ακτινοβολίας- Bystander effects of IR	31
3.2 Απομακρυσμένα αποτελέσματα ιοντίζουσας ακτινοβολίας (Abscopal effects of IR).....	32

3.3	Οξειδωτικό στρες και ο ρόλος του στην μη στοχευμένη επίδραση	33
4	Μέθοδος εξέτασης ιστών, υλικά και εκτέλεση πειράματος.....	35
4.1	Ανοσοϊστοχημεία.....	35
4.2	Αντιγόνα-Αντισώματα	35
4.3	Πειραματόζωα.....	38
4.4	Ακτινοβολήση	38
4.5	Απομόνωση – Φύλαξη Ιστών	41
4.6	Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για 8-οξογουανίνη σε παγωμένους ιστούς	41
4.7	Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για Ki-67 σε παγωμένους ιστούς	42
4.8	Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για p-65 σε παγωμένους ιστούς.....	43
4.9	Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για Caspase-3 σε παγωμένους ιστούς	43
4.10	Πρωτόκολλο Sudan Black B σε παγωμένους ιστούς	44
5	Αποτελέσματα.....	46
5.1	Οξειδωτικό Στρες- Βλάβες DNA 8-οξογουανίνη	46
5.1.1	Στρωματικά κύτταρα λεπτού εντέρου - 8-οξογουανίνη	48
5.1.2	Επιθηλιακά κύτταρα λεπτού εντέρου - 8-οξογουανίνη	50
5.2	Κυτταρικός Πολλαπλασιασμός- Ki-67	52
5.3	Σε εξέλιξη: Εξέταση εμφάνισης πρόωρης γήρανσης, απόπτωσης, και ύπαρξης φλεγμονικών παραγόντων	55
6	Συμπεράσματα - Σχολιασμός	59
6.1	Μελλοντικές κατευθύνσεις.....	61
	Βιβλιογραφία.....	62
	Παράρτημα.....	64

1 Εισαγωγικές Έννοιες

1.1 Ιοντίζουσες Ακτινοβολίες

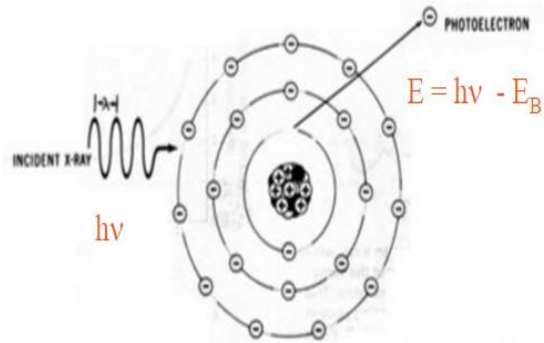
Ιοντίζουσα θεωρείται η ακτινοβολία που μεταφέρει τόση ενέργεια σε ένα άτομο της ύλης με την οποία αλληλεπιδρά ώστε να το ιονίσει, δηλαδή να απομακρύνει ένα δέσμιο ηλεκτρόνιο από το άτομο. Οι ιοντίζουσες ακτινοβολίες προέρχονται από το φυσικό περιβάλλον ή από τεχνητές πηγές. Και στις δύο περιπτώσεις, η πρωταρχική ακτινοβολία αποτελείται από φορτισμένα σωματίδια με μάζα, τα πρωτόνια και τα ηλεκτρόνια ή από ουδέτερα κβάντα ενέργειας χωρίς μάζα, τα φωτόνια και τα νετρίνα. Στην περίπτωση των φωτονίων μιλάμε για ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Από το φάσμα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, ιοντίζουσες θεωρούνται οι ακτίνες Χ, οι ακτίνες γ και η υψηλής ενέργειας υπεριώδης ακτινοβολία. Τα όρια μεταξύ ιοντίζουσας και μη ακτινοβολίας δεν είναι απόλυτα καθώς διαφορετικά άτομα ιονίζονται σε διαφορετικές ενέργειες.

1.1.1 Αλληλεπίδραση ιοντίζουσας ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη

Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία μεταφέρεται σε πακέτα ενέργειας, τα φωτόνια, η ενέργεια των οποίων δίνεται από την εξίσωση του Planck: $E=hf=\frac{hc}{\lambda}$, όπου h η σταθερά του Planck, f η συχνότητα του φωτονίου, λ το μήκος κύματος του φωτονίου και c η ταχύτητα του φωτός στο κενό. Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία αλληλεπιδρά με την ύλη με μια σειρά μηχανισμών, οι σημαντικότεροι εκ των οποίων είναι το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο, το φαινόμενο Compton και η δίδυμη γένεση.

1.1.2 Φωτοηλεκτρικό Φαινόμενο

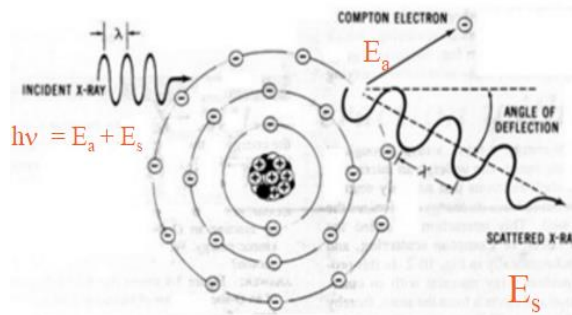
Το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο αναφέρεται στην εκπομπή ενός δέσμιου ηλεκτρονίου από τον εσωτερικό φλοιό ενός ατόμου. Αν E_n η ενέργεια σύνδεσης του ηλεκτρονίου με $n=K,L,M\dots$ και E η ενέργεια του εισερχόμενου φωτονίου, τότε η ενέργεια του ηλεκτρονίου που αποδεσμεύεται είναι $E_k=E-E_n$. Απαραίτητη προϋπόθεση για να συμβεί το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο, η ενέργεια του φωτονίου να είναι μεγαλύτερη της ενέργειας σύνδεσης του ηλεκτρονίου. Είναι ο κυρίαρχος μηχανισμός αλληλεπίδρασης με την ύλη για ακτινοβολίες ενέργειας μέχρι 50 KeV και εξαρτάται από τον ατομικό αριθμό του υλικού.



Εικόνα 1.1-1 Φωτοηλεκτρικό Φαινόμενο

1.1.3 Φαινόμενο Compton

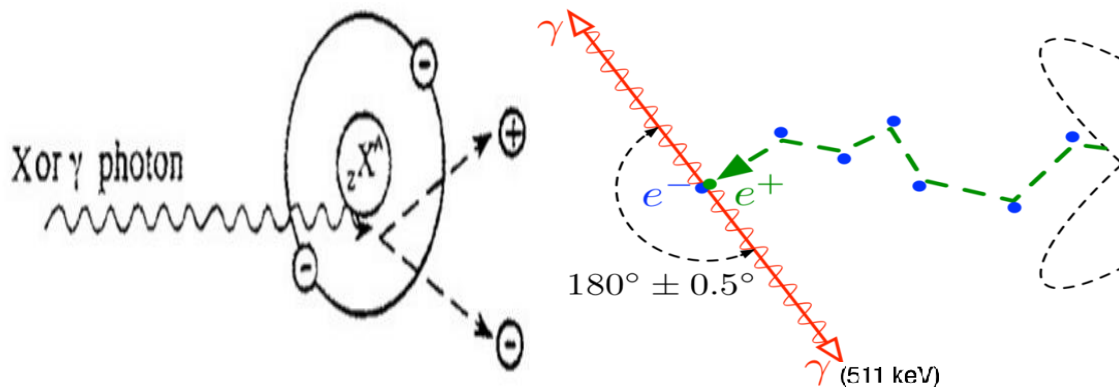
Το φαινόμενο Compton αναφέρεται στην ανελαστική αλληλεπίδραση μεταξύ ενός φωτονίου και ενός ελεύθερου ηλεκτρονίου ή ασθενώς δέσμιου ηλεκτρονίου και αφορά φωτόνια ενέργειας από 100 keV έως 10 MeV. Κατά την είσοδό του σε ένα υλικό, το φωτόνιο αλληλεπιδρά με ένα ελεύθερο ηλεκτρόνιο, του μεταφέρει μέρος της ενέργειάς του σκεδάζεται σε γωνία έως 180° και συνεχίζει μέχρι να συναντήσει άλλο ηλεκτρόνιο και να ξανασκεδαστεί ανελαστικά. Η διαδικασία αυτή συνεχίζεται έως ότου το φωτόνιο χάσει αρκετή ενέργεια ώστε να αλληλεπιδράσει με φωτοηλεκτρικό φαινόμενο και να εξαφανιστεί δίνοντας όλη του την ενέργεια σε δέσμιο ηλεκτρόνιο ή έως ότου εξέλθει από το υλικό.



Εικόνα 1.1-2 Φαινόμενο Compton

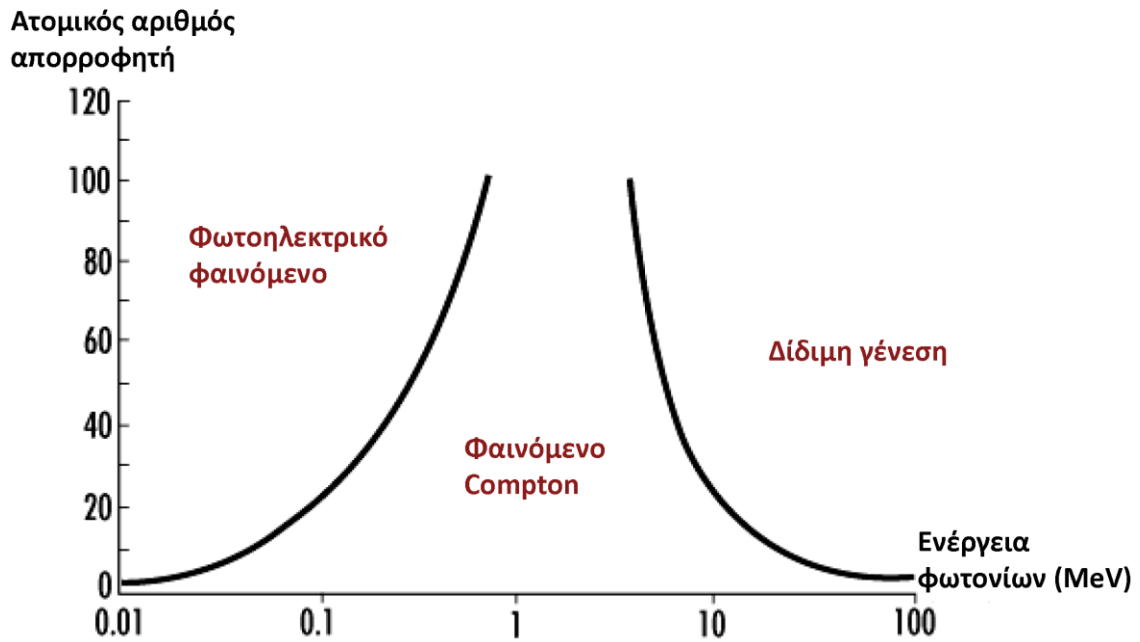
1.1.4 Δίδυμη Γένεση

Κατά τη δίδυμη γένεση ένα φωτόνιο μετατρέπεται σε ένα ηλεκτρόνιο και ένα ποζιτρόνιο. Απαραίτητες προϋποθέσεις για την πραγματοποίηση του φαινομένου αυτού είναι το φωτόνιο να έχει ενέργεια τουλάχιστον 1,022 MeV, δηλαδή τουλάχιστον ίση με τη μάζα ηρεμίας του ηλεκτρονίου συν αυτή του ποζιτρονίου που είναι 0,511 MeV και για τα δύο, όπως επίσης η ύπαρξη ισχυρού πεδίου Coulomb. Άρα η δίδυμη γένεση μπορεί αν συμβεί μόνο κοντά σε πυρήνα του υλικού στο οποίο κινείται το φωτόνιο. Το ποζιτρόνιο όταν συναντήσει ένα ηλεκτρόνιο εξαυλώνεται και παράγεται μια ακτίνα γ . Προϋπόθεση για να συμβεί ή εξαύλωση είναι να είναι ακίνητο το ποζιτρόνιο. Αυτό σημαίνει ότι για να εξαυλωθεί με ένα ηλεκτρόνιο θα πρέπει να διανύσει κάποια απόσταση, με σκεδάσεις να χάσει την αρχική του ενέργεια και στη συνέχεια να συμβεί η εξαύλωση.



Εικόνα 1.1-3 Φαινόμενο Δίδυμης Γένεσης (αριστερά). Εξαύλωση ποζιτρονίου (δεξιά)

Στο διάγραμμα που ακολουθεί φαίνονται οι ενεργειακές περιοχές όπου κυριαρχεί το κάθε φαινόμενο και η συσχέτιση με τον ατομικό αριθμό του απορροφητή. [1] [2] [3]



Διάγραμμα 1.1-1 Μηχανισμοί αλληλεπίδρασης με την ύλη σε σύγκριση με τον ατομικό αριθμό του υλικού και την ενέργεια των φωτονίων.

1.2 Στοιχεία Κυτταρικής Βιολογίας

Το κύτταρο αποτελεί τη βασική μονάδα οργάνωσης των ζώντων οργανισμών. Το κύτταρο είναι το μικρότερο και θεμελιώδες δομικό στοιχείο της έμβιας ύλης και αποτελείται από ένα σύστημα μορίων οργανωμένων σε δυναμική αλληλεπίδραση μεταξύ τους [4]. Όλα τα κύτταρα ενός οργανισμού έχουν την ίδια χημική σύσταση και ο παράγοντας που τα διαφοροποιεί είναι ο τρόπος έκφρασης του γενετικού τους υλικού. Μια ομάδα, όμοια διαφοροποιημένων κυττάρων ονομάζεται ιστός και αποτελεί τη δεύτερη βιολογική τάξη οργάνωσης ενός οργανισμού. Το κύτταρο έχει επίσης λειτουργικό, αναπαραγωγικό και κληρονομικό ρόλο [5]. Τα κύτταρα μπορούν να διακριθούν σε προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά ανάλογα με την ενδοκυτταρική τους δομή. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα υπάρχει συγκροτημένος πυρήνας που περιέχει το γενετικό υλικό, το DNA, δομή που απουσιάζει από τα προκαρυωτικά κύτταρα [6]. Βασική κυτταρική δομή των ευκαρυωτικών κυττάρων είναι τα μιτοχόνδρια. Αποτελούν σημαντική κυτταρική μονάδα καθώς λειτουργούν ως μονάδα παραγωγής ενέργειας για το κύτταρο και ευρύτερα για τον οργανισμό. Στα μιτοχόνδρια υπάρχει τμήμα του γενετικού υλικού του κυττάρου, το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA). Λόγω του μεγέθους του μιτοχονδρίου αλλά και της ελλιπούς του προστασίας είναι επιρρεπές σε βλάβες λόγω ιοντιζουσών ακτινοβολιών. Πιθανή βλάβη του mtDNA ή γενικότερα του μιτοχονδρίου μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές κυτταρικές βλάβες [7] [8].

1.2.1 Γενετικό Υλικό

Το γενετικό υλικό διακρίνεται στο δεσοξυριβοζονουκλεϊκό οξύ, DNA και το ριβοζονουκλεϊκό οξύ, RNA. Στο DNA είναι αποθηκευμένες σε μορφή γονιδίων όλες οι πληροφορίες που καθορίζουν τις λειτουργίες και την ανάπτυξη του κυττάρου. Στο RNA αποθηκεύονται προσωρινά πληροφορίες και διακρίνουμε τρεις μορφές RNA. Το μεταφορικό RNA (tRNA), που εμπλέκεται στη μεταφορά αμινοξέων κατά τη μετάφραση, το ριβοσωμικό RNA (rRNA), που εμπλέκεται στην πρωτεϊνοσύνθεση στα ριβοσώματα και το αγγελιαφόρο RNS (mRNA), που μεταφέρει πληροφορίες από τα γονίδια στα ριβοσώματα.

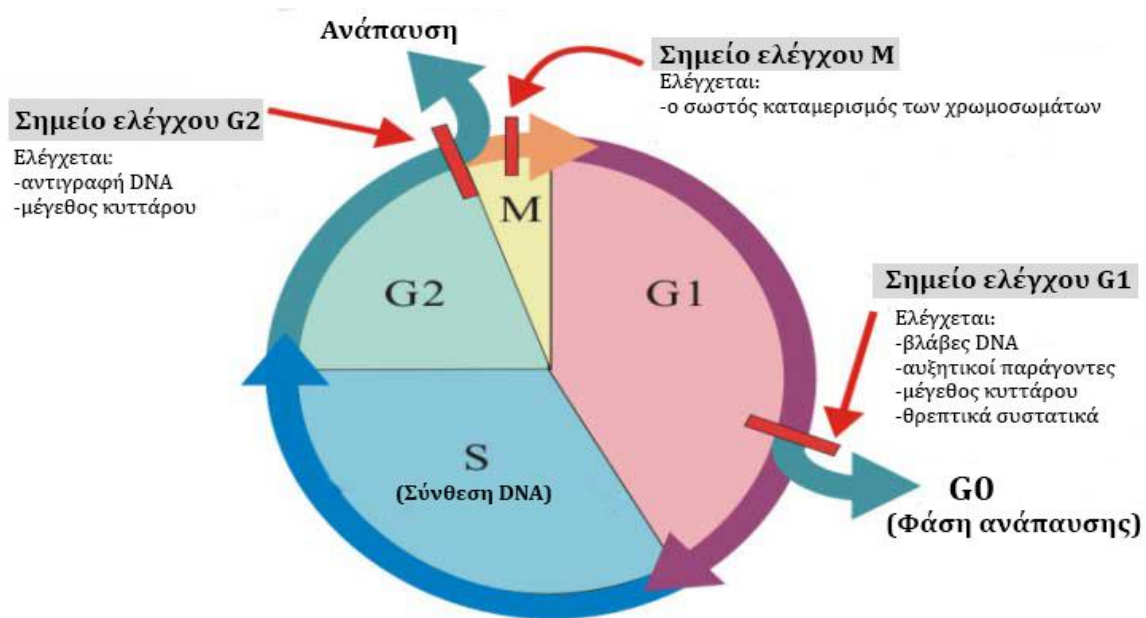
1.2.2 Κυτταρικός Κύκλος

Ο κύκλος της ζωής του κυττάρου ξεκινά από τη στιγμή της δημιουργίας του και ολοκληρώνεται με το διπλασιασμό του. Ο κυτταρικός κύκλος μπορεί να χωριστεί στη μεσόφαση και τη μίτωση ή μείωση στην περίπτωση των γαμετών. Στη μεσόφαση διακρίνουμε τις εξής φάσεις. Τη φάση G1, τη φάση S και τη φάση G2. Η φάση G1 μπορεί να χωριστεί στη φάση G1a και G1b. Κατά τη φάση G1a πραγματοποιείται η ανάπτυξη του κυττάρου και η πρωτεϊνοσύνθεση. Κατά τη φάση G1b εκτός της ανάπτυξης γίνεται η προετοιμασία του κυττάρου για την είσοδό του στη φάση S. Κατά τη φάση S (σύνθεση) γίνεται η αντιγραφή του γενετικού υλικού. Κατά τη φάση G2 γίνεται η προετοιμασία του κυττάρου για το διπλασιασμό του. Ακολουθεί η μίτωση (M) η οποία χωρίζεται στην πρόφαση, τη προμετάφαση, την ανάφαση και την τελόφαση. Κατά τη διάρκεια της μίτωσης το διπλασιασμένο γενετικό υλικό χωρίζεται σε δύο ίδιες ομάδες, διαιρείται ο πυρήνας όπως και το κυτταρόπλασμα και η κυτταρική μεμβράνη. Έτσι προκύπτουν δύο νέα κύτταρα. Κατά τη διάρκεια του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, δηλαδή στις φάσεις, G1b, S, G2 και M εκφράζεται η πρωτεΐνη Ki-67. Έτσι η ανίχνευσή της στο κύτταρο μαρτυρά ότι βρίσκεται σε φάση πολλαπλασιασμού [7] [9] [10].

