



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

---

ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΚΗΣ

Μελέτη Ακτινοευαισθησίας Καρκινικής Σειράς A431 με χρήση έξι (6)  
κινολογινικών παραγώγων

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Δέλλιος Δημήτριος

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή Ε.Μ. ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟΥ

Υπεύθυνος: Καθ. Γαζής Ευάγγελος

Καθ. Βλαστού Ρόζα

Καθ. Μαλτέζος Σταύρος

Επιβλέπουσα: Μαρία Παραβατού Ερευνήτρια Β' ΕΚΕΦΕ «Δ»

ΑΘΗΝΑ 2015

# Περιεχόμενα

1. Περίληψη .....	5
2. Abstract.....	6
3. Θεωρητικό Μέρος .....	7
3.1. Ιοντίζουσα Ακτινοβολία.....	7
3.1.1. Γενικά.....	7
3.1.2. Είδη Ιοντίζουσας Ακτινοβολίας.....	8
3.1.2.1. Άμεσα Ιοντίζουσα.....	8
3.1.2.2. Έμμεσα Ιοντίζουσα.....	12
3.1.3. Στάδια αλληλεπίδρασης ακτινοβολίας με την ύλη.....	13
3.1.4. Επιπτώσεις της ακτινοβολίας σε ζωντανούς οργανισμούς.....	16
3.1.5. Επιπτώσεις της ακτινοβολίας στην υγεία.....	19
3.1.6. Θεραπεία Καρκίνου.....	21
3.1.7. Ακτινοθεραπεία – ακτινοευαισθησία.....	22
3.2. Στρατηγικές αύξησης ακτινοευαισθησίας όγκου με φάρμακα στόχευσης.....	24
3.2.1. Πως χρησιμοποιείται η ακτινοθεραπεία σήμερα.....	24
3.2.2. Στρατηγικές αύξησης της απόκρισης του όγκου στην ακτινοθεραπεία.....	25
3.2.3. Μηχανισμοί κυτταρικής απόκρισης στις βλάβες του DNA.....	25
3.2.4. Τροποποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών.....	28
3.3. Μοριακή Στόχευση Του Υποδοχέα Του Επιδερμικού Αυξητικού Παράγοντα (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) .....	30
3.3.1. Τι είναι ο EGFR .....	30
3.3.2. EGFR: ένας καλός «στόχος» για την ραδιοφαρμακευτική.....	33

3.3.3. Μόρια στόχευσης του EGFR .....	33
3.4. Κιναζολίνες.....	34
3.4.1. Τι είναι οι κιναζολίνες και πως επιδρούν στην καταπολέμηση του καρκίνου.....	34
3.5. Ραδιοφάρμακα .....	36
3.5.1. Γενικά περί ραδιοφαρμάκων.....	36
3.5.2. Ραδιοφάρμακα για διάγνωση .....	36
3.5.3. Ραδιοφάρμακα για θεραπεία .....	37
3.5.4. Κιναζολίνες ως ραδιοφάρμακα .....	37
4. Πειραματικός μέρος.....	39
4.1. Σκοπός της παρούσας εργασίας.....	39
4.2. Κυτταρικές καλλιέργειες.....	41
4.2.1. Εξοπλισμός και Υλικά.....	41
4.2.2. Απόψυξη κυτταρικής σειράς.....	42
4.2.3. Καλλιέργεια κυττάρων.....	42
4.2.4. Ανακαλλιέργεια κυττάρων.....	42
4.2.5. Ψύξη κυττάρων.....	43
4.2.6. Μέτρηση κυττάρων με αιματοκυτταρόμετρο.....	43
4.3. Ακτινοβόληση Δειγμάτων.....	44
4.4. Αποτελέσματα – Συμπεράσματα.....	45
4.4.1. Δοκιμασία τοξικότητας (Μέθοδος ΜΓΤ) .....	45
4.4.1.1. Εξοπλισμός και Υλικά.....	45
4.4.1.2. Μέθοδος.....	46
4.4.1.3. Επεξεργασία Αποτελεσμάτων Δοκιμασίας Κυτταροτοξικότητας ΜΓΤ των κιναζολινών προς ακτινοβόληση.....	46
4.4.2. Συνδυαστική Δράση Ακτινοβολίας και κιναζολινικών παραγώγων.....	49

4.4.2.1. Εξοπλισμός και Υλικά.....	50
4.4.2.2. Πρωτόκολλο Μεθόδου.....	50
4.4.2.3. Επεξεργασία Μετρήσεων.....	51
4.4.3. Συμπεράσματα.....	53
5. Βιβλιογραφία.....	54
6. Ευχαριστίες.....	59

# 1. Περίληψη

Περίπου 50% των ασθενών που πάσχουν από καρκίνο θα υποστούν ακτινοθεραπεία κάποιας μορφής, είτε αποκλειστικά είτε σε συνεργασία με χημειοθεραπεία ή χειρουργική επέμβαση. Για ορισμένους καρκίνους, τα ποσοστά επιβίωσης του ασθενή μετά την ακτινοθεραπεία είναι αρκετά υψηλά (για παράδειγμα στον καρκίνο του λάρυγγα σε πρώιμη μορφή και στον καρκίνο του πνεύμονα). Αντίθετα, για πολλά άλλα είδη καρκίνων, τα ποσοστά επιβίωσης του ασθενή μετά την ακτινοθεραπεία παραμένουν πολύ χαμηλά (για παράδειγμα στο γλοιωβλάστωμα ή σε προχωρημένο καρκίνο του πνεύμονα).

**Συνοπώς κάθε βελτίωση στην αποδοτικότητα της ακτινοθεραπείας θα έχει όφελος σε ένα μεγάλο ποσοστό ασθενών.**

Οι ασθενείς των οποίων οι όγκοι χαρακτηρίζονται από υπερέκφραση του υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα EGF (EGFR) δεν ανταποκρίνονται καλά στην ακτινοθεραπεία. Οι κιναζολίνες, μόρια αναστολείς των σηματοδοτικών μονοπατιών του EGFR, που χρησιμοποιούνται και ως αντικαρκινικά φάρμακα, είναι γνωστό από την βιβλιογραφία ότι αυξάνουν την ακτινοευαισθησία των κυττάρων που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα. Στο ΕΚΕΦΕ «Δ» έχουν συντεθεί και χαρακτηριστεί χημικά πολλά νέα παράγωγα κιναζολινών με απώτερο στόχο την διάγνωση και θεραπεία καρκίνων που υπερεκφράζουν τον EGFR.

Στην παρούσα εργασία, παρουσιάζουμε μέρος της βιολογικής αξιολόγησης πέντε νέων παραγώγων των κιναζολινών. Η αξιολόγηση περιλαμβάνει την δοκιμασία της κυτταροτοξικότητας που επιτρέπει τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του φαρμάκου, η οποία αναστέλλει το 50% της κυτταρικής επιβίωσης, καθώς και δοκιμασία ακτινοευαισθητοποίησης της ανθεκτικής κυτταρικής σειράς A431.

## 2. Abstract

Approximately 50% of patients with cancer will undergo some form of radiation therapy, either exclusively or in conjunction with chemotherapy or surgery. For some cancers, the survival rates of patients after radiation is high enough (for example in the larynx cancer in early stages and in lung cancer). On the other hand, patient survival rates after radiotherapy for many other types of cancer remain very low (for example glioblastoma or advanced cancer of the lung).

**Thus any improvement in the efficiency of radiation therapy will benefit a large proportion of patients.**

Patients whose tumors are characterized by overexpression of the receptor of the growth factor EGF (EGFR) do not respond well to radiation therapy. The quinazolines, molecules inhibitors of the EGFR signaling pathways, which are used as anticancer drugs, are known from the literature to increase the radiosensitivity of cells overexpressing the receptor. In NCSR "D" several new quinazoline derivatives have been synthesized and characterized chemically with a view to the diagnosis and treatment of cancers that overexpress EGFR.

In this paper, we present part of the biological evaluation of five new analogues of quinazolines. The assessment includes testing the cytotoxicity, which allows calculation of the drug concentration that inhibits 50% of cell survival and radiosensitization test of the resistant cell line A431.

# 3. Θεωρητικό Μέρος

Αρχικά θα αναλυθεί σε βάθος, στα πλαίσια της εργασίας, η ιοντίζουσα ακτινοβολία, η φύση της και πως δημιουργείται και χρησιμοποιείται. Εκτενής αναφορά θα γίνει στις επιπτώσεις της σε ζωντανούς οργανισμούς και στην ανθρώπινη υγεία και πως μπορεί ελεγχόμενα να χρησιμοποιηθεί στην καταπολέμηση καρκινικών κυττάρων.

## 3.1. Ιοντίζουσα Ακτινοβολία

### 3.1.1. Γενικά

Η ιοντίζουσα ακτινοβολία είναι η ακτινοβολία που μεταφέρει αρκετή ενέργεια για να ελευθερώσει ηλεκτρόνια από άτομα ή μόρια, μετατρέποντάς τα κατά συνέπεια σε ιόντα με αυτόν τον τρόπο. Η ιοντίζουσα ακτινοβολία αποτελείται από ενεργητικά υποατομικά σωματίδια, ιόντα ή άτομα που κινούνται με σχετικιστικές ταχύτητες, και ηλεκτρομαγνητικά κύματα στο τέλος του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος της υψηλής ενέργειας.

Οι ακτίνες γάμμα, οι ακτίνες X, και το υψηλότερο υπεριώδες τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος θεωρούνται ιοντίζουσες ακτινοβολίες. Το κατώτερο υπεριώδες τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, το ορατό φως (συμπεριλαμβανομένων σχεδόν όλων των τύπων του φωτός λέιζερ), οι υπέρυθρες, τα μικροκύματα και τα ραδιοκύματα θεωρούνται μη ιοντίζουσες ακτινοβολίες. Τα όρια μεταξύ ιοντίζουσας και μη ιοντίζουσας ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας που λαμβάνει χώρα στο υπεριώδες δεν είναι σαφώς καθορισμένα, δεδομένου ότι διαφορετικά μόρια και άτομα ιονίζονται σε διαφορετικές ενέργειες. Ο συμβατικός ορισμός τοποθετεί τα όρια σε μια ενέργεια φωτονίων μεταξύ 10 eV και 33 eV στο υπεριώδες φάσμα.

Τυπικά ιοντίζοντα υποατομικά σωματίδια από ραδιενέργεια περιλαμβάνουν τα σωματίδια άλφα, τα σωματίδια βήτα και τα νετρόνια. Σχεδόν όλα τα προϊόντα της ραδιενεργού διάσπασης είναι ιοντίζοντα, επειδή η ενέργεια της είναι συνήθως πολύ μεγαλύτερη από αυτή που απαιτείται για τον ιοντισμό. Άλλα υποατομικά ιοντίζοντα σωματίδια που απαντώνται στη φύση είναι τα μίονια, τα μεσόνια, τα ποζιτρόνια, τα νετρόνια και άλλα σωματίδια που αποτελούν τις δευτερογενείς κοσμικές ακτίνες που παράγονται μετά από την αλληλεπίδραση πρωτογενών κοσμικών ακτινών με την ατμόσφαιρα της Γης [1][2]. Οι κοσμικές ακτίνες μπορούν επίσης να παράγουν ραδιοϊσότοπα στη Γη (για παράδειγμα, άνθρακα-14), τα οποία με τη σειρά τους διασπώνται και παράγουν ιοντίζουσα ακτινοβολία.

Οι κοσμικές ακτίνες και η διάσπαση των ραδιενεργών ισοτόπων είναι οι πρωτογενείς πηγές φυσικής ιοντίζουσας ακτινοβολίας στη Γη που αναφέρεται ως ακτινοβολία υποβάθρου.

Στο διάστημα, οι φυσικές εκπομπές θερμικής ακτινοβολίας από την ύλη σε εξαιρετικά υψηλές θερμοκρασίες (π.χ. εκκένωση πλάσματος ή το «στέμμα» του Ήλιου) μπορεί να είναι ιοντίζουσες. Η ιοντίζουσα ακτινοβολία μπορεί να παραχθεί φυσικά από την επιτάχυνση φορτισμένων σωματιδίων από φυσικά ηλεκτρομαγνητικά πεδία (π.χ. κεραυνούς), αν και αυτό είναι σπάνιο στη Γη. Φυσικές εκρήξεις σουπερνόβα (supernova) στο διάστημα παράγουν μεγάλο ποσοστό ιοντίζουσας ακτινοβολίας κοντά στην έκρηξη, κάτι που μπορεί να φανεί από τις επιπτώσεις στα λαμπερά νεφελώματα που συνδέονται με αυτά.

Η ιοντίζουσα ακτινοβολία μπορεί επίσης να παραχθεί τεχνητά χρησιμοποιώντας σωλήνες ακτινών X, επιταχυντές σωματιδίων, και οποιαδήποτε από τις διάφορες μεθόδους που παράγουν ραδιοϊσότοπα τεχνητά.

Η ιοντίζουσα ακτινοβολία είναι αόρατη και δεν είναι άμεσα ανιχνεύσιμη από τις ανθρώπινες αισθήσεις, οπότε είναι απαραίτητα συγκεκριμένα όργανα ανίχνευσης ακτινοβολίας, όπως μετρητές Geiger. Ωστόσο, η ιοντίζουσα ακτινοβολία μπορεί να οδηγήσει σε δευτερεύουσα εκπομπή ορατού φωτός κατά την αλληλεπίδραση με την ύλη, όπως στην Cherenkov ακτινοβολία και στον ραδιοφωσφορισμό.

Η ιοντίζουσα ακτινοβολία εφαρμόζεται εποικοδομητικά σε ένα ευρύ φάσμα τομέων, όπως η ιατρική, η έρευνα, η κατασκευή, και σε πολλούς άλλους τομείς, αλλά παρουσιάζει κίνδυνο για την υγεία, εάν δεν λαμβάνονται κατάλληλα μέτρα κατά της ανεπιθύμητης έκθεσης. Η έκθεση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία προκαλεί βλάβη σε ζωντανούς ιστούς, και μπορεί να οδηγήσει σε μεταλλάξεις, σε ασθένειες που οφείλονται στην ακτινοβολία, σε καρκίνο, και στο θάνατο.

## 3.1.2. Είδη Ιοντίζουσας Ακτινοβολίας

Η ιοντίζουσα ακτινοβολία έχει κατηγοριοποιηθεί από τη φύση των σωματιδίων ή των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων που δημιουργούν το φαινόμενο ιοντισμού. Αυτά έχουν διαφορετικούς μηχανισμούς ιοντισμού, και μπορούν να ομαδοποιηθούν χαρακτηρίζοντας την ακτινοβολία ως άμεσα ή έμμεσα ιοντίζουσα.

### 3.1.2.1. Άμεσα Ιοντίζουσα

Κάθε φορτισμένο σωματίδιο που έχει μάζα μπορεί να ιοντίζει άτομα ευθέως από θεμελιώδη αλληλεπίδραση μέσω της δύναμης Coulomb, μόνον εάν φέρει επαρκή κινητική ενέργεια. Αυτό περιλαμβάνει ατομικούς πυρήνες, ηλεκτρόνια, μίονια, φορτισμένα πιόνια, πρωτόνια και πυρήνες ενεργητικά φορτισμένους που δεν περιέχουν ηλεκτρόνια. Όλα τα παραπάνω πρέπει να κινούνται με σχετικιστικές ταχύτητες για να επιτευχθεί η απαιτούμενη κινητική ενέργεια. Στις δύο πρώτες πηγές ιοντίζουσων που αναγνωρίστηκαν δόθηκαν ειδικά ονόματα που χρησιμοποιούνται σήμερα: Οι πυρήνες ηλίου σε σχετικιστικές ταχύτητες ονομάζονται σωματίδια άλφα, και τα ηλεκτρόνια σε σχετικιστικές ταχύτητες



ονομάζονται σωματίδια βήτα. Οι φυσικές κοσμικές ακτίνες αποτελούνται κυρίως από σχετικιστικά πρωτόνια, αλλά περιλαμβάνουν επίσης βαρύτερους πυρήνες, όπως ιόντα του ηλίου, ιόντα HZE και μόνια. Τα φορτισμένα πιόνια είναι πολύ βραχύβια και μπορούμε να τα δούμε μόνο σε μεγάλες ποσότητες σε επιταχυντές σωματιδίων.

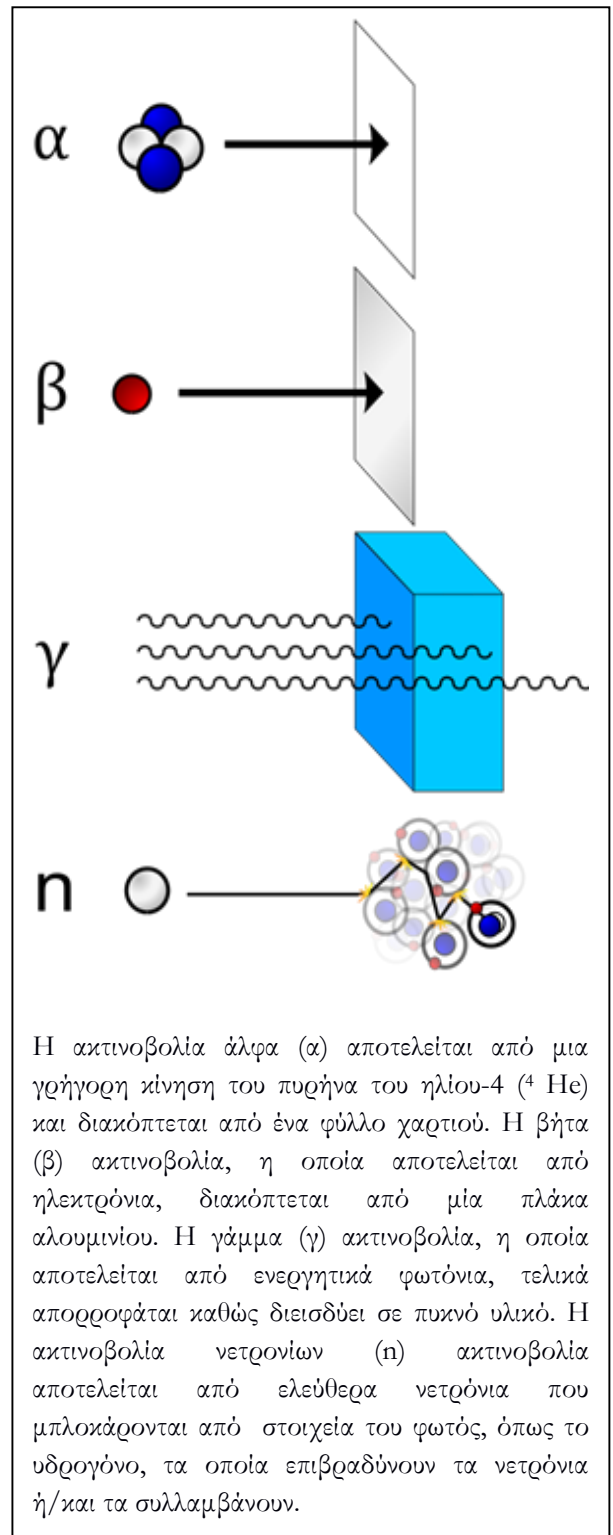
### Σωματίδια άλφα

Τα σωματίδια άλφα αποτελούνται από δύο πρωτόνια και δύο νετρόνια που συνδέονται μαζί σε ένα σωματίδιο και είναι παρόμοια με πυρήνα ηλίου. Εκπομπές σωματιδίων άλφα γενικά παράγονται κατά τη διαδικασία της άλφα διάσπασης, αλλά μπορούν επίσης να παραχθούν με άλλους τρόπους. Τα σωματίδια άλφα ονομάζονται από το πρώτο γράμμα της ελληνικής αλφαβήτου, α. Το σύμβολο για τα σωματίδια άλφα είναι α ή  $\alpha^{2+}$ . Επειδή είναι παρόμοια με πυρήνες ηλίου, μερικές φορές γράφονται ως  $\text{He}^{2+}$  ή  ${}^4_2\text{He}^{2+}$  υποδεικνύοντας ιόντα ηλίου με φορτίο +2 (λείπουν δύο ηλεκτρόνια του). Εάν το ιόν κερδίζει ηλεκτρόνια από το περιβάλλον του, το σωματίδιο άλφα μπορεί να γραφτεί ως ένα φυσιολογικό (ηλεκτρικώς ουδέτερο) άτομο ηλίου  ${}^4_2\text{He}$ .

Τα σωματίδια άλφα είναι μια πολύ ιοντίζουσα μορφή ακτινοβολίας των σωματιδίων, και όταν αυτά προκύπτουν από ραδιενεργή διάσπαση άλφα έχουν μικρή ικανότητα διείσδυσης (σε μικρό βάθος). Μπορούν να εμποδιστούν από μερικά εκατοστά του αέρα, ή από το δέρμα. Πιο ισχυρά, μεγάλοι μήκους σωματίδια άλφα που προκύπτουν από τριαδική σχάση είναι τρεις φορές πιο ενεργητικά, και μπορούν να διεισδύσουν τρεις φορές πιο μακριά. Οι πυρήνες ηλίου, που αποτελούν το 10-12% των κοσμικών ακτίνων, είναι επίσης συνήθως πολύ υψηλότερης ενέργειας από ό, τι εκείνοι που παράγονται με μεθόδους πυρηνικής διάσπασης, και είναι έτσι σε θέση να διασχίσουν το ανθρώπινο σώμα αλλά και πυκνή θωράκιση.

### Σωματίδια βήτα

Τα σωματίδια βήτα είναι υψηλής ενέργειας, υψηλής ταχύτητας ηλεκτρόνια ή ποζιτρόνια που εκπέμπονται από ορισμένες μορφές ραδιενεργών πυρήνων, όπως το κάλιο-40. Η παραγωγή των σωματιδίων βήτα ονομάζεται βήτα



διάσπαση. Έχουν οριστεί από το ελληνικό γράμμα βήτα ( $\beta$ ). Υπάρχουν δύο μορφές της βήτα διάσπασης, η  $\beta^-$  και η  $\beta^+$ , οι οποίες δίνουν ως παράγωγα αντίστοιχα ηλεκτρόνιο και ποζιτρόνιο.[3]

Όταν κάτι λέγεται ότι έχει ραδιενεργό μόλυνση, αυτό συχνά σημαίνει ότι υπάρχουν βήτα σωματίδια που εκπέμπονται από την επιφάνεια του, ανιχνεύσιμα με έναν μετρητή Geiger ή άλλο ανιχνευτή ακτινοβολίας. Όταν φέρεται κοντά στον βήτα εκπομπό, ο ανιχνευτής θα δείξει δραματική αύξηση σε ραδιενέργεια. Όταν ο ανιχνευτής καλύπτεται με ένα προστατευτικό κάλυμμα για να εμποδίσει τις ακτίνες βήτα, η ένδειξη θα μειωθεί δραματικά.

