



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΚΗΣ

Ανίχνευση ομαδοποιημένων
οξειδωτικών βλαβών DNA σε συστημικό
επίπεδο ύστερα από έκθεση σε
ιοντίζουσα ακτινοβολία

Διπλωματική εργασία

Κότσαρης Βασίλης

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

Αθήνα, 2015



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΚΗΣ

Ανίχνευση ομαδοποιημένων οξειδωτικών βλαβών DNA σε συστημικό επίπεδο ύστερα από έκθεση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία

Διπλωματική εργασία

Κότσαρης Βασίλης

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

Εγκρίθηκε από την τριμελή εξεταστική επιτροπή την Τρίτη, 21 Ιουλίου 2015.

.....
Γεωργακίλας Αλέξανδρος

Επ. Καθηγητής Ε.Μ.Π.

.....
Τερζούδη Γεωργία

Ερευνήτρια Β' Ε.Κ.Ε.Φ.Ε.

.....
Μακροπούλου Μυρσίνη

Αν. Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

Περίληψη

Το κυρίαρχο δόγμα της ραδιοβιολογίας που προβλέπει ότι η ιοντίζουσα ακτινοβολία επιδρά μόνο στα ακτινοβολημένα κύτταρα υπόκειται σε έντονη αμφισβήτηση τις δύο τελευταίες δεκαετίες. Είναι γνωστό πως οι σχετικά μεγάλες δόσεις της ακτινοθεραπείας προκαλούν σοβαρές βλάβες στην ακτινοβολημένη περιοχή. Ωστόσο, οι ακριβείς επιπτώσεις σε συστημικό επίπεδο δεν είναι πλήρως εξακριβωμένες. Οπότε, για τη εκτίμηση των επαγόμενων συστημικών αποτελεσμάτων εξετάσαμε τα επίπεδα σύνθετων βλαβών DNA σε απομακρυσμένους ιστούς ποντικών που είχαν ακτινοβοληθεί με υψηλές δόσεις στο πόδι. Συγκεκριμένα, υπολογίστηκαν συμπλέγματα βλαβών με αβασικά σημεία που βρίσκονται σε απόσταση 1-10 ζεύγη βάσεων σε απέναντι κλώνους. Οι βλάβες αυτές όπως και οι περισσότερες σύνθετες βλάβες είναι δύσκολα επιδιορθώσιμες και ενδεχόμενα μεταλλαξογόνες. Για αυτό το σκοπό εξετάστηκαν δείγματα DNA από τους ιστούς της γλώσσας και του παχέος εντέρου ύστερα από έκθεση σε δόσεις 10 και 40 Gy με ευρείες δέσμες και μικροδέσμες ακτίνων Χ. Οι μετρήσεις που πήραμε μετά από 24 και 96 h ύστερα από την ακτινοβόληση έδειξαν αυξημένες βλάβες κατά 1.6-2.1 φορές σε σχέση με τα μη ακτινοβολημένα ποντίκια που εξετάστηκαν. Τα επίπεδα βλαβών παρέμειναν σε υψηλό επίπεδο σε κάθε χρονική στιγμή, ενώ δεν παρουσιάστηκε εξάρτηση από τη δόση και την τεχνική ακτινοβόλησης. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν την επιμένουσα επαγωγή συστημικών αποκρίσεων στην περίπτωση ακτινοβόλησης με μεγάλες δόσεις και την επαγωγή βλαβών μεγάλης βιολογικής σημασίας.

Abstract

The prevalent tenet in radiobiology that ionizing radiation affects only the irradiated cells is subjected to intense controversy for the last two decades. It is well-known that the high doses of radiation therapy cause severe damages in the irradiated area. However, the exact implications at the systemic level are not fully determined. Thus, in order to assess the induced systemic effects we examined the levels of oxidative clustered DNA lesions (OCDLs) in tissues distant from the irradiation point (leg) in mice exposed to radiotherapy relevant high doses. Specifically, we estimated the levels of bistranded clustered DNA lesion and specifically abasic sites (AP) using human DNA repair enzyme endonuclease APE1 as the damage probe. These lesions as highly complex lesions are repair-resistant and potentially mutagenic if not processed correctly. For this purpose DNA samples from colon and tongue tissue after exposure to doses of 10 and 40 Gy with both broad X-ray beam and microbeam modality were analyzed. The obtained values after 24 and 96 hours revealed increased clustered DNA lesions 1.6-2.1 times above those of non-irradiated mice that were tested. Surprisingly enough, the lesions levels remained both times on high levels while no dependence from dose or radiation technique appeared. These results indicate the persistent induction of systemic responses and DNA lesions in vivo after local exposure to high levels of radiation and underline the major biological significance of this phenomenon.

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση αυτής της διπλωματικής εργασίας, θα ήθελα, αρχικά, να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα καθηγητή μου Δρ. Αλέξανδρο Γεωργακίλα τόσο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην ανάθεση της παρούσας εργασίας όσο και για την αμέριστη στήριξή του και την πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχε με τις γνώσεις του σε όλα τα στάδια του ερευνητικού και συγγραφικού έργου.

Για την παρούσα εργασία διενεργήθηκαν πειράματα στο εργαστήριο Υγειοφυσικής του Δρ. Γαβριήλ Παντελιά, στο Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος», με υπεύθυνη τη Δρ. Γεωργία Τερζούδη την οποία θα ήθελα να ευχαριστήσω για τη βοήθεια της στην πραγματοποίηση των πειραμάτων. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις Δρ. Βασιλική Χατζή και Δρ. Αγγελική Δαράκη, οι οποίες κατά την τα πρώτα μου ερευνητικά βήματα συνέβαλαν σημαντικά με τις γνώσεις τους και τη συνολική βοήθειά τους στην εξοικείωση μου με τις πειραματικές τεχνικές της Βιολογίας.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου, ακόμη, στην καθηγήτρια μου Μυρσίνη Μακροπούλου, η οποία με βοήθησε με τις γνώσεις τις στην Βιοφυσική και Ιατρική Φυσική και με την προθυμία της να μου προσφέρει συμβουλές κατά τη συγγραφή της διπλωματικής μου εργασίας. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω για τη συνεργασία μας τον Αντρέα Νταργαρά με τον οποίο εργαστήκαμε μαζί για το σχεδιασμό και την εκπόνηση αυτού του ερευνητικού έργου.

Περιεχόμενα

Περίληψη	iii
Abstract	iv
Ευχαριστίες	v
Περιεχόμενα	vi

Κεφάλαιο 1 Στοιχεία κυτταρικής βιολογίας

1.1 Εισαγωγή	1
1.2 Κυτταρική δομή	2
1.3 Το γενετικό υλικό	4
1.3.1 Γενικά στοιχεία	4
1.3.2 Δομή	5
1.3.3 Κυτταρικός κύκλος	7

Κεφάλαιο 2 Ακτινοβιολογία

2.1 Ιοντίζουσα ακτινοβολία: βασικά θεωρητικά στοιχεία και αλληλεπιδράσεις	11
2.1.1 Γενικά στοιχεία	11
2.1.2 Φυσική αλληλεπίδραση ακτίνων-Χ	13
2.1.3 Στάδια αλληλεπίδρασης ιοντίζουσας ακτινοβολίας και βιολογικής ύλης	17
2.2 Βιολογικά αποτελέσματα σε μοριακό επίπεδο και βλάβες στο DNA	18
2.2.1 Άμεσες και έμμεσες επιδράσεις	18

2.2.2	Βλάβες στο DNA	23
2.2.3	Η περίπτωση των ομαδοποιημένων βλαβών	27
2.2.4	Αναγνώριση και απόκριση στις βλάβες του DNA	30
2.2.5	Μηχανισμοί επιδιόρθωσης	31
2.2.6	Δυσλειτουργίες και προβλήματα στην επιδιόρθωση	35
2.3	Αποτελέσματα σε κυτταρικό επίπεδο.	37
2.3.1	Γενωμική αστάθεια	37
2.3.2	Κυτταρικός θάνατος	40
2.4	Συστημικά αποτελέσματα και το κλασικό παράδειγμα	41
2.4.1	Γενικά στοιχεία	41
2.4.2	Καθορισμένα και στοχαστικά αποτελέσματα	42
2.5	Μη στοχευμένες επιδράσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας	44
2.5.1	Γενικά στοιχεία και ορισμοί	44
2.5.2	Κλινικά και πειραματικά δεδομένα	50
2.5.2.1	Γενικά στοιχεία	50
2.5.2.2	Μη στοχευμένες επιδράσεις σε υγιής ιστούς	52
2.5.2.3	Μη στοχευμένες επιδράσεις μετά από ακτινοθεραπεία	57
2.5.3	Μηχανισμοί επαγωγής μη στοχευμένων επιδράσεων	58
2.5.3.1	Οξειδωτικό στρες	59
2.5.3.2	Ανοσοποιητικό σύστημα και φλεγμονώδεις αποκρίσεις	63
2.5.3.3	Γενωμική αστάθεια και έκφραση DNA	71
2.5.3.4	Μη στοχευμένες επιδράσεις λόγω παρουσίας όγκου	74

Κεφάλαιο 3	Μέθοδος	
3.1	Εισαγωγή	77
3.2	Η λειτουργία των ενζύμων	78
3.2.1	Ενζυμική επώαση του DNA	79
3.2.2	Η ενδονουκλεάση hAPE1	80
3.3	Ηλεκτροφόρηση	82
3.4	Απεικόνιση	84
3.5	Ανάλυση μέσου μοριακού βάρους	85
Κεφάλαιο 4	Εκτέλεση πειράματος	
4.1	Σκοπός	87
4.2	Υλικά και μέθοδοι	88
4.3	Πρωτόκολλο πειράματος	96
Κεφάλαιο 5	Πειραματικά αποτελέσματα και συμπεράσματα	
5.1	Αποτελέσματα	101
5.1.1	Απόκριση κάθε ιστού	103
5.1.2	Απόκριση στη δόση	107
5.1.3	Απόκριση σε κάθε χρονικό σημείο	109
5.1.5	Απόκριση σε κάθε τεχνική ακτινοβολήσης	111
5.2.	Συζήτηση και συμπεράσματα	113
Βιβλιογραφία	119
Παράρτημα	127

Κεφάλαιο 1

Στοιχεία κυτταρικής βιολογίας

1.1. Εισαγωγή

Το κύτταρο αποτελεί τη βασική μονάδα οργάνωσης όλων των ζωντανών οργανισμών. Ορίζεται ως το μικρότερο και θεμελιώδες δομικό στοιχείο της έμβιας ύλης που αποτελείται από ένα σύστημα μορίων οργανωμένων σε δυναμική αλληλεπίδραση μεταξύ τους [1]. Όλα τα κύτταρα ενός οργανισμού έχουν ουσιαστικά την ίδια χημική σύσταση και το γεγονός τα διαφοροποιεί είναι το πως εκφράζεται το γενετικό τους υλικό. Μια μεγάλη ομάδα όμοια διαφοροποιημένων κυττάρων ονομάζεται ιστός και αποτελεί τη δεύτερη βιολογική τάξη οργάνωσης ενός οργανισμού. Σύμφωνα με τη σύγχρονη κυτταρική θεωρία το κύτταρο εκτός από στοιχειώδη μονάδα οργάνωσης της έμβιας ύλης, έχει παράλληλα και λειτουργικό, αναπαραγωγικό και κληρονομικό ρόλο. Τα γενικώς αποδεκτά σημεία της σύγχρονης κυτταρικής βιολογίας είναι τα εξής [2]:

1. Όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί αποτελούνται από ένα (μονοκύτταροι) ή περισσότερα κύτταρα (πολυκύτταροι).
2. Όλα τα κύτταρα προκύπτουν μέσω διαίρεσης.
3. Το κύτταρο αποτελεί τη βασική δομική και λειτουργική μονάδα όλων των οργανισμών.

4. Η λειτουργία ενός οργανισμού εξαρτάται από το σύνολο της λειτουργίας κάθε κυττάρου και της μεταξύ τους αλληλεπίδρασης.
5. Όλη η ζωτική ενέργεια πηγάζει από μεταβολικές και βιοχημικές διεργασίες εντός του κυττάρου.
6. Όλα τα κύτταρα ενός οργανισμού έχουν την ίδια χημική σύσταση.

1.2. Κυτταρική δομή

Τα κύτταρα χωρίζονται σε 2 βασικές κατηγορίες, τα προκαρυωτικά και τα ευκαρυωτικά, ανάλογα με την ενδοκυτταρική μορφολογία τους. Βασική μορφολογική διαφορά αποτελεί η ύπαρξη συγκροτημένου πυρήνα στα ευκαρυωτικά κύτταρα, δηλαδή μια πυρηνική μεμβράνη που περικλείει το γενετικό υλικό σε μορφή DNA [3].