1.2.3 Αναστολή Κυτταρικού Κύκλου

Τόσο η αντιγραφή του γενετικού υλικού όσο και η μίτωση του κυττάρου είναι πολυσύνθετες διαδικασίες όπου εμπλέκονται πολλοί μηχανισμοί και ως εκ τούτου είναι πιθανόν να προκύψουν σφάλματα. Επίσης σφάλματα στην αντιγραφή και τη μίτωση μπορεί να προκληθούν από εξωγενείς παράγοντες όπως οι ιοντίζουσες ακτινοβολίες ή το οξειδωτικό στρες. Σε περίπτωση που το κύτταρο μεταβεί σε επόμενη κυτταρική φάση χωρίς να πληρούνται οι κατάλληλες συνθήκες ή έχοντας βλάβες από την προηγούμενη φάση, μπορεί να επιβαρυνθεί με καινούργιες βλάβες στο DNA του, να υπάρξει γονιδιωματική αστάθεια ή ακόμα και να προκληθεί κυτταρικός θάνατος. Για το λόγο αυτό ένα σύνολο πρωτεϊνών και σηματοδοτικών μονοπατιών ελέγχουν σε συγκεκριμένα σημεία του κυτταρικού κύκλου αν υπάρχουν οι σωστές συνθήκες. Τέτοια σημεία ελέγχου υπάρχουν

στο τέλος της φάσης G1b, στο τέλος της φάσης G2 και στη φάση M. Στη φάση G1 γίνεται έλεγχος βλαβών του DNA, ελέγχονται οι αυξητικοί παράγοντες, το μέγεθος του κυττάρου και τα θρεπτικά συστατικά. Σημαντικός είναι ο ρόλος της πρωτεΐνης p53 η οποία σε περίπτωση ύπαρξης βλαβών του DNA μπλοκάρει τη μετάβαση του κυττάρου στη φάση S. Στη φάση G2 ελέγχεται το μέγεθος του κυττάρου και η αντιγραφή του DNA που πραγματοποιήθηκε στη φάση S και τέλος στη φάση M ελέγχεται ο καταμερισμός των χρωμοσωμάτων μέσω του συμπλέγματος MPF (Mitosis Promoting Factor) που αποτελείται από την κυκλίνη B και την κινάση CDK1. Στην περίπτωση που ανιχνευθούν βλάβες μπλοκάρεται ο κυτταρικός κύκλος έως ότου διορθωθούν οι βλάβες. Αν η επιδιόρθωση των βλαβών δεν είναι εφικτή τότε το κύτταρο οδηγείται είτε σε απόπτωση είτε σε πρόωρη γήρανση. [6] [7]

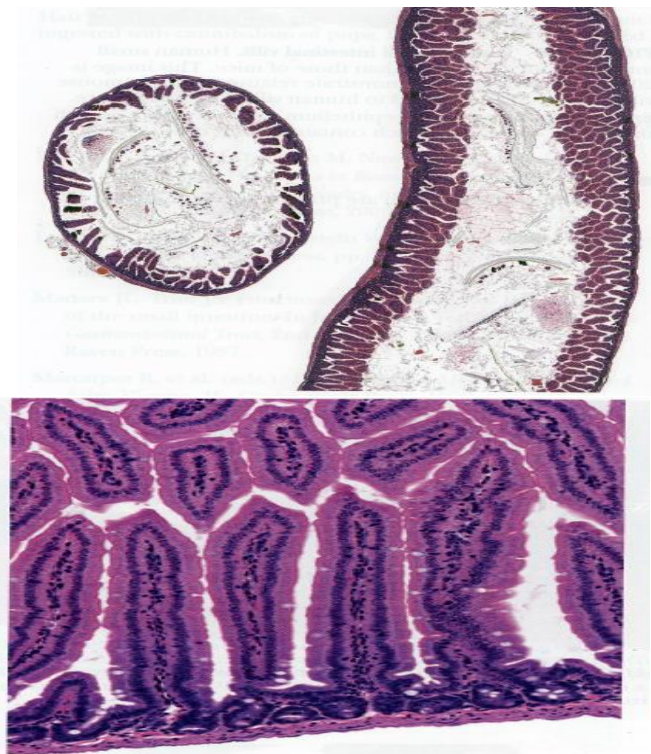


Εικόνα 1.2-1 Κυτταρικός κύκλος και σημεία ελέγχου

1.3 Λεπτό έντερο ποντικού

Το λεπτό έντερο αποτελεί τμήμα του πεπτικού συστήματος. Οι βασικές λειτουργίες του είναι η συνέχιση της πέψης που ξεκίνησε το στόμαχο και η απορρόφηση η απορρόφηση των τροφών που υπέστησαν πέψη από τα ένζυμα του εντερικού βλεννογόνου και του παγκρέατος. Το τοίχωμα του λεπτού εντέρου αποτελείται από το βλεννογόνο, τον υποβλεννογόνο, το μυϊκό και το περιτόναιο. Το συνολικό εμβαδόν του βλεννογόνου αυξάνει σημαντικά, κάτι που αντανακλά την απορροφητική λειτουργία του εντέρου. Η αύξηση της επιφάνειας του βλεννογόνου γίνεται με κάποιους βαθμούς αναδίπλωσης. Αυτοί είναι οι κυκλοτερείς πτυχές, οι εντερικές λάχνες, οι εντερικοί αδένες ή κρύπτες.

Ο εντερικός βλεννογόνος επενδύεται με μονόστιβο κυλινδρικό επιθήλιο. Στην Εικόνα 1.3-1 παρουσιάζεται τομή του λεπτού εντέρου ποντικού όπου διακρίνονται ο αυλός και τμήματα του τοιχώματος του εντέρου. Επίσης στη μεγέθυνση φαίνονται τα επιθηλιακά κύτταρα του λεπτού εντέρου ποντικού. Στις κρύπτες βρίσκονται τα αρχέγονα κύτταρα. Τα εντερικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται χαμηλά στις λάχνες, ωριμάζουν ανεβαίνοντας κατά μήκος των λαχνών και αποπίπτουν [11] [12].



Εικόνα 1.3-1 Επάνω: Τομή λεπτού εντέρου ποντικού Κάτω: Μεγέθυνση του βλεννογόνου όπου διακρίνεται το μονόστιβο επιθήλιο και κύτταρα του χορίου (Treuting, P.M., Comparative anatomy and histology : a mouse and human atlas. 2012)

2 Συνέπειες Ιοντιζουσών Ακτινοβολιών στην έμβια ύλη

Οι ιοντιζουσες ακτινοβολίες αλληλεπιδρούν με την έμβια ύλη με διάφορους μηχανισμούς, προκαλώντας αλλαγές σε διάφορα μόρια του κυττάρου, αλλάζοντας τις βιοχημικές τους ιδιότητες. Το σημαντικότερο μακρομόριο που μπορεί να υποστεί αλλοιώσεις είναι το DNA του κυττάρου. Βλάβες στο μόριο του DNA ενεργοποιεί διάφορους μηχανισμούς επιδιόρθωσης και ανάλογα με το μέγεθος και το είδος της βλάβης, το κύτταρο μπορεί να οδηγηθεί στο θάνατο είτε να προκύψει γονιδιωματική αστάθεια και πιθανόν καρκινογένεση.

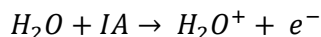
2.1 Μηχανισμοί αλληλεπίδρασης ιοντιζουσας ακτινοβολίας με τη βιολογική ύλη

Η αλληλεπίδραση ιοντιζουσών ακτινοβολιών με την βιολογική ύλη επάγει μια σειρά φαινομένων. Τα στάδια της αλληλεπίδρασης της ακτινοβολίας με την βιολογική ύλη είναι το φυσικό, το χημικό και το βιολογικό στάδιο. Το φυσικό στάδιο της αλληλεπίδρασης έχει διάρκεια της τάξης των fssec και αφορά στους μηχανισμούς με τους οποίους εναποτίθεται η ενέργεια στα άτομα της ύλης και προκαλείται η διέγερση και ο ιονισμός τους. Οι μηχανισμοί αυτοί αναλύθηκαν στο κεφάλαιο 1. [13]

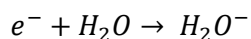
Οι ιοντισμοί που προκλήθηκαν κατά το φυσικό στάδιο είναι πιθανό να προκαλέσουν ρήξη χημικών δεσμών και δημιουργία ελεύθερων ριζών. Ελεύθερες ρίζες ονομάζουμε μόρια που φέρουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Μπορεί να είναι ανόργανα ή οργανικά μόρια και συμβολίζονται με * ή R* στην περίπτωση των οργανικών ελεύθερων ριζών. Είναι μεν ηλεκτρικά ουδέτερες αλλά είναι πολύ δραστικές γιατί έχουν ισχυρή τάση να συζευχθούν με κάποιο άλλο άτομο ή μόριο ώστε να πάψουν να έχουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Έτσι, ένα βιολογικό μακρομόριο μπορεί να σπάξει σε μικρότερα μακρομόρια με διαφορετικές βιοχημικές ιδιότητες ή να δημιουργηθεί μια ελεύθερη οργανική ρίζα R* ή οποία μετά από ένωση με κάποια άλλη οργανική ή μη ρίζα, θα δημιουργήσει ένα νέο μακρομόριο με

καινούργιες βιοχημικές ιδιότητες. Αυτές είναι οι άμεσες συνέπειες τις ιοντίζουσας ακτινοβολίας σε βιολογικά μόρια.

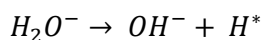
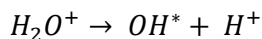
Οι έμμεσες συνέπειες της ιοντίζουσας ακτινοβολίας (ΙΑ) αφορούν σε μηχανισμούς που συνδέονται με τη ραδιόλυση του νερού. Δεδομένου ότι το νερό αποτελεί το 75% του οργανισμού, ένα σημαντικό μέρος της ενέργειας της ακτινοβολίας εναποτίθεται σε μόρια νερού και συμβαίνει η παρακάτω αντίδραση.



Το ηλεκτρόνιο μπορεί να συλληφθεί από ένα μόριο νερού:

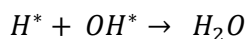
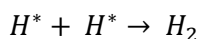


Τα ιόντα του νερού διασπώνται προς σχηματισμό ελεύθερων ριζών:

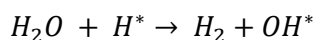


Οι ελεύθερες αυτές ρίζες λόγω της δραστηρότητάς έχουν ένα χρόνο ζωής της τάξης των μς πριν αντιδράσουν με κάποιο από τους ακόλουθους μηχανισμούς.

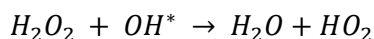
Είτε μεταξύ τους:



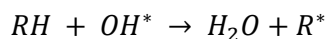
Είτε με μόρια νερού:



Είτε με κάποιο προϊόν:



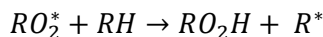
Είτε με κάποιο οργανικό μόριο RH:



Το μοριακό οξυγόνο έχει χημική συγγένεια με τις ελεύθερες ρίζες και έτσι λαμβάνει χώρα και η αντίδραση



Η τελευταία ελεύθερη ρίζα μπορεί να αντιδράσει με κάποιο οργανικό μόριο ως εξής:



Δηλαδή η αντίδραση μιας ελεύθερης οργανικής ρίζας δημιουργεί μια καινούργια. Οι διεργασίες αυτές συμβαίνουν κατά το χημικό στάδιο και έχουν χρονική διάρκεια της τάξης των msec. [13] [2] [14]

Ακολουθεί το βιολογικό στάδιο της αλληλεπίδρασης το οποίο μπορεί να χωριστεί σε βιοχημικό, κυτταρικό και συστημικό επίπεδο. Στο βιοχημικό επίπεδο, που διαρκεί έως ώρες, προσβάλλονται βιομόρια των κυττάρων, αναμεσα τους βιομόρια πολύ σημαντικά για τη λειτουργία του κυττάρου, ενεργοποιούνται διαδικασίες αναγνώρισης και επιδιόρθωσης των βλαβών και παρατηρείται αναστολή της πρωτεϊνσύνθεσης λόγω της δράσης ενζύμων. Σε κυτταρικό επίπεδο παρατηρούνται φαινόμενα που μπορεί να διαρκέσουν από ώρες έως και μήνες όπως αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και βλάβες σε ιστούς. Βλάβες που δεν επιδιορθώνονται μπορεί να οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο ή μεταλλάξεις. Έτσι, μπορεί να προκληθούν βλάβες σε συστημικό επίπεδο όπως φλεγμονικές αντιδράσεις, ανοσολογικές αποκρίσεις, ορμονικές διαταραχές, καρκινογένεση ή και θάνατο του οργανισμού. [15] [3]

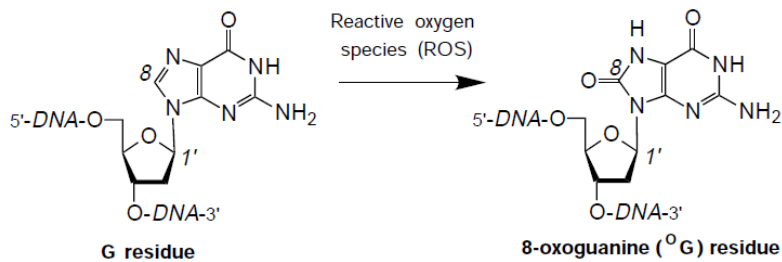
2.2 Βλάβες στο γενετικό υλικό DNA

Το σημαντικότερο μόριο του κυττάρου είναι το DNA καθώς είναι αυτό που περιέχει όλες τις πληροφορίες τόσο για τη λειτουργία όσο και τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου. Οι άμεσες αλλά κυρίως οι έμμεσες συνέπειες της ακτινοβολίας, δηλαδή η δημιουργία δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive oxygen species, ROS) προκαλούν διάφορα είδη φυσικοχημικών βλαβών στο DNA όπως:

- Σπάσιμο της μιας αλυσίδας του DNA (Single Strand Break, SSB)

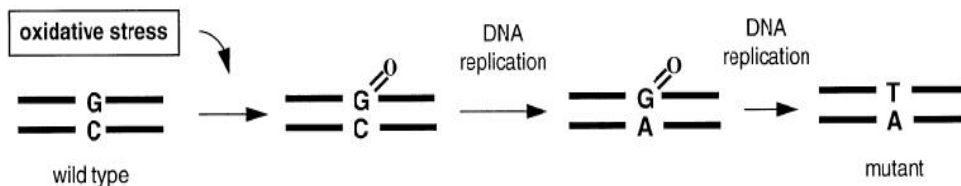
- Σπάσιμο της έλικας του DNA (Double Strand Break, DSB)
- Αλλοίωση βάσης όπως οξείδωση, απαμίνωση, αλκυλίωση ή μεθυλίωση
- Αντικατάσταση βάσης με κάποια άλλη
- Απώλεια βάσης και δημιουργία αβασικού σημείου.
- Εγκάρσιες διασυνδέσεις μεταξύ των κλώνων του DNA
- Σπάσιμο των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των αλυσίδων του DNA

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα μιας βλάβης τύπου αντικατάστασης βάσης είναι το εξής. Η βάση γουανίνη όταν αντιδράσει με μια ROS προκύπτει η 8-οξογουανίνη (G=O), όπως φαίνεται παρακάτω.



Εικόνα 2.2-1 Οξείδωση της γουανίνης σε 8-οξογουανίνη

Η G=O έχει διαφορετικές χημικές ιδιότητες από τη γουανίνη (G), δρα ανταγωνιστικά με τη θυμίνη (T) και ενώνεται με την αδενίνη (A). Έτσι κατά τη διαδικασία της αντιγραφής του DNA μπορεί να προκύψει αντικατάσταση της κυτοσίνης με την αδενίνη. Σε μια δεύτερη αντιγραφή η αδενίνη θα ενωθεί, όπως είναι φυσιολογικό με θυμίνη. Άρα η 8-οξογουανίνη προκαλεί μεγάλες αλλοιώσεις στο DNA αφού μετατρέπει το ζευγάρι G:C σε T:A φαίνεται σχηματικά στην εικόνα 2.2-2 [16] [17] [18].