Τα σωματίδια βήτα υψηλής ενέργειας μπορούν να παράγουν ακτίνες X γνωστές ως ακτινοβολία επιβράδυνσης («ακτινοβολία πέδησης») ή δευτερογενή ηλεκτρόνια (ακτίνες δέλτα) καθώς περνούν μέσω της ύλης. Και τα δύο αυτά είδη ακτινοβολίας μπορούν να προκαλέσουν έμμεση επίδραση ιοντισμού.

Η ακτινοβολία πέδησης μπορεί να είναι ανησυχητική, όταν κατά την θωράκιση βήτα εκπομπών, η αλληλεπίδραση των σωματιδίων βήτα με το υλικό θωράκισης παράγει ακτινοβολία πέδησης. Αυτή η επίδραση είναι μεγαλύτερη σε υλικά υψηλών ατομικών αριθμών, οπότε για θωράκιση πηγών βήτα χρησιμοποιούνται υλικά με χαμηλούς ατομικούς αριθμούς.

## Ποζιτρόνια και τα άλλα είδη αντιύλης

Το ποζιτρόνιο ή αντισωματίδιο είναι το αντισωματίδιο ή η αντιύλη του ηλεκτρονίου. Όταν ένα χαμηλής ενέργειας ποζιτρόνιο συγκρούεται με ένα χαμηλής ενέργειας ηλεκτρόνιο, συμβαίνει μηδενισμός, με αποτέλεσμα την μετατροπή τους σε ενέργεια δύο ή περισσότερων φωτονίων ακτινών γάμμα.

Τα ποζιτρόνια μπορεί να παράγονται μέσω πυρηνικής διάσπασης που παράγει ποζιτρόνια (μέσω ασθενών αλληλεπιδράσεων), ή με την παραγωγή ζεύγους από ένα επαρκώς ενεργητικό φωτόνιο. Τα ποζιτρόνια είναι κοινές τεχνητές πηγές ιοντίζουσας ακτινοβολίας που χρησιμοποιούνται στην ιατρική τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET).

Καθώς τα ποζιτρόνια είναι θετικά φορτισμένα σωματίδια μπορούν επίσης να ιοντίζουν απευθείας ένα άτομο μέσω αλληλεπιδράσεων Coulomb.

## Φωτονική Ακτινοβολία

Ακόμα κι αν τα φωτόνια είναι ηλεκτρικά ουδέτερα, μπορούν να ιοντίζουν άτομα απευθείας μέσω του φωτοηλεκτρικού φαινομένου και του φαινομένου Compton. Οποιαδήποτε από τις δύο αλληλεπιδράσεις θα προκαλέσει την εκτίναξη ενός ηλεκτρονίου από ένα άτομο σε σχετικιστικές ταχύτητες, μετατρέποντας αυτό το ηλεκτρόνιο σε ένα σωματίδιο βήτα (δευτερεύον σωματίδιο βήτα), που θα ιοντίσει πολλά άλλα άτομα. Δεδομένου ότι τα περισσότερα από τα επηρεαζόμενα άτομα ιοντίζονται άμεσα από τα δευτερεύοντα σωματίδια βήτα, τα φωτόνια αποτελούν έμμεση ιοντίζουσα ακτινοβολία.[4]

Η ακτινοβολία φωτονίων ονομάζεται ακτίνες γάμμα εάν παράγεται από μια πυρηνική αντίδραση, από διάσπαση υποατομικών σωματιδίων, ή ραδιενεργό διάσπαση στο εσωτερικό του πυρήνα. Αλλιώς ονομάζεται ακτίνες X που παράγονται έξω από τον πυρήνα. Ο γενικός όρος «ακτινοβολία φωτονίων» επομένως χρησιμοποιείται για να περιγράψει και τις δύο.[5][6][7]

Οι ακτίνες X έχουν συνήθως χαμηλότερη ενέργεια από τις ακτίνες γάμμα, και μια παλαιότερη σύμβαση ήταν να ορίζεται το όριο μεταξύ των δύο ως μήκος κύματος  $10^{-11}$  m ή ένα φωτόνιο ενέργειας 100 keV. [8] Το όριο αυτό προήλθε από τους περιορισμούς παλαιότερων λυχνιών ακτίνων X και περιορισμένης γνώσης περί ισομερών μεταπτώσεων. Οι σύγχρονες τεχνολογίες και ανακαλύψεις οδήγησαν σε μια επικάλυψη μεταξύ ενεργειών των ακτίνων X και των ακτίνων γάμμα. Σε πολλούς τομείς έχουν την ίδια λειτουργία, διαφέροντας σε επίγειες μελέτες μόνο στην προέλευση της ακτινοβολίας. Στην αστρονομία, εντούτοις, όπου η προέλευση της ακτινοβολίας συχνά δεν είναι δυνατόν να προσδιοριστεί με αξιοπιστία, ο παλαιότερος συμβατικός διαχωρισμός έχει διατηρηθεί, με τις ακτίνες X να ορίζονται μεταξύ περίπου 120 eV και 120 keV και τις ακτίνες γάμμα ως οποιαδήποτε ενέργεια άνω των 100 έως 120 keV, ανεξάρτητα από την πηγή.

Η φωτοηλεκτρική απορρόφηση είναι ο κυρίαρχος μηχανισμός σε οργανικά υλικά για φωτονικές ενέργειες κάτω των 100 keV, τυπικές για ακτίνες X που προέρχονται από κλασικό σωλήνα ακτίνων X. Σε ενέργειες πέρα των 100 keV, τα φωτόνια ionτίζουν την ύλη όλο και περισσότερο μέσω του φαινομένου Compton, και στη συνέχεια, έμμεσα, μέσω της διδυμης γένεσης σε ενέργειες πέρα των 5 MeV. Σε κάθε φαινόμενο σκέδασης, η ακτίνα γάμμα μεταφέρει ενέργεια σε ένα ηλεκτρόνιο, το οποίο συνεχίζει την πορεία του σε διαφορετική κατεύθυνση και με μειωμένη ενέργεια.

## Φορτισμένοι πυρήνες

Οι φορτισμένοι πυρήνες είναι χαρακτηριστικό των γαλαξιακών κοσμικών ακτίνων και των γεγονότων ηλιακών σωματιδίων και δεν έχουν φυσικές πηγές στη γη. Στο διάστημα, ωστόσο, πρωτόνια πολύ υψηλής ενέργειας, πυρήνες ηλίου, και ιόντα HZE μπορεί να εμποδιστούν αρχικά με σχετικώς λεπτές στιβάδες θωράκισης, τα ρούχα, ή το δέρμα. Ωστόσο, η προκύπτουσα αλληλεπίδραση θα δημιουργήσει δευτερογενή ακτινοβολία και θα προκαλέσει κλιμακωτές βιολογικές επιδράσεις. Εάν μόνο ένα άτομο ιστού μετατοπιστεί από ένα ενεργητικό πρωτόνιο, για παράδειγμα, η σύγκρουση θα προκαλέσει περαιτέρω αλληλεπιδράσεις στο σώμα. Αυτό ονομάζεται «γραμμική μεταφορά ενέργειας» (Linear Energy Transfer-LET), που χρησιμοποιεί την ελαστική σκέδαση.

Η LET μπορεί να απεικονιστεί ως μια μπάλα του μπιλιάρδου που χτυπά μία άλλη με τον τρόπο της διατήρησης της ορμής, αποστέλλοντας και τις δύο μακριά με την ενέργεια της πρώτης μπάλας να κατανέμεται μεταξύ των δύο άνισα. Όταν ένας φορτισμένος πυρήνας επιτυγχάνει έναν σχετικά αργά κινούμενο πυρήνα ενός αντικειμένου στο χώρο, συμβαίνει η LET και νετρόνια, σωματίδια άλφα, χαμηλής ενέργειας πρωτόνια και άλλοι πυρήνες θα απελευθερωθούν από τις συγκρούσεις και θα συμβάλουν στη συνολική απορροφώμενη δόση των ιστών.[9]

### 3.1.2.2. Έμμεσα Ιοντίζουσα

Η έμμεσα ιοντίζουσα ακτινοβολία είναι ηλεκτρικά ουδέτερη και ως εκ τούτου δεν αλληλεπιδρά έντονα με την ύλη. Το μεγαλύτερο μέρος των επιδράσεων ιοντισμού οφείλονται σε δευτερεύοντες ιοντισμούς.

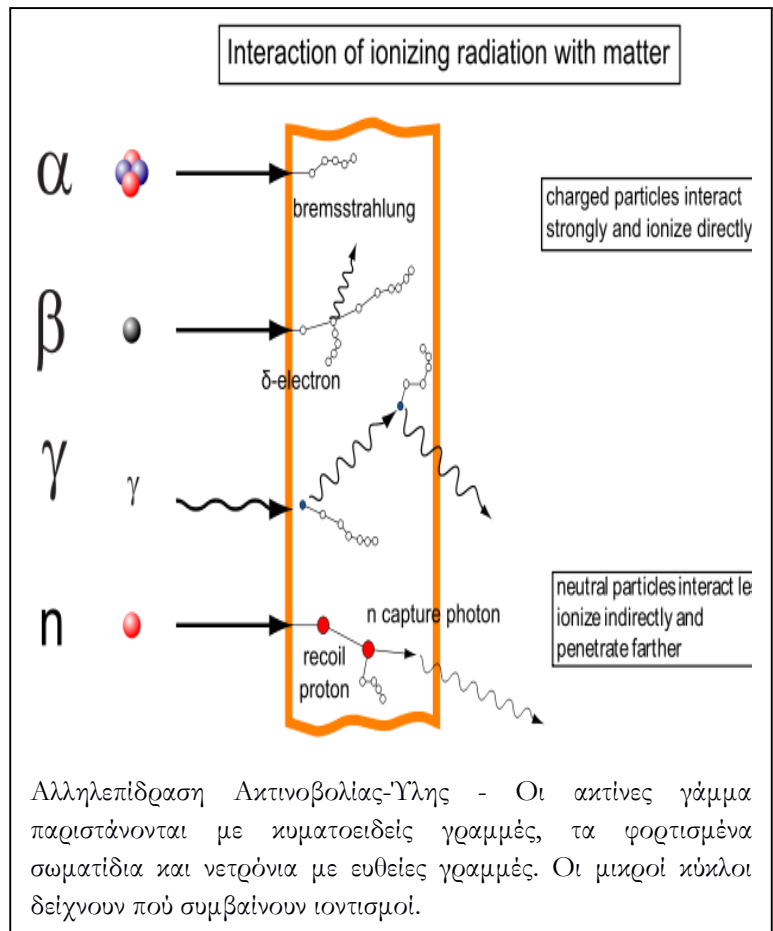
Ένα παράδειγμα έμμεσης ιοντίζουσας ακτινοβολίας είναι η ακτινοβολία νετρονίων.

#### Νετρόνια

Τα νετρόνια έχουν μηδενικό ηλεκτρικό φορτίο και ως εκ τούτου συχνά δεν προκαλούν άμεσα ιοντισμό σε ένα μόνο βήμα ή κατά την αλληλεπίδραση με την ύλη. Ωστόσο, γρήγορα νετρόνια θα αλληλοεπιδρούν με τα πρωτόνια στο υδρογόνο μέσω LET, και ο μηχανισμός αυτός διασκορπίζει τους πυρήνες των υλικών στην περιοχή-στόχο, προκαλώντας άμεσο ιοντισμό των ατόμων του υδρογόνου. Όταν τα νετρόνια χτυπούν τους πυρήνες του υδρογόνου, έχουν ως αποτέλεσμα ακτινοβολία πρωτονίων (γρήγορα πρωτόνια). Αυτά τα πρωτόνια είναι τα ίδια ιοντίζοντα επειδή είναι υψηλής ενέργειας, φορτίζονται, και αλληλεπιδρούν με τα ηλεκτρόνια στην ύλη.

Τα νετρόνια που χτυπούν άλλους πυρήνες εκτός του υδρογόνου θα μεταφέρουν λιγότερη ενέργεια στο άλλο σωματίδιο αν συμβεί LET. Αλλά, σε πολλούς πυρήνες που έχουν χτυπηθεί από νετρόνια, συμβαίνει ανελαστική σκέδαση. Το αν θα προκύψει ελαστική ή ανελαστική σκέδαση εξαρτάται από την ταχύτητα του νετρονίου, αν είναι γρήγορο ή θερμικό ή κάπου στο ενδιάμεσο. Επίσης, εξαρτάται από τους πυρήνες που χτυπά το νετρόνιο και από την διατομή του.

Στην ανελαστική σκέδαση, τα νετρόνια απορροφούνται εύκολα σε μια διαδικασία που ονομάζεται σύλληψη νετρονίων και αποδίδει στην ενεργοποίηση νετρονίων του πυρήνα. Οι αλληλεπιδράσεις νετρονίων με τους περισσότερους τύπους της ύλης με αυτόν τον τρόπο παράγουν συνήθως ραδιενεργούς πυρήνες. Ο πυρήνας οξυγόνου-16, για παράδειγμα, υποβάλλεται σε ενεργοποίηση νετρονίων, ταχέως διασπάται από μία εκπομπή πρωτονίου σχηματίζοντας άζωτο-16, το οποίο διασπάται σε οξυγόνο-16. Η διάσπαση του βραχύβιου αζώτου-16 εκπέμπει ισχυρή ακτινοβολία βήτα. Αυτή η διαδικασία μπορεί να γραφεί ως:



${}_{16}\text{O} (n, p) {}_{16}\text{N}$  (σύλληψη πιθανών ταχέων νετρονίων με  $> 11 \text{ MeV}$  νετρονίων)

${}_{16}\text{N} \rightarrow {}_{16}\text{O} + \beta^-$  (χρόνος ημιζωής  $t_{1/2} = 7.13 \text{ s}$ )

Αυτό το υψηλής ενέργειας  $\beta^-$  αλληλεπίδρα περαιτέρω με άλλους πυρήνες, εκπέμποντας υψηλής ενέργειας ακτίνες  $\gamma$  μέσω ακτινοβολίας πέδησης.

Αν και δεν είναι μία προτιμώμενη αντίδραση, η αντίδραση  ${}_{16}\text{O} (n, p) {}_{16}\text{N}$  αποτελεί σημαντική πηγή ακτίνων  $X$  που εκπέμπονται από το κατεψυγμένο νερό ενός αντιδραστήρα πεπιεσμένου νερού και συμβάλλει σημαντικά στην ακτινοβολία που παράγεται από ένα υδρόψυκτο πυρηνικό αντιδραστήρα ενώ λειτουργεί.

Για την καλύτερη θωράκιση των νετρονίων, χρησιμοποιούνται υδρογονάνθρακες που έχουν αφθονία σε υδρογόνο.

Σε σχάσιμα υλικά, δευτερογενή νετρόνια μπορεί να προικαλέσουν αλυσιδωτές πυρηνικές αντιδράσεις, προικαλώντας μεγαλύτερη ποσότητα ιονισμού από τα θυγατρικά προϊόντα της σχάσης.

Έξω από τον πυρήνα, τα ελεύθερα νετρόνια είναι ασταθή και έχουν μέση διάρκεια ζωής 14 λεπτών και 42 δευτερολέπτων. Τα ελεύθερα νετρόνια διασπώνται με εκπομπή ενός ηλεκτρονίου και ενός ηλεκτρονιακού αντνετρίνιου που θα γίνει πρωτόνιο, μια διαδικασία γνωστή ως βήτα διάσπαση.[10]

Στο διάγραμμα πάνω, ένα νετρόνιο συγκρούεται με ένα πρωτόνιο από το υλικό του στόχου, και στη συνέχεια γίνεται ένα γρήγορο πρωτόνιο ανάκρουσης που ιοντίζεται με τη σειρά του. Στο τέλος της διαδρομής του, το νετρόνιο συλλαμβάνεται από έναν πυρήνα σε μία  $(n, \gamma)$  -αντίδραση που οδηγεί στην εκπομπή ενός φωτονίου που μπορεί να συλλαμβάνει νετρόνια. Τέτοια φωτόνια έχουν πάντα αρκετή ενέργεια για να χαρακτηριστούν ως ιοντίζουσα ακτινοβολία.

### 3.1.3. Στάδια αλληλεπίδρασης ιοντίζουσας ακτινοβολίας με την ύλη

Κατά την αλληλεπίδραση ιοντίζουσών ακτινοβολιών με την ύλη πραγματοποιείται μια σειρά φαινομένων. Τα στάδια αλληλεπίδρασης της ακτινοβολίας με την ύλη διακρίνονται σε φυσικό, χημικό και τελικά βιολογικό, όπως συμβαίνουν διαδοχικά. Το φυσικό στάδιο αλληλεπίδρασης ακτινοβολίας-ύλης είναι και αυτό που πυροδοτεί τα δύο επόμενα στάδια, και αφορά τους μηχανισμούς εκείνους με τους οποίους αποδίδεται ενέργεια στην ύλη μέσω ιοντισμών και διεγέρσεων.

Έτσι η ακτινοβολήση κάποιου βιολογικού υλικού πυροδοτεί μια σειρά διεργασίες μέχρι τις τελικές επιπτώσεις, που εκδηλώνονται σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα, όπως φαίνεται παρακάτω.[11]

Φαινόμενο	Χρονική Κλίμακα
Αλληλεπίδραση με την ύλη	
Άμεσα iontίζουσα ακτινοβολία (e, p, α)	$10^{-16} - 10^{-14}$ sec
Έμμεσα iontίζουσα ακτινοβολία (γ, X, n)	$10^{-24} - 10^{-14}$ sec
Φυσιοχημικό Στάδιο (εναπόθεση ενέργειας)	$10^{-12} - 10^{-8}$ sec
Χημική Βλάβη (ελεύθερες ρίζες, διεγερμένα μόρια)	$10^{-7}$ sec – ώρες
Βιομοριακή Βλάβη (πρωτεΐνες, νουκλειικά οξέα κλπ.)	msec – ώρες
Πρώιμα βιολογικά αποτελέσματα (κυτταρικός θάνατος, ζωικός θάνατος)	ώρες –εβδομάδες
Όψιμα βιολογικά αποτελέσματα (πρόκληση θανάτου)	έτη – αιώνες

**Πίνακας:** Αλυσίδα σταδίων αλληλεπίδρασης iontίζουσας ακτινοβολίας και ύλης που οδηγούν σε βλάβες [12]

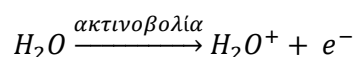
## Χημικό Στάδιο

Οι ionτισμοί και οι διεγέρσεις που συνέβησαν κατά το στάδιο επίδρασης φυσικών μηχανισμών, προκαλούν ρήξη χημικών δεσμών και δημιουργία ελεύθερων ριζών. Αυτό συνεπάγεται σε ταχείες χημικές αντιδράσεις μεταξύ των ατόμων του ακτινοβοληθέντος υλικού, και των συστατικών των υπολοίπων κυττάρων. [12]

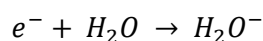
Οι ελεύθερες ρίζες, που σχηματίζονται από την επίδραση της iontίζουσας ακτινοβολίας, είναι άτομα ή μόρια ηλεκτρικά ουδέτερα που φέρουν ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική στοιβάδα. Κατά συνέπεια, είναι πολύ δραστικές επειδή είτε έχουν πολύ ισχυρή τάση να συζευχθούν με ένα μονήρες ηλεκτρόνιο ή με άλλη ελεύθερη ρίζα, είτε προσπαθούν να απαλείψουν το μονήρες ηλεκτρόνιο.

Η iontίζουσα ακτινοβολία παράγει τυχαίες διεγέρσεις και ionτισμούς μέσα σε ένα πολύπλοκο βιολογικό σύστημα. Μέσα στην έμβια ύλη, σε έναν βιολογικό οργανισμό, το μεγαλύτερο ποσοστό της απορροφηθείσας ακτινοβολίας θα αποδοθεί σε μόρια νερού και θα προκαλέσει την ραδιόλυσή του, καθώς η έμβια ύλη αποτελείται κατά 75% από νερό. Συνεπώς η μελέτη και κατανόηση της ραδιοχημείας του νερού και των ραδιοβιολογικών φαινομένων αποτελεί σημαντικό κομμάτι στην μελέτη της επίδρασης της iontίζουσας ακτινοβολίας σε ζωντανούς οργανισμούς.

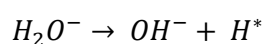
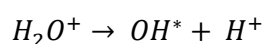
Κατά την έκθεση του νερού σε iontίζουσα ακτινοβολία, ο ionτισμός του μορίου του νερού δημιουργεί ένα ελεύθερο ηλεκτρόνιο και ένα θετικά φορτισμένο μόριο νερού σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Το ηλεκτρόνιο ( $e^-$ ) κατά την διαδρομή μέσα στο νερό του οργανισμού αποδίδει προοδευτικά την ενέργειά του μέσω διάφορων μηχανισμών, έως ότου συλληφθεί από κάποιο μόριο νερού, το οποίο μετά την σύλληψή μετατρέπεται σε αρνητικό ιόν:



Τα δύο ιόντα νερού, τόσο το θετικό όσο και το αρνητικό, διασπώνται και έχουν ως συνέπεια τον σχηματισμό ενός ιόντος και μιας ελεύθερης ρίζας, είτε υδροξυλίου, είτε υδρογόνου:

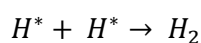


(Το \* σημαίνει ότι υπάρχει ασύζευκτο ηλεκτρόνιο ελεύθερης ρίζας)

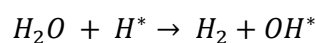
Οι ελεύθερες ρίζες που έχουν δημιουργηθεί είναι πολύ δραστικές, αντιδρούν πολύ εύκολα και ο χρόνος ζωής τους είναι μερικά εκατοντάδες μs.

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδράσουν ως εξής:

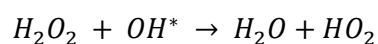
- Μεταξύ τους



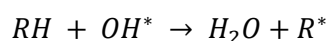
- Με μόρια νερού



- Με προϊόντα αντίδρασης



Αν συμβολίζουμε ως RH μια οργανική ένωση, τότε μία αντίδραση που μπορεί να συμβεί είναι:



Οι πρωτογενείς και οι δευτερογενείς ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδράσουν με βιολογικά μόρια και να προκαλέσουν ποικίλες ακτινοβιολογικές αλλοιώσεις και βλάβες.