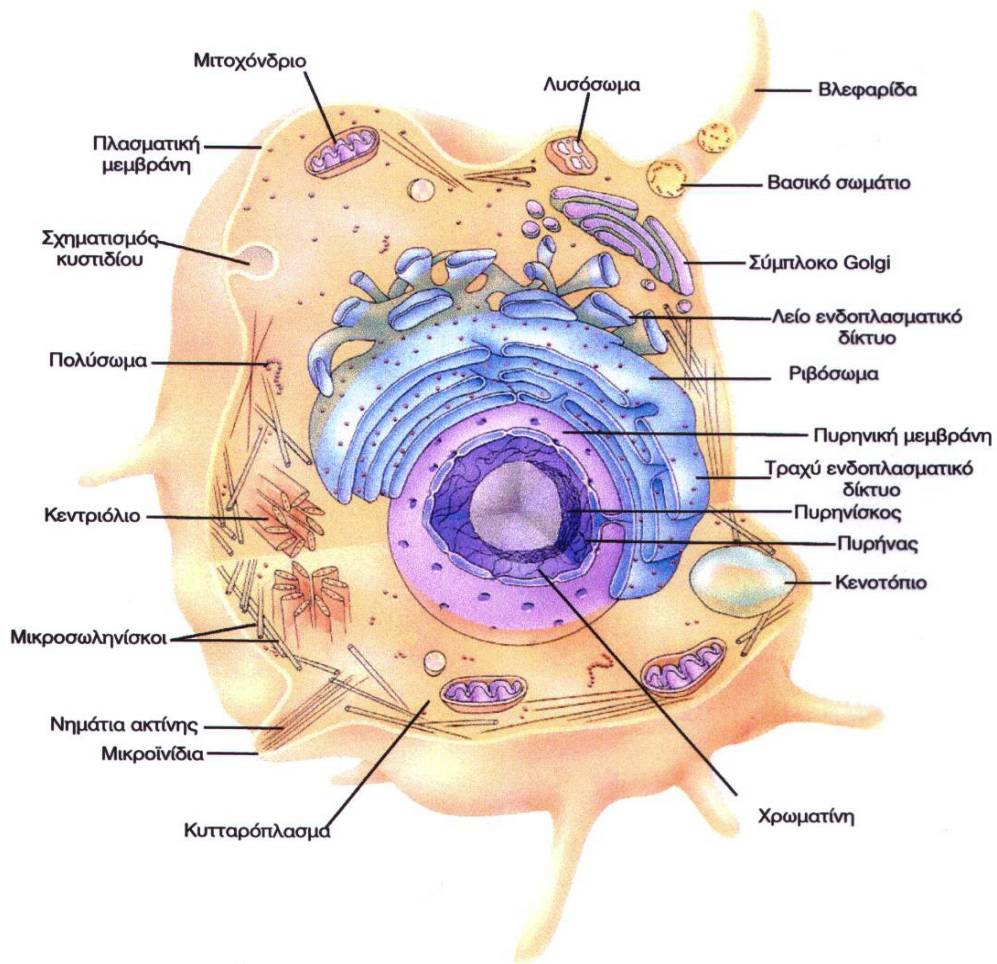
Όλα τα κύτταρα, ζωικά ή φυτικά έχουν παρόμοια χημική σύσταση και αποτελούνται από περιορισμένο αριθμό χημικών στοιχείων. Βασικό ρόλο παίζει ο άνθρακας (C), το υδρογόνο (H), το οξυγόνο (O), το άζωτο (N), ο φώσφορος (P) και το θείο (S) τα οποία αποτελούν και το 99% περίπου του κυτταρικού βάρους. Τα χημικά συστατικά των κυττάρων μπορούν να διακριθούν σε ανόργανα (H_2O και μεταλλικά ιόντα) και οργανικά (πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λίπη και νουκλεϊκά οξέα). Η σύσταση κατά προσέγγιση (% κ.β.) ενός ζωικού ή φυτικού κυττάρου είναι: νερό 75-85%, πρωτεΐνες 10-20%, λιπίδια 2-3%, υδατάνθρακες 1% και ανόργανα υλικά (οξέα, βάσεις, άλατα) 1%. Τα ανόργανα υλικά παρόλο που βρίσκονται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, βοηθούν στη διατήρηση του pH σε συγκεκριμένες τιμές, κάτι που βοηθά στην ομαλότητα των κυτταρικών λειτουργιών [3].

Παρά τις κάποιες φαινοτυπικές και λειτουργικές διαφοροποιήσεις ανάμεσα στις διάφορες ομάδες κυττάρων υπάρχει σε μεγάλο βαθμό ομοιότητα στις υποκυτταρικές διεργασίες, στα στοιχεία που συμμετέχουν σε αυτές όπως επίσης στη οργάνωση και διευθέτηση των διεργασιών αυτών. Με τις περισσότερες υποκυτταρικές διεργασίες να αλληλοδιαπλέκονται και με τα συστατικά τους να μεταφέρονται διαμέσου διαφορετικών μοριακών και

πρωτεϊνικών μονοπατιών απαιτείται μεγάλος βαθμός οργάνωσης στο κύτταρο. Γι αυτό το λόγο υπάρχει υψηλή διαμερισματοποίηση στα ευκαρυωτικά κύτταρα, έτσι ώστε να επιτελούνται οι περίπλοκες λειτουργίες τους. Η βασική διαμερισματοποίηση διακρίνει τρεις περιοχές στο κύτταρο: τον πυρήνα, το κυτταρόπλασμα και την κυτταρική μεμβράνη.^[4] Όπως θα δούμε παρακάτω παρουσιάζεται ακόμη μεγαλύτερη διαμερισματοποίηση στις περιοχές αυτές.

Ο πυρήνας περιβάλλεται από μια διπλή μεμβράνη την πυρηνική μεμβράνη η οποία έχει πάνω τις δίκτυα πρωτεϊνικών ινιδίων. Στον πυρήνα ακόμα υπάρχει ο πυρηνίσκος (ο οποίος περιέχει τα χρωμοσώματα), και το πυρηνόπλασμα το οποίο είναι ένα διάλυμα με πρωτεΐνες και RNA που εξυπηρετούν τις λειτουργίες του πυρήνα [3]. Στο κυτταρόπλασμα υπάρχουν τα οργανίδια και άλλες δομές, αυτές είναι το ενδοπλασματικό δίκτυο, το σύστημα Golgi, το ριβόσωμα, το κεντροσωμάτιο, τα μιτοχόνδρια, λυσοσωμάτια, το κενοτόπιο και άλλα κυστίδια. Ακόμα στο κυτταρόπλασμα υπάρχει ο κυτταρικός σκελετός οποίος αποτελείται από ένα σύστημα ινιδίων και είναι υπεύθυνος για το σχήμα, την μεταφορά ουσιών και την κίνηση του κυττάρου [3].

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν ιδιαίτερα σημαντική κυτταρική μονάδα καθώς λειτουργούν ως μονάδα παραγωγής ενέργειας για το κύτταρο και κατ' επέκταση για όλο τον οργανισμό.^[4] Επίσης, σε αυτά εδράζει και ένα τμήμα του γενετικού υλικού του κυττάρου που ονομάζεται μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) που έχει κυκλική μορφή και μέγεθος 16.659 ζεύγη βάσεων. Πιθανή βλάβη είτε του mtDNA είτε γενικότερα του μιτοχονδρίου οδηγεί σε σοβαρές κυτταρικές βλάβες. Καθώς το μιτοχόνδριο καταλαμβάνει μεγάλο όγκο (4-25% ανάλογα με το κύτταρο) και έχει μικρή προστασία αποτελεί βασικό στόχο της ιονίζουσας ακτινοβολίας [4,5]. Μαζί με τον πυρήνα όπου εδράζει το πυρηνικό DNA είναι με διαφορά οι στόχοι με τη μεγαλύτερη ζωτική σημασία.



Εικόνα 1.1: Η δομή και τα οργάνδια ενός ευκαρυωτικού ζωικού κυττάρου.

1.3. Το γενετικό υλικό

1.3.1. Γενικά στοιχεία

Υπάρχουν δύο είδη γενετικού υλικού, το δεσοξυριβοζονουκλεϊκό οξύ (DNA) και το ριβοζονουκλεϊκό οξύ (RNA) που λειτουργούν ως αποθήκη πληροφοριών στα κύτταρα [4]. Στο DNA είναι κωδικοποιημένες σε μορφή γονιδίων όλες οι πληροφορίες που καθορίζουν την ανάπτυξη και τις λειτουργίες του κυττάρου. Το RNA χρησιμεύει για προσωρινή αποθήκευση πληροφοριών και εμπλέκεται, στις διάφορες μορφές του, στην μεταφορά αμινοξέων κατά τη διαδικασία της μετάφρασης (μεταφορικό RNA - tRNA), στην πρωτεϊνοσύνθεση στα ριβοσώματα (ριβοσωμικό RNA - rRNA) και στη μεταφορά της

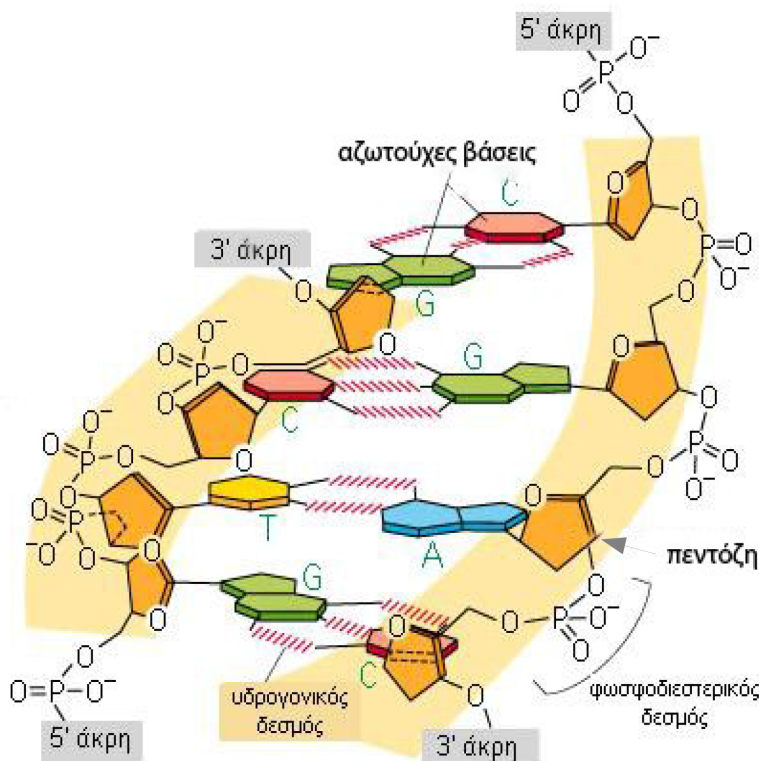
πληροφορίας από τα γονίδια στα ριβοσώματα (αγγελιαφόρο RNA – mRNA) [4]. Τα δύο αυτά πυρηνικά οξέα είναι βιοπολυμερή αποτελούμενα από επαναλαμβανόμενες υπομονάδες, τα νουκλεοτίδια. Κάθε νουκλεοτίδιο περιλαμβάνει έναν αζωτούχο δακτύλιο (μία βάση), που συνδέεται με ένα σάκχαρο με 5 άτομα C (την πεντόζη) και μία ή περισσότερες φωσφορικές ομάδες συνδεδεμένες στο σάκχαρο. Τα ριβοζονουκλεοτίδια από τα οποία δομείται το RNA περιέχουν το σάκχαρο ριβόζη και κάποια από τις βάσεις αδενίνη (A), ουρακίλη (U), γουανίνη (G) και κυτοσίνη (C). Τα δεοξυριβοζονουκλεοτίδια, όμως, που δομούν το DNA βασίζονται στο σάκχαρο δεσοξυριβόζη και περιέχουν μια από τις βάσεις αδενίνη (A), θυμίνη (T), γουανίνη (G) και κυτοσίνη (C). Στη σειρά των βάσεων των νουκλεοτιδίων κατά μήκος του μακρομορίου του DNA ή του RNA οφείλεται η κωδικοποίηση της γενετικής πληροφορίας [3,4].

1.3.2. Δομή

Η ανακάλυψη της δομής του DNA αποτέλεσε μεγάλης σημασίας εξέλιξη για την επιστήμη της βιολογίας. Μετά από πειράματα τη δεκαετία του 1950 με τη χρήση κρυσταλλογραφίας ακτίνων X αποκαλύφθηκε το μοντέλο της δομής του DNA που ονομάστηκε μοντέλο της διπλής έλικας [6]. Σύμφωνα με αυτό το μόριο του DNA αποτελείται από δύο πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες σε μορφή δύο αντιπαράλληλων κλώνων που σχηματίζουν δεξιόστροφη διπλή έλικα, με τη μια έλικα να κατέρχεται και την άλλη να ανέρχεται. Οι αζωτούχες βάσεις κάθε κλώνου είναι κάθετες ως προς τον άξονα του μορίου και προεξέχουν προς το εσωτερικό της συστροφής. Οι αζωτούχες βάσεις (ή πρωτεϊνικές) κάθε κλώνου είναι κάθετες ως προς τον άξονα του μορίου και προεξέχουν προς το εσωτερικό της συστροφής [2,3]. Οι δύο κλώνοι συγκρατούνται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου, με τα ζευγάρια των αζωτούχων βάσεων μεταξύ των οποίων αναπτύσσονται οι δεσμοί να είναι συγκεκριμένα, δηλαδή η αδενίνη με τη θυμίνη και η γουανίνη με την κυτοσίνη. Αναλυτικότερα μεταξύ αδενίνης και θυμίνης σχηματίζονται δύο δεσμοί υδρογόνου, ενώ μεταξύ γουανίνης και κυτοσίνης τρεις δεσμοί υδρογόνου. Τα νουκλεοτίδια ενώνονται με ένα 3-5 φωσφοδιεστερικό δεσμό, δηλαδή σχηματίζεται δεσμός μεταξύ του υδροξυλίου του άνθρακα 3' του πρώτου νουκλεοτιδίου και της

φωσφορικής ομάδας του άνθρακα 5' του επόμενου, με ταυτόχρονη απόσπαση ενός μορίου νερού. Κάθε αλυσίδα έχει προσανατολισμό 5-3, δηλαδή το πρώτο νουκλεοτίδιο έχει ελεύθερη τη φωσφορική ομάδα του άνθρακα 5' της πεντόζης του ενώ το τελευταίο νουκλεοτίδιο έχει ελεύθερο το υδροξύλιο του άνθρακα 3' της πεντόζης του [4].