Εικόνα 2.2-3 Μετατροπή του ζευγαριού G:C σε T:A (Serge Boiteux et al., 1998 [15])

2.2.1 Ομαδοποιημένες – Σύνθετες Ομαδοποιημένες Βλάβες DNA

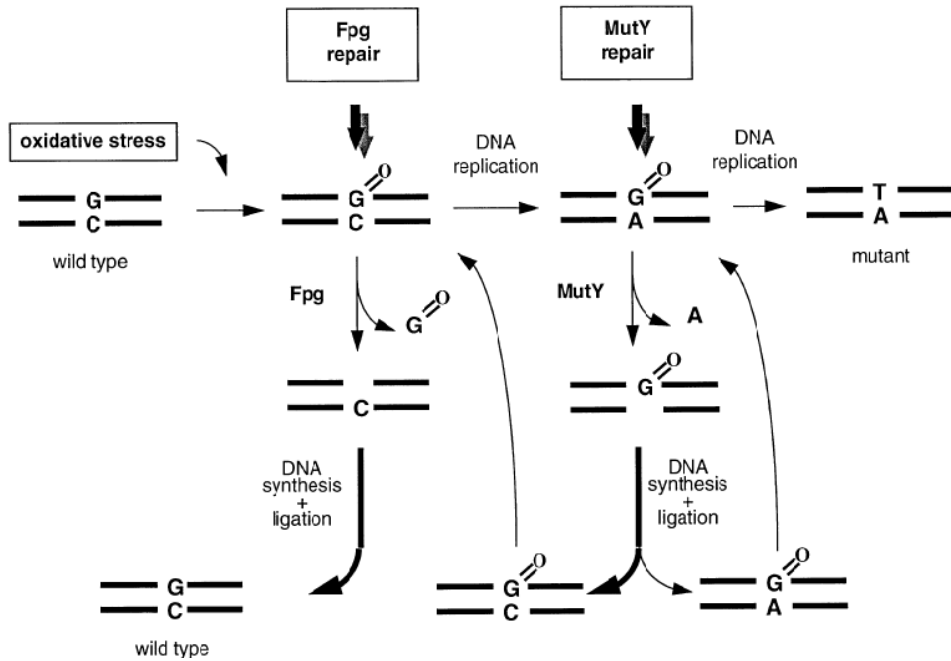
Με τον όρο ομαδοποιημένες βλάβες του DNA, clustered DNA lesions (CDLs) αναφερόμαστε στην ύπαρξη περισσότερων από μια βλάβες του DNA σε κοντινή απόσταση, δηλαδή μέσα σε απόσταση το πολύ 10 βάσεων. Στην περίπτωση που οι βλάβες αυτές είναι διαφορετικών τύπων βλάβες τότε τις ονομάζουμε σύνθετες ομαδοποιημένες βλάβες. Έχει παρατηρηθεί ότι οι συνέπειες των ομαδοποιημένων βλαβών είναι σαφώς σημαντικότερες από τις συνέπειες των ίδιων βλαβών αν αυτές ήταν διασκορπισμένες στο γονιδίωμα. Ο αριθμός των CDLs, ο τύπος τους, ο συνδυασμός τους και η εγγύτητά τους είναι παράγοντες που επηρεάζουν την δυνατότητα αλλά και την ταχύτητα επιδιόρθωσής τους [19]. Στην περίπτωση που οι CDLs βρίσκονται και στους δύο κλώνους του DNA στο ίδιο σημείο υπάρχει περίπτωση, αν δεν επιδιορθωθούν, να οδηγήσουν σε DSB, χρωμοσωμικές βλάβες και γονιδιωματική αστάθεια. Η δόση την ακτινοβολίας, η γεωμετρία της δέσμης και η ενέργειά της καθορίζουν τη χωρική αποθήκευση της ενέργειας και ως εκ τούτου την κατανομή των CDLs. Ο μέσος όρος των βλαβών σε κάθε CDL αυξάνει με την αύξηση της γραμμικής μεταφοράς ενέργειας (LET) και έτσι σε μεγάλη LET οι CDLs είναι πιο σύνθετες [20]. Ακτινοβολίες χαμηλού LET προκαλούν μεγαλύτερο αριθμό CDLs αλλά πιο απλών, μέσω των δευτερογενών ηλεκτρονίων που προκαλούν βλάβες σε εύρος δεκάδων nm [1]. Ένας ακόμη σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει το είδος και το πλήθος των βλαβών του DNA είναι η συγκέντρωση του οξυγόνου στο περιβάλλον του κυττάρου. Σε υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου το κλάσμα SSB/DSB μειώνεται ενώ ο αριθμός των βλαβών ανά CDL αυξάνει, δηλαδή οι CDLs γίνονται πιο σύνθετες [20]. Οι βλάβες που προκαλούνται λόγω των ιοντιζουσών ακτινοβολιών είναι κατά κύριο λόγο CDLs και σύνθετες. Έτσι, αν και οι βλάβες στο DNA λόγω των ακτινοβολιών είναι λιγότερες από τις βλάβες που προκαλούνται από άλλους παράγοντες, έχουν καθοριστική βιολογική σημασία και οδηγούν σε χρόνιες επιπτώσεις[19].

2.3 Απόκριση στις βλάβες του DNA. DNA Damage Response (DDR)

Η ύπαρξη βλαβών στο DNA ενεργοποιεί ένα μηχανισμό σηματοδότησης, το DNA Damage Response (DDR) ο οποίος ανάλογα με τη βαρύτητα και το είδος των βλαβών οδηγεί στην ενεργοποίηση κατάλληλων επιδιορθωτικών μηχανισμών με σκοπό την επιδιόρθωση των βλαβών και μπορεί να προκαλέσει αναστολή του κυτταρικού κύκλου. Η αναστολή του κυτταρικού κύκλου μπορεί να είναι προσωρινή, έως ότου επιδιορθωθούν οι βλάβες ή μόνιμη, οπότε το κύτταρο οδηγείται είτε σε πρόωρη γήρανση είτε σε απόπτωση. Ένα σύνολο πρωτεϊνών ενεργοποιούνται υπό την ύπαρξη συγκεκριμένων βλαβών και πυροδοτούν συγκεκριμένα σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία οδηγούν το κύτταρο σε κάποια από τις αναφερθείσες διαδικασίες. Τα μονοπάτια αυτά μπορεί να είναι αλληλεπικαλυπτόμενα. Στην εικόνα που ακολουθεί παρουσιάζεται ένας χάρτης των μονοπατιών του DDR.

Βλάβη του DNA ενεργοποιεί συγκεκριμένες πρωτεΐνες ανάλογα με το είδος της βλάβης. Οι πρωτεΐνες αυτές ενεργοποιούν συγκεκριμένες κινάσες οι οποίες με τη σειρά τους φωσφορυλιώνουν το υπόστρωμά τους ώστε να ενεργοποιηθεί ο κατάλληλος μηχανισμός επιδιόρθωσης του DNA ανάλογα με τη βλάβη. Κάθε μονοπάτι επιδιόρθωσης του DNA μπορεί να λειτουργεί είτε αυτόνομα είτε σε συνεργασία με άλλους μηχανισμούς επιδιόρθωσης, ανάλογα με την πολυπλοκότητα της βλάβης του DNA. Ο απαιτούμενος χρόνος για την επιδιόρθωση του DNA παρέχεται από διάφορους παράγοντες, όπως κινάσες και πρωτεΐνες, οι οποίοι αναστέλλουν τα σύμπλοκα των κυκλινών-CDK που είτε μειώνουν το ρυθμό είτε αναστέλλουν τη διαδικασία του κυτταρικού κύκλου. Σε περίπτωση που η βλάβη είναι εκτεταμένη ή δεν επιδιορθωθεί σωστά, το κύτταρο οδηγείται είτε σε απόπτωση είτε σε πρόωρη γήρανση. Σε αντίθετη περίπτωση μπορεί να υπάρξει γονιδιωματική αστάθεια και πιθανόν καρκινογένεση [21].

Ένα παράδειγμα μηχανισμού επιδιόρθωσης του DNA είναι το εξής. Στην περίπτωση ύπαρξης της 8-οξογουανίνης αντί της γουανίνης στο DNA ενεργοποιούνται οι πρωτεΐνες Fpg και MutY που είναι DNA γλυκοσυλάσες. Η Fpg ελευθερώνει τη G=O από το ζευγάρι G=O:C και μετά από τη σύνθεση DNA και την απολίπωση επανέρχεται στη σωστή μορφή G:C πριν την αντιγραφή του DNA. Στην περίπτωση που η βλάβη δεν διορθωθεί και προχωρήσει η αντιγραφή, η DNA πολυμεράση III θα αντιστοιχίσει απέναντι από την G=O, αδενίνη. Θα προκύψει δηλαδή το ζευγάρι G=O:A. Η πρωτεΐνη MutY θα πραγματοποιήσει εκτομή της αδενίνης στο ζευγάρι G=O:A και στη συνέχεια η DNA πολυμεράση I θα ενσωματώσει επιλεκτικά απέναντι από την G=O, κυτοσίνη δημιουργώντας ένα ζευγάρι G=O:C το οποίο επιδιορθώνεται από την Fpg. Η διαδικασία αυτή παρουσιάζεται σχηματικά στην εικόνα [18].

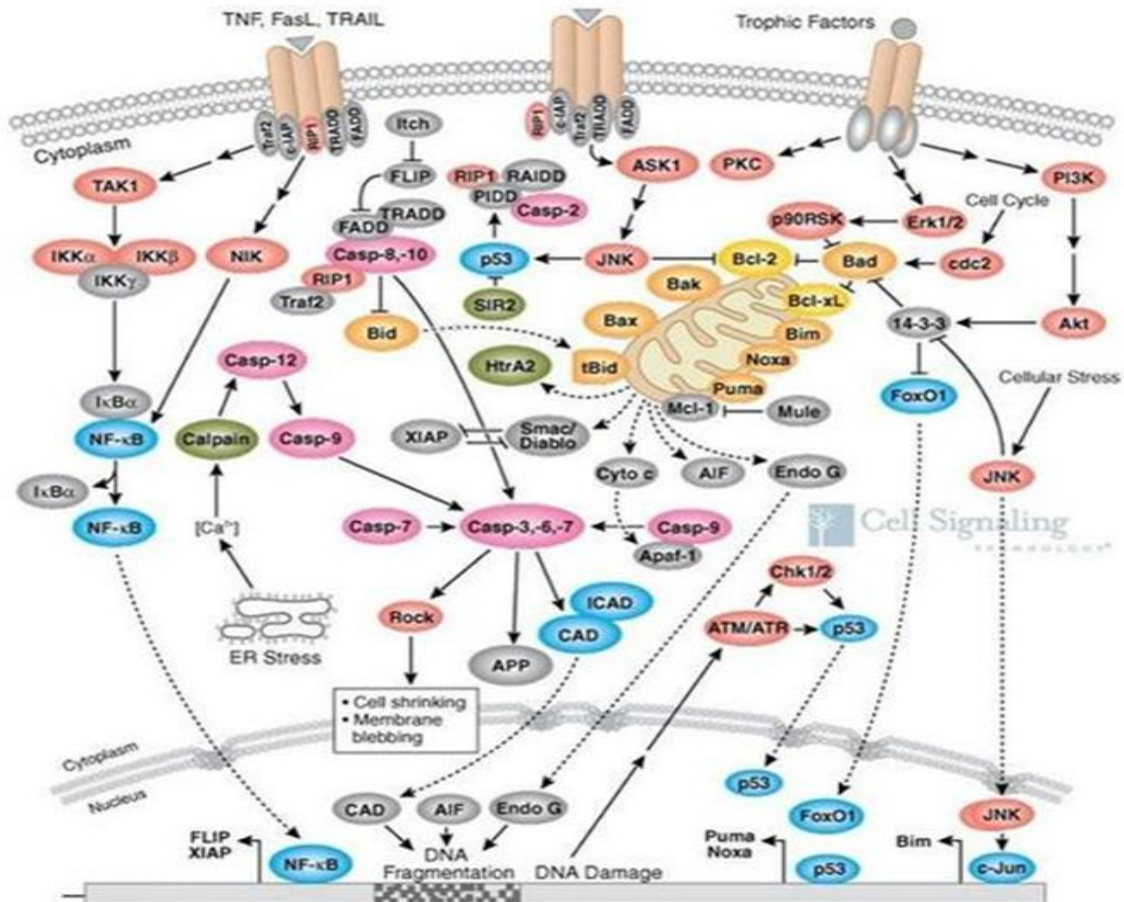


Εικόνα 2.33-2 Μηχανισμός επιδιόρθωσης λόγω ύπαρξης 8-οξογουανίνης στο DNA στην E.coli (Serge Boiteux et al., 1998 [15]).

Ο παραπάνω μηχανισμός αναφέρεται σε βακτήρια (E.coli). Ο μηχανισμός επιδιόρθωσης στον ανθρώπινο οργανισμό είναι ανάλογος. Αντίστοιχη της βακτηριακής Fpg στον άνθρωπο είναι η γλυκοσυλάση hOGG1 ενώ αντίστοιχη της MutY είναι η hNTH1. Οι πρώτες εξειδικεύονται κυρίως στις οξειδωμένες πουρίνες ενώ οι δεύτερες στις οξειδωμένες πυριμιδίνες [22].

2.4 Απόπτωση

Η απόπτωση αναφέρεται σε μία διαδικασία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Το κύτταρο, μετά από τη δράση αποπτωτικών σημάτων λόγω έκφρασης συγκεκριμένων πρωτεϊνών μπαίνει στη διαδικασία της απόπτωσης κατά την οποία το κύτταρο συρρικνώνεται, συρρικνώνεται η χρωματίνη και ο πυρήνας, η μιτοχονδριακή μεμβράνη διαρρηγνύεται και το κύτταρο αποδομείται σε αποπτωτικά σώματα τα οποία φαγοκυτταρώνονται. Η διαδικασία της απόπτωσης δεν προκαλεί φλεγμονή. Σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της απόπτωσης παίζουν οι κασπάσες η έκφραση των οποίων οδηγεί τελικά το κύτταρο στην απόπτωση.



Εικόνα 2.44-1 Αποπτωτικά Μονοπάτια (Cell Signaling Technology®)

2.5 Κυτταρική Γήρανση

Η κυτταρική γήρανση είναι μια κατάσταση μη αντιστρεπτής διακοπής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στην οποία το κύτταρο παραμένει μεταβολικά ενεργό. Έχουν αναφερθεί δύο είδη κυτταρικής γήρανσης. Η Αναδιπλασιαστική Γήρανση, Replicative Senescence (RS) και η Πρόωρη Γήρανση που επάγεται από στρεσογόνους παράγοντες, Stress Induced Premature Senescence (SIPS). Η πρώτη ενεργοποιείται από την διακοπή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μετά από έναν αριθμό διαιρέσεων λόγω των τελομερών φθοράς. Αντίθετα, η πρόωρη γήρανση λαμβάνει χώρα υπό διάφορες συνθήκες στρες και είναι ανεξάρτητη του μήκους των τελομερών. Στο εσωτερικό των λυσοσωμάτων των κυττάρων που δεν πολλαπλασιάζονται συσσωρεύεται λιποφουσκίνη, η οποία είναι ένα μη αποικοδομήσιμο συσσωμάτωμα οξειδωμένων πρωτεϊνών, λιπιδίων και μετάλλων. Η ύπαρξη λιποφουσκίνης είναι δείγμα πρόωρης γήρανσης του κυττάρου [23].

2.6 Νέκρωση – Φλεγμονή

Η νέκρωση είναι και αυτή μια διαδικασία πρόωρου κυτταρικού θανάτου. Η διαφορά με την απόπτωση έγκειται στο γεγονός ότι η νέκρωση δεν είναι μια ελεγχόμενη διαδικασία όπου ακολουθούνται συγκεκριμένα μονοπάτια και συγκεκριμένες διαδικασίες. Στη νέκρωση, λόγω του μεγέθους των βλαβών καταστρέφεται η ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης, εμπλέκονται συγκεκριμένοι υποδοχείς και απελευθερώνονται στο κύτταρο παράγοντες κυτταρικού θανάτου. Αυτό έχει σα συνέπεια τη ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης, και την απελευθέρωση στον εξωκυττάριο χώρο όλων των κυτταροπλασματικών ουσιών και δομών, πράγμα που οδηγεί σε φλεγμονή [1] [24].

3 Μη στοχευμένες επιδράσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας (Non-targeted effects, NTE)

Σήμερα έχουμε ένα πλήθος κλινικών και ερευνητικών παρατηρήσεων που υποδεικνύουν πως τα βιολογικά αποτελέσματα της ιοντίζουσας ακτινοβολίας δεν περιορίζονται μόνο στα ακτινοβολημένα κύτταρα αλλά επεκτείνονται και σε κύτταρα εκτός του πεδίου ακτινοβολήσης. Έτσι παρατηρούνται φαινόμενα όπως γονιδιωματική αστάθεια, ανταλλαγές αδερφών χρωματίδων, καρκινογένεση κ.α. σε κύτταρα που θεωρητικά δεν έχουν δεχθεί δόση. Επίσης, έχει παρατηρηθεί αύξηση της ακτινοπροστασίας και περιορισμός καρκινικών όγκων σε απομακρυσμένες θέσεις [25] [26, 27]. Μπορούμε να διακρίνουμε τις μη στοχευμένες επιδράσεις της ιοντίζουσας ακτινοβολίας σε παρακείμενα αποτελέσματα, bystander effects, και σε απομακρυσμένα, abscopal effects.

3.1 Παρακείμενα αποτελέσματα ιοντίζουσας ακτινοβολίας- Bystander effects of IR

Τα παρακείμενα αποτελέσματα της ιοντίζουσας ακτινοβολίας αναφέρονται σε συνέπειες που επάγονται σε κύτταρα που γειτονεύουν με τα κύτταρα που δέχτηκαν δόση ακτινοβολίας [26]. Η πρώτη τεκμηρίωση του φαινομένου έγινε με το πείραμα των Nagasawa και Little οι οποίοι ακτινοβόλησαν το 1% των κυττάρων μιας κυτταροκαλλιέργειας με σωματίδια-α και παρατήρησαν αυξημένο αριθμό ανταλλαγών αδερφών χρωματίδων στο 30% του κυτταρικού πληθυσμού της καλλιέργειας [28]. Σε άλλα πειράματα αποδείχθηκε ότι ακτινοβολημένα κύτταρα εκλύουν παράγοντες που προκαλούν αντιδράσεις στα γειτονικά, μη ακτινοβολημένα. Επίσης υπάρχει ένδειξη επικοινωνίας και επαγωγής γονιδιωματικής αστάθειας μεταξύ κυττάρων που εφάπτονται μέσω των χασμοσυνδέσεων της κυτταρικής μεμβράνης [29].

3.2 Απομακρυσμένα αποτελέσματα ιοντίζουσας ακτινοβολίας (Abscopal effects of IR)

Τα απομακρυσμένα αποτελέσματα της ιοντίζουσας ακτινοβολίας, *abscopal effects*, συνήθως σχετίζονται με κλινική έκθεση σε ακτινοβολία σε περιπτώσεις ακτινοθεραπείας. Σε μία ακτινοθεραπεία, ο όγκος δέχεται πολύ μεγάλες δόσεις ακτινοβολίας, της τάξης των δεκάδων Gy ενώ ο φυσιολογικός ιστός στο πεδίο της ακτινοβολίας δέχεται μεν μικρότερη αλλά αρκετά σημαντική δόση τάξης μερικών Gy [30]. Οι επιπτώσεις σε συστηματικό επίπεδο εξ αιτίας μιας τοπικής ακτινοβόλησης είναι καλά προσδιορισμένες και στην κλινική εφαρμογή παρατηρούνται φαινόμενα όπως ανορεξία, απώλεια βάρους και γενικευμένη κόπωση. Μια σπανιότερη επίδραση της θεραπείας με ακτινοβολία είναι η μείωση όγκων σε περιοχές μακριά από τον όγκο ακτινοβόλησης, επίδραση που περιγράφεται με τον όρο “*abscopal effect*”. Ο όρος “*abscopal*” εισήχθη από τον Mole το 1953 για να περιγράψει το φαινόμενο της υποχώρησης όγκου σε περιοχή σε απόσταση από την περιοχή ακτινοβόλησης [31]. Ο Parac πρότεινε ένα σύνολο μηχανισμών που θα μπορούσε να επηρεάσει την αυθόρμητη υποχώρηση των όγκων όπως το ανοσοποιητικό σύστημα, φυσικοί και ορμονικοί παράγοντες, νέκρωση όγκου και επιγενετικοί παράγοντες [32]. Παρά ταύτα, στην περίπτωση των *abscopal effects*, ο συγχρονισμός τους με την εφαρμογή μιας απομακρυσμένης ακτινοθεραπείας παρέχει μια ένδειξη για τον αιτιατό ρόλο της ακτινοβολίας στην επαγωγή φαινομένων όπως αυτό της οπισθοχώρησης ενός όγκου [33] [34]. Υπό άλλες προσεγγίσεις, οι παρατηρήσεις αυτές εντάσσονται αποκλειστικά στο πλαίσιο της ακτινοθεραπείας καθώς υποστηρίζουν ότι η ακτινοβολία δεν είναι απόλυτα στοχευμένη και υπάρχει διασπορά της δόσης σε όλο το σώμα [30]. Πάντως, υπάρχουν σήμερα αρκετά δεδομένα, εκτός της υποχώρησης όγκου που προαναφέρθηκε, που υποδεικνύουν την ύπαρξη του φαινομένου. Μερικά παραδείγματα είναι τα εξής. Το 1969 διαπιστώθηκε υποχώρηση της πλευρικής συλλογής υγρού στους πνεύμονες έπειτα από ακτινοβόληση για κακοήθες λέμφωμα στην κοιλιακή χώρα [35]. Σε άλλο πείραμα, η ακτινοβόληση σε πνεύμονα ποντικού προκάλεσε βλάβες στο DNA κυττάρων σε απομακρυσμένους ιστούς, ενώ η χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών περιόρισε το

φαινόμενο. Το πείραμα αυτό μάλιστα ανέδειξε το ρόλο των ελεύθερων ριζών οξυγόνου και αζώτου στην επαγωγή του φαινομένου [36].