Το μοριακό οξυγόνο παρουσιάζει μεγάλες ομοιότητες από χημικής πλευράς σε σχέση με τις ελεύθερες ρίζες, με αποτέλεσμα την δημιουργία επιπλέον δραστικών προϊόντων:



Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η παρουσία του οξυγόνου στο περιβάλλον των κυττάρων να προκαλεί μονιμοποίηση της βλάβης.

Το μεγαλύτερο μέρος των χημικών αντιδράσεων που προκαλούνται στα κύτταρα εξαιτίας ιοντίζουσας ακτινοβολίας, δεν έχουν ουσιαστικά αποτελέσματα σε επίπεδο επιβίωσης και λειτουργίας των κυττάρων.

Οι σημαντικές αντιδράσεις είναι εκείνες που αφορούν τις αλλοιώσεις στο γενετικό υλικό, λόγω της κρισιμότητας του DNA, στην λειτουργία και επιβίωση του κυττάρου.[11][13]

## Βιολογικό στάδιο

Στο στάδιο αυτό παρατηρούμε την εμφάνιση ενζυμικών επιδιορθωτικών μηχανισμών που δρουν στους μοριακούς σχηματισμούς που έχουν υποστεί βλάβη κατά το προηγούμενο στάδιο. Η διάρκεια επιδιόρθωσης διαρκεί από 15 min μέχρι και 1ώρα ενώ στο σύνολό της ολοκληρώνεται σε 4 ώρες.

Το μεγαλύτερο μέρος των βλαβών του DNA επιδιορθώνονται σε αυτό το χρονικό διάστημα. Οι βλάβες που δεν μπορούν να επιδιορθωθούν οδηγούν το κύτταρο σε προγραμματισμένο θάνατο -απόπτωση, ή σε ξαφνική απότομη θανάτωση – νέκρωση.[11]

## 3.1.4. Επιπτώσεις της ακτινοβολίας σε ζωντανούς οργανισμούς

Τα αποτελέσματα της επίδρασης της ιοντίζουσας ακτινοβολίας σε βιολογικούς οργανισμούς μπορούν να διακριθούν σε άμεσα ή αργότερα, επίκτητα σωματικά ή κληρονομικά και στοχαστικά ή μη. [11][14]



## Επιπτώσεις με βάση το επίπεδο βιολογικής οργάνωσης

Επίπεδο Βιολογικής Οργάνωσης	Επιδράσεις
Μοριακό	Βλάβες και αλλοιώσεις στα μακρομόρια και στις μεταβολικές διαδικασίες
Υποκυτταρικό	Βλάβες στις κυτταρικές μεμβράνες, στον πυρήνα, στα χρωμοσώματα, στα μιτοχόνδρια και στα λισσώματα
Κυτταρικό	Βλάβες στον κυτταρικό κύκλο και κατά συνέπεια στην διαίρεση με συνέπεια κυτταρικό θάνατο αλλά και πιθανή μετάπτωση όγκου σε κακοήγη
Ιστοί, Όργανα	Βλάβες στο κεντρικό νευρικό σύστημα, στον μυελό των οστών, στο γαστρεντερικό που συνεπάγονται σε δημιουργία καρκίνου
Οργανισμός	Μείωση χρόνου ζωής και θάνατος
Πληθυσμός	Μεταλλάξεις στο γονιδίωμα και χρωμοσωμικές αλλοιώσεις που συνεπάγονται σε μεταβολές στα γενετικά χαρακτηριστικά

**Πίνακας:** Ταξινόμηση Βιολογικών Βλαβών ως επίπτωση ιοντίζουσας ακτινοβολίας [12]

### Μοριακό Επίπεδο

Η βλάβες στα μόρια λόγω ακτινοβολίας μπορούν να προκληθούν μέσω ιοντισμών, διεγέρσεων και χημικών μεταβολών, με άμεση ή έμμεση επίδραση στα μόρια. Οι βλάβες σε σημαντικά μόρια, όπως του γενετικού υλικού, που συμβαίνουν λόγω χημικών διαφοροποιήσεων, είναι δυνατόν να πραγματοποιηθούν μέσα σε χρονικό διάστημα της τάξης των  $10^{-6}$  sec, ενώ η εμφάνιση της βιολογικής βλάβης μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε μέσα σε λίγες ώρες, μέρες ή ακόμα και σε μήνες, χρόνια ή ακόμα και δεκαετίες. [12]

Το μόριο που έχει τις σημαντικότερες επιδράσεις συνολικά στην λειτουργία και βιωσιμότητα του υπόλοιπου κυττάρου, είναι το μόριο του DNA. Είναι ο μόριο εκείνο που αποτελεί αναγκαίο παράγοντα δομής και λειτουργίας

του κυττάρου. Δεύτερες σε σημαντικότητα επιπτώσεων στο κύτταρο, λόγω ενδεχόμενων αλλοιώσεων ή βλαβών, είναι οι εξειδικευμένες πρωτεΐνες, όπως τα ένζυμα ή οι πρωτεΐνες των μεμβρανών του κυττάρου. Επιπλέον η ακτινοβολία μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στην σύνθεση των λιπών, των υδατανθράκων, στην κυτταρική μεμβράνη, στο ενδοπλασματικό δίκτυο, στα λισσώματα και τα μιτοχόνδρια. [12][15]

Το πιο ευαίσθητο τμήμα του DNA είναι οι αζωτούχες βάσεις της πυριμιδίνης, οι οποίες αντιδρούν εύκολα με τις ελεύθερες ρίζες του υδροξυλίου. Αυτό συνεπάγεται στην μετατροπή τους σε οργανικές ελεύθερες ρίζες και τελικά στην πλήρη καταστροφή τους. Αντιδράσεις όπως οι παραπάνω οδηγούν σε:

καταστροφή βάσεων, απελευθέρωση βάσεων, θραύση υδρογονικών δεσμών, διασταυρούμενες συνενώσεις στην ίδια έλικα πρωτεϊνικών και άλλων μορίων DNA, θραύση δεσμών μεταξύ των πολυνουκλεοτιδίων και τις έλικας

Οι θραύσεις του γενετικού υλικού διακρίνονται σε 2 είδη. Η θραύση σε μία από τις δύο έλικες (Single Strand Break – SSB), και η θραύση και στις 2 έλικες (Double Strand Break –DSB).

Ορισμένες μεταβολές από τις παραπάνω είναι αναστρέψιμες και μπορούν να από το ίδιο το DNA, μέσω επιδιορθωτικών μηχανισμών που διαθέτει. Σε αυτό βοηθάει σε μεγάλο βαθμό η αυστηρά ελικοειδής διάταξη του μορίου DNA. Σε περίπτωση βέβαια που έχουμε διαχωρισμό ή διασταυρούμενες βάσεις με άλλα νουκλεϊκά οξέα ή πρωτεΐνες, τότε η βλάβη είναι μη αναστρέψιμη και το πιο πιθανόν είναι ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος.[12]\_Αυτά θα τα αναλύσουμε παραπάνω σε επόμενο κεφάλαιο σχετικά με την απόκριση βλάβης του DNA.

## Κυτταρικό Επίπεδο

Η επίδραση της ακτινοβολίας σε κυτταρικό επίπεδο έχει να κάνει με τον τρόπο που επηρεάζει τον κυτταρικό κύκλο και συγκεκριμένα την μιτωτική φάση του. Οι αλλαγές στην μίτωση που οφείλονται στην επίδραση της ακτινοβολίας μπορεί να είναι οι παρακάτω:

- **Καθυστέρωση στην έναρξη της μίτωσης, που συνοδεύεται από φυσιολογική μίτωση.** Αυτή η καθυστέρηση ενδέχεται να οφείλεται σε βλάβη, η οποία έχει αποκατασταθεί. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε περίπτωση που δοθεί στο κύτταρο μικρή δόση ακτινοβολίας στην φάση της πρόφασης, δηλαδή πριν την έναρξη της μίτωσης. Η καθυστέρηση έχει να κάνει με αναστολή της σύνθεσης DNA, για να επιδράσουν οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί.
- **Πλήρης αναστολή της μίτωσης.** Κατά αυτόν τον τρόπο το κύτταρο συνεχίζει να υπάρχει και να λειτουργεί, χωρίς όμως να έχει την δυνατότητα να διαιρεθεί. Τα στείρα αυτά κύτταρα έχουν ημερομηνία λήξης και δεν μπορούν να δώσουν απογόνους.

Επομένως σε κυτταρικό επίπεδο, η ακτινοβολία μπορεί να προκαλέσει: κυτταρικό θάνατο, καταστολή της αύξησης του κυττάρου, χρωμοσωμικές βλάβες, περιορισμό της κινητικότητας-stress, αδενικές εκκρίσεις.

## Επίπεδο ιστών και οργάνων

Η απόκριση των οργάνων του οργανισμού ποικίλει, αν και οι επιπτώσεις της ionίζουσας ακτινοβολίας στους ιστούς είναι παρόμοιες. [12]

**Οι επιπτώσεις της ακτινοβολίας στην υγεία των ανθρώπων αναλύονται στην επόμενη παράγραφο**

### 3.1.5. Επιπτώσεις στην υγεία

Σε γενικές γραμμές, η ionίζουσα ακτινοβολία είναι επιβλαβής και δυνητικά θανατηφόρα για τα ζωντανά όντα αλλά μπορεί να έχει οφέλη για την υγεία σε θεραπεία ακτινοβολίας για τη θεραπεία του καρκίνου και την θυρεοτοξίκωση.

Οι περισσότερες ανεπιθύμητες επιπτώσεις στην υγεία από την έκθεση σε ακτινοβολία μπορεί να ταξινομηθούν σε δύο γενικές κατηγορίες:

- Αιτιοκρατικές, ντετερμινιστικές συνέπειες (επιβλαβείς αντιδράσεις ιστών) που οφείλονται κατά μεγάλο μέρος στη θανάτωση-απόπτωση / δυσλειτουργία των κυττάρων μετά από υψηλές δόσεις και
- Στοχαστικές συνέπειες, για παράδειγμα, καρκινικές και κληρονομικές επιπτώσεις που αφορούν είτε την ανάπτυξη καρκίνου σε άτομα που έχουν εκτεθεί σε ακτινοβολία λόγω μετάλλαξης των σωματικών κυττάρων είτε κληρονομική ασθένεια στους απογόνους τους, λόγω της μετάλλαξης των αναπαραγωγικών κυττάρων (φύττρα).[16]

Η πιο κοινή επίπτωση της ionίζουσας ακτινοβολίας είναι η στοχαστική διέγερση του καρκίνου σε λανθάνουσα περίοδο χρόνων ή και δεκαετιών μετά την έκθεση. Ο μηχανισμός με τον οποίο συμβαίνει αυτό είναι καλά κατανοητός, αλλά τα υπαρκτά ποσοτικά μοντέλα πρόβλεψης του επιπέδου του κινδύνου παραμένουν αμφιλεγόμενα. Το πιο ευρέως αποδεκτό μοντέλο προϋποθέτει ότι η συχνότητα εμφάνισης των καρκίνων που οφείλονται σε ionίζουσα ακτινοβολία αυξάνει γραμμικά με την αποτελεσματική δόση ακτινοβολίας σε ποσοστό 5,5% ανά Sievert.[17] Εάν αυτό το γραμμικό μοντέλο είναι σωστό, τότε ακτινοβολία λόγω φυσικού υποβάθρου είναι η πιο επικίνδυνη πηγή ακτινοβολίας για την γενική δημόσια υγεία, και ακολουθείται από την ακτινοβολία λόγω ιατρικής απεικόνισης και εφαρμογών. Άλλες στοχαστικές επιπτώσεις της ionίζουσας ακτινοβολίας είναι η τερατογένεση, η γνωστική εξασθένηση, και οι καρδιακές παθήσεις.

Η υψηλή δόση ακτινοβολίας προκαλεί ντετερμινιστικά αποτελέσματα που συμβαίνουν αξιόπιστα πάνω από ένα όριο, και η σοβαρότητά τους αυξάνει με τη δόση. Οι αιτιοκρατικές επιπτώσεις δεν είναι κατ' ανάγκη περισσότερο ή λιγότερο σοβαρές από τις στοχαστικές επιπτώσεις; είτε μπορούν τελικά να οδηγήσουν σε προσωρινή ενόχληση ή και σε θάνατο. Μερικά παραδείγματα είναι: εγκαύματα λόγω ακτινοβολίας και / ή ταχεία θνησιμότητα μέσω του συνδρόμου οξείας ακτινοβολίας, σύνδρομο χρόνιας ακτινοβολίας και θυρεοειδίτιδα που προκαλείται λόγω ακτινοβολίας.

Οι ελεγχόμενες δόσεις χρησιμοποιούνται για ιατρική απεικόνιση και την ακτινοθεραπεία, και μερικοί επιστήμονες υποπτεύονται ότι οι χαμηλές δόσεις μπορεί να έχουν ήπιες επιδράσεις που μπορούν να βελτιώσουν την υγεία[18], αλλά προς το παρόν δεν υπάρχουν αδιάσειστα στοιχεία που να δείχνουν ένα όριο δόσης κάτω από το οποίο ο κίνδυνος πρόκλησης όγκων είναι μηδέν.[19]

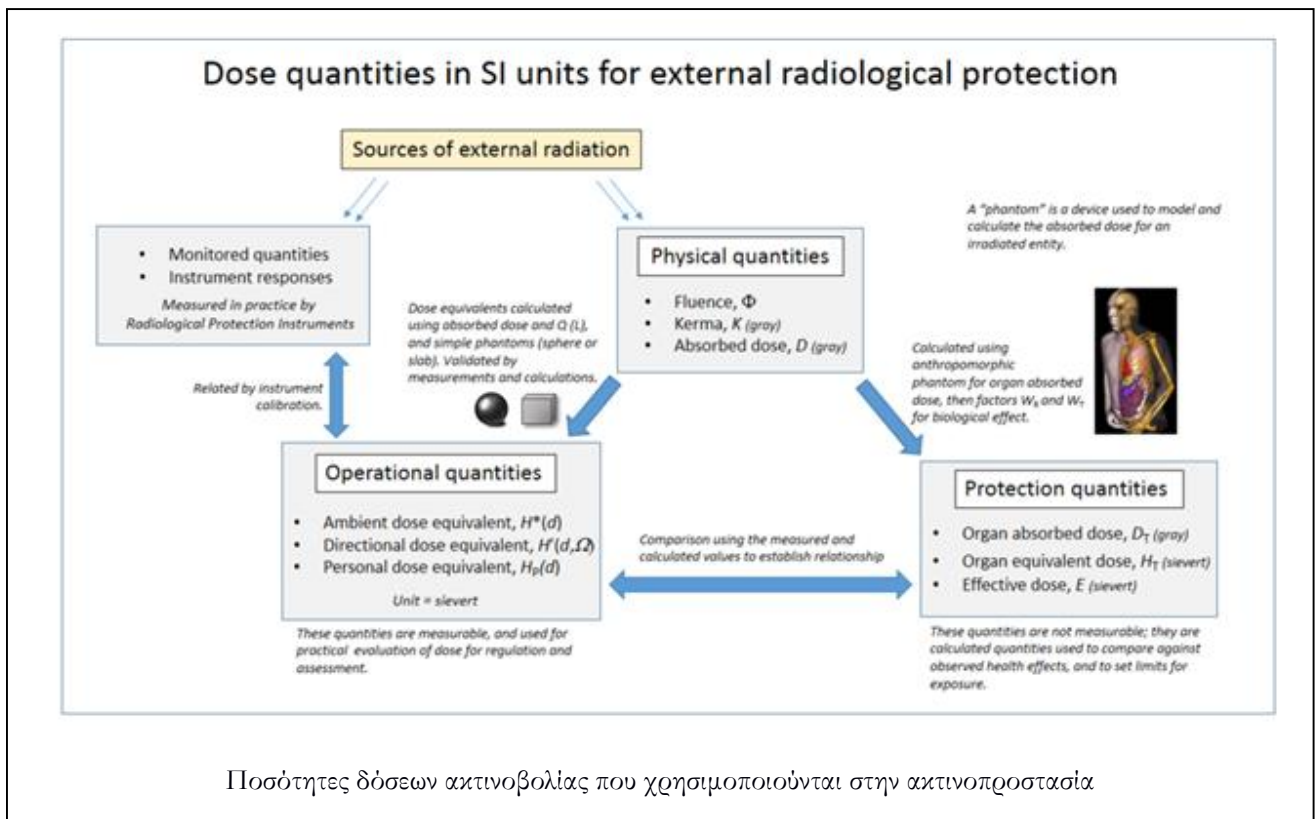
Όταν τα άλφα σωματίδια που εκπέμπουν ισότοπα εισέρχονται στον οργανισμό δια του στόματος, είναι πολύ πιο επικίνδυνα από ότι προτείνει ο χρόνος ημιζωής τους ή ο ρυθμός διάσπασης. Αυτό οφείλεται στην υψηλή σχετική βιολογική αποτελεσματικότητα της ακτινοβολίας άλφα για να προκαλέσει βιολογική βλάβη αφότου τα ραδιοϊσότοπα που εκπέμπουν σωματίδια άλφα εισέρχονται σε ζωντανά κύτταρα. Τα ραδιοϊσότοπα εκπομπής σωματιδίων άλφα που λαμβάνονται δια κατάποσης όπως τα transuranics ή οι ακτινίδες είναι κατά μέσο όρο περίπου 20 φορές πιο επικίνδυνα, και σε μερικά πειράματα έως και 1000 φορές πιο επικίνδυνα από μια αντίστοιχη δραστηριότητα ραδιοϊσοτόπων εκπομπής βήτα ή γάμα.

Το ανθρώπινο σώμα δεν μπορεί να αισθανθεί την ιοντίζουσα ακτινοβολία εκτός αν είναι σε πολύ υψηλές δόσεις, αλλά τα αποτελέσματα του ιοντισμού μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον χαρακτηρισμό της ακτινοβολίας. Οι παράμετροι που μας ενδιαφέρουν περιλαμβάνουν την ταχύτητα διάσπασης, την ροή των σωματιδίων, τον τύπο των σωματιδίων, την ενέργεια δέσμης, την KERMA, τον ρυθμό δόσης, και την δόση της ακτινοβολίας.

Εάν ο τύπος της ακτινοβολίας δεν είναι γνωστός, τότε μπορεί να προσδιοριστεί με διαφορικές μετρήσεις υπό την παρουσία ηλεκτρικών πεδίων, μαγνητικών πεδίων, ή μέσω ποικίλων ποσοτήτων θωράκισης.

Η Διεθνής Επιτροπή Προστασίας από τις Ακτινοβολίες (ICRP) διαχειρίζεται το διεθνές σύστημα ακτινοπροστασίας, η οποία καθορίζει τα συνιστώμενα όρια για την πρόσληψη δόσης. Οι τιμές δόσης μπορεί να αντιπροσωπεύουν την απορροφούμενη, την ισοδύναμη, την αποτελεσματική, ή την δεσμευμένη δόση. Η παρακολούθηση και ο υπολογισμός των δόσεων για την προστασία της υγείας του ανθρώπου ονομάζεται δοσιμετρία και πραγματοποιείται στο πλαίσιο της επιστήμης της φυσικής υγείας. Βασικά εργαλεία της μέτρησης είναι η χρήση των δοσιμέτρων για να προσδιοριστεί η εξωτερική αποτελεσματική απορρόφηση της δόσης και η χρήση βίο-δοκιμασιών για την δόση που έχει καταποθεί.

Η δεσμευμένη δόση είναι ένα μέτρο του στοχαστικού κινδύνου για την υγεία λόγω της πρόσληψης ραδιενεργού υλικού μέσα στο ανθρώπινο σώμα. Η ICRP αναφέρει "Για μια εσωτερική έκθεση, οι αποτελεσματικές δόσεις προσδιορίζονται γενικά από την αξιολόγηση των προσλήψεων ραδιονουκλεϊδίων από μετρήσεις βιοπροσδιορισμού ή από άλλες ποσότητες. Η δόση ακτινοβολίας καθορίζεται από την πρόσληψη χρησιμοποιώντας τους συνιστώμενους συντελεστές δόσης".[20]



### 3.1.6. Θεραπεία καρκίνου

Είναι πλέον καλά τεκμηριωμένο, ότι ο κάθε καρκίνος είναι μοναδικός, όσο μοναδικός είναι και ο άνθρωπος που τον φέρει. Τα νέα φάρμακα και οι θεραπείες αναπτύσσονται με στόχο να έχουν μεγαλύτερη εξειδίκευση για τα καρκινικά κύτταρα και έτσι μειωμένη τοξικότητα για τα φυσιολογικά κύτταρα (μοριακή φαρμακευτική). Στο πεδίο της ανάπτυξης νέων θεραπευτικών μεθόδων, συμβάλλουν ερευνητικές προσπάθειες αποκάλυψης νέων μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στη καρκινογένεση και στην εξέλιξη της νόσου. Οι έρευνες αυτές έφεραν στο φως πολλά σηματοδοτικά μόρια των οποίων ο ρόλος είναι κεντρικός στη διαδικασία της καρκινογένεσης. Τα μόρια αυτά έχουν αναγνωρισθεί ως «εν δυνάμει μόρια-στόχοι» για θεραπευτικό σιοπό. Επίσης, στην προσπάθεια ανάπτυξης νέων φαρμάκων συμβάλλουν: η σύνθεση κατόπιν σχεδιασμού, ο χαρακτηρισμός, η βιολογική *in vitro* και *in vivo* αξιολόγηση καθώς και τα στάδια κλινικής μελέτης πολλών (φαρμακοφόρων) μορίων διαφορετικών τάξεων και με διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης. Τα μόρια αυτά είναι συνήθως μικρά οργανικά μόρια, πεπτίδια, αντισώματα, και άλλα.

Για την αντιμετώπιση της ασθένειας στον κάθε ασθενή είναι αναγκαία η ανάπτυξη κλινικά αποδεικτών αναστολέων της καρκινογένεσης με μεγάλη εξειδίκευση και αποτελεσματικότητα καθώς επίσης και η ανάπτυξη βιοδεικτών που επιτρέπουν τον εντοπισμό των μηχανισμών που δε λειτουργούν φυσιολογικά στον κάθε ασθενή και κατά τη διάρκεια

εξέλιξης της νόσου. Είναι απαραίτητη η εμβάθυνση των γνώσεων στο πεδίο των μηχανισμών καρκινογένεσης καθώς και της απόκρισης των κυττάρων (φυσιολογικών και καρκινικών) στις θεραπείες. Νέα πρωτόκολλα θεραπείας αναπτύσσονται σε μία προσπάθεια να συνδυάσουν οι διαθέσιμες μορφές χημειο, ράδιο, ακτινο - θεραπείας.