Με αυτό τον τρόπο προκύπτει ένα μονόκλωνο μόριο DNA το οποίο όμως επειδή δεν σταθερό αναπτύσσει δεσμούς υδρογόνου όπως είπαμε μέσω των αζωτούχων βάσεων με μία άλλη μονόκλωνη αλυσίδα. Το δίκλωνο μόριο DNA (dsDNA) που σχηματίζεται είναι πολύ πιο σταθερό αφού σε ένα υδατικό περιβάλλον η ελεύθερη ενέργεια θα είναι πολύ μικρότερη. Ακόμη, κάθε νουκλεοτίδιο έχει μετρηθεί πως έχει μέγεθος κατά μήκος της αλυσίδας 0.33nm [3]. Έτσι μια πλήρης περιστροφή της έλικας που σχηματίζεται κάθε 3.4 nm, όταν το DNA βρίσκεται στη "χαλαρή" του κατάσταση, περιέχει περίπου 10 ζεύγη βάσεων.



Εικόνα 1.2:

Η δομή του δίκλωνου DNA και οι δεσμοί που αναπτύσσονται σε αυτό.

Η καθορισμένη αντιστοιχία βάσεων, που είδαμε παραπάνω, κατά την ένωση του νουκλεοτιδίου της μίας αλυσίδας με εκείνο της άλλης ονομάζεται συμπληρωματικότητα. Με αυτόν τον τρόπο η νουκλεοτιδική αλληλουχία της μίας αλυσίδας καθορίζει και την αλληλουχία της άλλης. Η συμπληρωματικότητα έχει τεράστια σημασία για τον αυτοδιπλασιασμό του DNA, αυτή η ιδιότητα είναι που το καθιστά το καταλληλότερο μόριο για τη διατήρηση και τη μεταβίβαση της γενετικής πληροφορίας.

Το ευκαρυωτικό DNA είναι συνδεδεμένο ισχυρά με μια ομάδα πρωτεϊνών, τις ιστόνες. Το συνολικό σύμπλεγμα του DNA και των συνδεδεμένων με αυτό πρωτεϊνών ονομάζεται χρωματίνη. Η χρωματίνη πακετάρεται γύρω από ένα οκταμερές ιστόνων σε μια δομή που ονομάζεται νουκλεόσωμα. Τα ινίδια χρωματίνης στην συνέχεια συμπυκνώνονται περαιτέρω και κατά αυτόν τον τρόπο δημιουργείται ένα χρωμόσωμα [1,3]. Το ανθρώπινο γονιδίωμα περιέχει $3 \cdot 10^9$ ζεύγη νουκλεοτιδίων, τα οποία είναι οργανωμένα σε 24 χρωμοσώματα (22 διαφορετικά αυτοσωματικά και 2 διαφορετικά φυλετικά). Το σύνολο της γενετικής πληροφορίας που είναι αποθηκευμένο στα χρωμοσώματα ενός οργανισμού αποτελεί το γονιδίωμα του.

1.3.3. Κυτταρικός κύκλος

Οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου

Για την αναπαραγωγή των κυττάρων και την εξέλιξη τους επιτελούνται συγκεκριμένες διεργασίες στο κύτταρο, με τη σημαντικότερη να είναι ο διπλασιασμός του DNA. Η αλληλουχία των διαδικασιών αυτών σε ένα αυστηρά προγραμματισμένο πλαίσιο με διαδοχικά στάδια ονομάζεται κυτταρικός κύκλος.

Ο κύκλος ζωής του κυττάρου ξεκινά από τη στιγμή της δημιουργίας του και ολοκληρώνεται με τον πλήρη διπλασιασμό του. Ένα πλήθος γενετικών και βιοχημικών παραγόντων ρυθμίζουν την μετάβαση από το ένα στάδιο στο άλλο, με τις κυκλίνες και τις κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (cyclin-dependent kinases - CDKs) να έχουν βασικό ρόλο [7]. Οι κύριες περίοδοι του κυτταρικού κύκλου είναι η μεσόφαση κατά την οποία το κύτταρο

δε διαιρείται και η περίοδος της διαίρεσης (M). Η διαίρεση πραγματοποιείται μέσω μίτωσης στα σωματικά κύτταρα και μέσω μείωσης στα γαμετοκύτταρα.

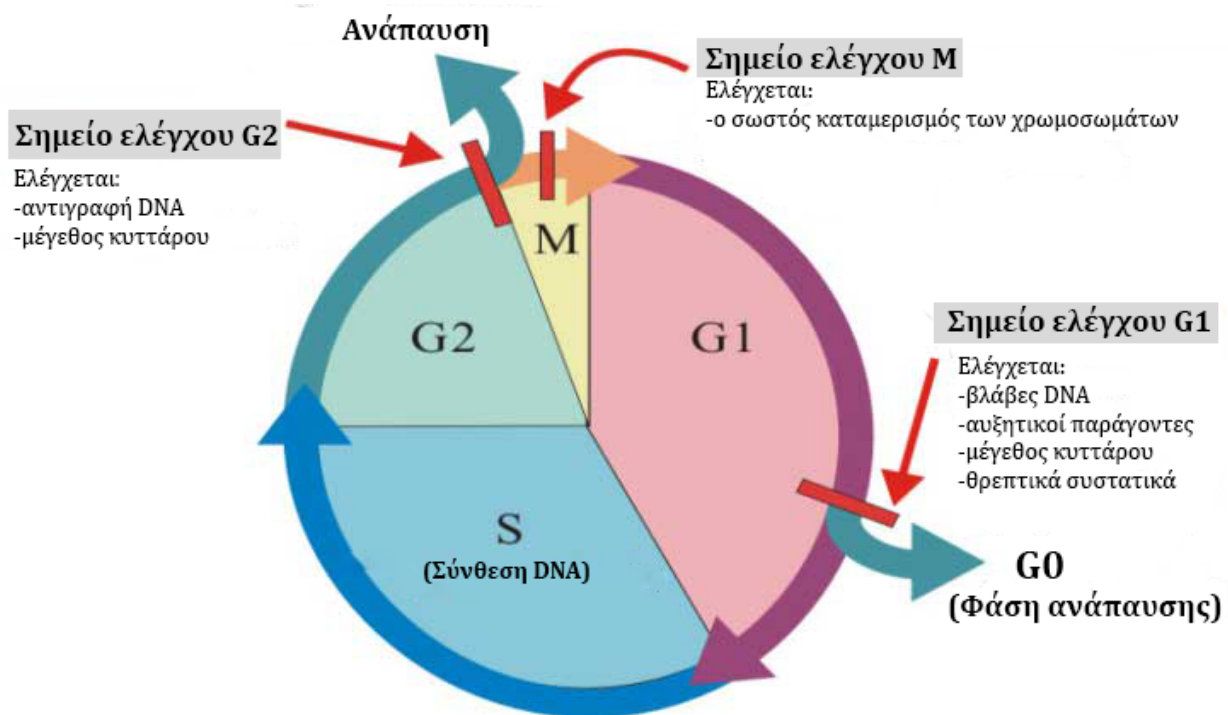
Η μεσόφαση αποτελεί το 90% περίπου της συνολικής ζωής του κυττάρου και διακρίνεται σε τρεις διαδοχικές φάσεις: την G1, την S και την G2 [8]. Κατά την G1, την πρώτη φάση του κύκλου, το κύτταρο αναπτύσσεται πραγματοποιώντας διάφορες βιοχημικές διεργασίες (όπως η σύνθεση πρωτεϊνών) και επιλέγει αν θα συνεχίσει στη φάση S ή στην G0. Κατά την S (Synthesis) πραγματοποιείται η πλήρης αντιγραφή του γενετικού υλικού. Το κύτταρο, όμως, μετά την G1 μπορεί να εισέλθει στην G0, δηλαδή να βγει εκτός κύκλου αναβάλλοντας την διαδικασία διπλασιασμού μέχρι να λάβει το κατάλληλο σήμα από το περιβάλλον και να εισέλθει στη φάση S. Μετά την S ακολουθεί το μεταβατικό στάδιο G2 κατά το οποίο το κύτταρο προετοιμάζεται να διπλασιαστεί. Η διαδικασία της μίτωσης είναι επίσης ακριβής και πολύπλοκη και περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια: πρόφαση, προμετάφαση, μετάφαση, ανάφαση και τελόφαση. Στη τελική φάση, αυτή της μίτωσης, μέσα από τα επιμέρους στάδια, τα χρωμοσώματα του πυρήνα χωρίζονται σε δύο ίδιες ομάδες, ο πυρήνας διαιρείται όπως επίσης και τα οργανίδια, το κυτταρόπλασμα και η κυτταρική μεμβράνη, δημιουργώντας έτσι δύο νέα, αυτόνομα και λειτουργικά κύτταρα [4,8].

Η διάρκεια ενός κυτταρικού κύκλου δεν είναι ίδια για όλα τα κύτταρα και εξαρτάται κυρίως από το κυτταρικό είδος και την ηλικία του οργανισμού. Η διάρκεια μπορεί να είναι από μία ώρα (στα έμβρυα) έως πάνω από ένα χρόνο (σε ένα φυσιολογικό υπατικό κύτταρο). Συνήθως, όμως, στα περισσότερα κύτταρα ενός θηλαστικού διαρκεί περίπου 24-48 ώρες. Η ρυθμός διαίρεσης ενός κυτταρικού τύπου αποτελεί σημαντικό παράγοντα καθορισμού της ευαισθησίας του στην έκθεση του σε ιοντίζουσα ακτινοβολία.

Τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου

Η διαίρεση του κυττάρου, όπως είδαμε, είναι ιδιαίτερα σύνθετη διαδικασία κατά την οποία διάφορα λάθη μπορεί να προκύψουν. Εκτός αυτού, όμως, η ομαλή επιτέλεση της μπορεί να επιβαρυνθεί και από εξωγενείς παράγοντες, όπως η ιοντίζουσα ακτινοβολία, με

συνέπεια να διαταραχθεί σοβαρά η ομοιόσταση του κυττάρου. Σε περίπτωση μετάβασης από τη μία φάση στην επόμενη χωρίς να υπάρχουν οι κατάλληλες συνθήκες το κύτταρο μπορεί να επιβαρυνθεί με νέες βλάβες στο DNA, γονιδιωματική αστάθεια ή να επέλθει κυτταρικός θάνατος. Για αυτό το λόγο μέσω ενός συνόλου πρωτεϊνών και σηματοδοτικών μονοπατιών ελέγχεται αν υπάρχουν οι σωστές συνθήκες για την μετάβαση στο επόμενο στάδιο. Τέτοια σημεία ελέγχου (checkpoints) υπάρχουν βρίσκονται ανάμεσα στα στάδια G1/S, S/G2 και στο M και ο έλεγχος που πραγματοποιείται στο καθένα παρουσιάζεται συνοπτικά στην εικόνα 1.3.



Εικόνα 1.3: Οι φάσεις και τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου

Ιδιαίτερα σημαντικό είναι το σημείο ελέγχου στο τέλος της G1 το οποίο εξαρτάται από την πρωτεΐνη p53. Η σωστή αντιγραφή του DNA που διεξάγεται στην φάση S είναι ζωτικής σημασίας για το κύτταρο, οπότε για μη προκληθούν ή διατηρηθούν αλλοιώσεις στο γονιδίωμα, σε περίπτωση παρουσίας βλαβών στο DNA, η p53 φροντίζει να διακοπεί η μετάβαση στη φάση S μέχρι να διορθωθούν ή εναλλακτικά να εκκινήσει την αποπτωτική διαδικασία σε περίπτωση που είναι εκτεταμένες. Το άλλο πολύ σημαντικό σημείο ελέγχου

είναι πριν τη μίτωση όπου ρυθμιστικό ρόλο έχει το σύμπλεγμα MPF (Mitosis Promoting Factor), το οποίο αποτελείται από την κυκλίνη B και την κινάση CDK1. Τελευταίο είναι το σημείο ελέγχου της μίτωσης ή αλλιώς σημείο ελέγχου της μιτωτικής ατράκτου. Για να προχωρήσει η διαδικασία ελέγχεται αν τα χρωματοσώματα είναι σωστά καθλωμένα στη μιτωτική άτρακτο έτσι ώστε να διασφαλιστεί η ίση κατανομή τους στα δύο θυγατρικά κύτταρα [3,4]. Μεταλλάξεις ή προβληματικές εκφράσεις των γονιδίων που σχετίζονται με τις παραπάνω διαδικασίες ελέγχου του κυτταρικού κύκλου έχουν σοβαρές συνέπειες στα κύτταρα, όπως η παρατεταμένη γονιδιωματική αστάθεια και ο κακοήθης μετασχηματισμός.

Κεφάλαιο 2

Ραδιοβιολογία

2.1. Ιοντίζουσα ακτινοβολία: βασικά θεωρητικά στοιχεία και αλληλεπιδράσεις

2.1.1. Γενικά στοιχεία

Ιοντίζουσα ακτινοβολία (ΙΑ) θεωρείται η μεταφερόμενη ενέργεια που δύναται να προκαλέσει ιονισμό των ατόμων της ύλης με τα οποία αλληλεπιδρά. Ιονισμός λέγεται η διαδικασία κατά την οποία η ακτινοβολία μεταφέρει κινητική ενέργεια στα δεσμευμένα ηλεκτρόνια ενός ατόμου τέτοια ώστε να απομακρυνθούν από αυτό. Ως αποτέλεσμα της διαδικασίας δημιουργούνται φορτισμένα σωματίδια (ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια και ένα θετικά φορτισμένο ιόν) τα οποία μέσω διάφορων φυσικοχημικών μετατροπών μπορούν να προκαλέσουν αλλοιώσεις στη βιολογική ύλη [9].