3.3 Οξειδωτικό στρες και ο ρόλος του στην μη στοχευμένη επίδραση

Με τον όρο οξειδωτικό στρες αναφερόμαστε στην αυξημένη, σε σχέση με τα φυσιολογικά επίπεδα, συγκέντρωση δραστικών μορφών οξυγόνου, Reactive Oxygen Species (ROS) και δραστικών μορφών αζώτου, Reactive Nitrogen Species (RNS). Οξειδωτικό στρες προκαλείται από ανισορροπία δημιουργίας ROS - RNS από συγκεκριμένους παράγοντες και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών των κυττάρων. Οι παράγοντες αυτοί είναι είτε ενδογενείς είτε εξωγενείς. Στους ενδογενείς παράγοντες εντάσσονται κυτταρικές λειτουργίες όπως η κυτταρική ανάπτυξη, η μιτοχονδριακή λειτουργία, η ανοσολογική απόκριση, η αποπτωτική απόκριση και η φλεγμονώδης αντίδραση. Στους εξωγενείς παράγοντες εντάσσονται και οι ιοντίζουσες ακτινοβολίες η οποίες παράγουν ROS με τους μηχανισμούς που αναλύθηκαν στο κεφάλαιο 3. Οι ROS – RNS μπορούν να μεταφερθούν μέσω χασμοσυνδέσεων σε γειτονικά κύτταρα ή μέσω διάχυσης σε παρακείμενα κύτταρα. Αυτές οι δραστικές μορφές αντιδρούν πολύ εύκολα και έτσι έχουν πολύ μικρή εμβέλεια, της τάξης των nm, μέσα στον οργανισμό. Έτσι, μπορούν να επηρεάσουν μόνο γειτονικά κύτταρα και μοιάζει δύσκολο να επηρεάζουν κύτταρα σε απομακρυσμένες θέσεις. Το υπεροξειδίο το υδρογόνου, H_2O_2 , είναι η μόνη από αυτές τις ουσίες, που λόγω της χαμηλής δραστικότητας, του μπορεί να φθάσει σε απομακρυσμένες θέσεις. Το H_2O_2 δημιουργείται ως συνέπεια της ακτινοβολίας αλλά παράγεται και από ένζυμα [37].

Τα μακροφάγα φαίνεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στις μη στοχευμένες επιδράσεις της ακτινοβολίας. Τα κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβες λόγω της ακτινοβολίας εκλύουν κυτοκίνες που διαφοροποιούν μονοκύτταρα σε μακροφάγα και στη συνέχεια τα προσελκύουν μαζί με άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού [38]. Είναι πιθανό τα μακροφάγα αυτά και τα άλλα ανοσοκύτταρα να μπορούν, μέσω του κυκλοφορικού συστήματος, να

μεταναστεύσουν σε απομακρυσμένα σημεία και μέσω της έκλυσης ROS – RNS και κυτοκινών να προκαλούν οξειδωτικό στρες. Είναι επίσης πιθανό οι κυτοκίνες που εκλύονται σε ένα σημείο που φλεγμαίνει να μπορούν να μετακινηθούν σε απομακρυσμένες περιοχές και να προκαλέσουν εκεί φλεγμονώδη αντίδραση και οξειδωτικό στρες [39].

4 Μέθοδος εξέτασης ιστών, υλικά και εκτέλεση πειράματος

4.1 Ανοσοϊστοχημεία

Πρόκειται για μια ευρέως χρησιμοποιούμενη *in situ* τεχνική για διαγνωστικούς και ερευνητικούς σκοπούς. Ο Albert Coons με μια σειρά εργασιών κατά τη διάρκεια των δεκαετιών '50 και '60 έθεσε τα θεμέλια της ανοσοϊστοχημείας (Coons AH, 1951). Βασική αρχή της τεχνικής είναι η ανάδειξη συγκεκριμένων στοιχείων (πρωτεΐνες, νουκλεϊνικά οξέα, λιπίδια, κτλ) των κυττάρων και των ιστών, μετά από την σύνδεσή τους με ειδικά αντισώματα.

4.2 Αντιγόνα-Αντισώματα

Κάθε χημική ένωση που αναγνωρίζεται από ένα οργανισμό σαν “ξένη” προκαλεί ανοσολογική απόκριση και την παραγωγή αντισωμάτων. Τέτοιες ενώσεις ονομάζονται αντιγόνα. Τα αντιγόνα δηλαδή διαθέτουν δύο κύριες ιδιότητες, την ικανότητα έκλυσης ανοσολογικής απόκρισης και την αντίδραση με το προϊόν της ανοσολογικής απόκρισης, τα αντισώματα, με ειδικό τρόπο. Η επιφάνεια ενός αντιγόνου καλύπτεται από συγκεκριμένες δραστικές περιοχές (καθοριστικές ομάδες) οι οποίες κατευθύνουν τη σύνθεση των αντισωμάτων. Άρα για ένα μόνο αντιγόνο μπορεί να παραχθεί ένα σύνολο διαφορετικών αντισωμάτων που καθένα θα αναγνωρίζει μια διαφορετική καθοριστική ομάδα, ή αλλιώς ένα διαφορετικό επίτοπο. Κάθε οργανισμός έχει την ικανότητα να διακρίνει τα δικά του μόρια από εκείνα άλλων οργανισμών, τα οποία αναγνωρίζονται ως ξένα. Αν για παράδειγμα εισάγουμε μια ανθρώπινη πρωτεΐνη σε ποντικό, ο ποντικός θα την αναγνωρίσει σαν ξένη, η ανθρώπινη πρωτεΐνη θα λειτουργήσει σαν αντιγόνο μέσα στον οργανισμό του ποντικού και θα ακολουθήσει μια ανοσολογική απόκριση. Θα παραχθούν αντισώματα από τον ποντικό που θα αντιδράσουν ειδικά με την ανθρώπινη πρωτεΐνη.

Η Ανοσοϊστοχημεία εκμεταλλεύεται την υψηλής εξειδίκευσης αντίδραση μεταξύ αντιγόνου-αντισώματος (Coons et al., 1941). Η χρήση σημασμένων αντισωμάτων, είναι ο πυρήνας της τεχνικής για την ανάδειξη πχ. μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης στην τομή του ιστού που μας ενδιαφέρει. Τα αντισώματα παρασκευάζονται μετά από ανοσοποίηση ζώων (αρουραίοι, κουνέλια, κα) και μπορεί να είναι μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά. Τα πολυκλωνικά αντισώματα είναι το μίγμα των αντισωμάτων που παράγονται εναντίον των όλων των διαφορετικών επιτόπων του αντιγόνου. Αντίθετα τα μονοκλωνικά αντισώματα είναι ειδικά για ένα μόνο αντιγονικό επίτοπο. Τα μονοκλωνικά αντισώματα έχουν το πλεονέκτημα της απόλυτα ειδικής δέσμευσης με την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει, αντίθετα τα πολυκλωνικά μπορεί να ενισχύουν το αποτέλεσμα της δέσμευσης (ισχυρότερο σήμα κατά τη φάση της οπτικοποίησης του αποτελέσματος).

Το πρώτο βήμα λοιπόν της μεθόδου είναι η παραγωγή αντισωμάτων για το αντιγόνο που μας ενδιαφέρει. Στη συνέχεια οι τομές του ιστού που μελετάμε, επωάζονται με το αντίσωμα, το οποίο λέγεται πρωτογενές αντίσωμα. Πριν την επώαση έχει προηγηθεί επεξεργασία των τομών για την αποκάλυψη των αντιγονικών επιτόπων που μας ενδιαφέρουν (antigen retrieval). Κατά την επώαση του πρωτογενούς αντισώματος στις τομές, αυτό ενώνεται με το αντίστοιχο αντιγόνο. Στη συνέχεια πρέπει να γίνουν ορατές οι θέσεις στις οποίες είναι παρόν το σύμπλοκο αντιγόνου-αντισώματος. Αυτό επιτυγχάνεται με τις μεθόδους ανίχνευσης όπου μπορούμε να διακρίνουμε δύο κατηγορίες, τις έμμεσες και τις άμεσες μεθόδους ανίχνευσης.

Στις άμεσες, το πρωτογενές αντίσωμα σημαίνεται με έναν κατάλληλο δείκτη (φθορίζουσα ουσία, ένζυμο, σωματίδια χρυσού) και η τομή μπορεί κατόπιν να παρατηρηθεί σε φωτονικό, ηλεκτρονικό ή μικροσκόπιο φθορισμού και να αξιολογηθεί η παρουσία του αντιγόνου που μας ενδιαφέρει.

Από τις έμμεσες μεθόδους, οι πλέον χρησιμοποιούμενες είναι αυτή του ανοσο-συμπλέγματος υπεροξειδάσης-αντιυπεροξειδάσης (PAP method) και της ανοσοενζυμικής τεχνικής βιοτίνης-στρεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης (ABC).

Στη μέθοδο υπεροξειδάσης-αντιυπεροξειδάσης χρησιμοποιείται ένα δεύτερο αντίσωμα, το οποίο ονομάζεται δευτερογενές αντίσωμα. Το αντίσωμα αυτό προκύπτει με ανοσοποίηση

ενός οργανισμού διαφορετικού από αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή του πρώτου. Αν για παράδειγμα το πρωτογενές αντίσωμα παρήχθη σε αρουραίο, το δευτερογενές θα παραχθεί σε κουνέλι. Το δευτερογενές αντίσωμα εντοπίζει και συνδέεται με το πρωτογενές αντίσωμα ενώ φέρει ένα πολυμερές. Στη συνέχεια εφαρμόζεται στην τομή υπεροξειδάση η οποία ενώνεται με το πολυμερές που φέρει το δευτερογενές αντίσωμα. Στη μέθοδο της βιοτίνης-στρεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης ακολουθείται η ίδια διαδικασία με τη διαφορά ότι το δευτερογενές αντίσωμα είναι βιοτινυλιωμένο, φέρει δηλαδή τη βιταμίνη βιοτίνη. Στη συνέχεια εφαρμόζεται στην τομή ένα σύμπλεγμα υπεροξειδάσης-στρεπταβιδίνης. Η στρεπταβιδίνη είναι μια πρωτεΐνη βακτηριακής προέλευσης που αποτελείται από τέσσερις πανομοιότυπες υπομονάδες, η κάθε μία από τις οποίες φέρει θέση δέσμευσης για τη βιοτίνη.

Το οπτικό σήμα είναι συνέπεια της ιδιότητας της υπεροξειδάσης να μετατρέπει το υπεροξειδίο του υδρογόνου σε νερό και να οξειδώνει διάφορα χρωμογόνα σε μία χρωματισμένη μορφή. Από το σύνολο των διαθέσιμων χρωμογόνων, μόνο η διαμινοβενζιδίνη (DAB) σχηματίζει αδιάλυτο ίζημα το οποίο διατηρείται για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Η ειδικότητα της μεθόδου μπορεί να ελαττωθεί λόγω παραμέτρων όπως η ύπαρξη κοινής αλληλουχίας αμινοξέων μεταξύ του υπό μελέτη αντιγόνου και άλλων μορίων, η σύνδεση της Fc μοίρας του πρωτογενούς αντισώματος με υποδοχείς φαγοκυττάρων, μαστοκυττάρων ή συμπλήρωμα, καθώς και η επιμόλυνση του παρασκευάσματος του πρωτογενούς αντισώματος με άλλα αντισώματα. Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την ειδικότητα της ανοσοϊστοχημείας είναι η ύπαρξη ενδογενούς δραστηριότητας υπεροξειδάσης, η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων βιοτίνης. [40]

4.3 Πειραματόζωα

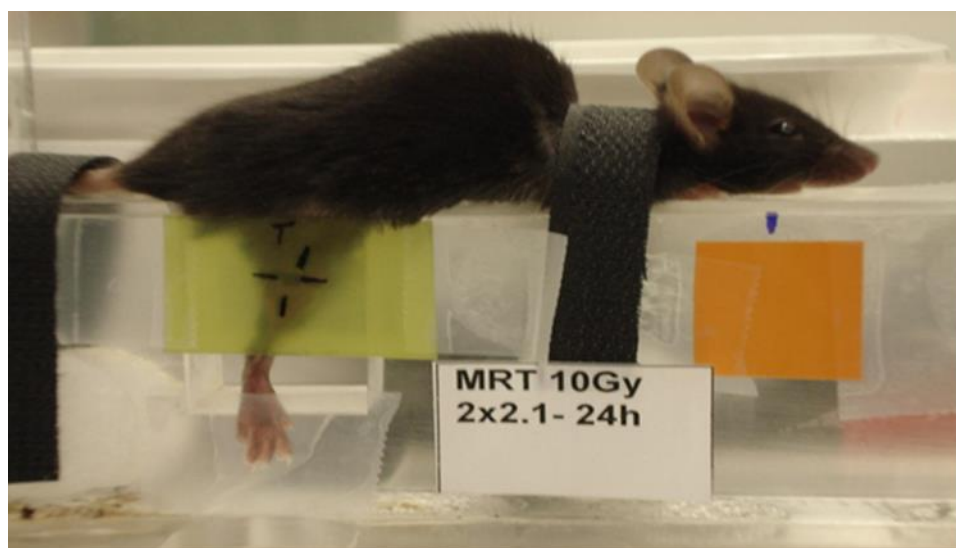
Στη συγκεκριμένη έρευνα χρησιμοποιήθηκαν υγιή ποντίκια του γένους C57BL/6. Πρόκειται για το πιο συνηθισμένο είδος ποντικού που χρησιμοποιείται για εργαστηριακά πειράματα. Αυτό γιατί χαρακτηρίζεται από ευρωστία και ευκολία στην αναπαραγωγή ενώ δεν είναι επιρρεπή στην ανάπτυξη όγκων.

4.4 Ακτινοβολήση

Η ακτινοβολήση έγινε στην επιταχυντική διάταξη Australian Synchrotron IMBL του Peter McCallum Institute στο πανεπιστήμιο της Μελβούρνης, το οποίο παράγει ακτίνες-χ ενέργειας 30 keV-120 keV. Τα δείγματα ακτινοβολήθηκαν με ρυθμό 49 Gy/sec με συνεχή ένταση 200mA. Τα χαρακτηριστικά αυτά και η υψηλής παραλληλότητας δέσμες που παράγει το συγκεκριμένο σύγχροτρο οδήγησαν στην ελαχιστοποίηση της διασποράς των φωτονίων. Τα ποντίκια τοποθετήθηκαν με τρόπο ώστε η δέσμη της ακτινοβολίας να κατευθύνεται μόνο στο πίσω δεξί πόδι και να μην διέρχεται από κανένα άλλο σημείο του σώματός τους. Για το έλεγχο της διασποράς αλλά και τη μέτρηση της απορρόφησης χρησιμοποιήθηκαν ειδικά ραδιοχρωμικά φιλμ τόσο στο σημείο της ακτινοβολήσης όσο και σε απομακρυσμένες περιοχές (Πίνακας 4.4-1).

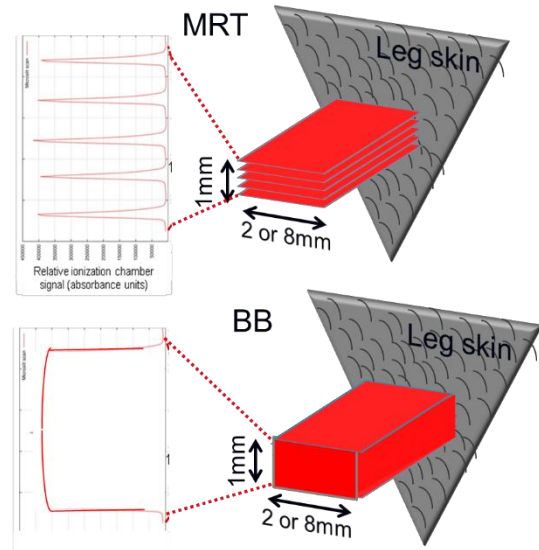
Πίνακας 4.4-1 Απορρόφηση και διασπορά ακτινοβολίας

Δείγματα	Απορρόφηση ακτινοβολίας (οπτική πυκνότητα)	Διασπορά στα 5 cm (mGy)	Διασπορά στο 1.5 cm (mGy)
BB 10Gy 2x2	0.0063		
BB 40Gy 2x2	0.0213		
BB 10Gy 8x8	0.0051		
BB 40Gy 8x8	0.0595	5.67	13.6
BB 10Gy 8x1	0.0208		
BB 40Gy 8x1	0.0362	2.68	



Εικόνα 4.4-1 Εικόνα από τη διαδικασία της ακτινοβόλησης όπου φαίνεται το σημείο ακτινοβόλησης και τα ραδιοχρωμικά φιλμ

Ο συνολικός αριθμός των ποντικών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 105. Χωρίστηκαν σε ομάδες των πέντε και η κάθε ομάδα ακτινοβολήθηκε με διαφορετικό συνδυασμό δόσης, διατομή ακτινοβολήσης, είδος δέσμη και θανατώθηκε σε διαφορετικό χρόνο μετά την ακτινοβολήση. Χρησιμοποιήθηκαν δόσεις των 10 Gy και 40 Gy, οι επιφάνειες ακτινοβολήσης ήταν 2x2mm, 8x8mm και 8x1mm, ο χρόνος θανάτωσης ήταν 24 και 96 ώρες μετά την ακτινοβολήση και χρησιμοποιήθηκε ευρεία δέσμη (Broad Beam) και ακτινοβολήση με μικροδέσμες (Microbeam Radiation Therapy, MRT). Το προφίλ της κάθε ακτινοβολίας φαίνεται στην Εικόνα 4.4-2. Επίσης, η μία ομάδα υποβλήθηκε σε όλη τη διαδικασία που υποβλήθηκαν όλες η ομάδες αλλά δεν ακτινοβολήθηκε ώστε τα ποντίκια της να χρησιμοποιηθούν σαν μάρτυρες (control). Όλοι οι συνδυασμοί φαίνονται στον Πίνακα 4.4-2.