- Τα φάρμακα και οι θεραπείες στοχεύουν μοριακούς μηχανισμούς όπως:
- Τις λειτουργίες (βήματα) που οδηγούν το κύτταρο στον κυτταρικό κύκλο – Ρύθμιση.
- Την Απόπτωση – προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος.
- Την Κυτταρική σηματοδότηση – μετάδοση σήματος.
- Την φύλαξη της ακεραιότητας του γονιδιώματος - Επιδιόρθωση του DNA και Τελομεράση

Η θεραπεία του καρκίνου μπορεί να γίνει με στόχευση των καρκινικών κυττάρων και θανάτωση ή απομάκρυνσή τους, όπως επίσης και με πάυση του περαιτέρω πολλαπλασιασμού τους.

Οι κύριοι τρόποι για να επιτευχθεί αυτό είναι:

- Η Χημειοθεραπεία (θανάτωση και αδρανοποίηση καρκινικών κυττάρων με χρήση φαρμάκων)
- Η Χειρουργική (αφαίρεση με επέμβαση καρκινικών τμημάτων)
- Η Ανοσοθεραπεία (ενίσχυση αμυντικών μηχανισμών του οργανισμού με κατάλληλη αγωγή)
- Η Ραδιοθεραπεία (με εσωτερική χορήγηση φαρμάκων – ραδιοφαρμάκων)
- Η Ορμονοθεραπεία
- Η Ακτινοθεραπεία (θα αναφερθούμε πιο συγκεκριμένα παρακάτω)[21][11]

### 3.1.7. Ακτινοθεραπεία – ακτινοευαισθησία

Ακτινοθεραπεία είναι η επιστήμη που ασχολείται με την θεραπεία διάφορων νόσων με την χρήση ιοντίζουσων ακτινοβολιών. Αποτελεί την 2η, μετά την χειρουργική επέμβαση, πιο διαδεδομένη μέθοδο καταπολέμησης του καρκίνου και παρουσιάζει σημαντικά ποσοστά επιτυχίας. Ένας καρκινοπαθής κατά 50% θα λάβει αγωγή καταπολέμησης όγκου που περιλαμβάνει ακτινοθεραπεία, ενώ είναι διαδεδομένη σε καταπολέμηση καλοηθών όγκων.

Κύριοι στόχοι της ακτινοθεραπείας είναι η εναπόθεση της μέγιστης δυνατής δόσης στον όγκο-στόχο, με χρήση δέσμης ακτινοβολίας υψηλής ενέργειας. Αυτό αποσκοπεί σε αναστολή της ανάπτυξης του όγκου και της κυτταρικής διαίρεσης, με τελικό ζητούμενο της πλήρη καταστροφή των καρκινικών κυττάρων. Βέβαια όσο απλό ακούγεται το παραπάνω, τόσο σύνθετο είναι να επιτευχθεί καθώς οι όγκοι περιτριγυρίζονται από υγιείς ιστούς, που πρέπει να προστατευθούν. Επομένως έχουμε να αντιμετωπίσουμε μια κατάσταση κατά την οποία προσπαθούμε να μεγιστοποιήσουμε την εναποτιθέμενη δόση σε μια περιοχή στόχο στο σώμα τους ασθενή με σκοπό τον τοπικό έλεγχο της νόσου από την μία, και από την άλλη προσπαθούμε να ελαχιστοποιήσουμε την δόση ακτινοβολίας σε γειτονικά

κύτταρα, ώστε η πιθανότητα κλινικά σημαντικής βλάβης λόγω θανάτωσης υγιών κυττάρων να διατηρηθεί σε αποδεκτά επίπεδα.[14]

Η ακτινοθεραπευτική αγωγή μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε:

- ριζική, όταν η θεραπεία αποσκοπεί στην ολοκληρωτική θανάτωση των καρκινικών κυττάρων ενός συγκεκριμένου όγκου σε μία περιοχή στόχο, ή στο να καταστήσει τα καρκινικά κύτταρα ανήμπορα για περαιτέρω κυτταρικό πολλαπλασιασμό.
- παρηγορητική-ανακουφιστική, όταν δεν είναι δυνατόν να επιτευχθεί η πλήρης εξάλειψη του όγκου λόγω φύσης, έκτασης ή θέσης του.[22]

Σε πολλές περιπτώσεις η ακτινοθεραπεία δεν αποτελεί την μόνη θεραπευτική αγωγή για ίαση του ασθενούς αλλά λειτουργεί συνεπικουρικά με άλλες θεραπείες (πχ αναλγητικά) ή με θεραπείες γενικής υποστήριξης του οργανισμού του καρκινοπαθούς (πχ μεταγγίσεις αίματος).[21] Μία χαρακτηριστική περίπτωση είναι ο συνδυασμός της ακτινοθεραπείας με χημειοθεραπεία. Έχει παρατηρηθεί πως ουσίες με κυτταροτοξική δράση στα καρκινικά κύτταρα που χρησιμοποιούνται κατά την χημειοθεραπεία, έχουν παράλληλη δράση στο να καταστούν τα καρκινικά κύτταρα ευαίσθητα σε ακτινοβόληση. Περισσότερα σχετικά με την επίτευξη τέτοιου είδους ακτινοευαισθησίας θα αναλύσουμε στο επόμενο κεφάλαιο, που αποτελεί και το αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας.

## 3.2. Στρατηγικές αύξησης ακτινοευαισθησίας όγκου με φάρμακα στόχευσης [23]

### 3.2.1. Πως χρησιμοποιείται η ακτινοθεραπεία σήμερα

Τις τελευταίες 2-3 δεκαετίες στην ακτινοθεραπεία, έχει βελτιωθεί σημαντικά η ακριβής εναπόθεση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας στους ιστούς. Αυτό μας επιτρέπει σήμερα, πιο ακριβή εναπόθεση της απορροφούμενης δόσης της ακτινοβολίας στα καρκινικά κύτταρα, ενώ παράλληλα μειώνεται σταδιακά κάθε ανεπιθύμητη εναπόθεση ακτινοβολίας σε περιβάλλοντες υγείς ιστούς.[24] Τεχνικές τέτοιου είδους, επιτρέπουν την αύξηση της δόσης στον καρκινικό ιστό, κάτι που δεν θα μπορούσε να επιτευχθεί χωρίς ακριβή στόχευση.

Παρ' όλες τις τεχνικές βελτιώσεις αλλά και το γεγονός ότι η ακτινοθεραπεία είναι μία από τις πιο αποτελεσματικές μεθόδους θεραπείας του καρκίνου, πολλοί ασθενείς υποτροπιάζουν και αυτό συμβαίνει είτε γιατί πρέπει ακόμα να λυθούν τεχνικά προβλήματα, είτε γιατί λείπουν γνώσεις στο βιολογικό επίπεδο που φτάνουν ως την μοναδικότητα του κάθε ασθενή.

Τρεις κύριοι βιολογικοί παράγοντες των όγκων έχουν δείξει ότι επηρεάζουν το αποτέλεσμα μετά από την ακτινοθεραπεία: **η έκταση της υποξίας**[25], η ικανότητα των κυττάρων που επιβιώνουν για να πολλαπλασιαστούν σε χρόνο θεραπείας 6-7 εβδομάδων (**επανεποίκηση**) [26][27], και **η εγγενής αντοχή στην ακτινοβολία** των καρκινικών κυττάρων[28]. Πειστικά στοιχεία για τον ρόλο καθενός από αυτούς τους παράγοντες στην κλινική ακτινοθεραπεία αποδεικνύονται από πολλές μελέτες. Επιπλέον, **η αγγείωση** έχει αποδειχθεί ότι παίζει ρόλο στην κλινική ακτινοθεραπεία [29][30]. Η γνώση της σπουδαιότητας αυτών των διαδικασιών έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη στρατηγικών για να ξεπεραστούν ή να διαμορφωθούν κατάλληλα, προκειμένου να αυξηθεί η επαγόμενη από ιοντίζουσα ακτινοβολία θανάτωση των καρκινικών κυττάρων.

Μια συμπληρωματική προσέγγιση είναι να διερευνηθούν οι μηχανισμοί της μείωσης βλαβών σε φυσιολογικούς ιστούς που προκαλούνται από ιοντίζουσα ακτινοβολία. Είναι ιδιαίτερα σημαντική η μελέτη της δόσης και της κλιμάκωσης αυτής κατά την ακτινοθεραπεία.



Και οι δύο προσεγγίσεις, η αύξηση της θανάτωσης των καρκινικών κυττάρων και η μείωση της νοσηρότητας (των παρενεργειών που μπορεί να αφορούν επανεμφάνιση όγκου, βλάβες στα περιβάλλοντα υγιή κύτταρα κλπ.), μπορούν να βελτιώσουν τα ποσοστά ίασης και την ποιότητα ζωής των ασθενών με καρκίνο που υποβάλλονται σε ραδιοθεραπεία.

### 3.2.2. Στρατηγικές αύξησης της απόκρισης του όγκου στην ακτινοθεραπεία

Η ιοντίζουσα ακτινοβολία όπως εφαρμόζεται στην κλινική ακτινοθεραπεία επάγει μια σύνθετη απόκριση στα κύτταρα. Ορισμένες διαδικασίες στοχεύουν την αποικιάσταση των ζημιών, ενώ άλλες αντιμετωπίζουν την διάδοση της ζημίας ή επάγουν τον κυτταρικό θάνατο. Η επιδιόρθωση βλαβών του DNA είναι ζωτικής σημασίας για τη γονιδιακή ακεραιότητα, και ελλείψεις στην επιδιόρθωση είναι γνωστό ότι έχουν μεγάλη επίδραση επί της κυτταρικής επιβίωσης μετά την έκθεση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία. Ως εκ τούτου, η παρέμβαση στο επίπεδο της απόκρισης των κυττάρων στη δράση των ιοντίζουσών ακτινοβολιών μέσω της **αναστολής των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA** έχει μεγάλο ενδιαφέρον στην έρευνα ακτινοθεραπείας. Πιο πρόσφατα, έχει επίσης αποδειχθεί η κυτταρική ακτινοευαισθησία των καρκινικών κυττάρων μπορεί να επηρεαστεί από την «μη ορθή» ενεργοποίηση **σηματοδοτικών μονοπατιών**. Τέλος, οι ζημιές που προκλήθηκαν από την επίδραση ιοντίζουσας ακτινοβολίας επηρεάζονται αισθητά από τα επίπεδα οξυγόνου και **ακτινοβόληση υπό υποξικές συνθήκες, όπως συμβαίνει στους περισσότερους όγκους, μειώνει την θανάτωση κυττάρων**. Δεδομένου ότι ρυθμίζουν την απόκριση των κυττάρων σε ιοντίζουσα ακτινοβολία, όλες αυτές οι διαδικασίες είναι ελκυστικοί στόχοι για νέες θεραπευτικές στρατηγικές.

### 3.2.3. Μηχανισμοί κυτταρικής απόκρισης στις βλάβες του DNA

Η επαγωγή βλαβών στο DNA που προκλήθηκαν από ιοντίζουσα ακτινοβολία ενεργοποιεί **τον κυτταρικό μηχανισμό απόκρισης βλαβών του DNA** (DNA Damage Response), δηλαδή μοριακά γεγονότα που ως επί το πλείστον αφορούν την τροποποίηση μεταφραστικών μηχανισμών των πρωτεϊνών που ενεργοποιούν ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια.[31][32] Ο DDR χρησιμοποιεί ένα πολύπλοκο δίκτυο πρωτεϊνών που συνεργάζονται για να ξεκινά και συντονίζει την επιδιόρθωση του DNA. Ο DDR σταματά τον κυτταρικό κύκλο, αποτρέποντας τη μεταφορά των βλαβών του DNA σε κυτταρικούς απογόνους, και διευκολύνει τη δράση επιδιορθωτικών μηχανισμών βλαβών του

DNA. Ο DDR έχει επίσης κρίσιμο ρόλο στην επαγωγή της απόπτωσης όταν η επιδιόρθωση αποτύχει. Ορισμένα σημεία ελέγχου (checkpoints) του κυτταρικού κύκλου, σε περίπτωση βλαβών, όπως αυτές που προκαλούνται από την ιοντίζουσα ακτινοβολία, επιτρέπουν την επιδιόρθωση του κατεστραμμένου DNA, και την πρόληψη της διάδοσης του. Τα κύτταρα μπορεί να σταματήσουν κατά τη μετάβασή τους από την φάση G1 στην S φάση του κυτταρικού κύκλου, στην ενδο - S φάση και στο σύνορο μεταξύ G2 και M φάσεων.[33]

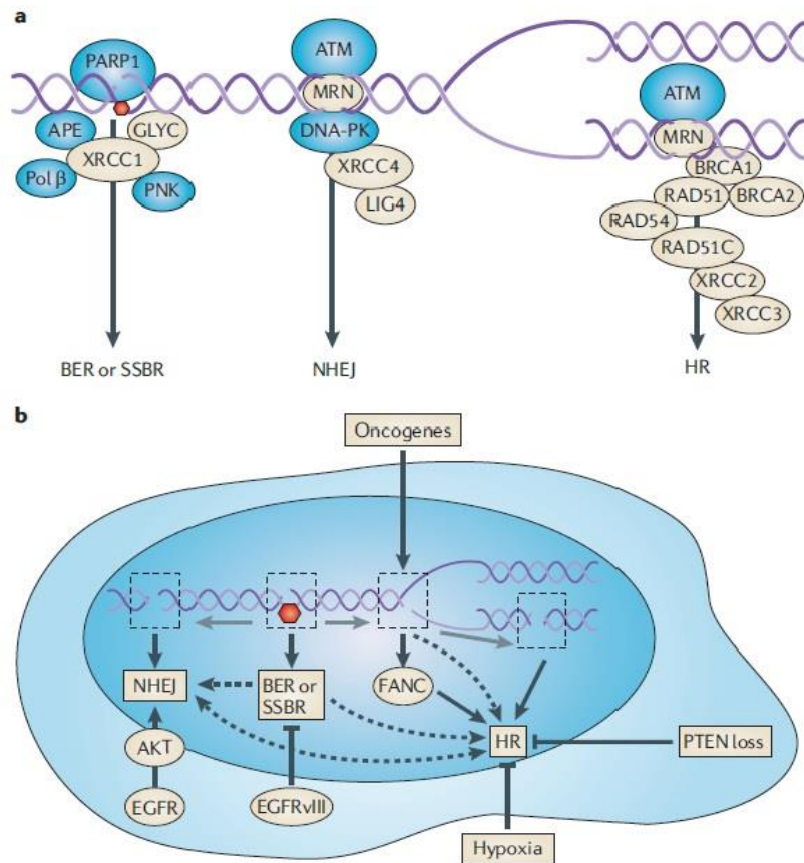
Ένας ελαττωματικός DDR, ιδίως αυτός που σχετίζεται με ενδεχόμενη αποτυχία στην αναχαίτιση του κυτταρικού κύκλου, είναι ένα χαρακτηριστικό που είναι κοινό σε πολλούς καρκίνους.[31][32] Πολλοί καρκίνοι σε ασθενείς εμφανίζουν ελαττωματικό DDR και σημεία ελέγχου, όπως αποδεικνύεται από την υψηλή συχνότητα εμφάνισης μεταλλάξεων της ATM, του TP53 (το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p53) και του εξαρτώμενου από την κυκλίνη αναστολέα της κινάσης 2A (CDKN2A)[34].

Η ιοντίζουσα ακτινοβολία επάγει μια ποικιλία από βλάβες του DNA, συμπεριλαμβανομένης της ζημιάς οξειδώνοντας βάσεις του γενετικού υλικού, την δημιουργία αβασικών θέσεων, το σπάσιμο σε μία ή και στις δύο έλικες του DNA (Single Strand Breaks-SSB και Double Strand Breaks-DSB). Αυτές οι βλάβες, εάν δεν επιδιορθωθούν, μπορούν τελικά να οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο μέσω μιτωτικής καταστροφής και απόπτωσης. Η δραστηριότητα των διεργασιών επιδιόρθωσης του DNA που ασχολούνται με τέτοιου είδους ζημιά είναι γνωστό ότι καθορίζει την απόκριση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία.[35] Ελλείψεις σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης DSBs, όπως η Μη Ομόλογη Σύζευξη Τερματισμού (Non Homologous End Joining-NHEJ) και ο Ομόλογος Ανασυνδυασμός (Homologous Recombination-HR), οι οποίες πιστεύεται ότι είναι οι πιο θανατηφόρες βλάβες που προκαλούνται από ιοντίζουσα ακτινοβολία, είναι ιδιαίτερα επιζήμιες για τα κύτταρα.[36] Ωστόσο, έχει γίνει όλο και πιο εμφανές ότι άλλες διαδικασίες επιδιόρθωσης είναι επίσης αναγκαίες για τη διασφάλιση της ακεραιότητας του γονιδιώματος και την επιβίωση του κυττάρου μετά από έκθεση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία. Μια τέτοια διαδικασία είναι η επιδιόρθωση με εκτομή βάσης (Base Excision Repair-BER)[37], η οποία επισκευάζει βλάβες βάσεων και SSBs[38] που μπορούν να μετατραπούν σε DSBs όταν συναντούν μια διχάλα αντιγραφής (replication fork). Δευτερεύοντα DSBs μπορούν επίσης να προκληθούν από προσπάθειες επισκευής σε μέρη με συγκεντρωμένες βλάβες γενετικού υλικού, κάτι που είναι χαρακτηριστικό της επίδρασης της ιοντίζουσας ακτινοβολίας.[39][40]

Οι σκέψεις αυτές οδήγησαν στην ανάπτυξη μιας σειράς νέων ενώσεων που επηρεάζουν την επιδιόρθωση του DNA, ιδιαίτερα την επιδιόρθωση DSB αλλά και διαδικασιών του DDR μετά τη χημειοθεραπεία και την ακτινοθεραπεία, με απώτερο στόχο την ευαισθητοποίηση καρκινικών κυττάρων στη θεραπεία. Αναστολείς σημαντικών μορίων στην επισκευή DSB, όπως ως ATM ή η DNA-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση (DNA-PK), έχει αποδειχθεί ότι ευαισθητοποιούν καρκινικά κύτταρα και ξενομοσχεύματα στην ακτινοθεραπεία.[41][42][43] Και οι δύο στρατηγικές αυξάνουν την κυτταρική βλάβη που επάγει η ιοντίζουσα ακτινοβολία αναστέλλοντας την επιδιόρθωση του DNA.

Τέτοιες προσεγγίσεις ενισχύουν την ευαισθησία στην αγωγή, αν και δεν είναι απαραίτητο ότι παρέχουν τη δυνατότητα επιλεκτικής εκρίζωσης των καρκινικών κυττάρων, καθώς επίσης αυξάνουν την ακτινοευαισθησία των φυσιολογικών κυττάρων.

Για να αποφύγουμε πρόσθετες βλάβες σε φυσιολογικό ιστό εξαιτίας ουσιών που αυξάνουν την ευαισθητοποίηση του κυττάρου σε ιοντίζουσα ακτινοβολία, είναι αναγκαίος κάποιος **βαθμός επιλεκτικότητας**. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την εκμετάλλευση της πολλαπλασιαστικής φύσης των όγκων σε ένα πλαίσιο στο οποίο τα φυσιολογικά κύτταρα έχουν μειωμένη αναπαραγωγή (όπως στο γλοιοβλάστωμα). Οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί είναι συνήθως αλλοιωμένοι στα καρκινικά κύτταρα και τα καρκινικά κύτταρα ενεργοποιούν και άλλους μηχανισμούς για την επιδιόρθωση ενός τύπου βλάβης (βλ. σχήμα b). Η υποξία π.χ. ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση πρωτεϊνών επισκευής και επηρεάζει τον HR.[44][45]

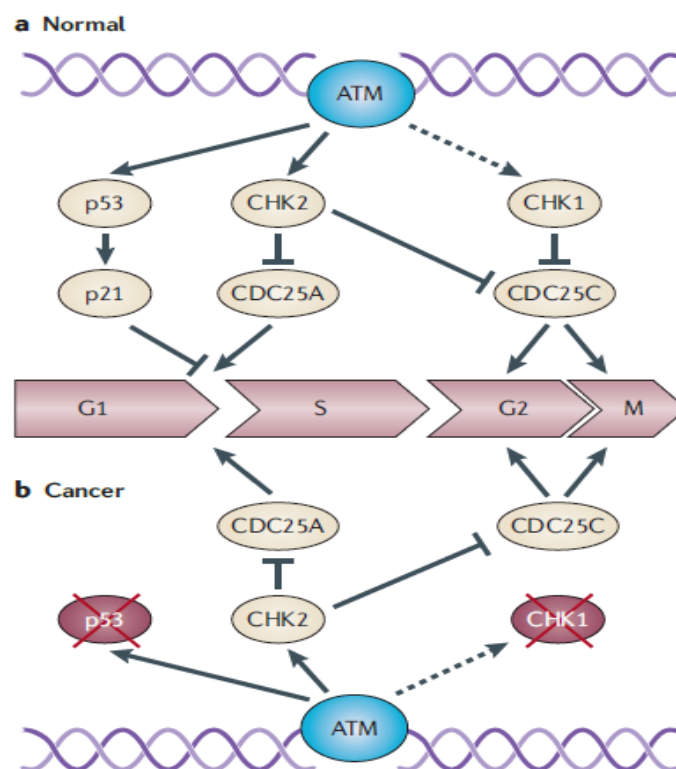


*Εικόνα: Επιδιόρθωση βλάβης DNA που επάγεται από ιοντίζουσα*

Εκτός από την επιδιόρθωση του DNA, τα **σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου** συνιστούν το άλλο σημαντικό συστατικό του μηχανισμού DDR. Η ενεργοποίηση του σημείου ελέγχου G1/S λόγω βλάβης στο DNA είναι σχεδόν καθολικά απύσα σε καρκινικά κύτταρα, και αυτή η απουσία συχνά προκαλείται από μεταλλάξεις στην p53 ή σε ρυθμιστικές διαδικασίες που σχετίζονται με αυτήν την πρωτεΐνη. Αυτό από μόνο του δεν φαίνεται να έχει μια συνεπή επίδραση στην ακτινοευαισθησία, καθώς δεν έχει βρεθεί συσχετισμός κλωνογόνου επιβίωσης και λειτουργικού G1 / S σημείου ελέγχου.[46][47] Ωστόσο, τα καρκινικά κύτταρα που είναι ανεπαρκή σε p53 πρέπει να βασίζονται στα S ή

G2 σημεία ελέγχου σε μεγαλύτερο βαθμό από τα φυσιολογικά κύτταρα για την επιβίωσή τους, κάτι το οποίο θα μπορούσε να αξιοποιηθεί θεραπευτικά.[48]