Είδη ιοντίζουσας ακτινοβολίας

Η ιοντίζουσα ακτινοβολία μπορεί να είναι είτε σωματιδιακή είτε ηλεκτρομαγνητική. Η σωματιδιακή περιλαμβάνει τα σωματίδια α (πυρήνες He), τα σωματίδια β (ηλεκτρόνια ή

ποζιτρόνια), τα πρωτόνια (p), τα νετρόνια (n), και άλλα βαρέα ιόντα. Από το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα ιοντίζουσα ακτινοβολία θεωρείται η ακτινοβολία γ και X οι οποίες είναι ενεργειακά υψηλές και έχουν μικρά μήκη κύματος. Οι ακτίνες-X έχουν μήκος κύματος 10 nm με 10 pm και ενέργειά που κυμαίνεται από 120 eV ως 120 keV. Οι ακτίνες- γ έχουν μήκος κύματος από 10 pm ως 0.1 pm και ενέργειά μεγαλύτερη από 100 eV και μικρότερη από 10 MeV.[10,11] Η αυστηρή διάκριση, ωστόσο, μεταξύ ιοντίζουσας και μη ιοντίζουσας ακτινοβολίας στο ηλεκτρομαγνητικό φάσμα είναι κατά κάποιο τρόπο αυθαίρετη καθώς κάποια μόρια μπορούν να ιοντιστούν με σχετικά μικρότερη ενέργεια. Η ενέργεια αυτή μπορεί να υπάρχει σε φωτόνια ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας του υπεριώδους φάσματος με μήκος κύματος 210 nm ως 10 nm (extreme ultraviolet) και σε αυτή την περίπτωση δρα, επίσης, ως ιοντίζουσα. [10]

Πηγές της ΙΑ

Η ιοντίζουσα ακτινοβολία μπορεί να δημιουργηθεί από τις διασπάσεις ασταθών πυρήνων, από φαινόμενα εξαΰλωσης και από συσκευές όπως το κύκλοτρο, μηχανήματα που παράγουν ακτίνες-X και διάφορες άλλες. Συχνά η παραγωγή ακτινοβολίας α και β συνοδεύει τις διαδικασίες ραδιενεργών διασπάσεων. [11]

Οι ακτινοβολίες αυτές μπορεί να προέρχονται είτε από φυσικές είτε από τεχνητές πηγές. Οι φυσικές πηγές ακτινοβολίας, στις οποίες οφείλεται πάνω από το 90% της έκθεσης στους ανθρώπους, δημιουργούνται από ραδιοϊσότοπα που βρίσκονται κυρίως στον φλοιό της γης αλλά και στο φαγητό, το νερό, τον αέρα ακόμα και μέσα στο σώμα μας. Εκτός τις γήινες πηγές υπάρχει και κοσμική ακτινοβολία που προκαλεί ιονισμό. Στην επιφάνεια της γης δε φτάνουν τα πρωτογενή σωματίδια της κοσμικής ακτινοβολίας αλλά δευτερογενή σωματίδια υψηλής ενέργειας που ονομάζονται μεσόνια. [9]

Η έκθεση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία προερχόμενη από την ανθρώπινη δραστηριότητα γίνεται κυρίως για ιατρικούς λόγους (είτε στην διάγνωση είτε στη θεραπεία) αλλά και λόγω της χρήσης πυρηνικών στην βιομηχανία, λόγω δοκιμών ή χρήσης πυρηνικών όπλων ή ακόμα και λόγω ατυχημάτων σε εργοστάσια που χρησιμοποιούν πυρηνική ενέργεια.[11]

2.1.2. Φυσικές αλληλεπιδράσεις ακτίνων-Χ

Η ιοντίζουσα ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία όταν μεταδίδεται μέσα στην ύλη μπορεί να μεταφέρει ενέργεια σε αυτή ή να περάσει χωρίς να τη επηρεάσει. Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία μεταφέρεται σε μορφή πακέτων ενέργειας που ονομάζονται φωτόνια. Η ενέργεια κάθε φωτονίου σύμφωνα με την εξίσωση του Planck είναι:

$$E = h\nu = hc/\lambda$$

όπου h είναι η σταθερά του Planck και ν η συχνότητα του φωτονίου.

Όταν η ακτινοβολία Χ ή γ απορροφάται ή περιθλάται από τα άτομα των ιστών ενός οργανισμού υπάρχουν βιολογικές επιπτώσεις καθώς η ενέργεια που μεταφέρουν τα φωτόνια μεταφέρεται στα άτομα των ιστών και των οργάνων. Ενώ η απορρόφηση του ορατού φωτός εξαρτάται κυρίως από τη μοριακή δομή του υλικού, από την άλλη η απορρόφηση της ενέργειας των ακτίνων Χ και γ δεν εξαρτάται από τη διάταξη των ατόμων στο μόριο αλλά εξαρτάται από τον ατομικό αριθμό του υλικού. Για παράδειγμα μετά την ακτινοβόληση με ακτίνες-Χ παρατηρούμε πως το ποσοστό απορρόφησης ενέργειας είναι ίδιο στις πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα ενός κυττάρου [10,11].

Το τι συμβαίνει όταν φωτόνια διέρχονται μέσα από την ύλη περιγράφεται κυρίως από τρία φαινόμενα : το φωτοηλεκτρικό, το φαινόμενο Compton και της δίδυμης γένεσης.

Φωτοηλεκτρικό φαινόμενο

Κατά τη διαδικασία της φωτοηλεκτρικής απορρόφησης ένα φωτόνιο αλληλεπιδρά με ένα άτομο της ύλης, με αποτέλεσμα την εκπομπή ενός από τα τροχιακά ηλεκτρόνια.. Το φαινόμενο πραγματοποιείται όταν η ενέργεια του φωτονίου είναι μεγαλύτερη της ενέργειας σύνδεσης του e^- (περίπου το 80% των φωτοηλεκτρικών φαινομένων αφορά σε e^- της Κ στοιβάδας). Το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον ατομικό αριθμό του υλικού και την ενέργεια των φωτονίων. Η πιθανότητα εκπομπής χαρακτηριστικής ακτινοβολίας στους μαλακούς ιστούς (χαμηλό Z) είναι πολύ μικρή, ακόμη ενώ παίζει τον βασικότερο ρόλο για μεταφορά ενέργειας στην ύλη σε

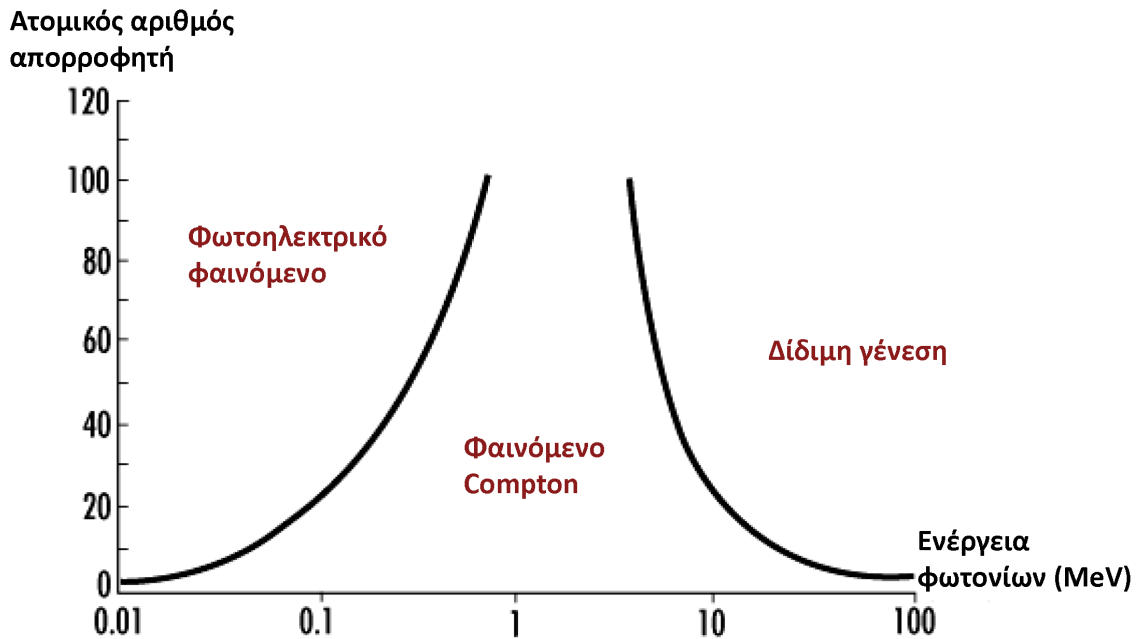
ακτινοβολίες με ενέργεια μικρότερη από 50 KeV σε μεγαλύτερες δεν είναι το ίδιο σημαντικό [11,12].

Φαινόμενο Compton

Στο φαινόμενο Compton το φωτόνιο σκεδάζεται ανελαστικά με «ελεύθερο» e^- του υλικού, κατά την οποία μέρος της ενέργειας του φωτονίου σκεδάζεται και η υπόλοιπη μεταφέρεται ως κινητική στο e^- . Το προσπίπτον φωτόνιο χάνει ενέργεια μετά την κρούση και σκεδάζεται σε γωνία 0° - 180° . Το φαινόμενο δεν εξαρτάται ιδιαίτερα από τον ατομικό αριθμό του υλικού και αποτελεί τον κυριότερο μηχανισμό απορρόφησης για ακτινοβολία ενέργειας 100 keV με 10 MeV, το οποίο είναι το ενεργειακό εύρος που χρησιμοποιείτε στις θεραπευτικές μεθόδους [11,12].

Δίδυμη γένεση

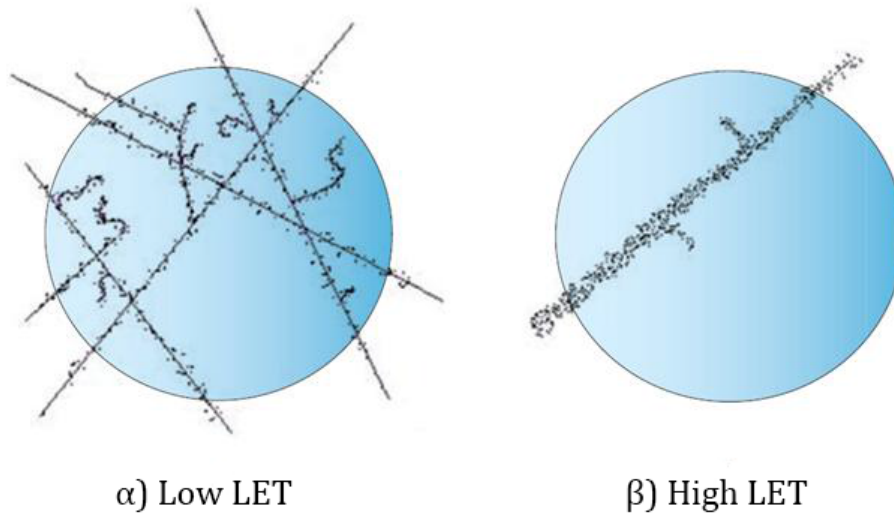
Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται όταν φωτόνιο με ενέργεια μεγαλύτερη από 1,022 MeV εισέλθει στο πεδίο Coulomb του πυρήνα ενός ατόμου. Αυτό που συμβαίνει τότε είναι η μετατροπή του φωτονίου σε ένα ηλεκτρόνιο και ένα ποζιτρόνιο που κινούνται σε αντίθετες κατευθύνσεις. Η διάρκεια ζωής του παραγόμενου ποζιτρονίου είναι μικρή καθώς όταν προσκρούσει σε κάποιο ηλεκτρόνιο θα εξαϋλωθεί παράγοντας ακτίνες-γ [11].



Διάγραμμα 2.1: Οι περιοχές όπου κυριαρχεί το κάθε φαινόμενο αλληλεπίδρασης των προσπιπτόντων φωτονίων και της ύλης.

Τα παραγόμενα ηλεκτρόνια και ποζιτρόνια από τις παραπάνω αλληλεπιδράσεις έχουν αρκετή ενέργεια για να προκαλέσουν ιονισμό ενός ή περισσότερων ατόμων που θα βρεθούν στην πορεία τους. Με αυτών το τρόπο παράγονται δευτερογενή ηλεκτρόνια τα οποία μπορούν να προκαλέσουν ιονισμούς σε σημεία αρκετά εκτός της τροχιάς της ΙΑ. Κάτι τέτοιο παρατηρείται ιδιαίτερα στις ακτινοβολίες χαμηλού LET. Για παράδειγμα, μία τροχιά ακτίνων-Χ (που αναλογεί σε 1 mGy απορρόφηση ανά κύτταρο) μπορεί να προκαλέσει περίπου 100 ιονισμούς σε ένα κύτταρο [10].

Η **γραμμική μεταφορά ενέργειας** ή LET (**Linear Transfer Energy – LET = dE/dx**) είναι ένα μέγεθος που περιγράφει τη μεταφορά ενέργειας στην ύλη κατά μήκος της διαδρομής της δέσμης σε αυτή. Με αυτό τον τρόπο σωματιδιακή ακτινοβολία υψηλού LET (σωματίδια α) δημιουργεί πυκνότερους ιονισμούς ενώ αντίθετα ακτινοβολίες χαμηλού LET προκαλούν ιονισμούς με μεγαλύτερη διασπορά όπως φαίνεται και στην εικόνα 2.2.