Εικόνα 4.4-2 Πάνω: Γεωμετρία δέσμης MRT
Κάτω: Γεωμετρία Ευρείας Δέσμης BB

Πίνακας 4.4-2 Οι ομάδες των ποντικών που ακτινοβολήθηκαν με διαφορετική δόση, διαφορετική δέσμη, με διαφορετικό εμβαδόν ακτινοβολήσης και θανατώθηκαν σε διαφορετικούς χρόνους μετά την ακτινοβολήση

Ακτινοβολίες	Αριθμός ποντικών ανά ομάδα	Παρελθής χρόνος της ακτινοβολήσης	Δόσεις	Εμβαδόν ακτινοβολήσης	Αριθμός ποντικών
Broad Beam	5	24h,96h	10Gy, 40Gy	2x2mm ² , 8x8mm ² , 8x1mm ²	60
Microbeam Radiation Therapy	5	24h, 96h	10Gy, 40Gy	2x2mm ² , 8x8mm ²	40
Control	5	-	-	-	5
Συνολικός αριθμός ποντικών	-	-	-	-	105

4.5 Απομόνωση – Φύλαξη Ιστών

Μετά την ακτινοβολήση, και τη θανάτωση των ποντικών 24 ή 96 ώρες αντίστοιχα, απομονώθηκαν αίμα και ιστοί τόσο από το σημείο της ακτινοβολήσης όσο και από ιστούς από απομακρυσμένες περιοχές. Το αίμα, μετά από ειδική επεξεργασία και διαχωρισμό του πλάσματος αποθηκεύτηκε στους -80°C . Οι ιστοί τοποθετήθηκαν σε ένα ειδικό κρυοπροστατευτικό υλικό, το OCT και φυλάχθηκαν στους -80°C . Στη συνέχεια έγιναν σειριακές τομές πάχους $10\mu\text{m}$ οι οποίες τοποθετήθηκαν σε ειδικά πλακάκια ανοσοϊστοχημείας. Τα πλακάκια αφού αφέθηκαν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου για 20min, τυλίχθηκαν σε αλουμινόχαρτο και φυλάχθηκαν στους -80°C . Οι ιστοί μεταφέρθηκαν παγωμένοι από την Μεμβούρνη στο Τμήμα Ιστολογίας-Εμβρυολογίας της Ιατρικής σχολής ΕΚΠΑ, όπου εκτελέστηκαν τα πειράματα.



Εικόνα 4.5-1 Εντερικός ιστός σε OCT

4.6 Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για 8-οξογουανίνης σε παγωμένους ιστούς

Αφήνουμε τα πλακάκια για 20 λεπτά να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου και αφαιρούμε το αλουμινόχαρτο. Μονιμοποιούμε τους ιστούς με 2% παραφορμαλδεΰδη για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Εκτελούμε δυο πλύσεις με Phosphate buffered saline (PBS) για 5 λεπτά και εφαρμόζουμε αιθανόλη 70% θερμοκρασίας -20°C για 20 λεπτά στους 4°C . Εκτελούμε δυο πεντάλεπτες πλύσεις με PBS και τοποθετούμε στους ιστούς 3% H_2O_2 διαλυμένο σε PBS για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτεινό μέρος. Μετά από δύο πεντάλεπτες πλύσεις με PBS εκτελούμε μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης του πρωτογενούς αντισώματος με διάλυμα 8% BSA, 0,5% Tween-20, 0,1% Triton-X σε PBS για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από δυο πεντάλεπτες πλύσεις με PBS επωάζουμε την 8-οξογουανίνη συγκέντρωσης 1/750 διαλυμένη σε

διάλυμα 0,05% Tween-20, 0,01% Triton-X σε PBS ολονύχτια στους 4°C. Εκτελούμε δυο πεντάλεπτες πλύσεις με PBS και επωάζουμε το δευτερογενές αντίσωμα (Primary Antibody Enhancer) για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από δυο πεντάλεπτες πλύσεις με PBS εφαρμόζουμε horseradish peroxidase (HRP) για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτεινό μέρος. Ξεπλένουμε δυο φορές με PBS και εφαρμόζουμε στους ιστούς 1% DAB για ένα λεπτό. Ξεπλένουμε με νερό βρύσης τοποθετούμε τα πλακάκια σε αιματοξυλίνη έως ότου επιτευχθεί η επιθυμητή χρώση και ξεπλένουμε με τρεχούμενο νερό. Τοποθετούμε τα πλακάκια διαδοχικά σε 96% και 100% αιθανόλη για 10 λεπτά στην κάθε μια και έπειτα για τουλάχιστον 20 λεπτά σε ξυλόλη. Τέλος τοποθετούμε καλυπτρίδες στα πλακάκια.

4.7 Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για Ki-67 σε παγωμένους ιστούς

Αφήνουμε τα πλακάκια για 20 λεπτά να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου και αφαιρούμε το αλουμινόχαρτο. Μονιμοποιούμε τους ιστούς με 2% παραφορμαλδεΐδη για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Εκτελούμε δυο πλύσεις με Phosphate buffered saline (PBS) για 5 λεπτά και εφαρμόζουμε αιθανόλη 70% θερμοκρασίας -20 °C για 20 λεπτά στους 4°C. Εκτελούμε δυο πεντάλεπτες πλύσεις με PBS και τοποθετούμε στους ιστούς 3% H₂O₂ διαλυμένο σε PBS για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτεινό μέρος. Μετά από δύο πεντάλεπτες πλύσεις με PBS εκτελούμε μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης του πρωτογενούς αντισώματος με διάλυμα 8% BSA, 0,5% Tween-20, 0,1% Triton-X σε PBS για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από δυο πεντάλεπτες πλύσεις με PBS επωάζουμε την Ki-67 συγκέντρωσης 1/200 διαλυμένη σε διάλυμα 0,05% Tween-20, 0,01% Triton-X σε PBS ολονύχτια στους 4°C. Εκτελούμε δυο πεντάλεπτες πλύσεις με PBS και επωάζουμε το δευτερογενές αντίσωμα (Primary Antibody Enhancer) για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από δυο πεντάλεπτες πλύσεις με PBS εφαρμόζουμε horseradish peroxidase (HRP) για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτεινό μέρος. Ξεπλένουμε δυο φορές με PBS και εφαρμόζουμε στους ιστούς 1% DAB για ένα λεπτό. Ξεπλένουμε με νερό βρύσης τοποθετούμε τα πλακάκια σε αιματοξυλίνη έως ότου επιτευχθεί η επιθυμητή χρώση και ξεπλένουμε με τρεχούμενο νερό. Τοποθετούμε τα

πλακάκια διαδοχικά σε 96% και 100% αιθανόλη για 10 λεπτά στην κάθε μια και έπειτα για τουλάχιστον 20 λεπτά σε ξυλόλη. Τέλος τοποθετούμε καλυπτρίδες στα πλακάκια.

4.8 Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για p-65 σε παγωμένους ιστούς

Αφήνουμε τα πλακάκια για 20 λεπτά να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου και αφαιρούμε το αλουμινόχαρτο. Μονιμοποιούμε τους ιστούς με 2% παραφορμαλδεΐδη για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Εκτελούμε δυο πλύσεις με Phosphate buffered saline (PBS) για 5 λεπτά και εφαρμόζουμε αιθανόλη 70% θερμοκρασίας -20 °C για 20 λεπτά στους 4°C. Εκτελούμε δυο πεντάλεπτες πλύσεις με PBS και τοποθετούμε στους ιστούς 3% H₂O₂ διαλυμένο σε PBS για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτεινό μέρος. Μετά από δύο πεντάλεπτες πλύσεις με PBS εκτελούμε μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης του πρωτογενούς αντισώματος με Ultra V Block για 7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από δυο πεντάλεπτες πλύσεις με PBS επωάζουμε την p-65 συγκέντρωσης 1/150 διαλυμένη σε διάλυμα 0,05% Tween-20, 0,01% Triton-X σε PBS ολονύχτια στους 4°C. Εκτελούμε δυο πεντάλεπτες πλύσεις με PBS και επωάζουμε Antirabbit 1/200 σε PBS για μια ώρα στους 37°C. Μετά από δυο πεντάλεπτες πλύσεις με PBS εφαρμόζουμε HRP Streptavidin συγκέντρωσης 1/200 σε PBS για 30 λεπτά στους 37 °C. Ξεπλένουμε δυο φορές με PBS και εφαρμόζουμε στους ιστούς 1% DAB για ένα λεπτό. Ξεπλένουμε με νερό βρύσης τοποθετούμε τα πλακάκια σε αιματοξυλίνη έως ότου επιτευχθεί η επιθυμητή χρώση και ξεπλένουμε με τρεχούμενο νερό. Τοποθετούμε τα πλακάκια διαδοχικά σε 96% και 100% αιθανόλη για 10 λεπτά στην κάθε μια και έπειτα για τουλάχιστον 20 λεπτά σε ξυλόλη. Τέλος τοποθετούμε καλυπτρίδες στα πλακάκια.

4.9 Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για Caspase-3 σε παγωμένους ιστούς

Αφήνουμε τα πλακάκια για 20 λεπτά να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου και αφαιρούμε το αλουμινόχαρτο. Μονιμοποιούμε τους ιστούς με 2% παραφορμαλδεΐδη για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Εκτελούμε δυο πλύσεις με Phosphate buffered saline (PBS) για 5

λεπτά και εφαρμόζουμε αιθανόλη 70% θερμοκρασίας -20 °C για 20 λεπτά στους 4°C. Εκτελούμε δυο πεντάλεπτες πλύσεις με PBS και τοποθετούμε στους ιστούς 3% H₂O₂ διαλυμένο σε PBS για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτεινό μέρος. Μετά από δύο πεντάλεπτες πλύσεις με PBS εκτελούμε μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης του πρωτογενούς αντισώματος με διάλυμα 8% BSA, 0,5% Tween-20, 0,1% Triton-X σε PBS για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από δυο πεντάλεπτες πλύσεις με PBS επωάζουμε την caspase-3 συγκέντρωσης 1/120 διαλυμένη σε διάλυμα 0,05% Tween-20, 0,01% Triton-X σε PBS ολονύχτια στους 4°C. Εκτελούμε δυο πεντάλεπτες πλύσεις με PBS και επωάζουμε Antirabbit 1/200 σε PBS για μια ώρα στους 37°C. Μετά από δυο πεντάλεπτες πλύσεις με PBS εφαρμόζουμε HRP Streptavidin συγκέντρωσης 1/200 σε PBS για 30 λεπτά στους 37°C. Ξεπλένουμε δυο φορές με PBS και εφαρμόζουμε στους ιστούς 1% DAB για ένα λεπτό. Ξεπλένουμε με νερό βρύσης τοποθετούμε τα πλακάκια σε αιματοξυλίνη έως ότου επιτευχθεί η επιθυμητή χρώση και ξεπλένουμε με τρεχούμενο νερό. Τοποθετούμε τα πλακάκια διαδοχικά σε 96% και 100% αιθανόλη για 10 λεπτά στην κάθε μια και έπειτα για τουλάχιστον 20 λεπτά σε ξυλόλη. Τέλος τοποθετούμε καλυπτρίδες στα πλακάκια.

4.10 Πρωτόκολλο Sudan Black B σε παγωμένους ιστούς

Παρασκευάζουμε διάλυμα Sudan Black B (SSB) σε 70% αιθανόλη συγκέντρωσης 0,7% w/v. Αναδεύουμε ολονύχτια και φιλτράρουμε. Παρασκευάζουμε το Nuclear Fast Red (NFR) solution, διάλυμα για τη χρώση του πυρήνα. Το διάλυμα αυτό παρασκευάζεται με 0,1% w/v Nuclear Fast Red, 5% w/v θειικό αργίλιο σε απεσταγμένο νερό. Αφήνουμε τα πλακάκια 20 λεπτά ώστε να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου και αφαιρούμε το αλουμινόχαρτο. Εκτελούμε 2 πλυσίματα με PBS και τοποθετούμε τα πλακάκια σε κιβέτα με PBS για τουλάχιστον 24 ώρες στους 4°C. Στη συνέχεια τοποθετούμε τα πλακάκια σε 50% και στη συνέχεια σε 70% αιθανόλη για 5 λεπτά στην κάθε μία. Ρίχνουμε μια σταγόνα SSB στον ιστό και τοποθετούμε καλυπτρίδα. Παρατηρούμε σε μικροσκόπιο για δημιουργία λιποφουσκίνης, και διακόπτουμε πριν δημιουργηθεί ίζημα στον ιστό. Αφαιρούμε την καλυπτρίδα και ξεπλένουμε τα πλακάκια σε 50% αιθανόλη και στη συνέχεια σε

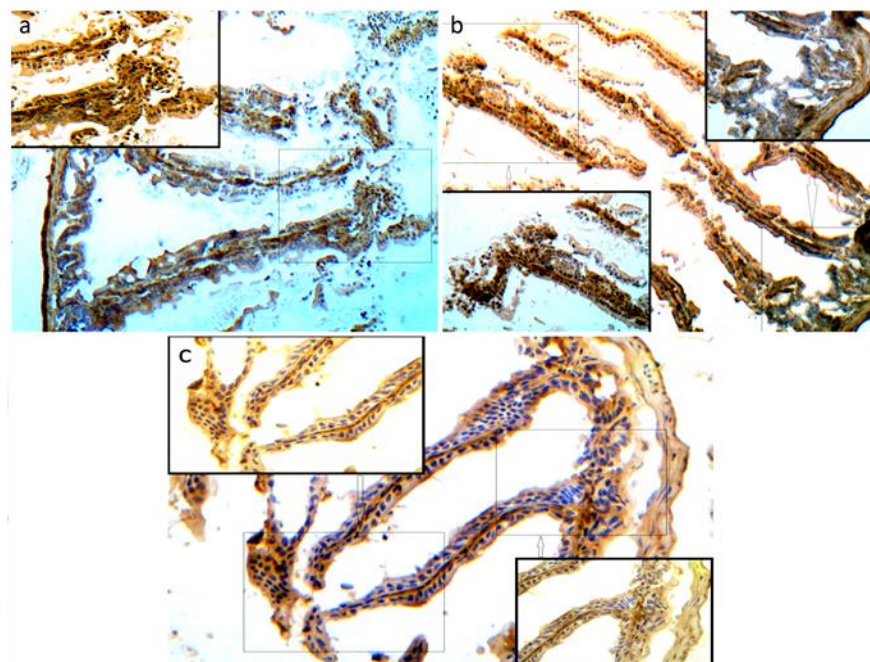
απεσταγμένο νερό. Στη συνέχεια τοποθετούμε τα πλακάκια στο NFR για 10 λεπτά. Ρίχνουμε μια σταγόνα 40% γλυκερόλης διαλυμένης σε PBS και καλύπτουμε τα πλακάκια.

5 Αποτελέσματα

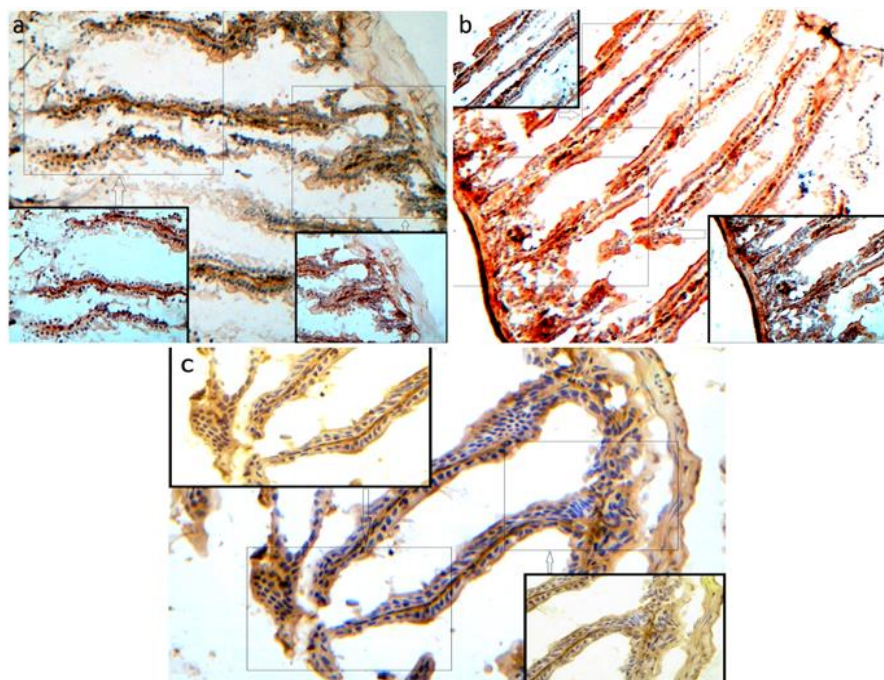
5.1 Οξειδωτικό Στρες- Βλάβες DNA 8-οξογουανίνη

Για την αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες στον ιστό του λεπτού εντέρου των ποντικών που ακτινοβολήθηκαν καταμετρήθηκαν ξεχωριστά τα θετικά στην 8-οξογουανίνη επιθηλιακά και τα στρωματικά εντερικά κύτταρα και έγινε σύγκρισή τους με τα αντίστοιχα κύτταρα του λεπτού εντέρου ποντικών που δεν ακτινοβολήθηκαν (control). Η καταμέτρηση έγινε ανά οπτικό πεδίο με οπτικό μικροσκόπιο με φακό μεγέθυνσης 64x. Καταμετρήθηκαν τέσσερα περιστατικά από κάθε είδος ακτινοβολήσης και από κάθε διαφορετικό χρόνο απομόνωσης των ιστών μετά την ακτινοβολήση, δηλαδή συνολικά 16 περιστατικά και 5 control. Από κάθε περιστατικό καταμετρήθηκαν 3 διαφορετικές περιοχές. Αναλυτικά οι μετρήσεις φαίνονται στους πίνακες του παραρτήματος και από της τιμές αυτές υπολογίστηκε η μέση τιμή και το σφάλμα τους. Για την εκτίμηση της στατιστικής σημαντικότητας των αποτελεσμάτων εκτελέστηκε t-test, μια στατιστική μέθοδος με την οποία μπορούμε να συμπεράνουμε αν τα αποτελέσματα της αξιολόγησης ενός δείγματος είναι στατιστικά σημαντικά και έτσι αν είναι ενδεικτικά για το σύνολο του πληθυσμού. Το t-test δίνει σαν αποτέλεσμα μια τιμή p-value. Αν το p-value είναι μικρότερο του 0,05 τότε θεωρούμε το εύρημα στατιστικά σημαντικό. Τα στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα σημειώνονται με αστερίσκο στα διαγράμματα.

Στις εικόνες που ακολουθούν παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της ανοσοϊστοχημείας για την 8-οξογουανίνη. Στην Εικόνα 5.1-1 παρουσιάζεται ιστός λεπτού εντέρου ποντικού που ακτινοβολήθηκε με BB 40 Gy και απομονώθηκε 24 ώρες μετά την ακτινοβολήση, ιστός λεπτού εντέρου ποντικού που ακτινοβολήθηκε με BB 40 Gy και απομονώθηκε 96 ώρες μετά την ακτινοβολήση και ιστός λεπτού εντέρου μη ακτινοβολημένου ποντικού. Στην Εικόνα 5.1-2 παρουσιάζεται ιστός λεπτού εντέρου ποντικού που ακτινοβολήθηκε με BB 10 Gy και απομονώθηκε 24 ώρες μετά την ακτινοβολήση, ιστός λεπτού εντέρου ποντικού που ακτινοβολήθηκε με BB 10 Gy και απομονώθηκε 96 ώρες μετά την ακτινοβολήση και ιστός λεπτού εντέρου μη ακτινοβολημένου ποντικού.