Με βάση επιτυχείς μελέτες *in vitro* [49][50] ειδικοί αναστολείς των κινασών CHK1 και CHK2, έχουν αναπτυχθεί για κλινική χρήση και προτείνονται για την ενίσχυση της ακτινοθεραπείας. Οι παραπάνω κινάσες είναι υπεύθυνες για τα σημεία ελέγχου, και είναι ζωτικής σημασίας για την εκτέλεση τους.[51] Η αναστολή της ATM έχει επιτυχώς δείξει ότι ενισχύει τα αποτελέσματα της δράσης των ιοντιζουσών ακτινοβολιών.[52][53][54]

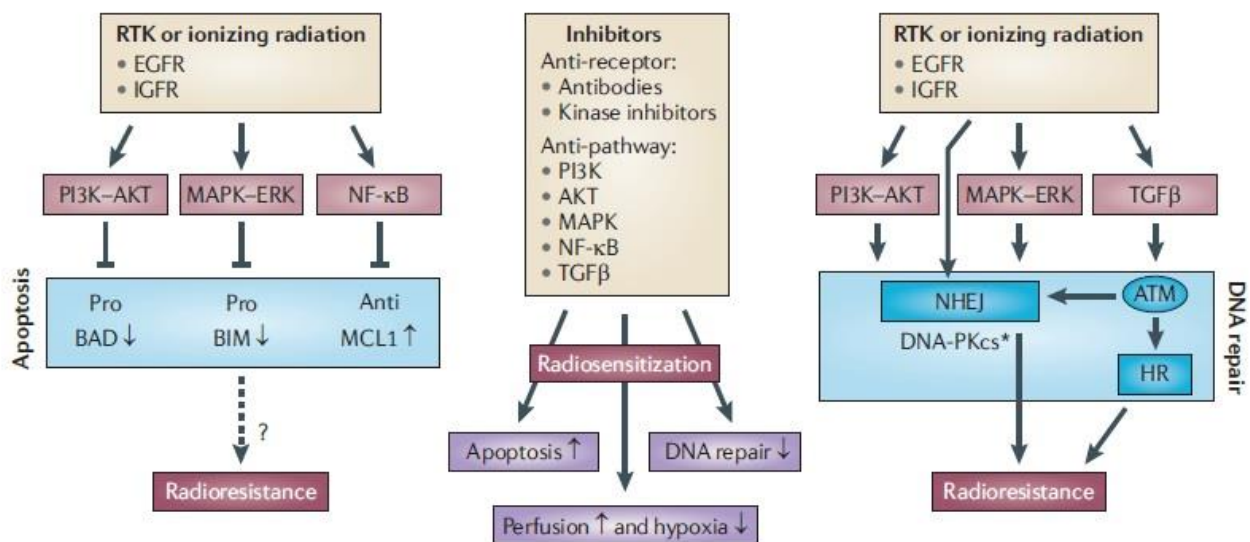


*Αναστολείς σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου.*

### 3.2.4. Τροποποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών

Η ενεργοποίηση του υποδοχέα αυξητικού παράγοντα με μετάλλαξη ή υπερέκφραση ή με μεταλλάξεις σε ογκογονίδια (όπως RAS) ή ογκοκατασταλτικά γονίδια (όπως PTEN) μπορεί να οδηγήσει στην σηματοδότηση μέσω των σηματοδοτικών μονοπατιών PI3K-AKT, MAPK-ERK, πυρηνικού παράγοντα-κΒ (NF-κΒ) και μετασχηματισμού αυξητικού παράγοντα-β (TGFβ). Τέτοια σηματοδότηση μπορεί να επηρεάσει την ακτινοευαισθησία με μείωση της απόπτωσης (αριστερά στο σχήμα) ή αύξηση της επιδιόρθωσης του DNA (δεξιά στο σχήμα). Οι σηματοδοτήσεις

AKT, MAPK και NF-κB μπορούν να οδηγήσουν σε φωσφορύλιωση και απενεργοποίηση των προ-αποπτωτικών (Pro) πρωτεϊνών BCL-2, που σχετίζεται τον κυτταρικό θάνατο (BAD) και BCL-2. Η τροποποίηση της απόπτωσης δεν οδηγεί πάντα σε αλλαγές που επηρεάζουν την κλωνογονική δυνατότητα. Η ενεργοποίηση των AKT και MAPK μονοπατιών οδηγεί στην ενεργοποίηση της καταλυτικής υπομονάδας της DNA-εξαρτώμενης πρωτεϊνικής κινάσης (DNA-PKcs, επίσης γνωστή ως PRKDC), μια κεντρική πρωτεΐνη στην επιδιόρθωση DSB με μη-ομόλογη σύνδεση (NHEJ). Αυτή η πρωτεΐνη μπορεί επίσης να ενεργοποιηθεί από τον υποδοχέα κινάσης τυροσίνης (RTK), τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) αφού μετατοπιστεί στον πυρήνα. Υπάρχει μια ισχυρή συσχέτιση ανάμεσα στην επιδιορθωτική ικανότητα στο DNA, ιδιαίτερα για DSBs, και στην ακτινοοευαισθησία. Η ιοντίζουσα ακτινοβολία μπορεί επίσης να ενεργοποιήσει τα μονοπάτια PI3K, MAPK και NF-κB. Επιπλέον, ο TGFβ είναι απαραίτητος για την πλήρη ενεργοποίηση της ATM ως απόκριση σε ενδεχόμενη βλάβη του DNA, επηρεάζοντας έτσι την επισκευή DSB με NHEJ και HR. Η αναστολή της σηματοδότησης μπορεί να αντιστρέψει αυτή την ακτινοαντοχή. Μερικοί αναστολείς έχουν επίσης αποδειχθεί ότι επηρεάζουν το αγγειακό σύστημα του όγκου, οδηγώντας σε βελτιωμένη αιμάτωση και μειωμένη υποξία.



*Στόχευση μεταγωγής σήματος.*

## 3.3. Μοριακή Στόχευση Του Υποδοχέα Του Επιδερμικού Αυξητικού Παράγοντα (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR)

### 3.3.1. Τι είναι ο EGFR

Ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (Epidermal Growth Factor, EGF) είναι το πρώτο μέλος που ανακαλύφθηκε της οικογένειας των αυξητικών παραγόντων που ρυθμίζουν την κυτταρική διαίρεση κατά την εμβρυική ανάπτυξη, αλλά και κατά την ενήλικη περίοδο των ζωικών οργανισμών.[55]

Ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) ανήκει στην οικογένεια ErbB. Οι υποδοχείς της οικογένειας ErbB ανήκουν στις πρωτεϊνικές κινάσες και πιο συγκεκριμένα στους υποδοχείς με δραστικότητα κινάσης τυροσίνης (Receptor Tyrosine Kinases, RTK). Η οικογένεια των ErbB (HER) υποδοχέων περιλαμβάνει εκτός από τον EGFR (ErbB-1 ή HER-1), τους ErbB-2 (HER-2), ErbB-3 (HER-3) και ErbB-4 (HER-4).

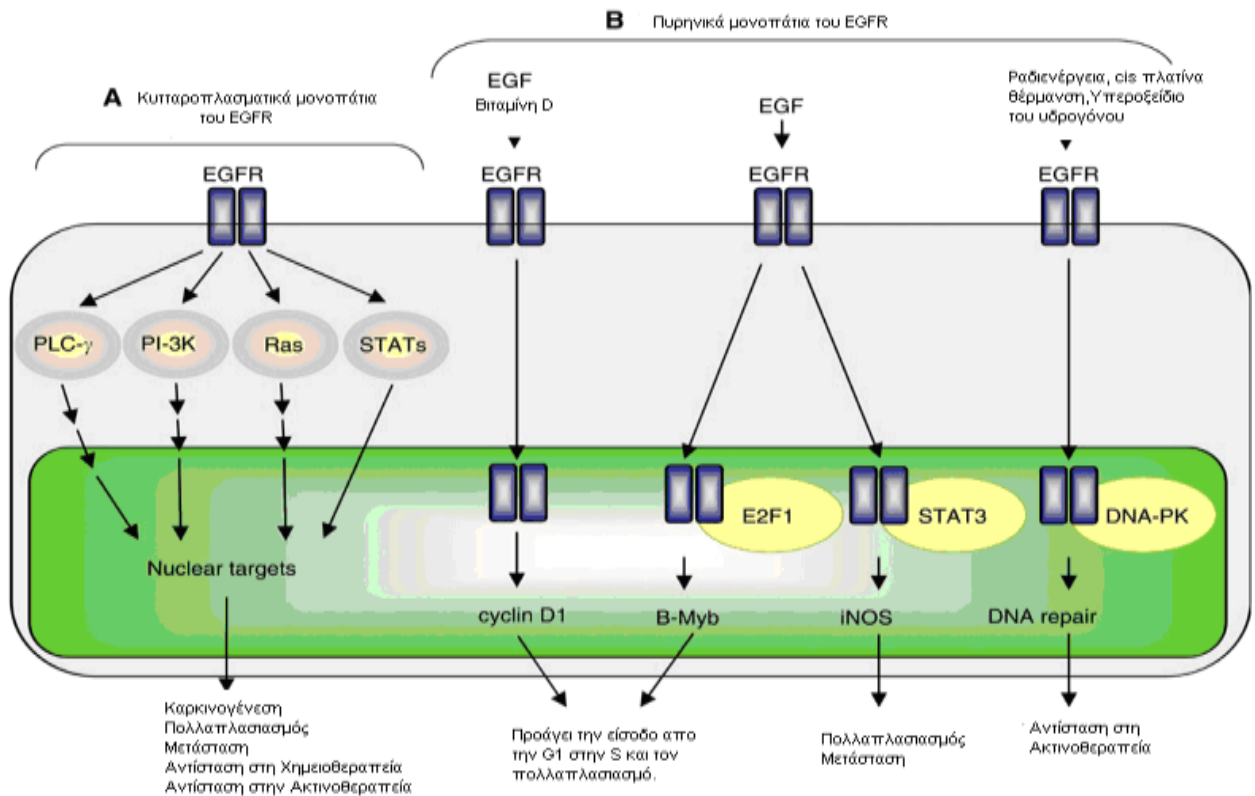
Είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη, που αποτελείται από τρεις περιοχές: (1) την εξωκυττάρια περιοχή, στην οποία δεσμεύεται ο αντίστοιχος αυξητικός παράγοντας που είναι ένα γλυκοζυλιωμένο αμινοτελικό (-NH<sub>2</sub>) τμήμα, (2) τη διαμεμβρανική περιοχή, δηλαδή ένα υδρόφοβο τμήμα, που συγκρατεί τον υποδοχέα στην κυτταρική μεμβράνη και (3) την ενδοκυτταρική περιοχή που είναι υπεύθυνη για την ενδοκυτταρική μεταγωγή σημάτων, ένα καρβοξυτελικό (-COOH) τμήμα εντός του κυτταροπλάσματος με δραστικότητα κινάσης τυροσίνης.

Για την ενεργοποίηση, ο EGFR συνδέεται επιλεκτικά με ένα μόριο προσδέτη, όπως για παράδειγμα τον EGF. Το προσδεδεμένο μόριο επάγει τον ομο- ή ετερο-διμερισμό του EGFR. Ο EGFR αυτοφωσφορυλιώνεται. Κατόπιν ενεργοποιούνται τα σηματοδοτικά μόρια και σηματοδοτικά μονοπάτια.

Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που συνδέονται με τον EGFR σχετίζονται με σημαντικές βιολογικές διεργασίες, καθώς καταλήγουν στην έκφραση γονιδίων που αφορούν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην απόπτωση, στην επιβίωση των κυττάρων, στη διαφοροποίηση των κυττάρων κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, στο νευρικό σύστημα, στην καρδιά κλπ., όπως αναλύσαμε και παραπάνω. Τα κυτταροπλασματικά μονοπάτια είναι τα κυριότερα και καλύτερα χαρακτηρισμένα σηματοδοτικά μονοπάτια του EGFR. Τέτοια μονοπάτια είναι τα εξής:

- το σηματοδοτικό μονοπάτι Ras-Raf-MAPK,
- το σηματοδοτικό μονοπάτι της κινάσης της 3-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PI3K) και της πρωτεϊνικής κινάσης Akt (phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway),
- το σηματοδοτικό μονοπάτι της φωσφολιπάσης C (Phospholipase C, PLC) και
- το σηματοδοτικό μονοπάτι των STAT πρωτεϊνών.

Ο EGFR εμπλέκεται όμως και σε πυρηνικά μονοπάτια.

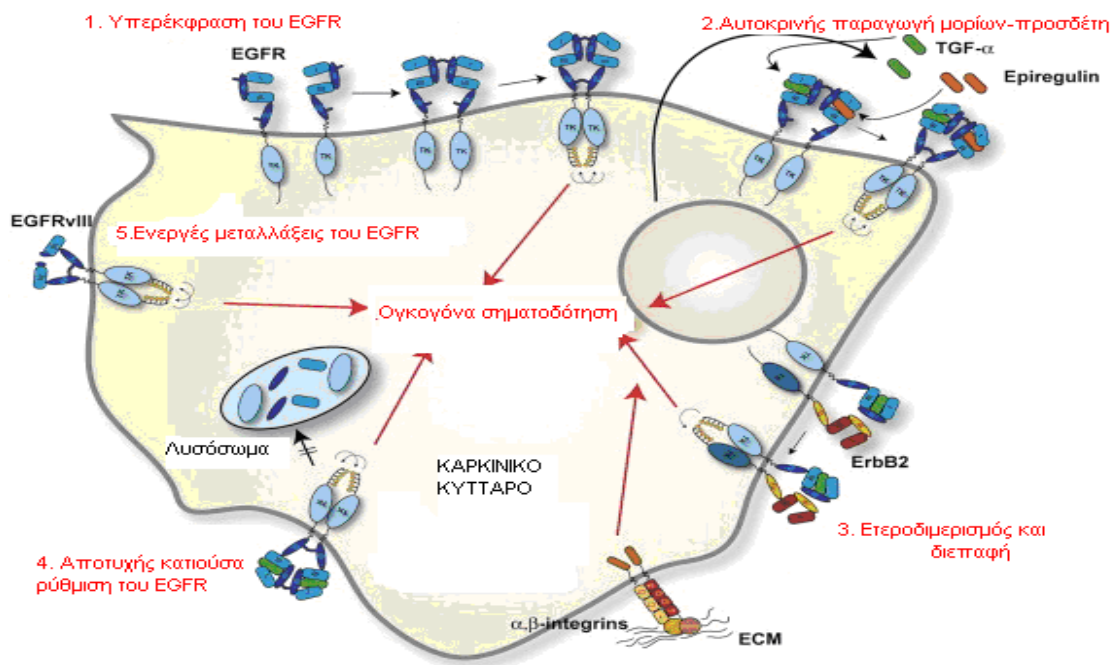


**Εικόνα:** Σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία ενεργοποιούνται από τον EGFR.

Ένας μηχανισμός ρύθμισης της σηματοδότησης είναι η ενδοκυττάρωση του ενεργοποιημένου EGFR, ενώ απορρύθμιση της σηματοδότησης μπορεί να οδηγήσει σε ογκογόνο σηματοδότηση και καρκινογένεση.

Οι μηχανισμοί που απορυθμίζουν το σύστημα EGFR-προσδεδεμένο μόριο και οδηγούν σε ογκογόνο σηματοδότηση είναι:

1. η αυξημένη παραγωγή μορίων προσδετών
2. τα υψηλά επίπεδα EGFR (υπερέκφραση του)
3. οι μεταλλαγμένες ενεργές δομές του EGFR
4. η ατελής καθοδική ρύθμιση του EGFR καθώς και
5. ο ετεροδιμερισμός και η διεπικοινωνία (cross-talk) του EGFR με υποδοχείς που δεν ανήκουν στην οικογένεια ErbB.



**Εικόνα:** Μηχανισμοί που απορρυθμίζουν το σύστημα που αποτελείται από τον EGFR και το προσδεδεμένο μόριο και οδηγούν σε ογκογόνο σηματοδότηση.



## 3.3.2. EGFR: ένας καλός «στόχος» για την ραδιοφαρμακευτική

Οι λόγοι για τους οποίους ο EGFR είναι καλό «μόριο στόχος» για την ραδιοφαρμακευτική είναι οι ακόλουθοι:

- a. Γιατί υπερεικφράζεται σε πολλούς τύπους καρκίνου,
  - b. Η υπερέκφρασή του συνδέεται με αντίσταση σε πολλές μορφές θεραπείας (χημειοθεραπεία, ραδιοθεραπεία),
  - c. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τον EGFR είναι κεντρικά στη διαδικασία της καρκινογένεσης (κυτταροπλασματικά και πυρηνικά σηματοδοτικά μονοπάτια),
  - d. Η απορρύθμιση των σηματοδοτικών μονοπατιών μπορεί να οδηγήσει σε ογκογόνο σηματοδότηση.
- [55][56][57][58][59][60][61][62]

## 3.3.3 Μόρια στόχευσης του EGFR

Η στόχευση των υποδοχέων EGFR γίνεται με τρεις κατηγορίες μορίων:

- a. με τα μονοκλωνικά αντισώματα (mAbs),
- b. με τα μικρού μοριακού βάρους μόρια που δρουν ως αναστολείς της δράσης κινάσης της τυροσίνης του EGFR (αναστολείς TK) και
- c. με πεπτίδια ανάλογα του αυξητικού παράγοντα EGF.

Οι δύο πρώτες κατηγορίες έχουν δώσει φάρμακα που κυκλοφορούν στο εμπόριο.[63]

## 3.4. Κιναζολίνες

### 3.4.1. Τι είναι οι κιναζολίνες και πως επιδρούν στην καταπολέμηση του καρκίνου

Οι κιναζολίνες είναι μόρια μικρού μοριακού βάρους, τα οποία είναι αναστολείς της δράσης TK των υποδοχέων. Έχουν την ικανότητα να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και να στοχεύουν το ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα και πιο συγκεκριμένα την περιοχή στην οποία δεσμεύεται το ATP. Οι κιναζολίνες συνδέονται με τον υποδοχέα αντιστρεπτά ή μη αντιστρεπτά. Με τον τρόπο αυτό, επιτυγχάνουν τελικά την αναστολή της φωσφορύλιωσης του υποδοχέα και την απενεργοποίηση των σηματοδοτικών του μονοπατιών.[64][65]

Οι δομές που μελετώνται περισσότερο για το σκοπό αυτό είναι: οι ανιλνοκιναζολίνες (anilinoquinazolines), οι ανιλνοκινολίνες (anilinoquinolines) και οι ανιλνοπυριδοπυριμιδίνες (anilino-pyridopyrimidines).

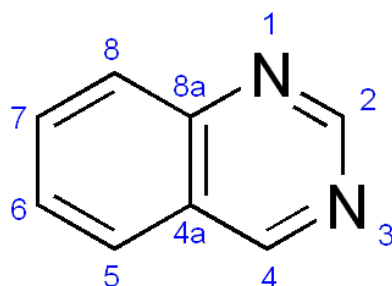
Τα τελευταία χρόνια έχουν σχεδιαστεί και βρίσκονται σε διάφορα στάδια μελέτης πάνω από 30 μόρια αναστολείς της δράσης κινάσης της τυροσίνης των υποδοχέων EGFR. Μετά από κλινικές μελέτες, κάποια από αυτά τα μόρια έχουν αναγνωρισθεί ως θεραπευτικά φάρμακα για συγκεκριμένους τύπους καρκίνου. Το Lapatinib, το Gefitinib και το Erlotinib, τα οποία είναι αντιστρεπτοί αναστολείς της δράσης κινάσης της τυροσίνης του διμερούς EGFR/ErbB2 και ανήκουν στην τάξη των ανιλνοκιναζολινών, έχουν εγκριθεί για κλινική χρήση, ενώ πολλά άλλα βρίσκονται σε διάφορα στάδια ανάπτυξης χημειοθεραπευτικής θεραπείας.

Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι ασθενείς που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα δεν ανταποκρίνονται καλά στην ακτινοβολία γιατί ο υποδοχέας όταν υπερεκφράζεται φαίνεται να ενεργοποιείται από την ιοντίζουσα ακτινοβολία καθώς φαίνεται να διμερίζεται χωρίς την παρουσία μορίων – προσδετών. Βέβαια, επιπλέον γνωρίζουμε ότι κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι κάποιοι ασθενείς που παίρνουν ως αντικαρκινικά φάρμακα αναστολείς της δράσης του EGFR ανταποκρίνονται καλύτερα στην ακτινοθεραπεία.[66] Φαίνεται λοιπόν ότι οι αναστολείς του υποδοχέα έχουν και δράση ακτινοευαισθητοποιητών. Οι μηχανισμοί όμως που ελέγχουν αυτή τη δράση δεν είναι μέχρι σήμερα όλοι και πλήρως γνωστοί. Τα (ράδιο)φάρμακα είναι θεμιτό να αξιολογούνται και για τις δύο ιδιότητές τους (αντικαρκινική δράση και ακτινοευαισθησία).

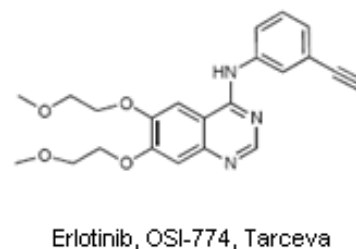
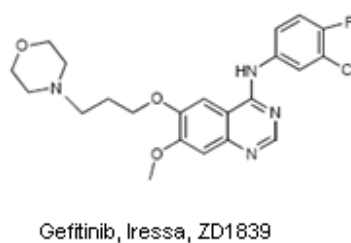
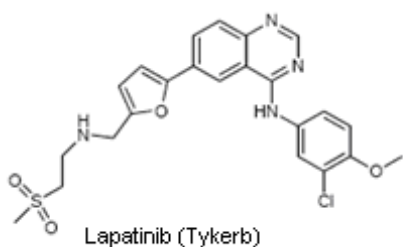
Τέλος, σημειώνεται ότι έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για την ανάπτυξη ραδιοφαρμάκων, κυρίως ως διαγνωστικών εργαλείων, βασιζόμενων στην φαρμακολογική δράση των κιναζολινών. [62][63][64] Για τις προσπάθειες αυτές

χρησιμοποιήθηκαν κυρίως ως βάσεις συνθέσεων παράγωγα των κιναζολινών που παρουσιάζουν καλή πρόσληψη από τον υποδοχέα.

Η βασική τους μοριακή δομή είναι η παρακάτω.