Εικόνα 2.2: Οι ιονισμοί, όπως αναπαρίστανται με μαύρες τελείες, που προκαλούνται από (α) χαμηλού και (β) υψηλού LET ακτινοβολία.

Ένα, ακόμη, μέγεθος στο οποίο αξίζει να αναφερθούμε στο σημείο αυτό είναι η **ένταση της ακτινοβολίας** η οποία δείχνει την πυκνότητα των φωτονίων ή των σωματιδίων μιας δέσμης. Κατά την είσοδο την δέσμης στη βιολογική ύλη η ένταση της μειώνεται λόγω απορρόφησης και αυτή η εκθετική μείωση περιγράφεται από τον τύπο :

$$I(x) = I_0 e^{-\mu x}$$

όπου I_0 η αρχική ένταση της δέσμης,

x το πάχος του υλικού και

$\mu = \mu_{pe} + \mu_p + \mu_c$ ο συνολικός συντελεστής απορρόφησης, με μ_{pe} συντελεστής απορρόφησης φωτοηλεκτρικού φαινομένου, μ_p συντελεστής απορρόφησης δίδυμης γένεσης και μ_c ο συντελεστής απορρόφησης λόγω φαινομένου Compton [10,11].

Η απορρόφηση της δέσμης εξαρτάται από τη μάζα, την πυκνότητα του υλικού και από την ενέργεια της δέσμης. Χαμηλές ενεργειακά δέσμες ακτινοβολίας απορροφώνται περισσότερο από τις υψηλότερες ενεργειακά.

2.1.3. Στάδια αλληλεπίδρασης ιοντίζουσας ακτινοβολίας και βιολογικής ύλης

Πριν αναφερθούμε στα στάδια αλληλεπίδρασης έχει σημασία να αναφερθούμε σε κάποια μεγέθη που είναι σημαντικά στην ακτινοβιολογία.

Ενεργειακή δόση ακτινοβολίας (D)

Η ποσότητα αυτή ορίζεται ως η ενέργεια ιοντίζουσας ακτινοβολίας W^D που απορροφάται από όγκο ύλης V και πυκνότητας ρ και δίνεται από τον τύπο : $D = dW^D / \rho dV$. Η μονάδα μέτρησής της είναι το Gy (Gray) που ισούται με Joule/kg.

Ισοδύναμη δόση (H_T)

Η ισοδύναμη δόση σε κάποιο όργανο είναι ίση με την απορροφούμενη δόση πολλαπλασιασμένη με ένα παράγοντα βάρους, W_R , σύμφωνα με τη βιολογική επίδραση της συγκεκριμένης ακτινοβολίας. Δηλαδή $H_T = D \times W_R$ με μονάδα μέτρησης το Sv (Sievert) [12].

Τα στάδια, λοιπόν, της αλληλεπίδρασης της ιοντίζουσας ακτινοβολίας με τη βιολογική ύλη είναι κατά σειρά εξέλιξης : το φυσικό, το χημικό, το βιοχημικό και το βιολογικό [9,10,13].

- Φυσικό στάδιο (asec – fsec): Σε αυτό το στάδιο μεταφέρεται ενέργεια στα άτομα της βιολογικής ύλης και η κατανομή της εξαρτάται από το είδος και την ενέργεια της ακτινοβολίας. Για ακτινοβολίες με χαμηλό LET παρατηρούνται λιγότεροι ιοντισμοί και διεγέρσεις κατά μήκος της διαδρομής της δέσμης ενώ για ακτινοβολίες με υψηλό LET υπάρχει μεγαλύτερη πυκνότητα ιοντισμών ανά μονάδα μήκους της διαδρομής. Επειδή στις ακτινοβολίες με χαμηλό LET η διασπορά των ιοντισμών είναι μεγάλη σε σχέση με τις διαστάσεις ενός βιομορίου, όπως το DNA, συνήθως τα φωτόνια περνούν χωρίς να απορροφηθεί μεγάλη ποσότητα ενέργειας από τα βιομόρια.
- Φυσικοχημικό στάδιο (fsec – nsec): Κατά το στάδιο αυτό τα διεγερμένα και ιοντισμένα άτομα ή μόρια αντιδρούν, σπάνε τους χημικούς τους δεσμούς και δημιουργούν νέα. Αυτά τα μόρια και άτομα ονομάζονται ελεύθερες ρίζες και είναι

ιδιαίτερα ασταθή και βραχύβια (με εμβέλεια μικρότερη από 100 Angstrom), ηλεκτρικά ουδέτερα με ίσους αριθμούς πρωτονίων και ηλεκτρονίων αλλά με ένα ηλεκτρόνιο της εξωτερικής στιβάδας να είναι ασύζευκτο.

- Χημικό στάδιο (nsec - msec): Τώρα, οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν μεταξύ τους ή με παρακείμενα μόρια σχηματίζοντας «άτυπα» μόρια, δηλαδή μόρια διαφορετικά από τα φυσιολογικά. Έτσι προκύπτουν βλάβες των βιολογικών μακρομορίων και δραστικές βιολογικές ελεύθερες ρίζες.
- Βιολογικό στάδιο (msec - έτη): Το στάδιο αυτό διακρίνεται στο βιοχημικό, το κυτταρικό και το συστημικό επίπεδο. Κατά το βιοχημικό (διάρκειας msec-ώρες), η προσβολή σημαντικών βιομορίων για τον μεταβολισμό του κυττάρου οδηγεί σε φαινόμενα όπως η αναστολή της πρωτεϊνσύνθεσης ενώ μέσω διαφόρων ενζύμων ξεκινάει η διαδικασία αναγνώρισης και επιδιόρθωσης των βλαβών που έχουν δημιουργηθεί. Στο κυτταρικό επίπεδο (διαρκεί ώρες-μήνες), παρατηρείται αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης και δημιουργία βλαβών στους ιστούς. Οι βλάβες που δεν επιδιορθώνονται οδηγούν σε μεταλλάξεις ή σε κυτταρικό θάνατο. Οι παραπάνω βλάβες επάγουν σε συστημικό επίπεδο (διαρκεί έτη) την πρόκληση σημαντικών λειτουργικών βλαβών, ανοσολογικών αποκρίσεων, ορμονικών, καρκινογένεση, έως και θάνατο του οργανισμού.

2.2. Βιολογικά αποτελέσματα σε μοριακό επίπεδο και βλάβες στο DNA

2.2.1. Άμεσες και έμμεσες επιδράσεις

Κατά την αλληλεπίδραση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας με τη βιολογική ύλη αποθηκεύεται ενέργεια στα βιομόρια αλλάζοντας τη δομή ή τη σύσταση τους. Η αλλαγή αυτή συμβαίνει είτε με άμεση αποθήκευση ενέργειας στο μόριο είτε έμμεσα μέσω αλυσιδωτών αντιδράσεων. Για ακτινοβολίες με υψηλό LET (νετρόνια, σωματίδια α : $LET > 20 \text{ keV}/\mu\text{m}$) η άμεση δράση είναι ο κυρίαρχος μηχανισμός επίδρασης στα κύτταρα

ενώ αντίθετα για ακτινοβολίες με χαμηλό LET η έμμεση δράση είναι σημαντικότερη. Για παράδειγμα οι βιολογικές συνέπειες από την έμμεση δράση των ακτίνων-Χ είναι μεγαλύτερες από τα 2/3 επί του συνόλου της επίδρασης των ακτίνων-Χ.^[5,11]

Άμεση δράση

Η ιοντίζουσα ακτινοβολία έχει άμεση δράση όταν προκαλείται διέγερση ή ιονισμός σε κάποιο βιομόριο με αποτέλεσμα αυτό να υποστεί κάποια βιοχημική μεταβολή. Τα βιομόρια στα οποία αναφερόμαστε είναι οργανικά πολυμερή μόρια μεγάλης βιολογικής σημασίας όπως ένζυμα, πρωτεΐνες ή τα νουκλεϊκά οξέα των κυττάρων.

Οι αντιδράσεις που συμβαίνουν κυρίως είναι οι εξής:

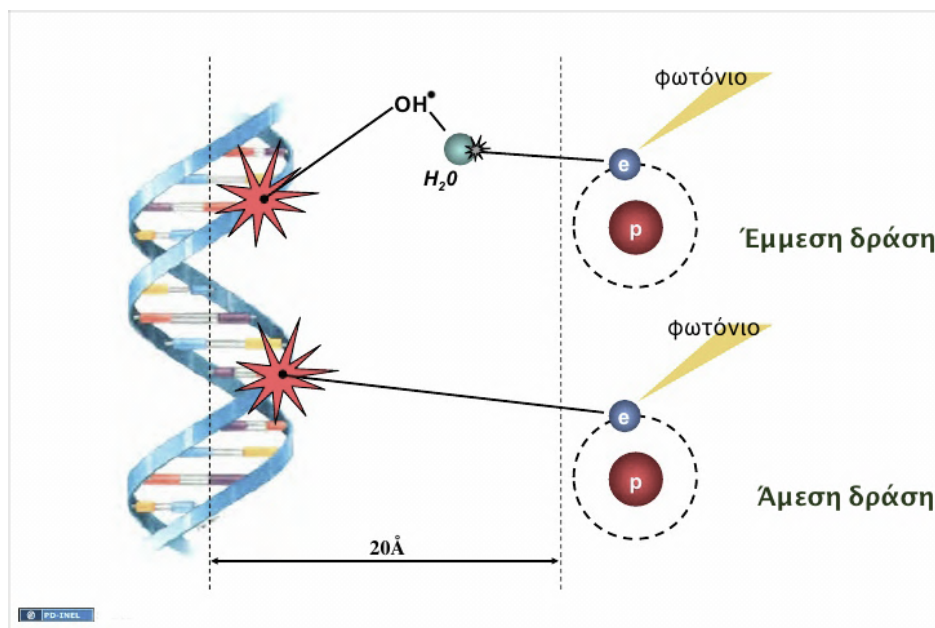
α) απώλεια ενός ατόμου υδρογόνου ή ενός μεθυλίου (-CH₃) και σχηματισμός μιας μακρομοριακής ρίζας. Οι ρίζες αυτές στην συνέχεια μπορεί να ενωθούν μεταξύ τους σχηματίζοντας ένα νέο μακρομόριο με διαφορετικές φυσικές και βιοχημικές ιδιότητες από το αρχικό [9,11].

β) Διάσπαση του μακρομορίου σε δύο ξεχωριστά και σταθερά μόρια με διαφορετικές επίσης φυσικές και βιοχημικές ιδιότητες από το αρχικό. Στα πρωτεϊνικά οξέα η άμεση δράση έχει ως αποτέλεσμα συνήθως την ρήξη των πεπτιδικών δεσμών και τη δημιουργία μικρότερων πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Από την άλλη στις νουκλεοπρωτεΐνες προκαλείται διαχωρισμός της ιστόνης από τα νουκλεϊκά οξέα ή θραύσεις (δίκλωνες ή μονόκλωνες) και δημιουργία ξεχωριστών τμημάτων [5,9].

Έμμεση δράση και ραδιόλυση του νερού

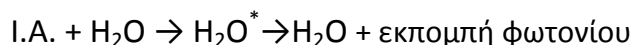
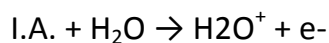
Η έμμεση δράση της ακτινοβολίας προκύπτει όταν σε κάποιο βιομόριο προκληθεί αλλαγή μέσω διαδοχικών αντιδράσεων που περιλαμβάνουν μόρια που έχουν διεγερθεί ή ιονιστεί. Η έμμεση δράση πραγματοποιείται μέσω των ελεύθερων ριζών που έχουν δημιουργηθεί από τη ραδιόλυση του νερού. Το νερό παίζει το ρόλο του μέσου διασποράς της ενέργειας

των ιοντιζουσών ακτινοβολιών καθώς αφθονεί στα κύτταρα (αποτελεί το 80% τις μάζας των ζωντανών κυττάρων). Οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται είναι εξαιρετικά δραστικές και για αυτό αν προκαλέσουν κάποια βλάβη στα βιομόρια αυτό θα γίνει σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα (10^{-5} sec) [5,11].

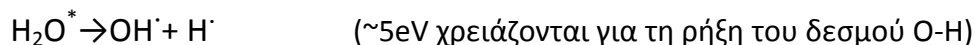


Εικόνα 3.3: Η έμμεση και άμεση δράση της ΙΑ. Στην εικόνα απεικονίζεται το πως επάγεται η βλάβη στο DNA μέσω του υδροξυλίου, της πιο δραστήριας ελεύθερης ρίζας, όπως και το εύρος της δραστηριότητας της. Φαίνεται, ακόμη ο άμεσος ιονισμός των φωτονίων στο μόριο του DNA.