Εικόνα 5.1-1. Ανοσοϊστοχημία σε παγωμένο ιστό, 8-οξογουανίνη. a) Μη στοχευμένα ακτινοβολημένο έντερο με BB 40 Gy 24 ώρες μετά την ακτινοβόληση. b) Μη στοχευμένα ακτινοβολημένο έντερο με BB 40 Gy 96 ώρες μετά την ακτινοβόληση. c) Μη ακτινοβολημένο έντερο (control).



Εικόνα 5.1-2. Ανοσοϊστοχημία σε παγωμένο ιστό, 8-οξογουανίνη. a) Μη στοχευμένα ακτινοβολημένο έντερο με BB 10 Gy 24 ώρες μετά την ακτινοβόληση. b) Μη στοχευμένα ακτινοβολημένο έντερο με BB 10 Gy 96 ώρες μετά την ακτινοβόληση. c) Μη ακτινοβολημένο έντερο (control).

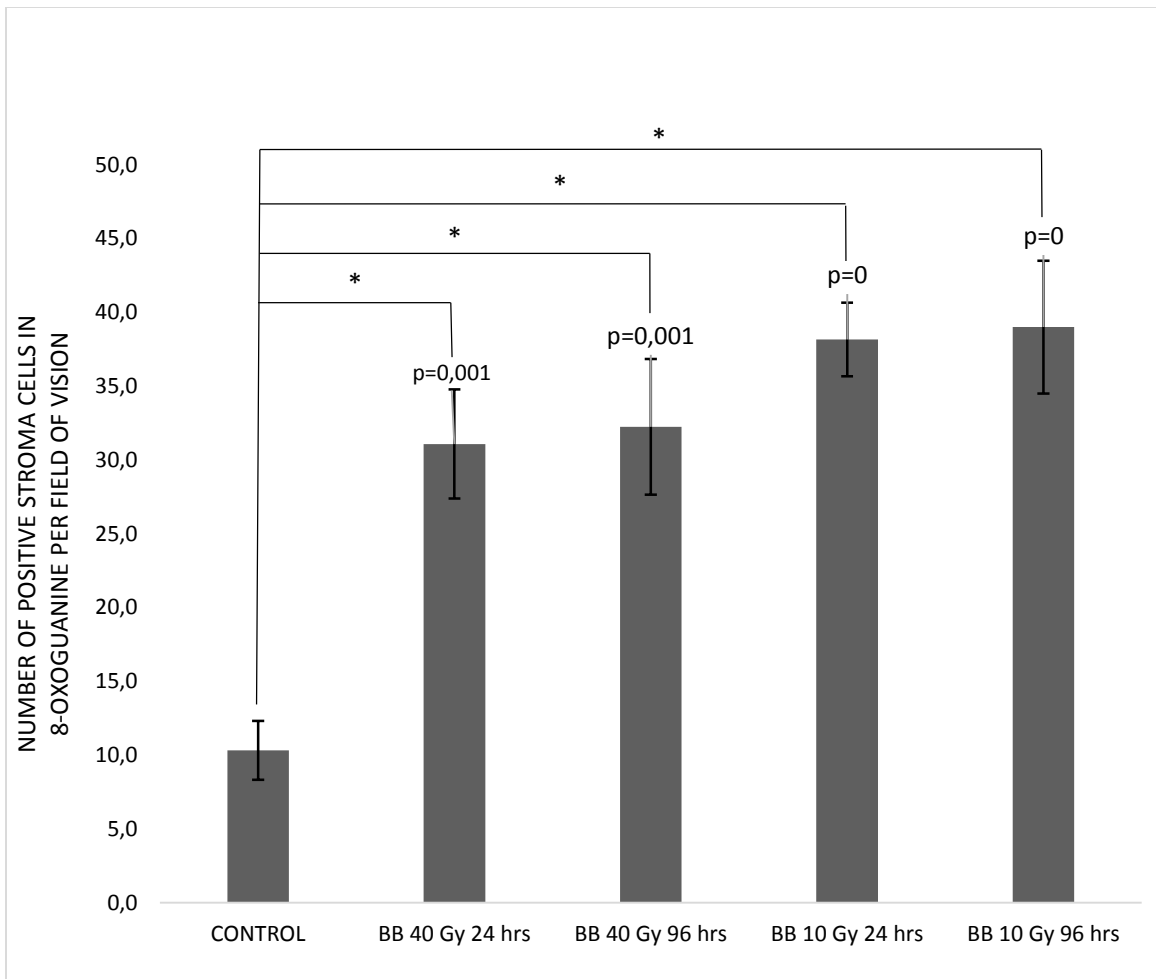
Παρατηρούμε αυξημένη παρουσία 8-οξογουανίνης τόσο στα 40 Gy όσο και στα 10 Gy, τόσο 24 ώρες όσο και 96 ώρες μετά την ακτινοβόληση σε σύγκριση με τον ιστό του μη ακτινοβολημένου ποντικού. Αυτή η αύξηση παρατηρείται τόσο στα επιθηλιακά όσο και στα στρωματικά κύτταρα.

5.1.1 Στρωματικά κύτταρα λεπτού εντέρου - 8-οξογουανίνη

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της καταμέτρησης των θετικών στην 8-οξογουανίνη στρωματικών εντερικών κυττάρων τόσο των ακτινοβολημένων όσο και των μη ακτινοβολημένων ποντικών. Στο διάγραμμα φαίνονται σχηματικά τα αποτελέσματα. Ο αστερίσκος υποδηλώνει στατιστική σημαντικότητα.

Πίνακας 5.1.1-1 Αποτελέσματα καταμέτρησης των θετικών στην 8-οξογουανίνη στρωματικών κυττάρων

ΘΕΤΙΚΑ ΣΤΡΩΜΑΤΙΚΑ ΕΝΤΕΡΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΤΗΝ 8-οξογουανίνη					
	CONTROL	BB 40 Gy 24 hrs	BB 40 Gy 96 hrs	BB 10 Gy 24 hrs	BB 10 Gy 96 hrs
Αριθμός θετικών κυττάρων ανά οπτικό πεδίο	10,3	31,1	32,3	38,2	39
Σφάλμα	2	3,7	4,6	2,5	4,5
p-value	-	0,001	0,001	0	0



Διάγραμμα 5.1.1-1 8-οξογουανίνη σε στρωματικά εντερικά κύτταρα σε διαφορετικές δόσεις και χρόνους. Σύγκριση των μη στοχευμένα ακτινοβολημένων εντέρων με τα μη ακτινοβολημένα. Ο αστερίσκος υποδηλώνει στατιστική σημαντικότητα.

Παρατηρούμε εμφανώς αυξημένα ποσοστά θετικών στρωματικών εντερικών κυττάρων στην 8-οξογουανίνη τόσο στα 40 Gy όσο και στα 10 Gy σε σύγκριση με τα στρωματικά εντερικά κύτταρα των μη ακτινοβολημένων ποντικών. Τα αποτελέσματα αυτά είναι στατικά σημαντικά καθώς το p-value κυμαίνεται από 0 έως 0,001. Δεν παρατηρούμε κάποια διαφορά μεταξύ 24 και 96 ωρών μετά την ακτινοβόληση ούτε στα 40 Gy ούτε στα 10 Gy. Οι αυξημένες τιμές στα 10 Gy σε σχέση με τα 40 Gy που φαίνονται στο διάγραμμα δεν είναι στατιστικά σημαντικές καθώς δίνουν p-value 0,1 έως 0,2

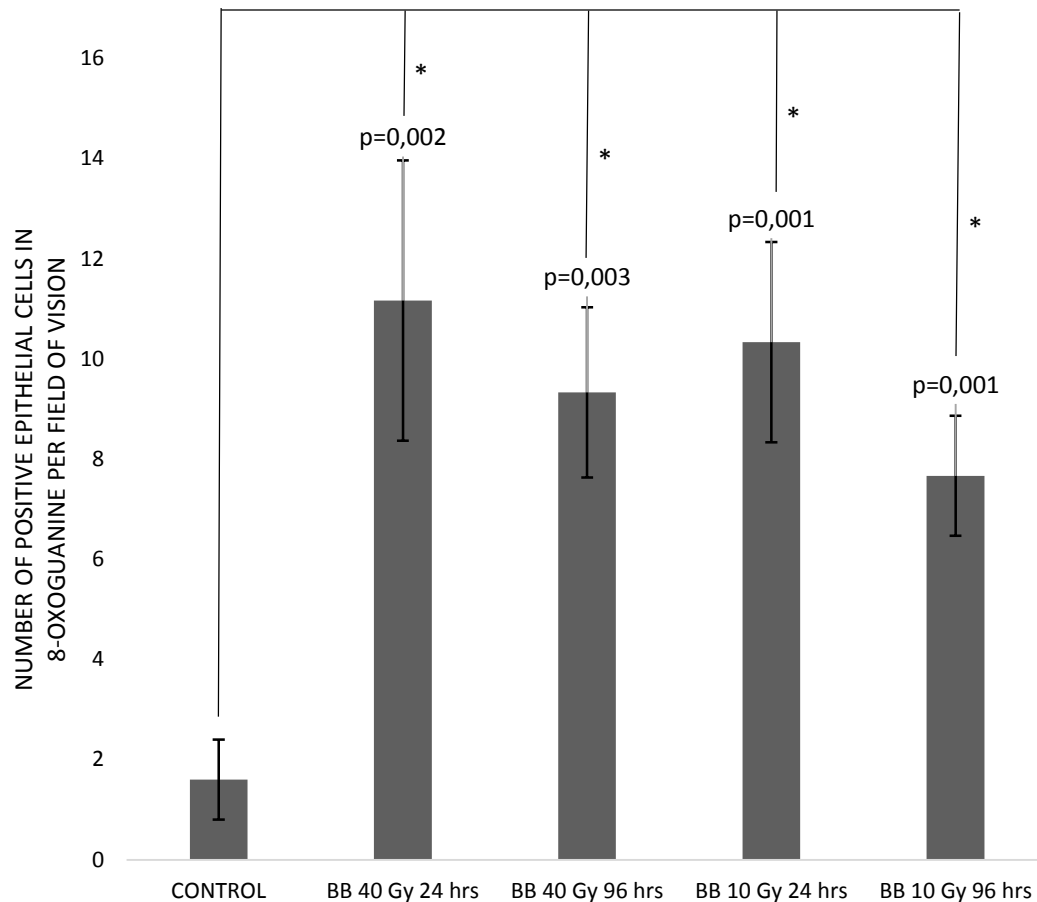
Έτσι, στα 40 Gy έχουμε 3 και 3,1 ενώ στα 10 Gy, 3,7 και 3,8 φορές αυξημένη 8-οξογουανίνη για τις 24 και τις 96 ώρες αντίστοιχα σε σύγκριση με τα μη ακτινοβολημένα.

5.1.2 Επιθηλιακά κύτταρα λεπτού εντέρου - 8-οξογουανίνη

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της καταμέτρησης των θετικών στην 8-οξογουανίνη επιθηλιακών εντερικών κυττάρων τόσο των ακτινοβολημένων όσο και των μη ακτινοβολημένων ποντικών. Στο διάγραμμα φαίνονται σχηματικά τα αποτελέσματα. Ο αστερίσκος υποδηλώνει στατιστική σημαντικότητα.

Table 5.1.2-1. Αποτελέσματα καταμέτρησης των θετικών στην 8-οξογουανίνη επιθηλιακών κυττάρων

ΘΕΤΙΚΑ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΕΝΤΕΡΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΤΗΝ 8-οξογουανίνη					
	CONTROL	BB 40 Gy 24 hrs	BB 40 Gy 96 hrs	BB 10 Gy 24 hrs	BB 10 Gy 96 hrs
Αριθμός θετικών κυττάρων ανά οπτικό πεδίο	1,6	11,2	9,3	10,3	7,7
Σφάλμα	0,8	2,8	1,7	2	1,2
p-value	-	0,002	0,003	0,001	0,001



Διάγραμμα 5.1.2-1. 8-οξογουανίνη σε επιθηλιακά εντερικά κύτταρα σε διαφορετικές δόσεις και χρόνους. Σύγκριση των μη στοχευμένα ακτινοβολημένων εντέρων με τα μη ακτινοβολημένα. Ο αστερίσκος υποδηλώνει στατιστική σημαντικότητα.

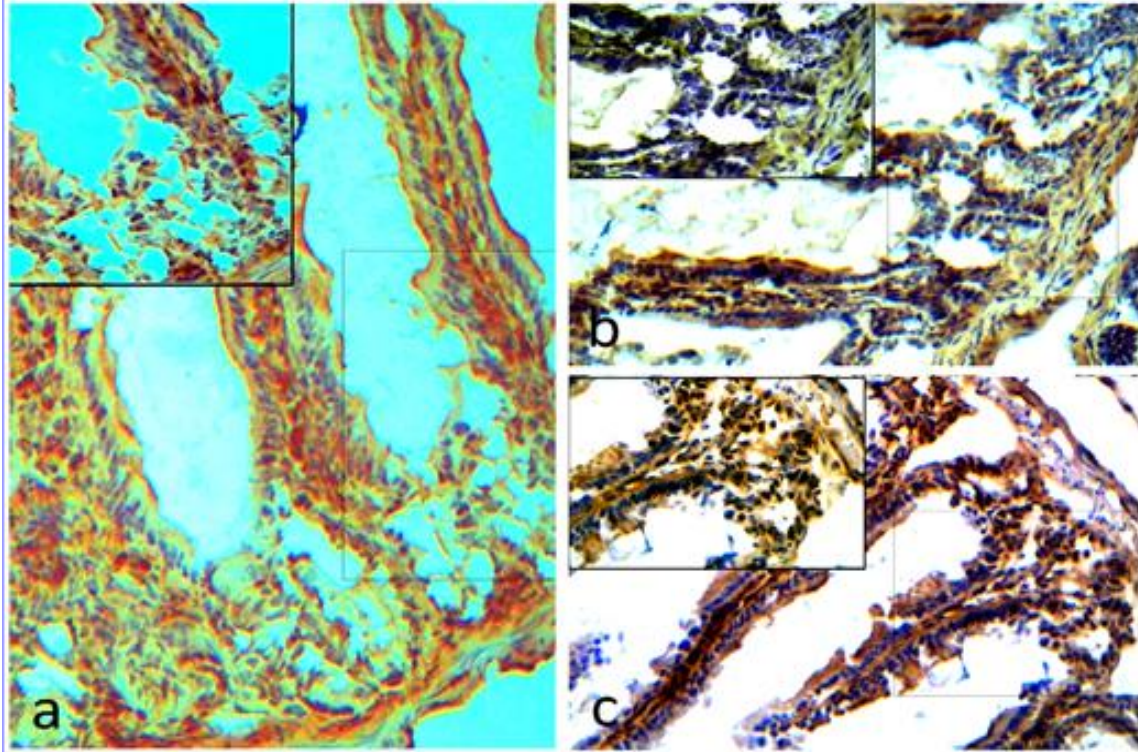
Παρατηρούμε αυξημένα ποσοστά θετικών επιθηλιακών εντερικών κυττάρων στην 8-oxoguanine τόσο στα 40 Gy όσο και στα 10 Gy σε σύγκριση με τα στρωματικά εντερικά κύτταρα των μη ακτινοβολημένων ποντικών. Τα αποτελέσματα αυτά είναι στατιστικά σημαντικά καθώς το p-value κυμαίνεται από 0,001 έως 0,003. Συγκεκριμένα, στα 40 Gy έχουμε 7 και 5,8 ενώ στα 10 Gy, 6,4 και 4,8 φορές αυξημένη 8-οξογουανίνη για τις 24 και τις 96 ώρες αντίστοιχα σε σύγκριση με τα μη ακτινοβολημένα.

Στο διάγραμμα φαίνεται να υπάρχει μείωση των ποσοστών της 8-οξογουανίνης από τις 24 στις 96 ώρες τόσο για τα 40 Gy όσο και για τα 10 Gy. Σε αντίθεση με τα στρωματικά κύτταρα που υπήρχε μια ένδειξη αύξησης της 8-οξογουανίνης στα 10Gy σε σύγκριση με τα 40 Gy, στα επιθηλιακά κύτταρα παρατηρούμε ακριβώς το αντίθετο. Εντούτοις, οι παρατηρήσεις αυτές δεν είναι στατιστικά σημαντικές.

5.2 Κυτταρικός Πολλαπλασιασμός- Ki-67

Για την αξιολόγηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στον ιστό του λεπτού εντέρου των ποντικών που ακτινοβολήθηκαν καταμετρήθηκαν τα θετικά κύτταρα στην Ki-67 και έγινε σύγκριση με τα αντίστοιχα θετικά κύτταρα στην Ki-67 των μη ακτινοβολημένων ποντικών. Η καταμέτρηση έγινε ανά εντερική κρύπτη. Καταμετρήθηκαν τέσσερα περιστατικά από κάθε είδος ακτινοβολήσης και από κάθε διαφορετικό χρόνο απομόνωσης των ιστών μετά την ακτινοβολήση, δηλαδή συνολικά 16 περιστατικά και 5 control. Αναλυτικά οι μετρήσεις φαίνονται στους πίνακες του παραρτήματος και από της τιμές αυτές υπολογίστηκε η μέση τιμή και το σφάλμα τους. Από κάθε περιστατικό καταμετρήθηκαν 10 διαφορετικές περιοχές. Για την εκτίμηση της στατιστικής σημαντικότητας των αποτελεσμάτων εκτελέστηκε t-test, μια στατιστική μέθοδος με την οποία μπορούμε να συμπεράνουμε αν τα αποτελέσματα της αξιολόγησης ενός δείγματος είναι στατιστικά σημαντικά και έτσι αν είναι ενδεικτικά για το σύνολο του πληθυσμού. Το t-test δίνει σαν αποτέλεσμα μια τιμή p-value. Αν το p-value είναι μικρότερο του 0,05 τότε θεωρούμε το εύρημα στατιστικά σημαντικό. Τα στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα σημειώνονται με αστερίσκο στα διαγράμματα.

Στην εικόνα που ακολουθεί παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της ανοσοϊστοχημείας για την Ki-67. Παρουσιάζεται ιστός λεπτού εντέρου ποντικού που ακτινοβολήθηκε με BB 40 Gy και απομονώθηκε 24 ώρες μετά την ακτινοβολήση, ιστός λεπτού εντέρου ποντικού που ακτινοβολήθηκε με BB 40 Gy και απομονώθηκε 96 ώρες μετά την ακτινοβολήση και ιστός λεπτού εντέρου μη ακτινοβολημένου ποντικού.