*Χημική Δομή Δακτύλιου Κιναζολίνης. Αποτελείται από έναν δακτύλιο βενζολίου και έναν δακτύλιο πυριμιδίνης*



*Χημικές Δομές Αναστολέων της δράσης TK που έχουν εγκριθεί για κλινική χρήση.*

## 3.5. Ραδιοφάρμακα

### 3.5.1. Γενικά περί Ραδιοφαρμάκων

Τα ραδιοφάρμακα αποτελούν ανόργανες ή οργανικές φαρμακευτικές ενώσεις ραδιονουκλιδίων (ιχνηθέτες) οι οποίες χρησιμοποιούνται για διαγνωστικούς και για θεραπευτικούς σκοπούς. Ο όρος ραδιονουκλίδιο αναφέρεται στους ραδιενεργούς πυρήνες. Ο ιστορικός όρος ιχνηθέτης αναφέρεται στην δυνατότητα εντοπισμού, παρακολούθησης ή και μελέτης μιας διεργασίας που διενεργείται στον οργανισμό του ασθενή που χορηγείται το ραδιοφάρμακο.[67][68]

Η χρήση των ραδιοφαρμάκων για την απεικόνιση οργανικών λειτουργιών και ασθενειών είναι μια μοναδική ικανότητα της πυρηνικής ιατρικής. Σε αντίθεση με άλλες μορφές απεικόνισης, όπως η Αξονική Τομογραφία (CT), η Μαγνητική Τομογραφία (MRI) και το υπερηχογράφημα (US), οι διαδικασίες πυρηνικής ιατρικής είναι ικανές να αποτυπώνουν τη φυσιολογική λειτουργία και τη μεταβολική δραστηριότητα δίνοντας έτσι πιο συγκεκριμένες πληροφορίες σχετικά με την οργανική λειτουργία και δυσλειτουργία. Η διαδεδομένη χρήση και η αυξανόμενη ζήτηση για αυτές τις τεχνικές συνδέονται άμεσα με την ανάπτυξη και τη διαθεσιμότητα ενός ευρέως φάσματος ειδικών ραδιοφαρμάκων.

### 3.5.2 Ραδιοφάρμακα για διάγνωση

Τα ραδιοφάρμακα για διάγνωση πρέπει να έχουν τις εξής ιδιότητες:

- Επιτομή του ραδιοϊσοτόπου μόνο ακτινοβολίας γάμμα
- Ενέργεια ακτινοβολίας 100 keV με 250 keV
- Ενεργός χρόνος ημιζωής μικρότερος από 1.5 φορές τη διάρκεια της εξέτασης
- Υψηλός λόγος στόχου προς μη στόχο
- Ελάχιστη δόση στον ασθενή και στο ιατρικό προσωπικό
- Απόλυτα ασφαλές για τον ασθενή
- Καλές δυνατότητες επισήμανσης από τον ιχνηθέτη
- Χαμηλό κόστος και εύκολη διαθεσιμότητα του ραδιοφαρμάκου
- Απλή προετοιμασία και ποιοτικός έλεγχος του ραδιοφαρμάκου αν παρασκευάζεται σε κλινικά εργαστήρια.

Στα ραδιοφάρμακα για διάγνωση γίνεται χρήση ακτινοβολίας μεγάλης διεισδυτικότητας (που δεν απορροφάται από τους ιστούς) και η εξωτερική ανίχνευση αυτής πραγματοποιείται από κατάλληλες ανιχνευτικές διατάξεις (SPECT, PET)

### 3.5.3 Ραδιοφάρμακα για θεραπεία

Τα ραδιοφάρμακα για θεραπευτική χρήση πρέπει να πληρούν τις εξής ιδιότητες:

- Διάσπαση ραδιονουκλιδίου είτε με εκπομπή σωματιδίων  $\beta$  - είτε με εκπομπή σωματιδίων- $\alpha$  είτε με εκπομπή ηλεκτρονίων Auger είτε με ηλεκτρόνια εσωτερικής μετατροπής.
- Μέση/υψηλή ενέργεια ακτινοβολίας (πάνω από 1 MeV)
- Μεγάλος ενεργός χρόνος ημιζωής (π.χ. μερικές ημέρες)
- Υψηλός λόγος στόχου προς μη στόχο
- Ελάχιστη δόση στον ασθενή και στο ιατρικό προσωπικό
- Απόλυτα ασφαλές για τον ασθενή
- Καλές δυνατότητες επισήμανσης από τον ιχνηθέτη
- Χαμηλό κόστος και εύκολη διαθεσιμότητα του ραδιοφαρμάκου
- Απλή προετοιμασία και ποιοτικός έλεγχος του ραδιοφαρμάκου αν παρασκευάζεται σε κλινικά εργαστήρια.

Η θεραπεία που χρησιμοποιεί ραδιοφάρμακα επισημασμένα με ραδιονουκλίδια που εκπέμπουν ακτινοβολία- $\beta$ , αναδεικνύεται ως ένα σημαντικό μέρος της πυρηνικής ιατρικής. Εκτός από την διαχείριση του καρκίνου του θυρεοειδούς, η θεραπεία με ραδιονουκλίδια χρησιμοποιείται για την ανακούφιση του πόνου των οστών, παρέχοντας σημαντική βελτίωση στην ποιότητα ζωής των καρκινοπαθών ασθενών που υποφέρουν από πόνους που σχετίζονται με μετάσταση στα οστά, καθώς και για τη θεραπεία του πόνου στις αρθρώσεις, όπως στη ρευματοειδή αρθρίτιδα.[69][70][71]

### 3.5.4 Κιναζολίνες ως ραδιοφάρμακα

Οι κιναζολίνες, όπως αναφέραμε και στο προηγούμενο κεφάλαιο, μπορούν να χρησιμοποιηθούν εκτός από αντικαρκινικά φάρμακα και ως ραδιοφάρμακα. Επομένως είναι χρήσιμα τόσο στην χημειοθεραπεία όσο και στην ραδιοθεραπεία.

Συγκεκριμένα γνωρίζουμε ότι ο δακτύλιος της κινναζολίνης μπορεί να συνδεθεί εύκολα με ρήνιο (Re). Από την στιγμή που το κινναζολινικό παράγωγο μελετηθεί εργαστηριακά ως προς κάποια ιδιότητα που θέλουμε να ελέγξουμε, για παράδειγμα την αποτελεσματικότητά τους ως ακτινοευαισθητοποιητές, μπορούμε να αντικαταστήσουμε το Re, με ιχνηθετημένο Re, αν θέλουμε να χρησιμοποιήσουμε την κινναζολίνη για θεραπευτικούς σκοπούς ή με ιχνηθετημένο  $^{99m}\text{Tc}$  να θέλουμε να χρησιμοποιήσουμε την κινναζολίνη για διάγνωση. Αυτό είναι εφικτό γιατί το Re, με το  $\text{Re}^*$  και το  $^{99m}\text{Tc}$  έχουν όμοια χημική συμπεριφορά στην πρόσδεση με τον κινναζολινικό δακτύλιο.[72]

# 4. Πειραματικό Μέρος

## 4.1 Σκοπός της παρούσας εργασίας

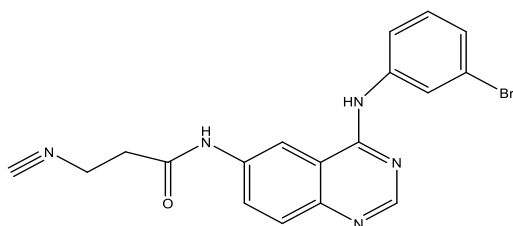
Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι να μελετήσουμε την ακτινοευαίσθητοποιητική δράση 6 κιναζολινικών παραγώγων στην καρκινική σειρά A431, που είναι σειρά που υπερεκφράζει τον EGFR. Η A431 είναι γνωστό από την βιβλιογραφία ότι παρουσιάζει μεγάλη ακτινοαντοχή [73]

Τα κιναζολινικά παράγωγα που μελετήθηκαν είναι τα ακόλουθα:

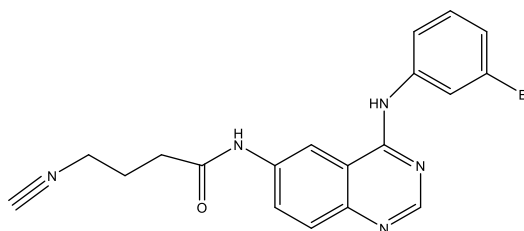
- 4C
- 6C
- 3C (μόριο αναφοράς)

Και τα σύμπλοκα

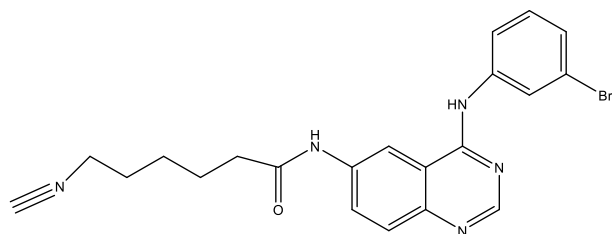
- Re4C
- Re6C
- ReCp



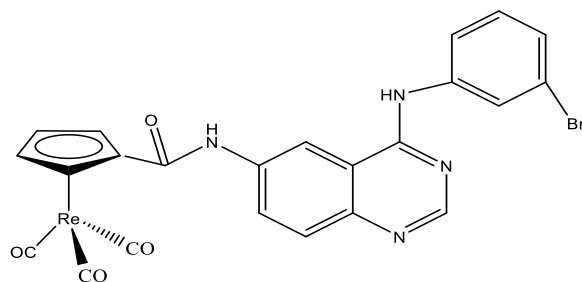
*Παράγωγο 3C*



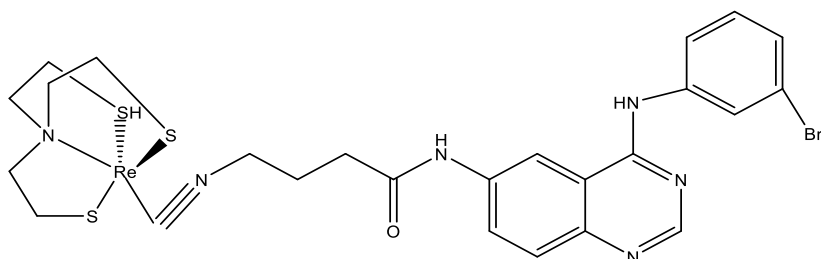
*Παράγωγο 4C*



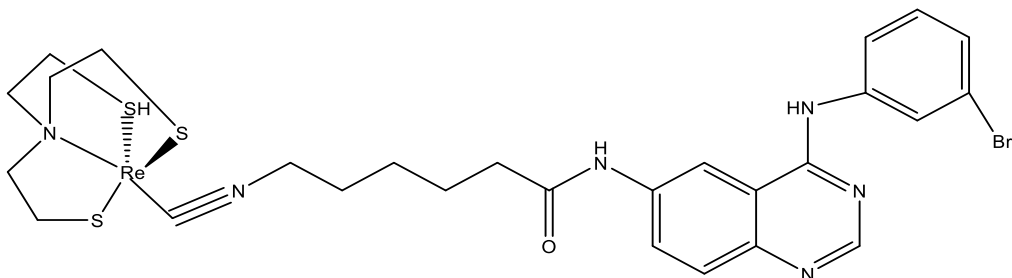
*Παράγωγο 6C*



*Σύμπλοκο ReCp*



*Σύμπλοκο Re4C*



*Σύμπλοκο Re6C*



## 4.2 Κυτταρικές καλλιέργειες

Οι κυτταρικές καλλιέργειες αναπτύχθηκαν αρχικά ως μια μέθοδος μελέτης της συμπεριφοράς των κυττάρων, ελεύθερων από πιθανές *in vivo* επιδράσεις που συμβαίνουν στον οργανισμό.

Σκοπός της καλλιέργειας των κυττάρων είναι να διατηρηθούν τα κύτταρα βιώσιμα, μακριά από το φυσιολογικό οργανισμό από τον οποίον προήλθαν και κάτω από ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες. Όλες οι εργασίες γίνονται σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, ο οποίος είναι εξοπλισμένος με υπεριώδη (UV) λάμπα και φίλτρα αέρος ώστε οι συνθήκες εργασίας να είναι άσηπτες. Τα κύτταρα επωάζονται στους 37° C στον επωαστικό κλίβανο (*incubator*) σε κορεσμένες συνθήκες υγρασίας και παρουσία 5% CO<sub>2</sub>. [74] Τα υλικά και τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για τις κυτταρικές καλλιέργειες βρίσκονται διαθέσιμα στο εμπόριο. [75]

Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, όπως έχουμε ήδη αναφέρει ήταν η A431 (*human epidermoid carcinoma cells*). Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά προέρχεται από ανθρώπινο καρκίνωμα και υπερεκφράζει τον EGFR. Κάθε κύτταρο A431 περιέχει 2\*10<sup>6</sup> υποδοχείς, σε σύγκριση με άλλα επιδερμικά κύτταρα που περιέχουν 10<sup>4</sup> έως 10<sup>5</sup> υποδοχείς. [76] Ο μεγάλος αριθμός υποδοχέων στα κύτταρα A431 είναι αποτέλεσμα γονιδιακής ενίσχυσης (πολλά αντίγραφα του ίδιου γονιδίου στα κύτταρα). Τα κύτταρα αυτά έχουν επιτρέψει την κλωνοποίηση του γονιδίου του υποδοχέα και έχουν καταστήσει δυνατή τη μελέτη των ιδιοτήτων του. [77]

### 4.2.1 Εξοπλισμός και Υλικά

- Μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης, Axiovert 25 Zeiss
- Επωαστικός κλίβανος με παροχή CO<sub>2</sub>
- Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής (*Laminar flow*), ELMED
- Δοχείο υγρού αζώτου
- Φιάλες κυτταροκαλλιεργειών
- Σιφώνια ακριβείας
- Ειδικά σωληνάκια ψύξης κυττάρων των 2 ml
- Πιπέτες, Gibson
- Φυγόκεντρος, Heraeus Christ
- Κυτταρική σειρά A431 (επιδερμικά επιθηλιακά κύτταρα)
- DMSO, Sigma

- Θρεπτικό υλικό: D-MEM HIGH GLUCOSE
- Εμβρυϊκός ορός μόσχου (FBS)
- Διάλυμα L-γλουταμίνης 200 mM
- Διάλυμα πενικιλίνης / στρεπτομικίνης 100 Units/mL και 10mg/ mL
- Διάλυμα τρυψίνης/EDTA: 0,05% / 0,02 % σε PBS χωρίς Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>
- Εμπλουτισμένο θρεπτικό υλικό: D-MEM HIGH GLUCOSE (10% FBS, 1% L-Glutamine, 1% Penicillin/Streptomycin)
- Διάλυμα ψύξης: 10% DMSO σε ορό μόσχου
- Διάλυμα μονιμοποίησης (Fixative): Μεθανόλης – Οξικό οξύ σε αναλογία 3:1
- Διάλυμα τρυψίνης/EDTA: 0,05% / 0,02 % σε PBS χωρίς Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>
- Αντικειμενοφόρες πλάκες
- Ισοτονικό ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών –χλωριούχων (PBS), pH 7.439

## 4.2.2 Απόψυξη κυτταρικής σειράς

Η κυτταρική σειρά A431 παραλαμβάνεται από συνθήκες βαθιάς ψύξης (υγρό άζωτο -196° C, 10<sup>7</sup> κύτταρα / ml διαλύματος ψύξης σε ειδικά σωληνάκια ψύξης κυττάρων των 2ml (cryotubes) που βρίσκονται σε ειδικά ψυγεία φύλαξης παγωμένων κυττάρων στους -80° C). Κατά την απόψυξη, τα σωληνάκια μεταφέρονται αμέσως από το υγρό άζωτο ή από τους -80° C στο θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, όπου με την προσθήκη εμπλουτισμένου θρεπτικού υλικού, προθερμασμένο στους 37° C, γίνεται σιγά – σιγά η απόψυξη των κυττάρων. Αμέσως μετά την απόψυξη τα κύτταρα μεταφέρονται σε φιάλες ή τριβλία καλλιέργειας εμπλουτισμένα με 10ml θρεπτικό υλικό προθερμασμένο στους 37° C και τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο.

## 4.2.3 Καλλιέργεια κυττάρων

Τα κύτταρα της σειράς A431 καλλιεργούνται με εμπλουτισμένο θρεπτικό υλικό D-MEM στον επωαστικό κλίβανο στους 37° C παρουσία CO<sub>2</sub> 5% και κορεσμένη σε υδρατμούς ατμόσφαιρα. Κάθε δύο με τρεις μέρες πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια.

## 4.2.4 Ανακαλλιέργεια κυττάρων

Όταν τα κύτταρα έχουν καλύψει το 80-90% της επιφάνειας της φιάλης στο οποίο καλλιεργούνται, πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια. Ο προσδιορισμός του ποσοστού κάλυψης γίνεται με παρατήρηση στο μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης. Αρχικά εργαζόμαστε μέσα στο θάλαμο κάθετης νηματικής ροής όπου αφαιρείται το παλιό θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας και τα κύτταρα ξεπλένονται πρώτα με διάλυμα PBS. Με την διαδικασία αυτή απομακρύνονται ίχνη ορού βοηθώντας τα κύτταρα να ξεκολλήσουν πιο γρήγορα. Έπειτα αφαιρούμε το PBS και προσθέτουμε 2ml ανά φιάλη διαλύματος τρυψίνης/EDTA και τα κύτταρα επάζονται στον επωαστικό κλίβανο για περίπου 10 λεπτά (μεγαλύτερος χρόνος επώασης στη τρυψίνη πιθανών να επιφέρει λύση των κυττάρων). Η πορεία αποκόλλησης των κυττάρων παρακολουθείται στο μικροσκόπιο. Μετά την ολοκλήρωση της αποκόλλησης των κυττάρων το αιώρημα αυτών χωρίζεται σε 2 - 3 τριβλία στα οποία προστίθενται 10ml εμπλουτισμένου θρεπτικού υλικού.

## 4.2.5 Ψύξη κυττάρων

Η διατήρηση κάθε κυτταρικής σειράς για μεγάλο χρονικό διάστημα είναι δυνατή με την αποθήκευσή της σε υγρό άζωτο. Η ψύξη των κυττάρων πραγματοποιείται βαθμιαία. Αρχικά τα κύτταρα που βρίσκονται σε εκθετική φάση ανάπτυξης μέσα στον επωαστικό κλίβανο αποκολλούνται από τη φιάλη, με την διαδικασία της ανακαλλιέργειας που περιγράψαμε παραπάνω. Στην συνέχεια μεταφέρονται σε σωλήνα φυγοκέντρωσης όπου φυγοκεντρώνονται για 10 λεπτά στις 1500 rpm. Όταν ολοκληρωθεί η φυγοκέντρωση, αφαιρείται το υπερκείμενο θρεπτικό υλικό και γίνεται επαναιώρηση του ιζήματος των κυττάρων σε 1 ml διαλύματος ψύξης. Τέλος, μεταφέρονται σε ειδικά σωληνάκια ψύξης, τα οποία τοποθετούνται στο υγρό άζωτο.

## 4.2.6 Μέτρηση κυττάρων με αιματοκυτταρόμετρο

Η μέτρηση των κυττάρων με αιματοκυτταρόμετρο είναι μια άμεση και εύκολη μέθοδος προσδιορισμού του αριθμού των κυττάρων σε εναιώρημα γνωστού όγκου.

Το αιματοκυτταρόμετρο είναι μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρος πλάκα με δύο κατάλληλα επεξεργασμένες επιφάνειες. Η κάθε επιφάνεια αποτελείται από εννέα μεγάλα τετράγωνα σε μορφή πλέγματος. Κάθε ένα από τα τέσσερα τετράγωνα στις γωνίες χωρίζεται σε δεκαέξι μικρότερα τετράγωνα. Κάθε μεγάλο τετράγωνο (κόκκινο τετράγωνο) έχει επιφάνεια  $1 \text{ mm}^2$ , έτσι ώστε όταν καλύπτεται με καλυπτρίδα ο όγκος του υγρού σε κάθε τετράγωνο

να είναι  $10^{-4}$  ml. Γνωρίζοντας τον όγκο του κυτταρικού εναιωρήματος και μετρώντας τα κύτταρα σε ένα τετράγωνο μπορεί να προσδιορισθεί ο αριθμός και η συγκέντρωση τους. Τοποθετείται η καλυπτρίδα στο αιματοκυτταρόμετρο και με πιπέττα τοποθετούνται 10μl από το κυτταρικό εναιώρημα στην άκρη της καλυπτρίδας, έτσι ώστε να καλυφθεί η κατάλληλα επεξεργασμένη επιφάνεια λόγω του τριχοειδούς φαινομένου. Τα κύτταρα που βρίσκονται στα τέσσερα ακριανά μεγάλα τετράγωνα διαμερίσματα του αιματοκυτταρομέτρου μετρώνται στο οπτικό μικροσκόπιο. Ο αριθμός των κυττάρων ανά mL αρχικού εναιωρήματος ισούται με τον μέσο όρο του αριθμού των κυττάρων στα τέσσερα διαμερίσματα του αιματοκυτταρομέτρου επί  $10^4$ .

## 4.3 Ακτινοβόληση Δειγμάτων

Η ακτινοβόληση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε πηγή κοβαλτίου ( $^{60}\text{Co}$ ) GammaCell 220 Irradiator (Atomic Energy of Canada Ltd, Ottawa, Canada, Ιανουαρίου 1974), που βρίσκεται στο ΙΠΡΕΤΕΑ, στο ΕΚΕΦΕ «Δ», σε θερμοκρασία δωματίου,

Πριν την ακτινοβόληση έχει προηγηθεί μέτρηση του ρυθμού δόσης με την βοήθεια φορητού δοσίμετρου, που τοποθετείται στο σημείο που θα ακτινοβοληθούν τα δείγματα. Ύστερα από βαθμονόμηση της πηγής βρέθηκε ότι τη στιγμή που έγινε η ακτινοβόληση χρειάζονταν 3 min και για να δεχτούν τα κύτταρα ακτινοβολία 1 Gy (δηλαδή 0,33 Gray/min).

## 4.4. Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

### 4.4.1. Δοκιμασία Τοξικότητας (Μέθοδος ΜΤΤ)

Η χρωματομετρική μέθοδος ΜΤΤ {3-(4,5-dimethylthiazol -2 yl)-2.5-diphenyltetrazolium bromide}, που περιγράφεται για πρώτη φορά από τον Mosmann το 1983 βασίζεται στην ικανότητα των ζωντανών κυττάρων να μετατρέπουν το διαλυτό κίτρινο άλας τετραζολίου (ΜΤΤ) σε αδιάλυτους πορφυρούς κρυστάλλους φορμαζάνης. Συγκεκριμένα ο δακτύλιος του τετραζολίου μεταβολίζεται στα ενεργά μιτοχόνδρια από τη δραστηριότητα διαφόρων αφυδρογονασών και το απαλό κίτρινο χρώμα του υποστρώματος μετατρέπεται σε πορφυρούς κρυστάλλους, οι οποίοι μετά τη διάλυσή τους με ισοπροπανόλη δίνουν ένα σκούρο μπλε/μοβ χρώμα. Τα άλατα τετραζολίου δέχονται ηλεκτρόνια από τα οξειδωμένα υποστρώματα ή από κατάλληλα ένζυμα όπως NADH και NADPH. Η συγκέντρωση των κρυστάλλων στα μιτοχόνδρια των κυττάρων είναι ευθέως ανάλογη της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων.