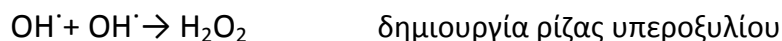
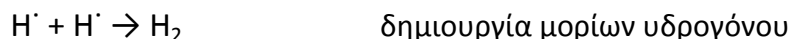
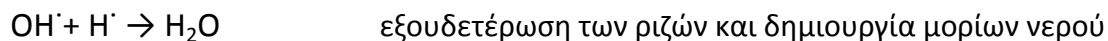
Η αλληλεπίδρασή της ιοντίζουσας ακτινοβολίας με το νερό δημιουργεί κατιόντα H_2O^+ διεγερμένα μόρια νερού (H_2O^*) καθώς και ελεύθερα ηλεκτρόνια (e^-). Τα κατιόντα H_2O^+ και τα διεγερμένα μόρια νερού αποσυντίθενται και οδηγούν άμεσα (10^{-13} s) στη δημιουργία των ελεύθερων ριζών υδρογόνου (H^\cdot) και υδροξυλίου (OH^\cdot), ενώ τα ελεύθερα ηλεκτρόνια, λόγω της πολικότητάς τους έλκουν τα μόρια του νερού γύρω τους δημιουργώντας τα λεγόμενα ενυδατωμένα ηλεκτρόνια (e^-_{aq}).^[5,9,11,13]



ή

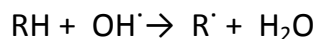


Η υδροξυλική ρίζα, η ρίζα υδρογόνου και τα ενυδατωμένα ηλεκτρόνια αντιδρούν μεταξύ τους με τον εξής τρόπο:

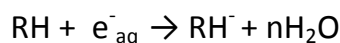
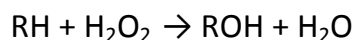
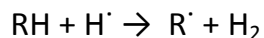


Όλες οι παραπάνω αντιδράσεις συμβαίνουν πολύ γρήγορα (10^{-7}sec) και έχουν σαν αποτέλεσμα τη παραγωγή των παραπάνω χημικά δραστικών μορίων (OH^\cdot , H^\cdot , e^-_{aq} , H_2O_2) που μπορούν να αντιδράσουν με άλλα μόρια προκαλώντας του χημικές μεταβολές.

Αν, για παράδειγμα, η υδροξυλική ρίζα (OH^\cdot) που είναι ιδιαίτερα δραστική με εμβέλεια μικρότερη από 100 Angstrom βρεθεί σε απόσταση αλληλεπίδρασης με ένα οργανικό μόριο RH (όπως το DNA) θα προκύψει η εξής αντίδραση :



Τα υπόλοιπα προϊόντα προκαλούν τις παρακάτω εξίσου σημαντικές αντιδράσεις:



Θα έχουμε, λοιπόν, είτε δημιουργία οργανικών ελεύθερων ριζών R^\cdot οι οποίες επειδή είναι πολύ ασταθείς και με υψηλό ενεργειακό περιεχόμενο θα αντιδράσουν/μετασχηματιστούν

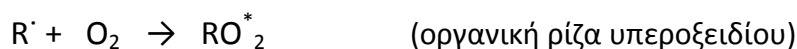
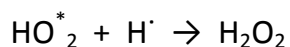
αμέσως είτε θα προκληθούν άμεσα αλλοιώσεις από τα προϊόντα της ραδιόλυσης προκαλώντας αλλαγές στη δομή του οργανικού μορίου με σοβαρές βιοχημικές συνέπειες.

Η τιμή **G** είναι ένα χρήσιμο μέγεθος που μας δείχνει το μέγεθος της παραγωγής ελευθέρων ριζών ή μορίων για κάθε 100eV απορροφούμενης ενέργειας. Η τιμή αυτή εξαρτάται από το pH του μέσου και το LET της ακτινοβολίας. Ακόμη ένα χρήσιμο μέγεθος που αναφέρεται στη δραστηριότητα των προϊόντων της ραδιόλυσης είναι η **σταθερά διάχυσης D (Diffusion constant)** που δείχνει το πόσο μπορεί κινηθεί στο μέσο το μόριο ή η δραστική ρίζα. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι τιμές των δύο αυτών μεγεθών για κάποια βασικά προϊόντα ακτινοβόληση με ακτίνες-X σε συνθήκες pH 3-13 [5,14].

	H[·]	OH[·]	H₂O₂	e⁻_{aq}
G	0.55	2.72	1.13	2.63
D (10⁻⁵ cm²/s)	8	2	2.3	5

Πίνακας 2.1: Η τιμές για την παραγωγή (G) και τη διάχυση (D) κάποιων βασικών οξειδωτικών δραστικών ριζών και του μορίου H₂O₂.

Η παρουσία οξυγόνου, επίσης, παίζει πολύ σημαντικό ρόλο καθώς τα e⁻_{aq} και H[·] μετατρέπονται (10⁻⁶ s) σε υπεροξειδική O^{*-}₂ και περοξυλική HO^{*}₂ ρίζα [5]. Η αναλογία O^{*-}₂ / HO^{*}₂ εξαρτάται άμεσα από το pH. Αυξημένη παρουσία οξυγόνου εντείνει τις επιπτώσεις της ΙΑ. Υπό αυτές τις συνθήκες μπορούν να προκύψουν οι εξής αντιδράσεις [9]:



Πριν ενεργοποιηθούν οι ενζυμικοί μηχανισμοί για την επιδιόρθωση τους βλαβών έχουν

προηγηθεί οι διαδικασίες της ανασύζευξης και της αποκατάστασης για την ανάπλαση των μορίων του νερού και των άλλων μορίων που έχουν μεταβληθεί [11,12].

Ανασύζευξη (recombination) πραγματοποιείται αμέσως μετά την ακτινοβόληση, σε χρονικό διάστημα μικρότερο από 10^{-11} sec, όταν τα προϊόντα της ραδιόλυσης είναι ακόμα πολύ κοντά. διάχυση των παραπάνω μορίων αυξάνει την μεταξύ τους απόσταση.

Αποκατάσταση (restitution) ονομάζεται η χημική ανασύσταση και επιστροφή των τροποποιημένων μορίων στην αρχική τους κατάσταση χωρίς την παρεμβολή ενζύμων ή άλλων βιοκαταλυτικών ουσιών. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σε χρόνο της τάξης 10^{-3} sec.

2.2.2. Βλάβες στο DNA

Στα θηλαστικά το πυρηνικό DNA προστατεύεται αρκετά καλά από την πυρηνική μεμβράνη. Κάτι που συμβαίνει στη μεγαλύτερη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου εκτός από τη φάση της κυτταρικής διαίρεσης όπου ο πυρήνας διπλασιάζεται και το DNA είναι πιο πιθανό να εκτεθεί σε διάφορους τοξικούς παράγοντες όπως η ρίζα υδροξυλίου και το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Επομένως, τα κύτταρα που διαιρούνται με γρήγορους ρυθμούς είναι περισσότερο επιρρεπή στις επαγόμενες από την ακτινοβολία βλάβες. Οι βλάβες στο μόριο του DNA μπορούν να προκληθούν είτε από την άμεση εναπόθεση ενέργειας στο μόριο προκαλώντας συνήθως σπάσιμο της αλυσίδας ενός ή και δύο κλώνων είτε έμμεσα μέσω των προϊόντων της ραδιόλυσης του νερού προκαλώντας κυρίως τη χημική αλλοίωση ή την αποκοπή αζωτούχας βάσης.

Αυξημένα επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) ή αζώτου (RNS), ειδικά σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, αποτελούν βασικό συντελεστή επαγωγής βλαβών DNA. Από τα προϊόντα της ραδιόλυσης αυτό που είναι το πιο δραστικό είναι η ρίζα του υδροξυλίου καθώς προκαλεί το 60-70% επί του συνόλου των βλαβών στο DNA για ακτινοβολίες με χαμηλό LET [15,16]. Επειδή είναι εξαιρετικά δραστική η ρίζα του υδροξυλίου, για να προκαλέσει βλάβη στο μόριο του DNA θα πρέπει να έχει δημιουργηθεί σε πολύ κοντινή

απόσταση από αυτό (μικρότερη από 10nm). Το εύρος διάχυσής της στο κυτταρικό περιβάλλον είναι περίπου 6nm δηλαδή περίπου 3 φορές η διάμετρος της διπλής έλικας του DNA [15]. Οι τέσσερις βάσεις του DNA είναι εξίσου ευαίσθητες στην προσβολή από τη ρίζα υδροξυλίου. Ωστόσο, επειδή η αποθήκευση ενέργειας είναι ανάλογη της μάζας έχει βρεθεί πως οι πυριμιδίνες είναι 100 πιο ευαίσθητες από τις πουρίνες στην άμεση επίδραση της ακτινοβολίας [9,16] .

Εκτός από τις βλάβες που προκαλούνται από την ionίζουσα ακτινοβολία ή άλλους εξωγενείς παράγοντες, έχει παρατηρηθεί ότι υπάρχουν ενδογενείς βλάβες στο DNA που προκαλούνται από φυσικές διαδικασίες του κυττάρου. Οι βλάβες αυτές προκαλούνται είτε από προϊόντα του μεταβολισμού, όπως οι ROS, RNS, δραστικές καρβονυλικές μορφές, προϊόντα λιπιδικής περοξειδωσης και αλκαλικοί παράγοντες, είτε από διαδικασίες ραδιόλυσης που πυροδοτούνται από άλλους παράγοντες. Έχει βρεθεί ότι στα κύτταρα των θηλαστικών παρουσιάζονται περισσότερες από 60000 ενδογενείς βλάβες στο DNA [17].

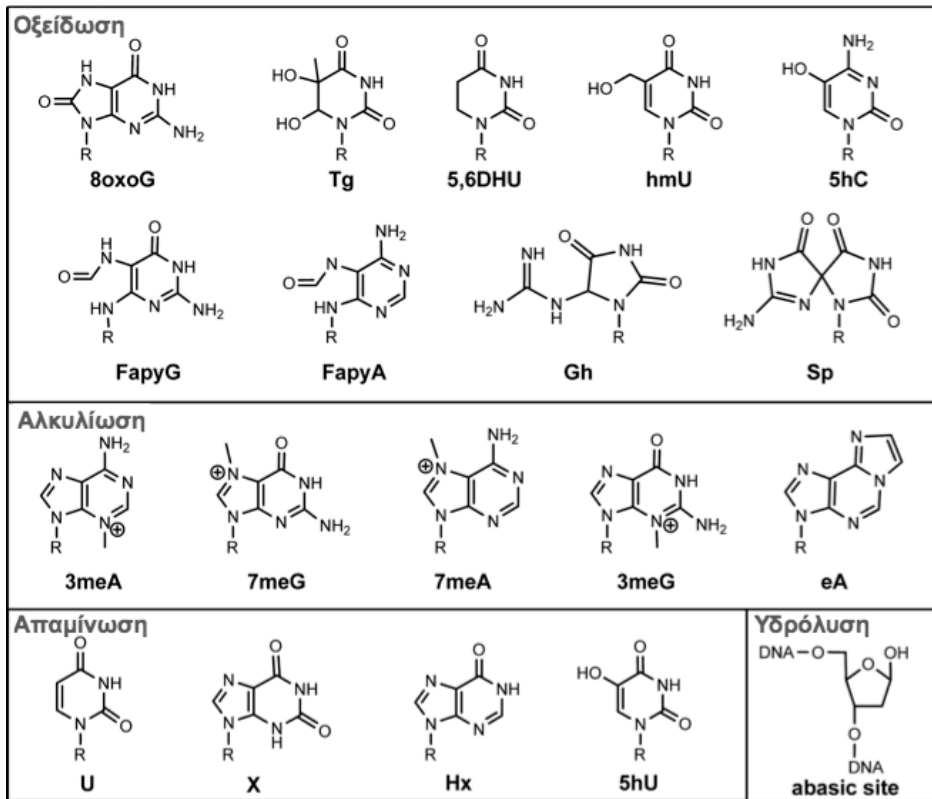
Τα διάφορα είδη φυσικοχημικών βλαβών στο μόριο του DNA που προκαλούνται την ΙΑ είναι συνοπτικά τα παρακάτω:

1. ρήξη της σύνδεσης σακχάρου-φωσφορικής ρίζας της μίας πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας (**Single Strand Break - SSB**)
2. διπλό σπάσιμο του μορίου του DNA. Συμβαίνει όταν υπάρχει ρήξη και στις δύο αλυσίδες στην ίδια θέση ή σε γειτονικές θέσεις (**Double Strand Break – DSB**)
3. **αλλοίωση βάσης** (οξειδωση, απαμίνωση, αλκυλίωση ή μεθυλίωση)
4. απώλεια βάσης και δημιουργία αβασικού σημείου, αποπουρινώσεις και αποπυριμιδινώσεις (apurinic/apyrimidinic sites - **AP sites**)
5. **εγκάρσιες διασυνδέσεις** μεταξύ των κλώνων του DNA ή μεταξύ DNA και μοριακών πρωτεϊνών.
6. **σπάσιμο δεσμών υδρογόνου** μεταξύ των δύο αλυσίδων

Οι **SSBs** και οι **DSBs** δημιουργούνται όταν υπάρξει ρήξη του φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ δεσοξυριβόζης και φωσφορικής ομάδας του ενός ή και των δύο κλώνων του DNA αντίστοιχα. Η διπλή ρήξη προκαλείται συνήθως από ακτινοβολίες μεγάλου LET καθώς η απώλεια ενέργειας είναι πολύ μεγαλύτερη κατά μήκος της διαδρομής της ακτινοβολίας, δημιουργώντας βλάβες σε πιο κοντινές αποστάσεις. Οι SSBs όπως και οι DSBs είναι δύσκολα επιδιορθώσιμες και μπορούν να οδηγήσουν σε λανθασμένη αντικατάσταση βάσεων, σπάσιμο του χρωμοσώματος, χρωμοσωματικές ανταλλαγές και είναι κυρίως επάγον τον κυτταρικό θάνατο [16].

Πέρα από τις **ενδοκλωνικές ή διακλωνικές διασυνδέσεις** του DNA πραγματοποιούνται και **διαμοριακές διασυνδέσεις** του μορίου του DNA με πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες αυτές μπορεί να είναι ιστονικές ή μη ιστονικές, η παρουσία, ωστόσο, ιστονικών πρωτεϊνών και DNA σε αναλογία 1:1 τις κάνει πιο πιθανές να εμπλακούν σε εγκάρσιες διασυνδέσεις με το μόριο του DNA [11].