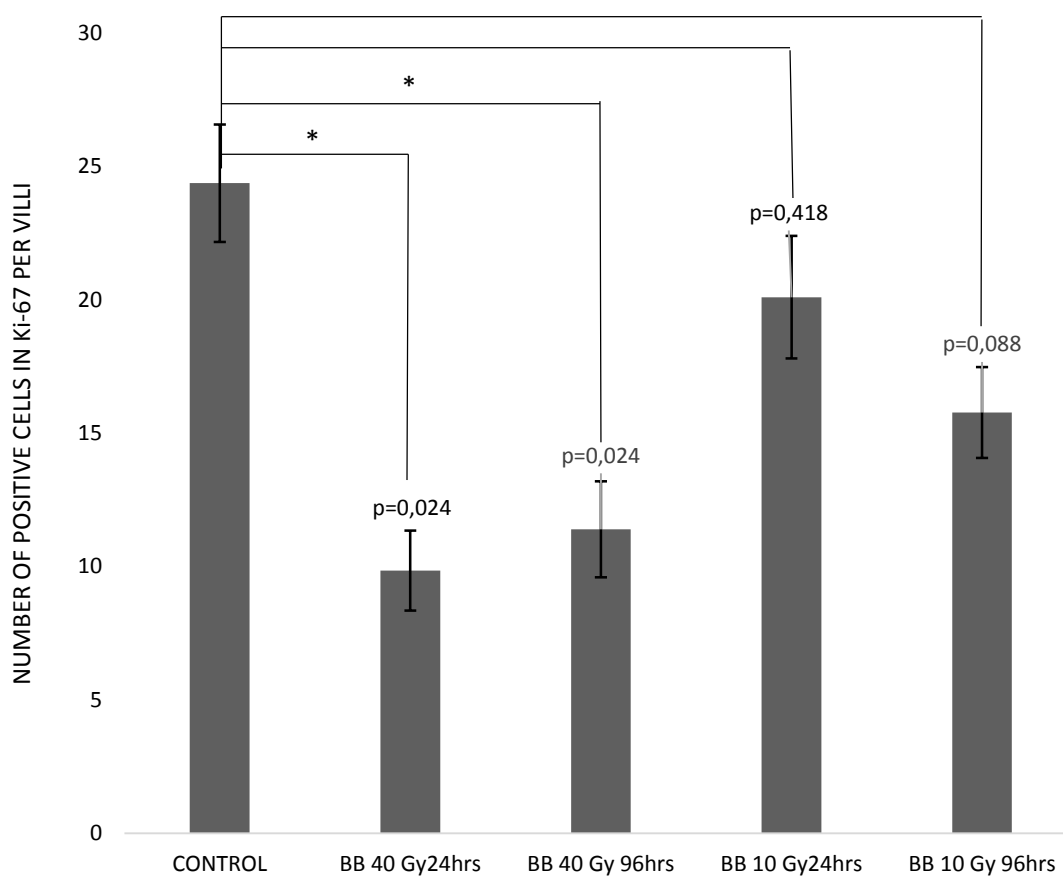
Εικόνα 5-2-1. Ανοσοϊστοχημεία σε παγωμένο ιστό, Ki-67. a) Μη στοχευμένα ακτινοβολημένο έντερο με BB 40 Gy 96 ώρες μετά την ακτινοβολήση. b) Μη στοχευμένα ακτινοβολημένο έντερο με BB 40 Gy 24 ώρες μετά την ακτινοβολήση. c) Μη ακτινοβολημένο έντερο (control).

Αναμένουμε έντονη παρουσία της Ki-67 χαμηλά στις εντερικές λάχνες καθώς εκεί πολλαπλασιάζονται ταχέως τα επιθηλιακά κύτταρα, τα οποία στη συνέχεια ωριμάζοντας ανεβαίνουν κατά μήκος των λαχνών όπου και αποπίπτουν. Παρατηρούμε στην εικόνα 5.2-1 (c) ότι στο λεπτό έντερο του μη ακτινοβολημένου ποντικού έχουμε έντονο κυτταρικό πολλαπλασιασμό όπως αναμέναμε. Αντίθετα, στο λεπτό έντερο των ακτινοβολημένων ποντικών με 40 Gy, τόσο 24 όσο και 96 ώρες μετά την ακτινοβολήση παρουσιάζεται μειωμένος κυτταρικός πολλαπλασιασμός όπως φαίνεται στις b) και a) αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα της καταμέτρησης παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα και στο διάγραμμα που ακολουθεί.

Πίνακας 5.2-1 Αποτελέσματα καταμέτρησης των θετικών στην Ki-67 εντερικών κυττάρων

Θετικά εντερικά κύτταρα στην Ki-67					
	CONTROL	BB 40 Gy 24 hrs	BB 40 Gy 96 hrs	BB 10 Gy 24 hrs	BB 10 Gy 96 hrs
Αριθμός θετικών κυττάρων ανά κρύπτη	24,4	9,9	11,4	20,1	15,8
Σφάλμα	2,2	1,5	1,8	2,3	1,7
p-value	-	0,024	0,024	0,418	0,088



Διάγραμμα 5.2-1 Ki-67 σε εντερικά κύτταρα σε διαφορετικές δόσεις και χρόνους. Σύγκριση των μη στοχευμένα ακτινοβολημένων εντέρων με τα μη ακτινοβολημένα. Ο αστερίσκος υποδηλώνει στατιστική σημαντικότητα

Παρατηρούμε μειωμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό στα εντερικά κύτταρα των ποντικών που ακτινοβολήθηκαν στο πόδι σε σύγκριση με τα μη ακτινοβολημένα. Συγκεκριμένα, στα 40 Gy έχουμε 2,5 και 2,1 φορές λιγότερα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα στις 24 και 96 ώρες αντίστοιχα σε σύγκριση με τα μη ακτινοβολημένα. Το αποτέλεσμα είναι στατιστικά σημαντικό καθώς έχουμε p-value 0,024.

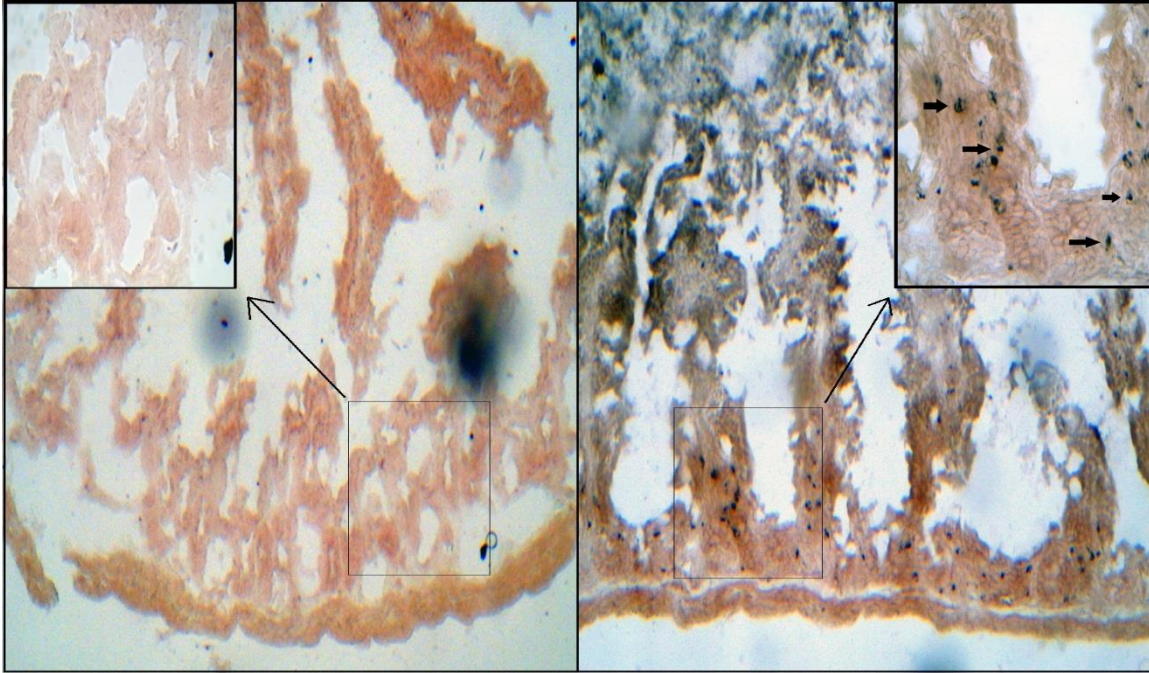
Στα 10 Gy έχουμε μια σαφή ένδειξη μείωσης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού αλλά δεν προκύπτουν στατιστικά σημαντικές διαφορές αφού το p-value κυμαίνεται από 0,088 έως 0,418. Τέλος, ούτε στην περίπτωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού υπάρχει σαφής ένδειξη που να μαρτυρά διαφορές μεταξύ των 24 και των 96 ωρών μετά την ακτινοβολήση.

5.3 Σε εξέλιξη: Εξέταση εμφάνισης πρόωρης γήρανσης, απόπτωσης, και ύπαρξης φλεγμονικών παραγόντων

Η μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε συνδυασμό με το αυξημένο οξειδωτικό στρες υποδηλώνει αναστολή του κυτταρικού κύκλου λόγω ενεργοποίησης του DDR ή άλλων μηχανισμών. Αυτή τη στιγμή, σε μια προσπάθεια να εξακριβωθεί αν η αναστολή του κυτταρικού κύκλου οδηγεί σε πρόωρη γήρανση ή απόπτωση τα κύτταρα, όπως επίσης και για να προσδιοριστούν οι παράγοντες που ευθύνονται για τα φαινόμενα αυτά είναι σε εξέλιξη τα εξής πειράματα:

Έλεγχος πρόωρης γήρανσης με τη μέθοδο Sudan black b

Στην εικόνα που ακολουθεί παρουσιάζεται το αποτέλεσμα του Sudan black b σε παγωμένους ιστούς για την ανίχνευση θετικών κυττάρων σε λιποφουσκίνη, που είναι όπως προαναφέρθηκε μάρτυρας πρόωρης γήρανσης.

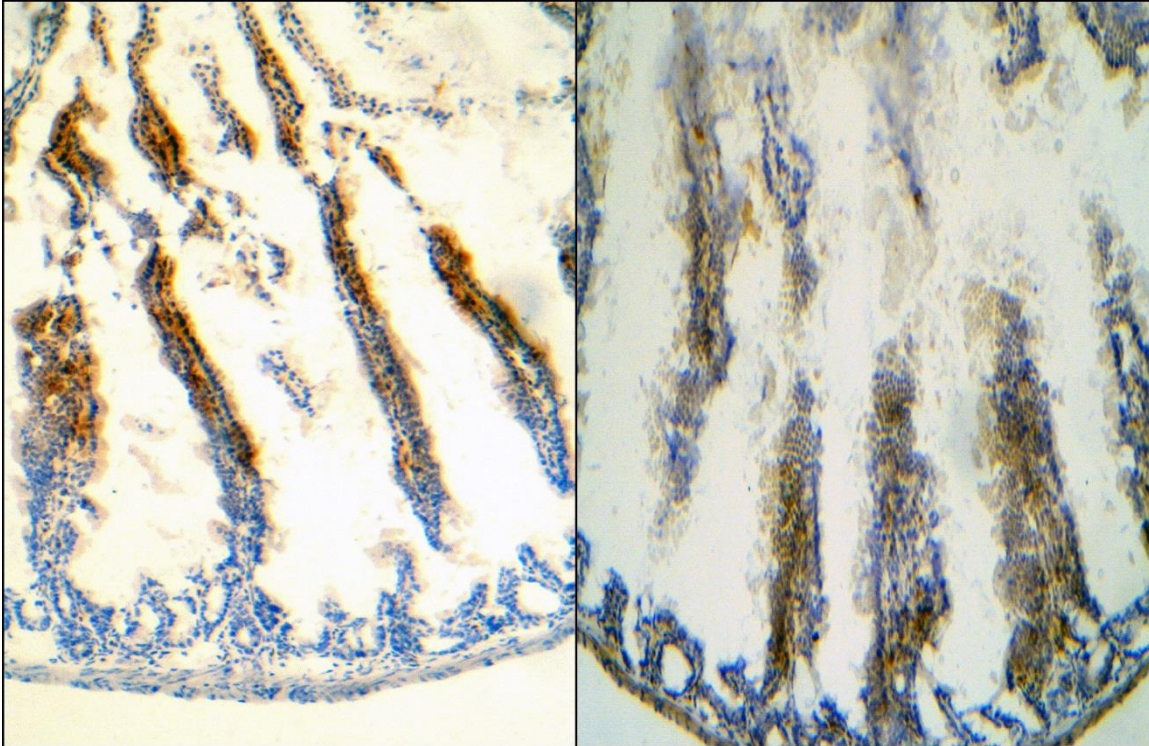


Εικόνα 5.3-1. Sudan Black B σε παγωμένο ιστό. Αριστερά: Μη ακτινοβολημένο έντερο. Δεξιά: Μη στοχευμένα ακτινοβολημένο έντερο με 40 Gy. Παρατηρούμε ύπαρξη θετικών στη λιποφουσκίνη κυττάρων.

Από την σύγκριση των εικόνων του εντερικού ιστού των μη ακτινοβολημένων ποντικών και των ακτινοβολημένων με 40 Gy προκύπτει μια πρώτη εικόνα ότι υπάρχουν αυξημένα ποσοστά θετικών εντερικών κυττάρων στη λιποφουσκίνη στα μη στοχευμένα ακτινοβολημένα δείγματα. Χρειάζεται βελτιστοποίηση της τεχνικής ώστε να μειωθεί το ίζημα που επικάθεται στους ιστούς ώστε να είναι δυνατή η αξιολόγηση όλων των δειγμάτων και να καταλήξουμε σε συγκεκριμένα αποτελέσματα.

Έλεγχος απόπτωσης με Ανοσοϊστοχημεία με Caspase 3

Η έκφραση της πρωτεΐνης caspase 3 οδηγεί το κύτταρο σε μονοπάτι απόπτωσης. Στην εικόνα φαίνεται το αποτέλεσμα της ανοσοϊστοχημείας με caspase 3.

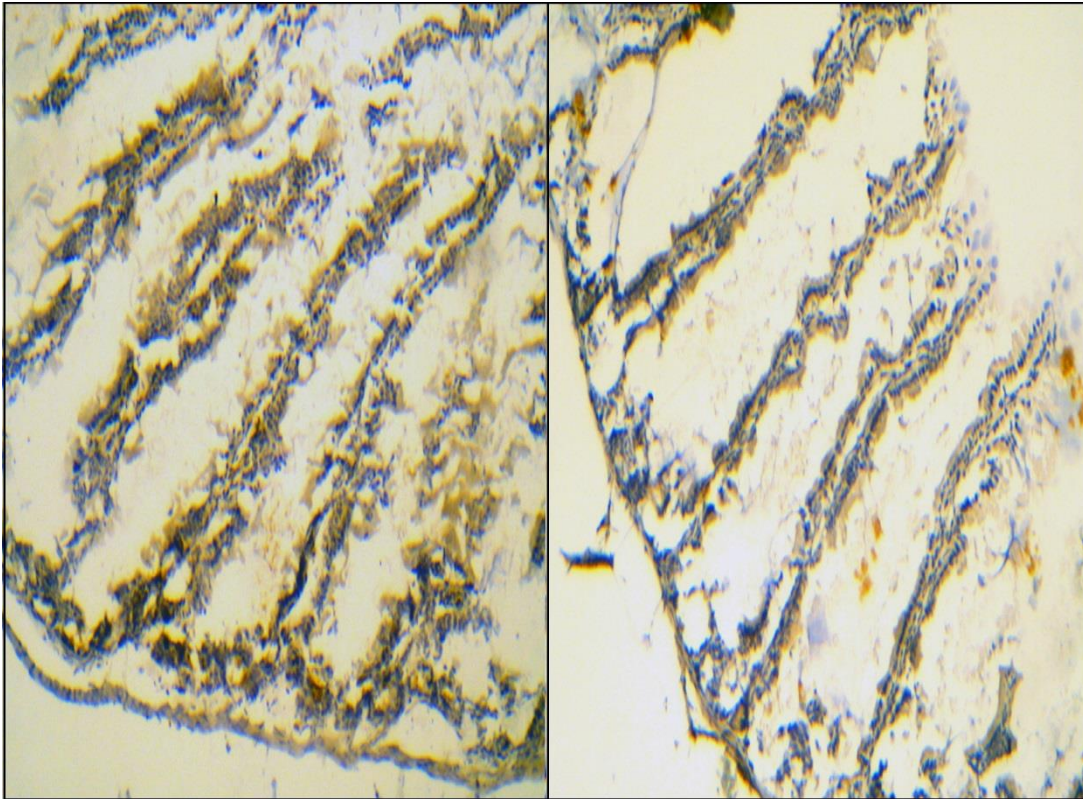


Εικόνα 5.3-2. Ανοσοϊστοχημεία σε παγωμένο ιστό, caspase 3. Αριστερά: Μη ακτινοβολημένο έντερο. Δεξιά: Μη στοχευμένα ακτινοβολημένο έντερο με 40 Gy.

Η εικόνα που παίρνουμε έχει πολύ μη ειδικό σήμα και έτσι δεν μπορούμε να βγάλουμε κανένα συμπέρασμα προς το παρόν. Απαιτείται είτε η βελτίωση της τεχνικής ώστε να έχουμε ειδικό σήμα και να είναι εφικτή η αξιολόγηση είτε η εκτέλεση άλλου πειράματος, συγκεκριμένα του tunel, το οποίο ανιχνεύει το θρυμματισμό του μορίου το DNA. Έτσι θα προκύψει εικόνα για το αν υπάρχει αυξημένη απόπτωση στα ακτινοβολημένα δείγματα.

Έλεγχος ύπαρξης φλεγμονής με Ανοσοϊστοχημεία με p65

Τέλος, προσπαθώντας να προσδιορίσουμε τους παράγοντες που οδηγούν στην αύξηση του οξειδωτικού στρες στους απομακρυσμένους ιστούς, εκτελούνται πειράματα ανοσοϊστοχημείας για την ανίχνευση των επιπέδων της πρωτεΐνης p65, η οποία συνδέεται με την ύπαρξη φλεγμονώδους αντίδρασης. Μια εικόνα του αποτελέσματος του πειράματος φαίνεται παρακάτω αλλά ούτε σε αυτή την περίπτωση μπορούμε ακόμα να καταλήξουμε σε συμπεράσματα.



Εικόνα 5.3-3. Ανοσοϊστοχημεία σε παγωμένο ιστό, p-65. Αριστερά: Μη ακτινοβολημένο έντερο. Δεξιά: Μη στοχευμένα ακτινοβολημένο έντερο με 40 Gy.

6 Συμπεράσματα - Σχολιασμός

Εκτελώντας τεχνικές ανοσοϊστοχημείας σε παγωμένο ιστό, και συγκεκριμένα λεπτού εντέρου, μη ακτινοβολημένων ποντικών και ποντικών που ακτινοβολήθηκαν με ακτίνες-Χ χαμηλής ενέργειας και δέχτηκαν δόσεις 10 Gy και 40 Gy στο πίσω δεξί τους πόδι, βρήκαμε σημαντικά αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού στρες στο έντερο των ακτινοβολημένων ποντικών. Πρόκειται για συνέπεια της ακτινοβολίας σε απομακρυσμένο ιστό καθώς η ακτινοβολήση έγινε με τρόπο τέτοιο που το έντερο των ποντικών που ακτινοβολήθηκε δεν δέχτηκε δόση.