#### 4.4.1.1 Εξοπλισμός και Υλικά

- Επωαστικός κλίβανος με παροχή CO<sub>2</sub>
- Πλακίδια κυτταροκαλλιεργειών επίπεδου πυθμένα με 96 μικροφρεάτια,
- Μετρητής οπτικής απορρόφησης πλακιδίων ELISA
- Ισοπροπανόλη
- Κυτταρική σειρά A431 (επιδερμικά επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα)
- Θρεπτικό υλικό D-MEM HIGH GLUCOSE
- {3-(4, 5-dimethylthiazol -2 yl)-2.5-diphenyltetrazolium bromide} (ΜΤΤ)
- DMEM complete
- Διάλυμα ΜΤΤ 0.5 mg/ml σε DMEM

#### 4.4.1.2. Μέθοδος

Πραγματοποιείται σπορά κυττάρων A431 (3.000 - 4.000 κύτταρα / μικροφρεάτιο) σε πλακίδια κυτταροκαλλιιεργειών με 96 μικροφρεάτια. Την επόμενη ημέρα αφαιρείται το εμπλουτισμένο θρεπτικό υλικό και προστίθενται σε φρέσκο θρεπτικό υλικό τα παράγωγα κινολινών που μελετάμε σε διάφορες συγκεντρώσεις (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100  $\mu\text{M}$ ). Τα πλακίδια τοποθετούνται σε επωαστικό κλίβανο στους 37° C. Μετά από 72 ώρες αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και προστίθενται 100  $\mu\text{L}$  διαλύματος ΜΤΤ (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Τα κύτταρα επωάζονται με το ΜΤΤ για 4 ώρες στους 37° C. Κατά τη διάρκεια της επώασης σχηματίζονται μπλε/μοβ κρύσταλλοι φορμαζάνης. Μετά το τέλος της επώασης απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό και προστίθεται σε κάθε μικροφρεάτιο 100  $\mu\text{l}$  ισοπροπανόλης. Ακολουθεί καλή ανάδευση ώστε να διαλυθούν οι μπλε/μοβ κρύσταλλοι και μετράται η απορρόφηση σε φωτόμετρο ELISA και μήκος κύματος 540 nm. Πραγματοποιούνται 3ς ανεξάρτητες δοκιμασίες, και κάθε δείγμα (συγκέντρωση φαρμάκου) είναι εις τετραπλούν σε κάθε δοκιμασία.

#### 4.4.1.3. Επεξεργασία Αποτελεσμάτων Δοκιμασίας Κυτταροτοξικότητας ΜΤΤ των κινολινών προς ακτινοβόληση

Στην παρούσα φάση, μετά την λήψη δεδομένων από το φωτόμετρο ELISA, εισάγουμε τα δεδομένα σε υπολογιστικό φύλλο, όπου τα έχουμε συγκεντρωτικά και για τις τρεις επαναλήψεις του πειράματος. Κατόπιν υπολογίζουμε για κάθε δόση του κάθε παραγώγου τον μέσο όρο της τετράδας όπως έχουμε τοποθετήσει στα πλακίδια 96 μικροφρεατίων και τον συγκρίνουμε με τον μέσο όρο του δείγματος ελέγχου (control, καλλιέργεια χωρίς φάρμακο) επί της 100.

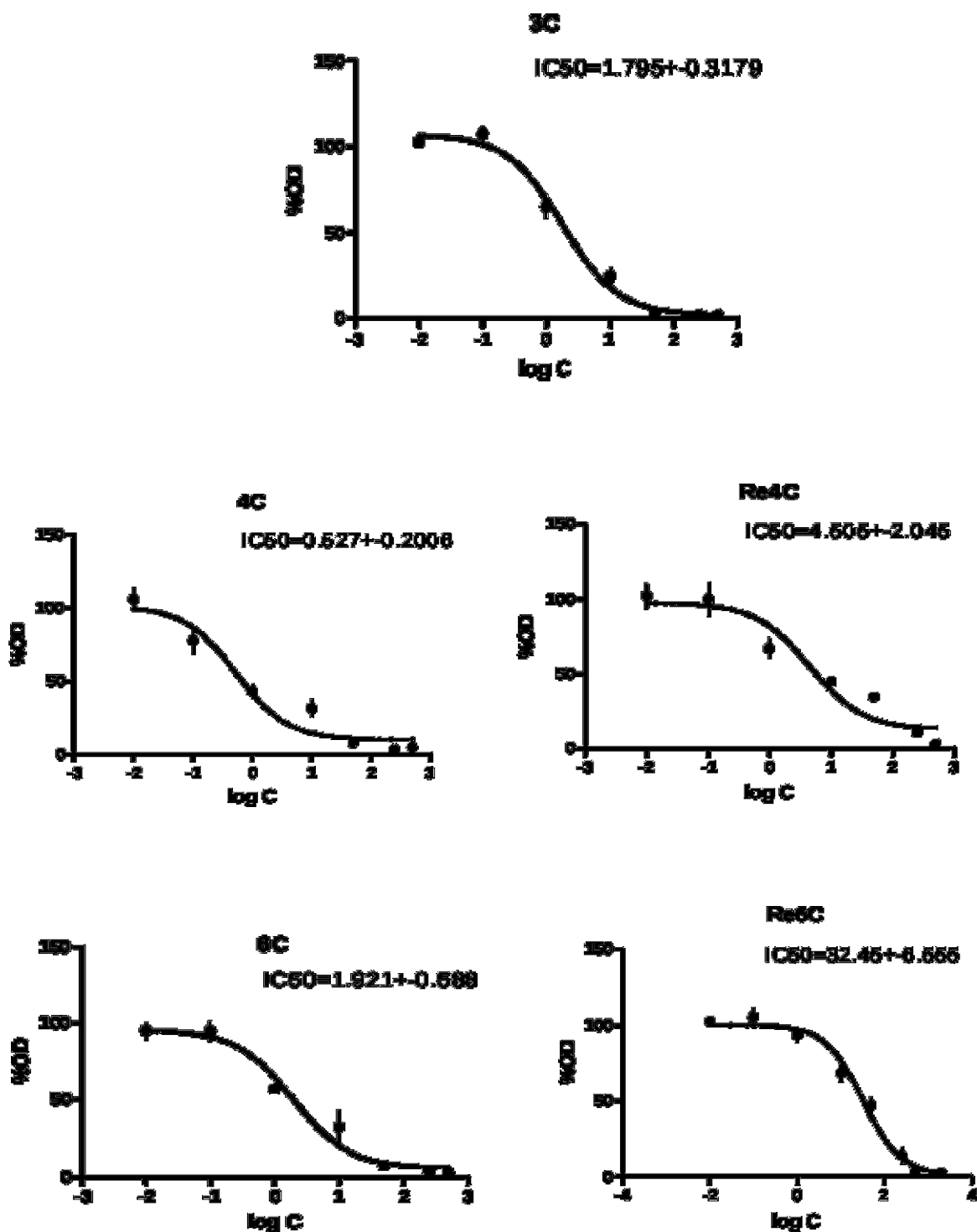
Επειτα κατασκευάζουμε διαγράμματα για το κάθε παράγωγο που εξετάζουμε μέσω του λογισμικού Graphpad Prism, για να βρούμε το IC<sub>50</sub> για το κάθε παράγωγο. Το λογισμικό Prism είναι λογισμικό για χρήση σε βιολογικές δοκιμασίες.

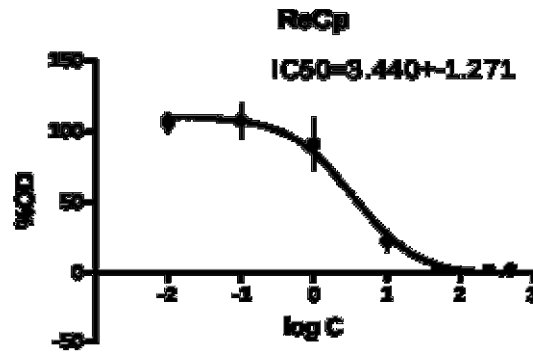
Το IC<sub>50</sub> είναι δείκτης που μας δείχνει το πόσο τοξικό είναι το παράγωγό μας. Πιο συγκεκριμένα, η ημιμέγιστη ανασταλτική συγκέντρωση (IC<sub>50</sub>) είναι ένα μέτρο της αποτελεσματικότητας μιας ουσίας στην αναστολή μίας συγκεκριμένης βιολογικής ή βιοχημικής λειτουργίας.

Αυτό ποσοτικό μέτρο δείχνει πόσο ένα συγκεκριμένο φάρμακο ή άλλη ουσία (αναστολέας) είναι απαραίτητη για να αναστείλει μια δεδομένη βιολογική διεργασία (ή συστατικό της διαδικασίας, δηλαδή ένα ένζυμο, κύτταρο, υποδοχέα κυττάρου, μικροοργανισμό) κατά το ήμισυ. Χρησιμοποιείται ως ένα μέτρο της δραστηριότητας φαρμάκου σε φαρμακολογική έρευνα. Το IC<sub>50</sub> αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του φαρμάκου που απαιτείται για 50% αναστολή *in vitro* της κυτταρικής επιβίωσης. Το IC<sub>50</sub> αποτελεί συγκρίσιμο μέγεθος μεταξύ φαρμάκων.

Το κάθε διάγραμμα απεικονίζει στον οριζόντιο άξονα τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήσαμε για το κάθε παράγωγο λογαριθμημένες και στον κάθετο άξονα την επί της 100 κυτταρική επιβίωση σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου (control). Για να βρούμε το IC<sub>50</sub> έχει γίνει ανάλυση του διαγράμματος με σιγμοειδή προσαρμογή (sigmoidal fitting)

Τα διαγράμματα καθώς και το IC<sub>50</sub> του κάθε φαρμάκου παρατίθενται παρακάτω:





**Διαγράμματα:** Γραφική Αναπαράσταση Δόσης-Ακτινοβολίας για προσδιορισμό του IC<sub>50</sub>. Παρατίθενται από κατά σειρά το 3C, 4C, Re4C, 6C, Re6C, ReCp,. Στον κάθετο άξονα απεικονίζεται η επί της 100 κυτταρική επιβίωση και στον οριζόντιο άξονα λογαριθμημένες τις συγκεντρώσεις φαρμάκων.

Όπως μπορούμε εύκολα να διαπιστώσουμε, στο σύνολό τους τα κιναζολινικά παράγωγα είναι πιο δραστικά από τα αντίστοιχα σύμπλοκά τους με ψυχρό Re, καθώς σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις επιτυγχάνουν αναστολή της κυτταρικής επιβίωσης κατά 50% σε αντίθεση με τα σύμπλοκα, που χρειάζονται μεγαλύτερες συγκεντρώσεις για να επιτύχουν αυτό το ποσοστό.

Συγκεκριμένα, το πιο δραστικό – τοξικό μας φάρμακο είναι η κιναζολίνη 4C (IC<sub>50</sub>=0.527±0.200), ενώ το λιγότερο δραστικό είναι το κιναζολινικό σύμπλοκο Re6C (IC<sub>50</sub>=32.45±6.56).



LIGANDS		COMPLEXES	
Παράγωγα	IC <sub>50</sub>	Παράγωγα	IC <sub>50</sub>
3C Ref.	1.795±0.318		
4C	0.527±0.200	Re4C	4.505±2.05
6C	1.921±0.588	Re6C	32.45±6.56
		ReCp	3.440±1.271

**Πίνακας:** Κατά σειρά το κάθε παράγωγο όσο και το IC<sub>50</sub> του. Παρατίθενται οι προσδέτες (ligands) και τα σύμπλοκα ψυχρού Re (complexes)

#### 4.4.2. Συνδυαστική Δράση Ακτινοβολίας και κιναζολινικών παραγώγων

Για την μέθοδο μελέτης της ακτινοευαस्थίας χρησιμοποιήσαμε μέθοδο από την βιβλιογραφία που αφορά το κιναζολινικό παράγωγο Iressa.[78] Η δοκιμασία χρησιμοποιήθηκε για να ελέγξουμε την βιωσιμότητα των κυττάρων αναλογικά με την δόση της ακτινοβολίας και του φαρμάκου που χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά. Είναι η βασική δοκιμασία που χρησιμοποιήθηκε στα πλαίσια της εργασίας, για τον έλεγχο της συνδυαστικής δράσης του φαρμάκου και της ακτινοβολίας στην ακτινοευαस्थτοποίηση της κυτταρικής σειράς A431.

#### 4.4.2.1. Εξοπλισμός και Υλικά

- Επωαστικός κλίβανος με παροχή CO<sub>2</sub>
- Πλακίδια κυτταροκαλλιιεργειών επίπεδου πυθμένα με 96 μικροφρεάτια,
- Μετρητής οπτικής απορρόφησης πλακιδίων ELISA
- Ισοπροπανόλη
- Κυτταρική σειρά A431 (επιδερμικά επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα)
- Θρεπτικό υλικό D-MEM HIGH GLUCOSE
- {3-(4,5-dimethylthiazol -2 yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide} (MTT)
- DMEM complete, PAA Laboratories
- Διάλυμα MTT 1 mg/ml σε DMEM
- Πηγή ακτινοβολίας κοβαλτίου
- Κιναζολινικά Παράγωγα

#### 4.4.2.2 Πρωτόκολλο Μεθόδου

Τα κύτταρα της σειράς A431 στρώνονται σε 10\*96w/plate. (500 κύτταρα ανά well - μικροφρεάτιο). Εικοσιτέσσερις (24) ώρες μετά την σπορά, απομακρύνεται το καλλιιεργητικό υλικό και προστίθεται φρέσκο με διάφορες συγκεντρώσεις των κινάζολινικών παραγώγων. Συγκεκριμένα οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήσαμε ήταν 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 μM

Μετά από άλλες 24 ώρες, οι κυτταροκαλλιιεργειες υποβλήθηκαν σε ακτινοβοληση με ακτίνες γ. Η πηγή που χρησιμοποιήθηκε ήταν πηγή κοβαλτίου, με απορροφούμενη δόση 1Gy/3min. Τα κύτταρα ακτινοβολούνται σε κλιμακούμενες δόσεις (0, 1Gy, 3Gy, 6Gy, 9Gy).

Μετά από 7 ημέρες απομακρύνουμε το καλλιιεργητικό υλικό και προσθέτουμε 0.5μg/ml διαλύματος MTT. Η διαδικασία που ακολούθηθηκε στα επόμενα στάδια είναι ίδια με αυτήν που περιγράψαμε στη μέθοδο MTT.

Οι καμπύλες καθορίστηκαν για δόσεις ακτινοβολίας και για συγκεντρώσεις φαρμάκου που αναφέραμε παραπάνω. Η ευαισθησία των κυττάρων με τα εξεταζόμενα φάρμακα εκφράζεται από το IC<sub>50</sub>.

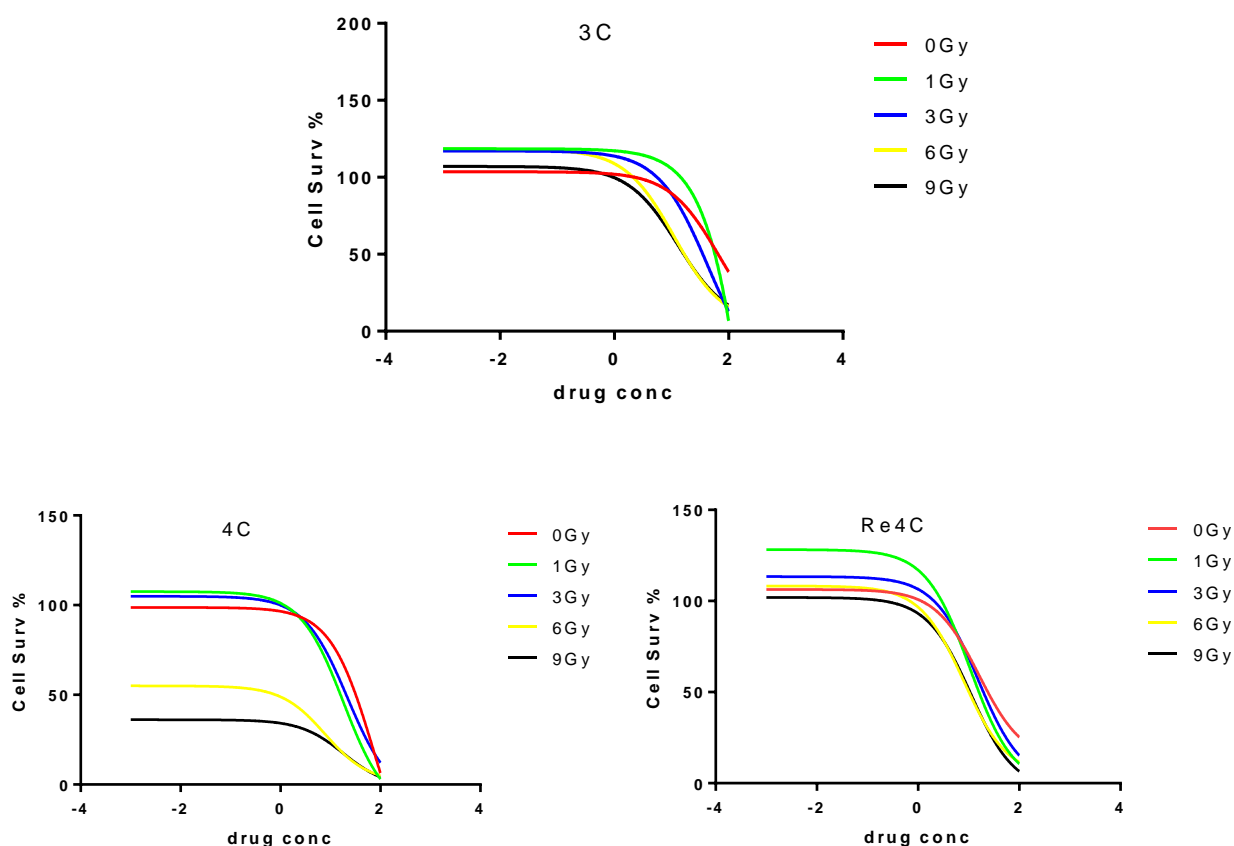
Διαπιστώνεται ότι η μέθοδος αυτή υπερτερεί έναντι της κλασικής μεθόδου clonogenic assay, καθώς επιτρέπει εύκολα και σε σύντομο χρονικό διάστημα, την μελέτη της δράσης πολλών φαρμάκων σε διάφορες συγκεντρώσεις και σε διαφορετικές δόσεις ακτινοβολίας ταυτόχρονα.

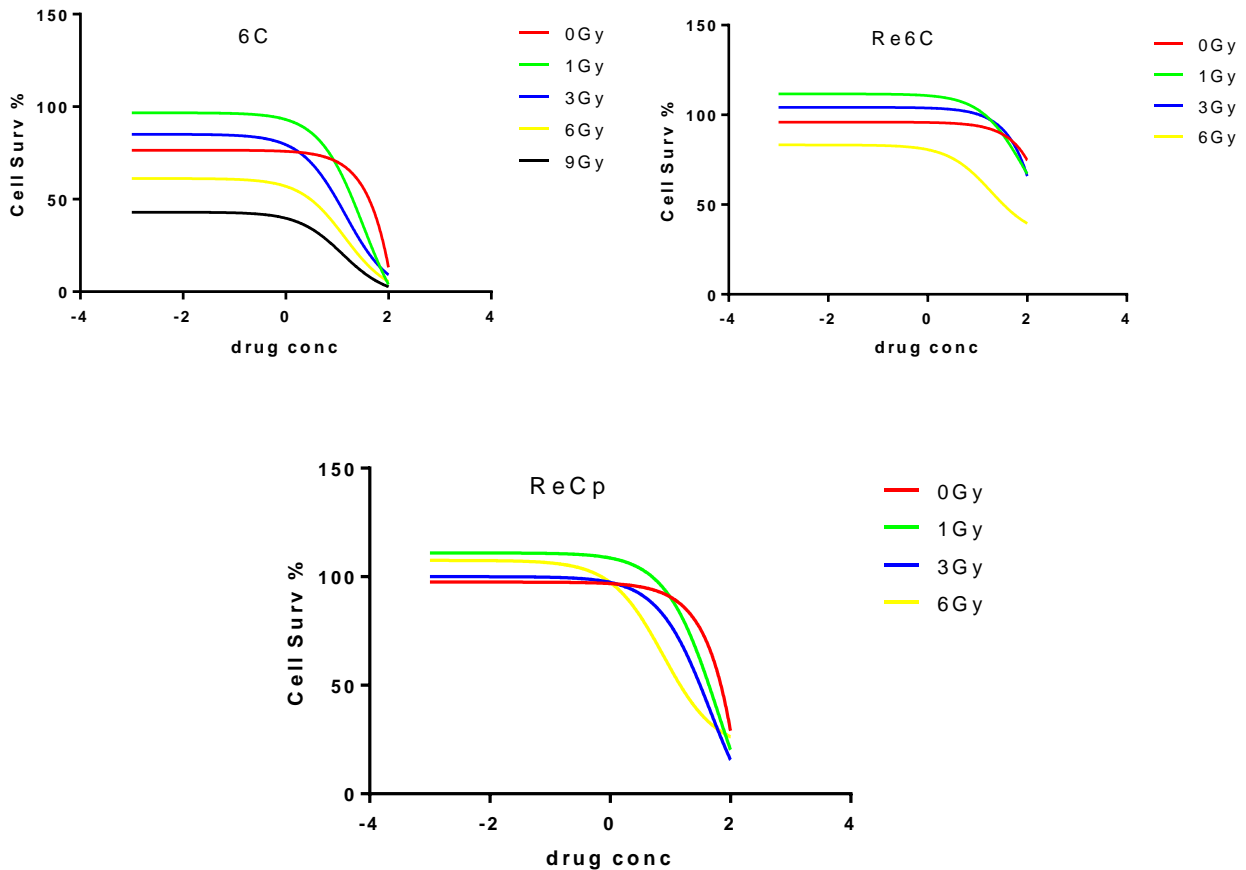
Βασικό μειονέκτημα της μεθόδου είναι οι μεγάλες αποκλίσεις μεταξύ των τιμών που παίρνουμε κατά την επεξεργασία των μετρήσεων και τα μεγάλα σφάλματα που λαμβάνουμε. Οι αποκλίσεις μεταξύ των τιμών εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τον μικρό αριθμό κυττάρων σε κάθε πηγάδι. Η ελαχιστοποίηση των σφαλμάτων μπορεί να επιτευχθεί με αρκετές επαναλήψεις της μεθόδου.