Από τις διάφορες περιπτώσεις αλλοίωσης βάσης αυτές με την μεγαλύτερη σημασία είναι οι **οξειδωτικές βλάβες** καθώς είναι αυτές που δημιουργούνται σε μεγαλύτερο βαθμό υπό συνθήκες στρες. Σχηματίζονται ως επί το πλείστον από δραστικές ρίζες και οξειδωτικά μόρια, μπορούν να πάρουν ποικίλες μορφές και είναι ιδιαίτερα μεταλλαξογόνες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα η δημιουργία της 8-υδροξυγουανίνης, από την οξείδωση της γουανίνης, η οποία συνδέεται με την αδενίνη με 2 δεσμούς υδρογόνου και οδηγεί σε μετάλλαξη τύπου αντικατάστασης.



Εικόνα 3.4: Τα κύρια είδη βλαβών των βάσεων του DNA που προκαλούνται λόγω οξειδωσης, αλκυλίωσης, απαμίνωσης και υδρόλυσης [32].

Ακόμη, τα προϊόντα της υδρόλυσης μπορούν να δημιουργήσουν αποκοπή μιας πουρίνης ή μιας πυριμιδινης αφήνοντας στο μόριο του DNA μια αβασική θέση η οποία μπορεί να πάρει διάφορες μορφές. Για παράδειγμα, η υδροξυλική ρίζα όταν αντιδράσει με το μόριο του DNA στη θέση σύνδεσης βάσης-σακχάρου προκαλεί αποκοπή της βάσης παίρνοντας τελικά τη θέση σύνδεσής της στο σημείο 1 του σακχάρου. Επίσης, όταν κάποιο προϊόν της ραδιόλυσης αντιδράσει με το μόριο του DNA θα προκαλέσει απόσπαση ενός ατόμου υδρογόνου από τη θέση 1 της δεσοξυριβόζης και δημιουργία οργανικής ρίζας στη θέση αυτή. Η ρίζα μπορεί να αντιδράσει τότε με μοριακό οξυγόνο δημιουργώντας μια ρίζα περοξειλίου η οποία εκπίπτει ενεργειακά προκαλώντας απώλεια της βάσης και δημιουργία 2'- δεοξυ-ριβονολακτόνης. Η δεοξυ-ριβονολακτόνη είναι μεταλλαξογόνα και ανθεκτική στα επιδιορθωτικά ένζυμα. Γενικά τα αβασικά σημεία αν δε διορθωθούν είναι μη μεταγραφόμενα, οδηγούν σε μεταλλάξεις κατά τη διαδικασία του διπλασιασμού του DNA και μπορούν να προκαλέσουν ακόμα τον κυτταρικό θάνατο [19]. Έχει υπολογιστεί

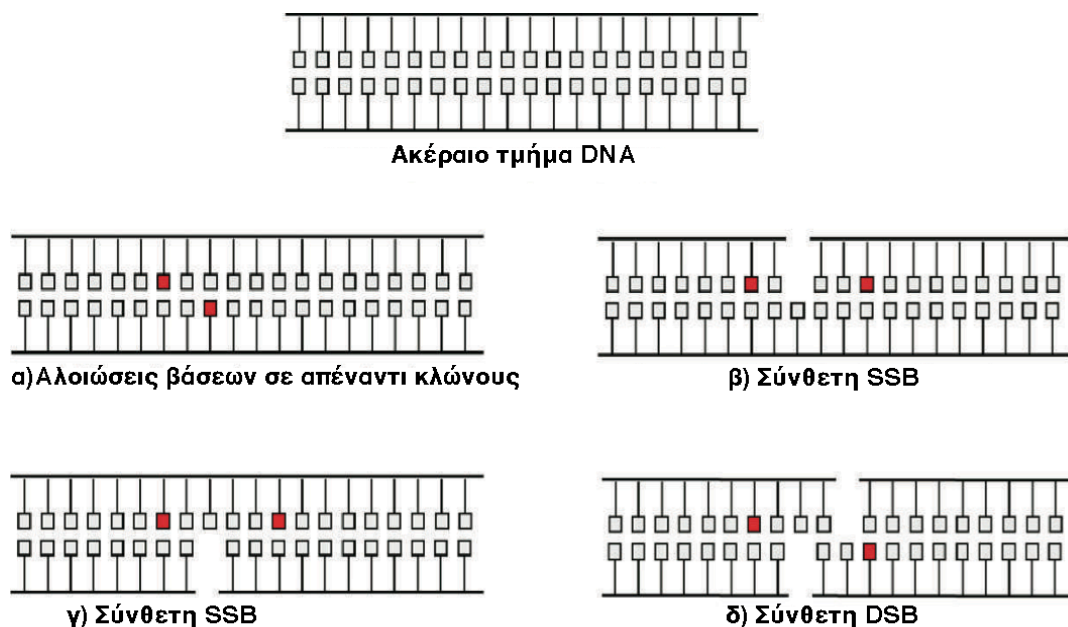
ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες δημιουργούνται ημερησίως, λόγω των προϊόντων του μεταβολισμού (κυρίως από H_2O_2 και O^{*-2}) σε ένα ανθρώπινο κύτταρο περίπου 10000 αποπυρινώσεις και 500 αποπυριμιδινώσεις [17].

Γενικά, το είδος της ακτινοβολίας, η ενέργειά της, ο ρυθμός ακτινοβόλησης παίζουν σημαντικό ρόλο στην έκταση και το είδος των βλαβών στο κύτταρο και το DNA. Απορροφούμενη δόση 1 Gy ακτινοβολίας χαμηλού LET προκαλεί κατά μέσο όρο 10^5 ιοντισμούς ανά κύτταρο (διαμέτρου 10 μm) που οδηγούν, μέσω της άμεσης ή έμμεσης δράσης, σε περίπου 500-1000 SSBs, 20-30 DSBs και 1000-2000 βλάβες βάσεων στο DNA. Παρόλο που ο αριθμός των βλαβών που προκαλούνται από την ΙΑ είναι πολύ μεγάλος ένα μικρό ποσοστό αυτών έχει βιολογική σημασία και μπορεί να οδηγήσει μέχρι και σε κυτταρικό θάνατο [11,15].

2.2.3. Η περίπτωση των ομαδοποιημένων βλαβών

Ιδιαίτερη αναφορά οφείλουμε να κάνουμε στο είδος βλαβών που ονομάζονται ομαδοποιημένες και σύνθετες βλάβες, η βιολογική επίπτωση των οποίων παρατηρήθηκε σχετικά πρόσφατα. Η σημασία τους αναγνωρίστηκε αρχικά από τον John F. Ward (δεκαετία του 1980), ο οποίος αναφέρθηκε σε αυτές ως *τοπικώς πολλαπλά προσβεβλημένες θέσεις* (Locally Multiple Damaged Sites – LMDS) [20]. Ως ομαδοποιημένες/σύνθετες βλάβες (clustered/complex DNA lesions) θεωρούμε την ύπαρξη 2 ή περισσότερων βλαβών σε κοντινή απόσταση, δηλαδή μέσα σε 1 ή 2 περιστροφές της έλικας του DNA [21]. Οι βλάβες αυτές μπορεί να είναι του ίδιου ή διαφορετικού τύπου και στην περίπτωση αυτή ονομάζονται σύνθετες ομαδοποιημένες βλάβες (complex clusters). Ιδιαίτερα σημαντική και κομβική υπήρξε η παρατήρηση πως οι συνέπειες των συμπλεγμάτων βλαβών είναι αξιοσημείωτα μεγαλύτερες από τις μεμονωμένες βλάβες που τα συνθέτουν αν αυτές ήταν σε διασκορπισμένες στο γονιδίωμα και όχι συγκεντρωμένες σε μία περιοχή. Η φύση των επιμέρους βλαβών, οι συνδιασμοί τους, η αλυσίδα όπου βρίσκονται, όπως και το πόσο κοντά είναι μεταξύ τους παίζουν σημαντικό ρόλο στο πόσο αν και πόσο εύκολα θα επιδιορθωθούν τα

συμπλέγματα αυτά. Γενικά οι ομαδοποιημένες βλάβες διακρίνονται σε 2 κατηγορίες: τις DSBs και τις μη DSBs οξειδωτικές ομαδοποιημένες βλάβες DNA (OCDLs – Oxidative Clustered DNA Lesions). Οι OCDLs περιλαμβάνουν διάφορης συνθετότητας SSBs, οξειδωμένες πουρίνες και πυριμιδίνες και οξειδωμένα αβασικά σημεία οι οποίες κατανέμονται με διάφορους τρόπους στο μόριο του DNA σε απόσταση 1-10 ζεύγη βάσεων [21]. Ιδιαίτερα σημαντικά και εξαιρετικά επικίνδυνα είναι τα συμπλέγματα όπου οι βλάβες τους βρίσκονται σε απέναντι κλώνους του DNA (bistranded clusters) καθώς σε περίπτωση μη επιδιόρθωσης μπορεί να οδηγήσουν σε DSBs, χρωμοσωμικές βλάβες, αυξημένη πιθανότητα μεταλλάξεων και γενωμική αστάθεια γενικότερα [15].



Εικόνα 2.5: Παραδείγματα μορφών σύνθετων βλαβών DNA. Τα συμπλέγματα βλαβών περιλαμβάνουν διάφορους συνδυασμούς αλλοιωμένων βάσεων ή/και αβασικών σημείων (απεικονίζονται με κόκκινο χρώμα) [15].

Η δόση της ακτινοβολίας, η γεωμετρία της δέσμης και η τροχιά της στο κύτταρο καθορίζουν την χωρική αποθήκευση ενέργειας και κατ' επέκταση το μέγεθος και την κατανομή των ομαδοποιημένων βλαβών. Γενικά παρατηρείται μείωση τους ανά μονάδα απορροφούμενης δόσης συνολικά στο κύτταρο με την αύξηση του LET. Αυτό όμως έχει ως συνέπεια ο μέσος όρος βλαβών σε κάθε σύμπλεγμα βλαβών να αυξάνεται με την αύξηση του LET, και οι ομαδοποιημένες βλάβες από υψηλού LET ακτινοβολία να είναι πιο

σύνθετες [15]. Έχει παρατηρηθεί πως ακόμη και χαμηλές δόσεις ακτινοβολίας (~1Gy) μπορούν εκτός από μεμονωμένες βλάβες να προκαλέσουν και όλα τα παραπάνω είδη ομαδοποιημένων βλαβών. Ακόμη, ακτινοβολίες χαμηλού LET μπορούν λόγω της δομής τους να δημιουργήσουν μεγάλο αριθμό ομαδοποιημένων βλαβών (60% επί του συνόλου των βλαβών) μέσω των υψηλά ενεργειακά παραγόμενων δευτερογενών ηλεκτρονίων του προκαλώντας βλάβες σε εύρος 20nm [11]. Έχει βρεθεί και πειραματικά πως οι ομαδοποιημένες βλάβες προκαλούνται, υπό διάφορες συνθήκες, από μία μόνο τροχιά ακτινοβολίας [22]. Ακόμη, με προσομοιώσεις Monte Carlo έχει βρεθεί πως ακτινοβολίες χαμηλού LET (<1keV/μm) προκαλούν σε ποσοστό 60% μεμονωμένες SSB και το υπόλοιπό 40% των μονόκλωνων θραύσεων συνοδεύεται από άλλες βλάβες [14].

Βασικός παράγοντας που επηρεάζει το πλήθος και το είδος των βλαβών και την αναλογία μεταξύ SSB και DSB είναι το ποσοστό οξυγόνου που υπάρχει στο κυτταρικό περιβάλλον. Παρατηρείται πως σε αερόβιες συνθήκες (υψηλή ποσότητα O₂) το κλάσμα SSB/DSB μειώνεται ενώ παράλληλα αυξάνεται ο αριθμός βλαβών ανά σύμπλεγμα καθιστώντας τις βλάβες πιο σύνθετες [15].

Ενώ οι βλάβες από ενδογενείς παράγοντες ή από άλλους περιβαλλοντικούς λόγους (εκτός των ιοντίζουσων ακτινοβολιών) είναι κυρίως μεμονωμένες, οι βλάβες από ΙΑ είναι κυρίως ομαδοποιημένες και σύνθετες. Το γεγονός που κάνει τις βλάβες αυτές εξαιρετικά σημαντικές βιολογικά είναι ότι παρουσιάζουν πολύ μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στους επιδιορθωτικούς ενζυμικούς μηχανισμούς σε σχέση με τις μεμονωμένες και μπορεί να παρατηρηθούν στον οργανισμό αρκετό καιρό μετά την ακτινοβολήση (μετά από εβδομάδες ακόμη και χρόνια). Για τους παραπάνω λόγους παρόλο που οι βλάβες DNA λόγω ΙΑ είναι λιγότερες σε σχέση με τις καθημερινή συσσώρευση βλαβών από άλλους παράγοντες έχουν καθοριστική βιολογική σημασία και προκαλούν χρόνιες επιπτώσεις στο οργανισμό [20,21]. Η παραγωγή, ακόμη, μεγάλου αριθμού ομαδοποιημένων βλαβών σε σχέση με την ύπαρξη σχετικά εύκολα επιδιορθώσιμων μεμονωμένων ενδογενών βλαβών αποτελεί σημαντικό παράγοντα υποστήριξης του γραμμικού, χωρίς κατώφλι, παραδείγματος για την εκτίμηση των βιολογικών συνεπειών από τη χαμηλή έκθεση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία [15].