Συγκεκριμένα, ανιχνεύτηκαν αυξημένα επίπεδα 8-οξογουανίνης στο έντερο των ακτινοβολημένων δειγμάτων. Στα στρωματικά εντερικά κύτταρα των ποντικών που ακτινοβολήθηκαν με 40 Gy η 8-οξογουανίνη ήταν 3 και 3,1 φορές αυξημένη, 24 και 96 ώρες μετά την ακτινοβολήση αντίστοιχα, σε σύγκριση με τα μη ακτινοβολημένα δείγματα. Στην ακτινοβολήση με 10 Gy παρατηρήσαμε 3,7 και 3,8 φορές αυξημένη 8-οξογουανίνη σε αντιστοιχία. Δεν παρατηρείται καμία διαφορά μεταξύ των 24 και των 96 ωρών

Στα επιθηλιακά εντερικά κύτταρα των ποντικών που ακτινοβολήθηκαν με 40 Gy η 8-οξογουανίνη ήταν 7 και 5,8 φορές αυξημένη, 24 και 96 ώρες μετά την ακτινοβολήση αντίστοιχα, σε σύγκριση με τα μη ακτινοβολημένα δείγματα. Στην ακτινοβολήση με 10 Gy παρατηρήσαμε 6,4 και 4,8 φορές αυξημένη 8-οξογουανίνη σε αντιστοιχία. Η μείωση της 8-οξογουανίνης στις 96 ώρες σε σχέση με τις 24 ώρες δεν είναι μεν στατιστικά σημαντική αλλά μπορεί να έχει κάποιο ενδιαφέρον καθώς είναι η μόνη περίπτωση που δείχνει ότι ο χρόνος που παρέρχεται της ακτινοβολήσης ίσως έχει κάποια επιρροή. Μεγαλύτερο δείγμα θα βοηθούσε στην επαλήθευση ή την απόρριψη της υπόθεσης αυτής. Τα επιθηλιακά κύτταρα είναι ταχέως πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα και ως εκ τούτου πιο επιρρεπή στη ανάπτυξη μεταλλάξεων σε περιβάλλον με οξειδωτικό στρες. Άρα είναι χρήσιμο να κατανοήσουμε πώς συμπεριφέρονται με την πάροδο του χρόνου μετά από μια ακτινοβολήση. Συγκρίνοντας τα στρωματικά με τα επιθηλιακά κύτταρα βλέπουμε ότι τα δεύτερα επηρεάζονται περισσότερο καθώς εμφανίζουν σαφώς μεγαλύτερη αύξηση της 8-οξογουανίνης.

Όσον αφορά στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό παρατηρείται μειωμένος στα ακτινοβολημένα δείγματα καθώς η Ki-67 παρουσιάζει μείωση στα δείγματα αυτά. Αυτό παραπέμπει σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου λόγω ενεργοποίησης του μηχανισμού απόκρισης σε βλάβες του DNA, (DNA Damage Response-DDR). Πιο συγκεκριμένα στα εντερικά κύτταρα των ποντικών που ακτινοβολήθηκαν με 40 Gy έχουμε μειωμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό 2,5 και 2,1 φορές για τις 24 και τις 96 ώρες αντίστοιχα σε σχέση εκείνα των μη ακτινοβολημένων δειγμάτων. Επίσης υπάρχει σαφής ένδειξη για μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στα 10 Gy αλλά το αποτέλεσμα δεν είναι στατιστικά σημαντικό και για την επιβεβαίωση της ένδειξης αυτής απαιτείται η εξέταση περισσότερων περιστατικών. Επίσης, δεν είναι στατιστικά σημαντική η διαφορά του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μεταξύ των δειγμάτων που ακτινοβολήθηκαν με 10 Gy και 40 Gy. Ούτε στην περίπτωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού παρατηρούμε διαφορές 24 και 96 ώρες μετά την ακτινοβολήση.

Τέλος, τα πρώτα αποτελέσματα των πειραμάτων με τη μέθοδο Sudan Black b για την ανίχνευση λιποφουσκίνης, ως μάρτυρα πρόωρης κυτταρικής γήρανσης, υποδεικνύουν ύπαρξη αυξημένης πρόωρης γήρανσης στους ιστούς των ακτινοβολημένων δειγμάτων.

Το γεγονός ότι τα αποτελέσματα όλων των πειραμάτων δείχνουν ότι δεν υπάρχουν διαφορές μεταξύ των 24 και των 96 ωρών μετά την ακτινοβολήση, μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι 24 ώρες είναι αρκετές για την εμφάνιση του φαινομένου της απόκρισης απομακρυσμένων ιστών στην ακτινοβολία στη μέγιστη ένταση του και ταυτόχρονα ότι οι πάροδος 96 ωρών δεν είναι αρκετή για την αποκατάσταση των συνεπειών του φαινομένου. Αυτό μπορεί να σημαίνει είτε ότι χρειάζεται περισσότερος χρόνος ώστε όσα κύτταρα είναι εφικτό να επιδιορθωθούν να το κάνουν και να επανέλθουν σε φυσιολογική λειτουργία ή αλλιώς να οδηγηθούν σε απόπτωση και πρόωρη γήρανση ώστε να επανέλθει μια φυσιολογική κατάσταση σε συστημικό επίπεδο είτε ότι οι βλάβες είναι τέτοιες που δεν είναι δυνατή η αντιμετώπιση τους οπότε οδηγούμαστε σε γονιδιωματική αστάθεια και καρκινογένεση. Για την περαιτέρω μελέτη της χρονικής εξέλιξης του φαινομένου απαιτούνται πειράματα όπου θα αφήσουμε τα ποντίκια να ζήσουν αρκετές μέρες, ίσως και μήνες μετά την ακτινοβολήση.

6.1 Μελλοντικές κατευθύνσεις

Ήδη βρίσκονται σε εξέλιξη πειράματα για τον προσδιορισμό των παραγόντων που ευθύνονται για το φαινόμενο της απόκρισης απομακρυσμένων ιστών. Εξετάζοντας τους ιστούς για παρουσία συγκεκριμένων πρωτεϊνών, όπως της p65 ή συγκεκριμένων κυττάρων, όπως μακροφάγων και ανοσοκυττάρων, θα εξακριβωθεί αν το φαινόμενο οφείλεται σε φλεγμονώδη ή ανοσολογική απόκριση του οργανισμού.

Σε δεύτερο χρόνο θα πρέπει να εξεταστούν περισσότερα είδη ιστών όπως επίσης και των άμεσα ακτινοβολημένων ιστών ώστε να γίνει σύγκριση και αν είναι δυνατόν συσχέτιση των συνεπειών της ακτινοβολίας σε απομακρυσμένους ιστούς με τους άμεσα ακτινοβολημένους. Σήμερα, κατά το σχεδιασμό μιας ακτινοθεραπείας, λαμβάνονται υπόψιν μόνο οι συνέπειες στους ιστούς γύρω από το σημείο ακτινοβολήσης, οι οποίοι θα δεχθούν άμεσα δόση. Αν υπάρξει τέτοιου είδους συσχέτιση ίσως θα πρέπει να αρχίσουμε να σκεφτόμαστε ότι για το σχεδιασμό της θεραπείας θα πρέπει να εξετάζονται και οι συνέπειες σε απομακρυσμένες θέσεις. Φυσικά κάτι τέτοιο απαιτεί περισσότερα πειράματα με μεγαλύτερα δείγματα ώστε να είναι δυνατή η καλύτερη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων ώστε να έρθουμε σε θέση να μπορούμε να προβλέψουμε τη συνέπεια μιας συγκεκριμένης δόσης σε κάποιο συγκεκριμένο απομακρυσμένο ιστό. Σε αντίθεση με τους άμεσα ακτινοβολημένους ιστούς, για τους οποίους υπάρχουν πολλά δεδομένα και μπορούμε να προβλέψουμε με ακρίβεια τη συμπεριφορά τους, δεν υπάρχουν δεδομένα για τους απομακρυσμένους. Τέλος, αφού πλέον γνωρίζουμε ότι η ακτινοβολήση προκαλεί οξειδωτικό στρες σε απομακρυσμένες περιοχές θα πρέπει να εξεταστεί αν η χορήγηση αντιοξειδωτικών και αντιφλεγμονωδών ουσιών, όπως για παράδειγμα η φυτικής προέλευσης κουρκουμίνη, μετά την ακτινοθεραπεία, θα μπορούσαν να περιορίσουν τις μακροχρόνιες τοξικές επιδράσεις της ακτινοβολίας.

Βιβλιογραφία

1. Agency, I.A.E., *Radiation Biology*. 2010.
2. Μαργαρίτης, Λ., *Ραδιοβιολογία ακτινοβολίες και ζωή*. 1996: Συμμετρία. 184 p.
3. Γαζής, Ε.Ν., *ΙΟΝΤΙΖΟΥΣΕΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΕΣ Εφαρμογές στην Ιατρική και Βιολογία*. 2002, Αθήνα: Παπασωτηρίου. 336 p.
4. Σαρρής, Π.Φ., *Εισαγωγή στην Κυτταρική Βιολογία και Γενετική*. 2004.
5. Wolfe, S.L., *Biology of the cell*. 1972, Belmont, Calif.: Wadsworth Pub. Co. 545 p.
6. Alberts, B., *Essential cell biology*. 3rd ed. 2010, New York: Garland Science.
7. Lodish, H.F., *Molecular cell biology*. 6th ed. 2007, New York: W.H. Freeman. xxxvii, 1150, 76 p.
8. Azzam, E.I., J.P. Jay-Gerin, and D. Pain, *Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury*. *Cancer Lett*, 2012. **327**(1-2): p. 48-60.
9. Cooper, G.M. and R.E. Hausman, *The cell : a molecular approach*. 6th ed. 2013, Sunderland, MA: Sinauer Associates. xxv, 832 p.
10. Scholzen, T. and J. Gerdes, *The Ki-67 protein: from the known and the unknown*. *J Cell Physiol*, 2000. **182**(3): p. 311-22.
11. Treuting, P.M., *Comparative anatomy and histology : a mouse and human atlas*. 2012, Amsterdam: Elsevier/Academic Press. xii, 461 p.
12. Kierszenbaum, A.L., *Histology and cell biology : an introduction to pathology*. 2nd ed. 2007, Philadelphia, PA: Mosby Elsevier. xiv, 671 p.
13. Κυριάκος Ψαρράκος, Ε.Μ.-Α., Άννα Γκοτζαμάνη - Ψαρράκου, Αναστάσιος Σιούντας, *Επίτομη ιατρική φυσική*. 2010, Θεσσαλονίκη: University Studio Press. 300 p.
14. Lilley, J.S., *Nuclear physics : principles and applications*. The Manchester physics series. 2001, Chichester ; New York: J. Wiley. xvi, 393 p., 1 p. of col. plate.
15. Alpen, E.L., *Radiation biophysics*. Prentice Hall biophysics and bioengineering series. 1990, Englewood Cliffs, N.J.: Prentice Hall. xx, 392 p.
16. Tchou, J. and A.P. Grollman, *Repair of DNA containing the oxidatively-damaged base, 8-oxoguanine*. *Mutat Res*, 1993. **299**(3-4): p. 277-87.
17. Nash, H.M., et al., *Cloning of a yeast 8-oxoguanine DNA glycosylase reveals the existence of a base-excision DNA-repair protein superfamily*. *Curr Biol*, 1996. **6**(8): p. 968-80.
18. Boiteux, S. and J.P. Radicella, *Base excision repair of 8-hydroxyguanine protects DNA from endogenous oxidative stress*. *Biochimie*, 1999. **81**(1-2): p. 59-67.
19. Hada, M. and A.G. Georgakilas, *Formation of clustered DNA damage after high-LET irradiation: a review*. *J Radiat Res*, 2008. **49**(3): p. 203-10.
20. Georgakilas, A.G., P. O'Neill, and R.D. Stewart, *Induction and repair of clustered DNA lesions: what do we know so far?* *Radiat Res*, 2013. **180**(1): p. 100-9.
21. Pateras, I.S., et al., *The DNA damage response and immune signaling alliance: Is it good or bad? Nature decides when and where*. *Pharmacol Ther*, 2015. **154**: p. 36-56.
22. Yang, N., M.A. Chaudhry, and S.S. Wallace, *Base excision repair by hNTH1 and hOGG1: a two edged sword in the processing of DNA damage in gamma-irradiated human cells*. *DNA Repair (Amst)*, 2006. **5**(1): p. 43-51.
23. Georgakopoulou, E.A., et al., *Specific lipofuscin staining as a novel biomarker to detect replicative and stress-induced senescence. A method applicable in cryo-preserved and archival tissues*. *Aging (Albany NY)*, 2013. **5**(1): p. 37-50.

24. Majno, G. and I. Joris, *Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death*. Am J Pathol, 1995. **146**(1): p. 3-15.
25. Smilenov, L.B., et al., *A microbeam study of DNA double-strand breaks in bystander primary human fibroblasts*. Radiat Prot Dosimetry, 2006. **122**(1-4): p. 256-9.
26. Hatzi, V.I., et al., *Non-targeted radiation effects in vivo: a critical glance of the future in radiobiology*. Cancer Lett, 2015. **356**(1): p. 34-42.
27. Siva, S., et al., *Abscopal effects of radiation therapy: a clinical review for the radiobiologist*. Cancer Lett, 2015. **356**(1): p. 82-90.
28. Nagasawa, H. and J.B. Little, *Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles*. Cancer Res, 1992. **52**(22): p. 6394-6.
29. Shao, C., et al., *Targeted cytoplasmic irradiation induces bystander responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(37): p. 13495-500.
30. Morgan, W.F. and M.B. Sowa, *Non-targeted effects induced by ionizing radiation: mechanisms and potential impact on radiation induced health effects*. Cancer Lett, 2015. **356**(1): p. 17-21.
31. Mole, R.H., *Whole body irradiation; radiobiology or medicine?* Br J Radiol, 1953. **26**(305): p. 234-41.
32. Papac, R.J., *Spontaneous regression of cancer*. Cancer Treat Rev, 1996. **22**(6): p. 395-423.
33. Brush, J., et al., *Molecular mechanisms of late normal tissue injury*. Semin Radiat Oncol, 2007. **17**(2): p. 121-30.
34. Stone, H.B., et al., *Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms*. Lancet Oncol, 2003. **4**(9): p. 529-36.
35. Nobler, M.P., *The abscopal effect in malignant lymphoma and its relationship to lymphocyte circulation*. Radiology, 1969. **93**(2): p. 410-2.
36. Khan, M.A., R.P. Hill, and J. Van Dyk, *Partial volume rat lung irradiation: an evaluation of early DNA damage*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1998. **40**(2): p. 467-76.
37. Havaki, S., et al., *The role of oxidative DNA damage in radiation induced bystander effect*. Cancer Lett, 2015. **356**(1): p. 43-51.
38. Sprung, C.N., et al., *Immunological markers that predict radiation toxicity*. Cancer Lett, 2015. **368**(2): p. 191-7.
39. Redon, C.E., et al., *Tumors induce complex DNA damage in distant proliferative tissues in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(42): p. 17992-7.
40. Κούτρας, Α.Κ., *Διδακτορική Διατριβή ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ p27kip1 ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ p34cdc2 ΣΕ ΕΝΤΟΠΙΣΜΕΝΟ ΠΟΡΟΓΕΝΕΣ ΔΙΗΘΗΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΜΕ ΣΤΟΧΟ ΤΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΠΙΘΑΝΗΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΜΕ ΚΛΑΣΣΙΚΟΥΣ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΛΙΚΗ ΕΚΒΑΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ*. 2003: ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ.

Παράρτημα

ΠΙΝΑΚΕΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

ΘΕΤΙΚΑ ΣΤΡΩΜΑΤΙΚΑ ΕΝΤΕΡΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΤΗΝ 8-oxoguanine					
	CONTROL	BB 40 Gy 24 hrs	BB 40 Gy 96 hrs	BB 10 Gy 24 hrs	BB 10 Gy 96 hrs
Αριθμός θετικών κυττάρων ανά οπτικό πεδίο	9	23	33	35	41
	10	30	27	34	32
	17	40	26	39	36
	12	20	31	42	56
	3	27	35	36	28
	7	35	40	39	39
	9	27	43	45	36
	10	34	36	40	45
	13	35	37	35	38
	11	40	23	43	42
	15	29	37	37	37
	8	33	19	33	38
	9				
	8				
	14				
Μέση τιμή	10,3	31,1	32,3	38,2	39
Σφάλμα	2	3,7	4,6	2,5	4,5
p-value	-	0,001	0,001	0	0

ΘΕΤΙΚΑ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΕΝΤΕΡΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΤΗΝ 8-oxoguanine					
	CONTROL	BB 40 Gy 24 hrs	BB 40 Gy 96 hrs	BB 10 Gy 24 hrs	BB 10 Gy 96 hrs
Αριθμός θετικών κυττάρων ανά οπτικό πεδίο	1	9	18	10	12
	3	10	10	15	8
	2	18	11	9	7
	0	6	9	8	7
	0	10	7	5	6
	2	11	12	9	10
	3	5	9	13	5
	2	7	8	10	8
	4	19	12	15	6
	0	11	5	12	9
	3	15	7	11	6
	2	13	4	7	8
	0				
	2				
0					
Μέση τιμή	1,6	11,2	9,3	10,3	7,7
Σφάλμα	0,8	2,8	1,7	2	1,2
p-value	-	0,002	0,003	0,001	0,001

Θετικά εντερικά κύτταρα στην ki-67					
	CONTROL	BB 40 Gy 24hrs	BB 40 Gy 96hrs	BB 10 Gy 24hrs	BB 10 Gy 96hrs
Αριθμός θετικών κυττάρων ανά κρύπτη	25	15	8	18	15
	23	3	19	24	22
	39	1	14	19	16
	37	9	22	15	17
	36	8	17	14	28
	21	2	11	20	18
	27	10	3	17	19
	21	7	1	16	20
	34	5	9	18	15
	36	9	6	20	21
	23	10	11	33	15
	19	13	8	29	10
	17	15	7	36	10
	15	9	2	33	7

	18	2	12	22	16
	20	6	10	30	10
	12	1	19	28	5
	26	8	15	25	14
	20	0	5	27	9
	25	10	4	23	18
	24	9	17	11	20
	27	12	14	28	14
	16	14	12	12	16
	20	13	5	7	11
	29	2	13	15	16
	31	8	23	6	14
	17	9	16	14	17
	32	4	12	10	17
	34	10	10	13	19
	30	19	9	9	13
	18	16	20	24	25
	26	20	11	21	16
	24	19	19	26	5
	21	17	10	20	17
	28	10	13	22	20
	19	14	10	18	24
	18	13	5	23	23
	25	15	6	19	15
	22	18	13	17	10
	20	9	15	22	14
Μέση Τιμή	24,4	9,9	11,4	20,1	15,8
Σφάλμα	2,2	1,5	1,8	2,3	1,7
p-value	-	0,024	0,024	0,418	0,088