### 4.4.2.3 Επεξεργασία Μετρήσεων

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε όπως με την δοκιμασία ΜΤΤ.

Παρακάτω παρατίθενται τα διαγράμματα που κατασκευάστηκαν έπειτα από επεξεργασία των δεδομένων: Απεικονίζει στον κάθετο άξονα την επί της 100 κυτταρική επιβίωση αναλογικά με το control, σε σχέση με την συγκέντρωση του φαρμάκου που χρησιμοποιήθηκε. Οι συγκεντρώσεις είναι οι λογαριθμημένες τιμές των συγκεντρώσεων φαρμάκου σε  $\mu\text{M}$ . Επιπλέον παρατίθεται η καμπύλη για κάθε δόση ακτινοβολίας που χρησιμοποιήθηκε.





#### Παρατηρούμε τα εξής:

Το κιναζολινικό παράγωγο 3C, όπως είπαμε, είναι το καλύτερο παράγωγο από προηγούμενη σειρά συνθέσεων κιναζολινών παραγώγων που μελετήθηκε στο εργαστήριο. Στις μικρές συγκεντρώσεις φαρμάκου η ακτινοβολία αυξάνει την κυτταρική επιβίωση. Μείωση της κυτταρικής επιβίωσης παρατηρείται σε μεγάλες δόσεις ακτινοβολίας, για μεγάλες δόσεις φαρμάκου.

Τα κιναζολινικά παράγωγα 4C και 6C παρουσιάζουν τα καλύτερα αποτελέσματα. Σε μικρές συγκεντρώσεις φαρμάκων και δόσεις ακτινοβολίας η κυτταρική επιβίωση αυξάνει σε σχέση με τον μάρτυρα (ή αλλιώς δείγμα ελέγχου-control). Όμως, μικρές δόσεις του φαρμάκου για δόσεις ακτινοβολίας άνω 3 Gy έχουμε πολύ μικρότερη κυτταρική επιβίωση σε σύγκριση με όλα τα παράγωγα που μελετήθηκαν.

Το Re4C καθώς και το ReCP φαίνεται να έχουν παρόμοια δράση. Σε μικρές συγκεντρώσεις φαρμάκου και στις μικρότερες δόσεις ακτινοβολίας παρατηρείται αύξηση της κυτταρικής επιβίωσης. Μείωση της κυτταρικής επιβίωσης παρατηρείται σε μεγάλες δόσεις ακτινοβολίας, για μεγάλες δόσεις φαρμάκου.

Το σύμπλοκο Re6C μόνο σε μεγάλες δόσεις ακτινοβολίας και συγκέντρωσης φαρμάκου αυξάνει ελαφρά την ακτινοευαισθησία των κυττάρων.

### 4.4.3 Συμπεράσματα

Από την παραπάνω πειραματική μελέτη επιβεβαιώνεται η αρχική μας υπόθεση, ότι δηλαδή είναι εφικτή η ακτινοευαίσθητοποίηση της καρκινικής σειράς A431, που υπερεκφράζει τον EGFR με χρήση των μελετώμενων κιναζολινικών παραγώγων. Παρατηρούμε ότι συγκρίνοντας όλα τα κιναζολινικά παράγωγα, το παράγωγο 4C είναι το καλύτερο ως προς την μελετώμενη ιδιότητα. Ανάλογα αποτελέσματα παρουσιάζει και το 6C. Τα παράγωγα αυτά προσφέρονται λοιπόν για περαιτέρω βιολογική μελέτη ή ακόμα και ως βάση για την κατασκευή νέων κιναζολινικών παραγώγων, που θα φέρουν βελτιωμένες ιδιότητες σχετικά με την δράση τους ως ακτινοευαίσθητοποιητές.

# 5. Βιβλιογραφία

1. Woodside, Gayle (1997). Environmental, Safety, and Health Engineering. US: John Wiley & Sons. p. 476. ISBN 0471109320.
2. Stallcup, James G. (2006). OSHA: Stallcup's High-voltage Telecommunications Regulations Simplified. US: Jones & Bartlett Learning. p. 133. ISBN 076374347X.
3. "Beta Decay". Lbl.gov. 9 August 2000.
4. European Centre of Technological Safety. "Interaction of Radiation with Matter" (PDF). Radiation Hazard. Retrieved 5 November 2012.
5. Feynman, Richard; Robert Leighton; Matthew Sands (1963). The Feynman Lectures on Physics, Vol.1. USA: Addison-Wesley. pp. 2–5. ISBN 0-201-02116-1.
6. L'Annunziata, Michael; Mohammad Baradei (2003). Handbook of Radioactivity Analysis. Academic Press. p. 58. ISBN 0-12-436603-1.
7. Grupen, Claus; G. Cowan; S. D. Eidelman; T. Stroth (2005). Astroparticle Physics. Springer. p. 109. ISBN 3-540-25312-2.
8. Charles Hodgman, Ed. (1961). CRC Handbook of Chemistry and Physics, 44th Ed. USA: Chemical Rubber Co. p. 2850.
9. Contribution of High Charge and Energy (HZE) Ions During Solar-Particle Event of September 29, 1989 Kim, Myung-Hee Y.; Wilson, John W.; Cucinotta, Francis A.; Simonsen, Lisa C.; Atwell, William; Badavi, Francis F.; Miller, Jack, NASA Johnson Space Center; Langley Research Center, May 1999.
10. Particle Data Group Summary Data Table on Baryons. lbl.gov (2007). Retrieved on 2012-08-16.
11. Κυριάκος Ψαρράκος, Ε. Μολυβδά – Αθανασοπούλου, Άννα Γκοτζαμάνη – Ψαρράκου, Αναστάσιος Στιούνας. Ιατρική Φυσική. Θεσσαλονίκη, University Studio Press (2009)
12. Γ. Τσακίρης, Ν. Θρουβάλας, Γ. Κύργιας. Ακτινοθεραπευτική Ογκολογία. Αθήνα, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας (2000)
13. Μαργαρίτη, Λουκά Χ. Ραδιοβιολογία – Ακτινοβολίες και ζωή (1996)
14. Γεωργίου Ευάγγελος. Ιατρική Φυσική. Αθήνα, Π.Χ. Πασχαλίδης (2008)
15. Αντώνης Βεργανελάκης, Παναγιώτης Κρητίδης, Λευτέρης Οικονόμου, Γιάννης Παπάζογλου, Ευθύμιος Παπανικολάου, Λευτέρης Σιδέρης, Θανάσης Σιμόπουλος. Εμείς και η Ραδιενέργεια. Ηράκλειο, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης (1989)
16. ICRP, 2007. The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP Publication 103. Ann. ICRP 37 (2-4) - paragraph 55
17. ICRP, 2007. The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP Publication 103. Ann. ICRP 37 (2-4)

18. "RADIATION HORMESIS CHALLENGING LNT THEORY VIA ECOLOGICAL AND EVOLUTIONARY CONSIDERATIONS"(PDF). Publication date 2002. Health Physics Society. Retrieved 2010-12-11.
19. "Health Risks from Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation: BEIR VII Phase 2". Publication date 2006. National Academy of Science. Retrieved 2013-11-11.
20. ICRP, 2007. The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP Publication 103. Ann. ICRP 37 (2-4) - Paragraph 144.
21. Προυκάκης Χαράλαμπος Χ, Ιατρική Ακτινοφυσική. Αθήνα, Παρισσιανού Α. Ε. (2004)
22. Πάρις Α. Κοσμιδης, Γεώργιος Τσακίρης. Ογκολογία – Ραδιοβιολογία. Αθήνα, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας (2003)
23. Adrian C. Begg, Fiona A. Stewart and Conchita Vens “Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs”, NATURE Reviews, Cancer Vol 11, April 2011
24. Bhide, S. A. & Nutting, C. M. Recent advances in radiotherapy. *BMC Med.* **8**, 25 (2010).
25. Nordsmark, M. *et al.* Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multi-center study. *Radiother. Oncol.* **77**, 18–24 (2005).
26. Kim, J. J. & Tannock, I. F. Repopulation of cancer cells during therapy: an important cause of treatment failure. *Nature Rev. Cancer* **5**, 516–525 (2005).
27. Withers, H. R., Taylor, J. M. & Maciejewski, B. The hazard of accelerated tumor clonogen repopulation during radiotherapy. *Acta Oncol.* **27**, 131–146 (1988).
28. West, C. M., Davidson, S. E., Roberts, S. A. & Hunter, R. D. Intrinsic radiosensitivity and prediction of patient response to radiotherapy for carcinoma of the cervix. *Br. J. Cancer* **68**, 819–823 (1993).
29. Ahn, G. O. *et al.* Inhibition of Mac-1 (CD11b/CD18) enhances tumor response to radiation by reducing myeloid cell recruitment. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 8363–8368 (2010).
30. Kioi, M. *et al.* Inhibition of vasculogenesis, but not angiogenesis, prevents the recurrence of glioblastoma after irradiation in mice. *J. Clin. Invest.* **120**, 694–705 (2010).
31. Jackson, S. P. & Bartek, J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* **461**, 1071–1078 (2009).
32. Kastan, M. B. DNA damage responses: mechanisms and roles in human disease: 2007 G. H. A. Clowes Memorial Award Lecture. *Mol. Cancer Res.* **6**, 517–524 (2008).
33. Lobrich, M. & Jeggo, P. A. The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction. *Nature Rev. Cancer* **7**, 861–869 (2007).
34. Negrini, S., Gorgoulis, V. G. & Halazonetis, T. D. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 220–228 (2010).
35. Jeggo, P. & Lavin, M. F. Cellular radiosensitivity: how much better do we understand it? *Int. J. Radiat. Biol.* **85**, 1061–1081 (2009).
36. O’Driscoll, M. & Jeggo, P. A. The role of double-strand break repair - insights from human genetics. *Nature Rev. Genet.* **7**, 45–54 (2006).

37. Almeida, K. H. & Sobol, R. W. A unified view of base excision repair: lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification. *DNA Repair (Amst)*. **6**, 695–711 (2007).
38. Caldecott, K. W. Single-strand break repair and genetic disease. *Nature Rev. Genet.* **9**, 619–631 (2008).
39. Dianov, G. L., O'Neill, P. & Goodhead, D. T. Securing genome stability by orchestrating DNA repair: removal of radiation-induced clustered lesions in DNA. *Bioessays* **23**, 745–749 (2001).
40. Jenner, T. J., Fulford, J. & O'Neill, P. Contribution of base lesions to radiation-induced clustered DNA damage: implication for models of radiation response. *Radiat. Res.* **156**, 590–593 (2001).
41. Veuger, S. J., Curtin, N. J., Richardson, C. J., Smith, G. C. & Durkacz, B. W. Radiosensitization and DNA repair inhibition by the combined use of novel inhibitors of DNA-dependent protein kinase and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Cancer Res.* **63**, 6008–6015 (2003).
42. Hickson, I. *et al.* Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM. *Cancer Res.* **64**, 9152–9159 (2004).
43. Rainey, M. D., Charlton, M. E., Stanton, R. V. & Kastan, M. B. Transient inhibition of ATM kinase is sufficient to enhance cellular sensitivity to ionizing radiation. *Cancer Res.* **68**, 7466–7474 (2008).
44. Chan, N. *et al.* Chronic hypoxia decreases synthesis of homologous recombination proteins to offset chemoresistance and radioresistance. *Cancer Res.* **68**, 605–614 (2008).
45. Bindra, R. S. *et al.* Hypoxia-induced down-regulation of BRCA1 expression by E2Fs. *Cancer Res.* **65**, 11597–11604 (2005).
46. Slichenmyer, W. J., Nelson, W. G., Slebos, R. J. & Kastan, M. B. Loss of a p53-associated G1 checkpoint does not decrease cell survival following DNA damage. *Cancer Res.* **53**, 4164–4168 (1993).
47. Bucher, N. & Britten, C. D. G2 checkpoint abrogation and checkpoint kinase-1 targeting in the treatment of cancer. *Br. J. Cancer* **98**, 523–528 (2008).
48. Mack, P. C. *et al.* Enhancement of radiation cytotoxicity by UCN-01 in non-small cell lung carcinoma cells. *Radiat. Res.* **162**, 623–634 (2004).
49. Syljuasen, R. G. *et al.* Inhibition of Chk1 by CEP-3891 accelerates mitotic nuclear fragmentation in response to ionizing Radiation. *Cancer Res.* **64**, 9035–9040 (2004).
50. O'Connor, M. J., Martin, N. M. & Smith, G. C. Targeted cancer therapies based on the inhibition of DNA strand break repair. *Oncogene* **26**, 7816–7824 (2007).
51. Zabludoff, S. D. *et al.* AZD7762, a novel checkpoint kinase inhibitor, drives checkpoint abrogation and potentiates DNA-targeted therapies. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 2955–2966 (2008).
52. Brezak, M. C., Kasprzyk, P. G., Galcera, M. O., Lavergne, O. & Prevost, G. P. CDC25 inhibitors as anticancer agents are moving forward. *Anticancer Agents Med. Chem.* **8**, 857–862 (2008).
53. Golding, S. E. *et al.* Improved ATM kinase inhibitor KU-60019 radiosensitizes glioma cells, compromises insulin, AKT and ERK prosurvival signaling, and inhibits migration and invasion. *Mol. Cancer Ther.* **8**, 2894–2902 (2009).
54. Chen, C. C., Kennedy, R. D., Sidi, S., Look, A. T. & D'Andrea, A. CHK1 inhibition as a strategy for targeting Fanconi Anemia (FA) DNA repair pathway deficient tumors. *Mol. Cancer* **8**, 24 (2009).



55. Μαργαρίτης Α.Χ., Γαλανόπουλος Β.Κ., Κεραμάρης Κ.Ε., Μαρίνος Ε.Σ., Παπασιδέρη Ι.Σ., Στραβοπόδης Δ.Ι., Τρουργιάκος Ι.Π. Βιολογία Κυττάρου. Αθήνα: Λίτσας Ο.Ε., 2004
56. Bennasroune, A., Gardin, A., Aunis, D., Cremel, G. and Hubert, P. Tyrosine kinase receptors as attractive targets of cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2004, Τόμ. 50, σσ. 23-38.
57. Hunter, T. The Croonian Lecture 1997. The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1988, Τόμ. 353, σσ. 583-605.
58. Zandi, R., Larsen, A. B., Andersen, P., Stockhausen, M. T. and Poulsen, H. S. Mechanisms for oncogenic activation of the epidermal growth factor receptor. *Cell Signal.* 2007, Τόμ. 19, σσ. 2013-23.
59. Cohen, S., Ushiro, H., Stoscheck, C. and Chinkers, M. A native 170,000 epidermal growth factor receptor-kinase complex from shed plasma membrane vesicles. *J Biol Chem.* 1982, Τόμ. 257, σσ. 1523-31.
60. Roepstorff, K., Grovdal, L., Grandal, M., Lerdrup, M. and van Deurs, B. Endocytic downregulation of ErbB receptors: mechanisms and relevance in cancer. *Histochem Cell Biol.* 2008, Τόμ. 129, σσ. 563-78.
61. Abourbeh, G., Dissoki, S., Jacobson, O., Litchi, A., Ben Daniel, R., Laki, D., Levitzki, A. and Mishani, E. Evaluation of radiolabeled ML04, a putative irreversible inhibitor of epidermal growth factor receptor, as a bioprobe for PET imaging of EGFR-overexpressing tumors. *Nucl Med Biol.* 2007, Τόμ. 34, σσ. 55-70.
62. Uberall, I., Kolar, Z., Trojanec, R., Berkovcova, J. and Hajduch, M. The status and role of ErbB receptors in human cancer. *Exp Mol Pathol.* 2008, Τόμ. 84, σσ. 79-89.
63. Imai, K. and Takaoka, A. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006, Τόμ. 6, σσ. 714-27.
64. Dancey, J. and Sausville, E. A. Issues and progress with protein kinase inhibitors for cancer treatment. *Nat Rev Drug Discov.* 2003, Τόμ. 2, σσ. 296-313.
65. Levitzki, A. and Mishani, E. Tyrosine kinase inhibitors and other tyrosine kinase inhibitors. *Annu Rev Biochem.* 2006, Τόμ. 75, σσ. 93-109.
66. Kwak, E. L., Sordella, R., Bell, D. W., Godin-Heymann, N., Okimoto, R. A., Brannigan, B. W., Harris, P. L., Driscoll, D. R., Fidias, P., Lynch, T. J., Rabindran, S. K., McGinnis, J. P., Wissner, A., Sharma, S. V., Isselbacher, K. J., Settleman, J. and Haber, J. Irreversible inhibitors of the EGF receptor may circumvent acquired resistance to gefitinib. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005, Τόμ. 102, σσ. 7665-70.
67. Κυριάκος Ψαρράκος, Ε. Μολυβδά – Αθανασοπούλου, Άννα Γκοτζαμάνη – Ψαρράκου, Αναστάσιος Σιούντας. *Ιατρική Φυσική. Θεσσαλονίκη, University Studio Press (2009)*
68. Γαζής, Ε.Ν., *Ιοντίζουσες Ακτινοβολίες. Αθήνα, Παπασωτηρίου. 2003*
69. IAEA. Radiopharmaceuticals: Production and Availability, [https://www.iaea.org/About/Policy/GC/GC51/GC51InfDocuments/English/gc51inf-3-att2\\_en.pdf](https://www.iaea.org/About/Policy/GC/GC51/GC51InfDocuments/English/gc51inf-3-att2_en.pdf)
70. Baert, A.A.L., C. Schiepers, and M. Allen-Auerbach, *Diagnostic Nuclear Medicine.* 2006: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
71. Welch, M.J. and C.S. Redvanly, *Handbook of radiopharmaceuticals: radiochemistry and applications.* 2003: Wiley

72. Celia Fernandes, Isabel C. Santos, I. Santos, Hans-Jurgen Pietzsch, Jens-Uwe Kunstler, Werner Kraus, Ana Rey, Nikos Margaritis, Athanasia Bourkoula, Aris Chiotellis, Maria Paravatou-Petsotas and Ioannis Pirmettis, Rhenium and technetium complexes bearing quinazoline derivatives: progress towards a  $^{99m}\text{Tc}$  biomarker for EGFR-TK imaging, Received 4th February 2008, Accepted 1st April 2008. First published as an Advance Article on the web 13th May 2008 DOI: 10.1039/b802021c
73. J Infect Dis 137: 122-130, 1978. RK Schmidt-Ullrich<sup>1</sup>, RB Mikkelsen<sup>1</sup>, P Dent<sup>1,2</sup>, DG Todd<sup>1</sup>, K Valerie<sup>1</sup>, BD Kavanagh<sup>1</sup>, JN Contessa<sup>1</sup>, WK Rorrer<sup>1</sup> and PB Chen<sup>1</sup>, 'Radiation-induced proliferation of the human A431 squamous carcinoma cells is dependent on EGFR tyrosine phosphorylation', Departments of Radiation Oncology and Pharmacology/Toxicology, Medical College of Virginia/Virginia Commonwealth University, PO Box 980058, Richmond, Virginia 23298-0058, USA, Oncogene (1997) 15, 1191 ± 1197
74. Hall, E.J., Radiobiology for the Radiologist, Lippincott Williams & Wilkins; Seventh edition (June 6, 2011)
75. A.V.R.S.a.B. Human Chromosomes. McGraw-Hill, 1995.
76. Haigler, H., Ash, J. F., Singer, S.J. and Cohen, S. Visualization by fluorescence of the binding and internalization of epidermal growth factor in human carcinoma cells A431. Proc Natl Acad Sci USA .1978.σσ.3317-21
77. Stryer, L. Βιοχημεία .1997.Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
78. SHINICHI YABUUCHI, YU KATAYOSE, AKIRA ODA, MASAMICHI MIZUMA, SATORU SHIRASOU, TSUYOSHI SASAKI, KUNIHARU YAMAMOTO, MASAYA OIKAWA, TOSHIKI RIKIYAMA, TOHRU ONOGAWA, HIROSHI YOSHIDA, HIDEO OHTUSKA, FUYUHIKO MOTOI, SHINICHI EGAWA and MICHIAKI UNNO ' ZD1839 (IRESSA®) Stabilizes p27Kip1 and Enhances Radiosensitivity in Cholangiocarcinoma Cell Lines' , Department of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan, ANTICANCER RESEARCH 29: 1169-1180 (2009)
79. Berenbaum MC: A method for testing for synergy with any number of agents.
80. Βαλασή Αλεξία, 'Χημική χρωμοσωματική ακτινοευαισθητοποίηση καρκινικών κυττάρων A431 από το κιναζολινικό παράγωγο N-{4-[(3-bromophenyl)amino]-quinazoline-6-yl}-2-chloroacetamide, Διπλωματική Εργασία, ΣΕΜΦΕ ΕΜΠ, Αθήνα 2011
81. Βασιλείου Μαρία-Αικατερίνη 'In vitro συγκριτική μελέτη κιναζολινικών παραγώγων με απώτερο στόχο την χρήση τους στην Ραδιοφαρμακευτική για απεικόνιση όγκων που υπερεκφράζουν τον Υποδοχέα του Επιδερμικού Αυξητικού Παράγοντα (EGFR)', Διπλωματική Εργασία, ΣΕΜΦΕ ΕΜΠ, Αθήνα 2013

## 6. Ευχαριστίες

Ευχαριστώ τον Υπεύθυνο Καθ. κ. Ε. Γαζή, καθώς επίσης τα μέλη της τριμελούς επιτροπής για την ουσιαστική και πολύτιμη συμβολή τους στην εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Ευχαριστώ την Επιβλέπουσα Δρ. Μ. Παραβατού για την καθοδήγηση και ουσιαστική συμβολή της καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας.

Ευχαριστώ επίσης ιδιαίτερα την Βαρβάρα Μαυροειδή και το Φώτη Καπίρη για τη φιλία τους αλλά και για την αμέριστη βοήθεια και την πολύτιμη συνεργασία τους κατά την εκμάθηση των τεχνικών για την υλοποίηση του πειραματικού μέρους.

Ευχαριστώ πάνω απ' όλους τους συντρόφους μου για την αμέριστη στήριξη τους όλα τα προηγούμενα χρόνια αλλά και για τα επόμενα που θα έρθουν. Επίσης την οικογένειά μου για την πολύτιμη αγάπη τους και την συμπαράστασή τους και αμέριστη υπομονή τους όλα τα χρόνια των σπουδών μου.