2.2.4. Αναγνώριση και απόκριση στις βλάβες του DNA

Η ύπαρξη βλαβών DNA προκαλεί την ενεργοποίηση ενός μηχανισμού σηματοδότησης **Απόκρισης στις βλάβες DNA (DNA Damage Desponse – DDR)** που οδηγεί σε τρεις ενδεχόμενες κυτταρικές διαδικασίες: τη μόνιμη ή προσωρινή αναστολή του κυτταρικού κύκλου, τον κυτταρικό θάνατο μέσω της αποπτωτικής οδού ή την ενεργοποίηση των εξειδικευμένων επιδιορθωτικών μηχανισμών. Ένα σύνολο πρωτεϊνών ανταποκρίνεται στην ύπαρξη συγκεκριμένων βλαβών και πυροδοτεί αλληλεπικαλυπτόμενα σηματοδοτικά μονοπάτια που καταλήγουν σε κάποια από τις παραπάνω διαδικασίες ανάλογα με το είδος των βλαβών, την έκτασή τους και τη γενικότερη κατάσταση του κυττάρου.

Στην περίπτωση ύπαρξης DSBs τα σηματοδοτικά μονοπάτια ανίχνευσης και απόκρισης της βλάβης που ενεργοποιούνται, σε γενικές γραμμές αποτελούνται από τις παρακάτω διαδικασίες. Αρχικά, το σύμπλεγμα πρωτεϊνών Mre11–Rad50–Nbs1 (MRN) φαίνεται να ανιχνεύει τις DSBs [23] κατά τον ομόλογο ανασυνδυασμό (ένα από τα δύο μονοπάτια επιδιόρθωσης των DSBs). Το σύμπλεγμα MRN έχει ρόλο στην ενεργοποίηση των Rad53 και CHK1 κινασών των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, όπως και της πρωτεΐνης ATM (ataxia telangiectasia mutated). Τότε η ATM προσδένεται στα σημεία θραύσης, φωσφορυλιώνεται και ενεργοποιεί τις CHK1 κινάσες οι οποίες με τη σειρά τους φωσφορυλιώνουν την πρωτεΐνη p53. Με αυτό τον τρόπο αναστέλλεται η δράση της κατασταλτικής πρωτεΐνης MDM-2 και στην συνέχεια ενεργοποιείται η p21 που προσδένεται στη κυκλινο-εξαρτώμενη κινάση cyclinE-CDC-2 και έτσι ελέγχει το σημείο μετάβασης G1-S [11,24]. Με αυτό τον τρόπο σταματά η μετάβαση στη φάση S και το DNA δεν διπλασιάζεται για να διορθωθεί πρώτα η βλάβη. Στην περίπτωση της επιδιόρθωσης μέσω του μηχανισμού της μη ομόλογης ένωσης άκρων NHEJ (Non-homologous End-joining) είναι απαραίτητη η ενεργοποίηση του συμπλέγματος DNA-PK. Η DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs) που αποτελεί την καταλυτική υπομονάδα καθίσταται λειτουργική μετά την πρόσδεση του ετεροδιμερούς των πολυπεπτιδίων Ku70 και Ku80. Το ετεροδιμερές Ku αναγνωρίζει και προσδένεται στα άκρα της βλάβης δημιουργώντας σύμπλεγμα με την DNA-PKcs. Τότε η ενεργοποίηση της DNA-PK οδηγεί σε φωσφορυλίωση των καταλοίπων Ser 15 και 37 της p53, διακοπή του κύκλου και εκκίνηση

του μηχανισμού επιδιόρθωσης NHEJ [25].

Στις περιπτώσεις άλλων ειδών βλαβών DNA εκτός των DSBs, σε μεγάλο ή μικρότερο κυρίως βαθμό, είναι γνωστά ορισμένα στοιχεία για τις αντίστοιχες λειτουργίες αναγνώρισης και απόκρισης. Πολλές πρωτεΐνες που εμπλέκονται στα σηματοδοτικά αυτά μονοπάτια είναι κοινές με εκείνες που εμφανίζονται στις DSBs και έχουν ως στόχο την διακοπή του κυτταρικού κύκλου και την πυροδότηση των αντίστοιχων λειτουργιών επιδιόρθωσης. Η ATR (ataxia-telangiectasia and Rad3-related), που ανήκει στην ομάδα κινασών PIKKs (Phosphoinositide Kinase - Related Kinases) έχει τον ίδιο ρόλο με την ATM αλλά λειτουργεί στην απόκριση SSBs ρυθμίζοντας τον κυτταρικό διπλασιασμό μέσω της ενεργοποίησης της ελεγκτικής κινάσης 2 (Chk2) [23,26]. Στην περίπτωση της ενεργοποίησης του επιδιορθωτικού μηχανισμού BER λόγω της ύπαρξης αλλοιωμένων βάσεων (όπως οξειδώσεις, αλκυλιώσεις) ανταποκρίνονται και εδώ με τον ίδιο τρόπο οι ειδικές πρωτεΐνες ATM και Chk2. Στην συνέχεια φαίνεται πως η κινάση Chk2 φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη XRCC1 με το τμήμα Thr284 οδηγώντας στην ενεργοποίηση του μηχανισμού επιδιόρθωσης της βλάβης [27].

2.2.5. Μηχανισμοί επιδιόρθωσης

Ένα πολύπλοκο σύστημα από διάφορα εξειδικευμένα ένζυμα και βοηθητικές πρωτεΐνες ενεργοποιείται για την επιδιόρθωση των βλαβών στο DNA καθώς σε διαφορετική περίπτωση οι επιπτώσεις στο κύτταρο και γενικά στον οργανισμό θα ήταν καταστροφικές. Για κάθε είδος βλάβης ενεργοποιείται ένας ειδικός μηχανισμός μέσω της απόκρισης των σηματοδοτικών μονοπατιών που περιλαμβάνει συγκεκριμένα επιδιορθωτικά ένζυμα και πρωτεΐνες.

Επιδιόρθωση δίκλωνων θραύσεων

Για την επιδιόρθωση των DSB επιστρατεύονται δυο ανεξάρτητοι μηχανισμοί. Αυτοί είναι η **μη ομόλογη ένωση άκρων NHEJ** (Non-homologous End-joining) και ο **ομόλογος**

ανασυνδυασμός HR (Homologous Recombination).

Στη μη ομόλογη ένωση άκρων μετά τη πρόσδεση του Ku στα άκρα της βλάβης στους κλώνους του DNA, DNA πολυμεράσες και νουκλεάσες καθαρίζουν και διαμορφώνουν κατάλληλα τα άκρα έτσι ώστε να ενεργοποιηθεί το σύμπλεγμα XRCC4/DNA λιγάσης IV επιτελεστεί η απολίνωση των 2 μερών. Ο NHEJ είναι επιρρεπής στα λάθη, λειτουργεί καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου αλλά κυριαρχεί κατά τις φάσεις G1 και S [11,28].

Από την άλλη ο ομόλογος ανασυνδυασμός βασιζόμενος για την επιδιόρθωση στην αλληλουχία της αδερφής χρωματίδας είναι ελεύθερος σφαλμάτων και είναι ενεργός κατά το τέλος της φάσης S και κατά την G2 [11,29]. Κατά τον HR μετά την πρόσδεση του συμπλέγματος Mre11–Rad50–Nbs1 στα σπασμένα άκρα ακολουθεί η μεταφορά της πληροφορίας από την ομόλογη ακολουθία και η σύνθεση των κατάλληλων νουκλεοτιδίων με τη βοήθεια κυρίως των πρωτεϊνών rad51 και XRCC2.

Επιδιόρθωση μονόκλωνων βλαβών

Οι μηχανισμοί που ενεργοποιούνται σε αυτές τις περιπτώσεις είναι συνοπτικά οι εξής:

- **Επιδιόρθωση αταίριαστου ζεύγους βάσεων (Mismatch Repair - MMR)**

Ενεργοποιείται για τα λάθη τοποθέτησης ενός νουκλεοτιδίου που εμφανίζονται κατά την αντιγραφή του DNA (προσθήκη ή απάλειψη 1-4 βάσεων, εισδοχή μη συμπληρωματικής βάσης) [30].

- **Επιδιόρθωση εκτομής νουκλεοτιδίου (Nucleotide Excision Repair - NER)**

Ο μηχανισμός αυτός διορθώνει τις βλάβες λόγω παραμόρφωσης του σχήματος της διπλής έλικας του DNA. Τέτοιες είναι ο σχηματισμός διμερών πυριμιδινών (pyrimidine dimers) και η ομοιοπολική πρόσδεση ογκωδών χημικών ομάδων [31].

- **Επιδιόρθωση εκτομής βάσης (Base Excision Repair - BER)**

Διορθώνει τις SSBs και τις διάφορες αλλοιώσεις ή απώλειες μίας βάσης (οξειδωση, μεθυλίωση, αποπουρίνωση, αποπυριμιδίνωση ή απαμίνωση) [32].

Επιδιόρθωση εκτομής βάσης (BER)

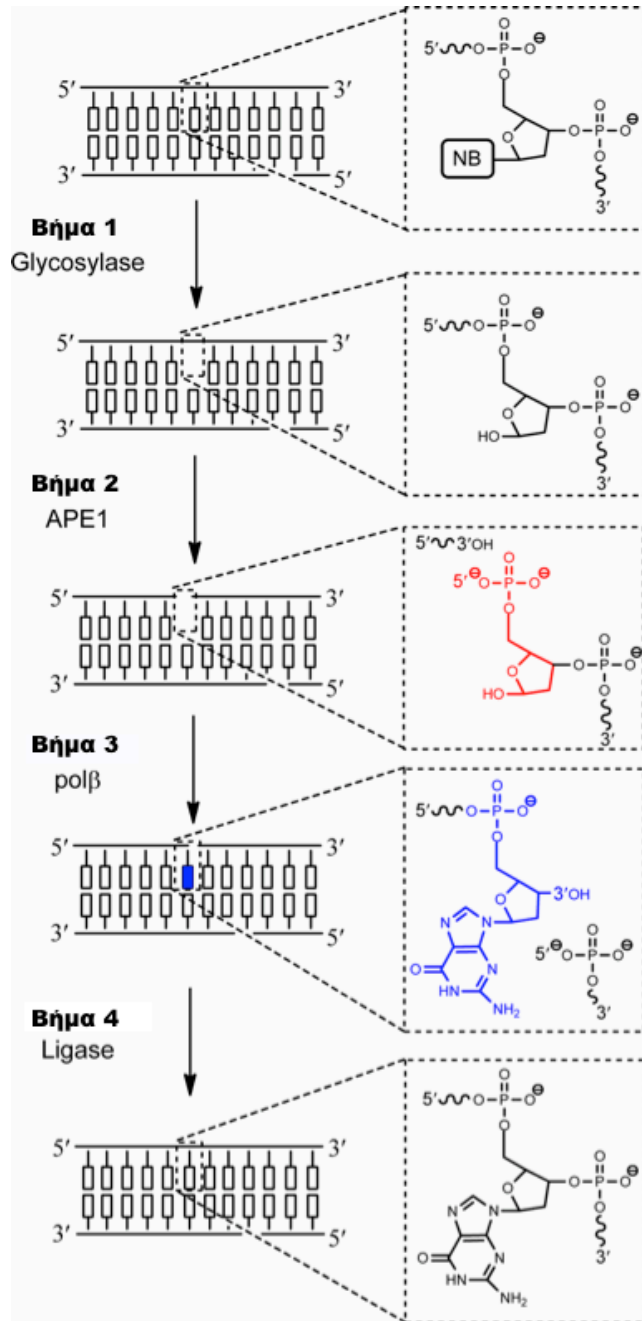
Οι βλάβες που ενεργοποιούν τον μηχανισμό BER προκαλούνται αναλογικά σε μεγαλύτερο βαθμό από χαμηλές δόσεις και από ακτινοβολίες χαμηλού LET, λόγω της φύσης των βλαβών που επάγονται σε αυτές τις περιπτώσεις. Αν δεν επιδιορθωθούν είναι ιδιαίτερα μεταλλαξογόνες και στην περίπτωση που είναι ομαδοποιημένες σε απέναντι κλώνους μπορεί να εξελιχθούν σε DSB.

Η διαδικασία επιδιόρθωσης του μηχανισμού BER εκκινεί από ένα ένζυμο που ονομάζεται **DNA γλυκοσυλάση** του διαβάζει την αλληλουχία των βάσεων προσπαθώντας να ανιχνεύσει εκείνες που έχουν αλλοιωθεί ή βρίσκονται σε λάθος θέση. Υπάρχουν 11 γνωστές DNA γλυκοσυλάσες στα ανθρώπινα κύτταρα οι οποίες είτε εξειδικεύονται σε 1-2 περιπτώσεις βλαβών είτε μπορούν να ανιχνεύσουν περισσότερες. Οι DNA γλυκοσυλάσες διακρίνονται σε δύο είδη, τις μονολειτουργικές και τις πολυλειτουργικές. Οι μονολειτουργικές μέσω ενός μορίου νερού υδρολύουν τον γλυκοζιδικό δεσμό δημιουργώντας μία αβασική θέση.

Από την άλλη, οι πολυλειτουργικές γλυκοσυλάσες μέσω μιας πυρηνόφιλης αμινομάδας τους, εκτός από τη ρήξη του γλυκοζιδικού δεσμού, καταλύουν τη ρήξη φωσφοδιεστερικού δεσμού μέσω της δημιουργίας μιας Schiff βάσης στη θέση 3 της δεσοξυριβόζης του αβασικού σημείου και συνεπώς επάγουν επιπλέον τη ρήξη του κλώνου στη θέση αυτή [32].

Στη συνέχεια, ανεξάρτητα από το ποια γλυκοσυλάση έχει προηγηθεί, θα δράσει μια AP ενδονουκλεάση τύπου 1 (APE1) η οποία θα προκαλέσει ρήξη του φωσφοδιεστερικού δεσμού με τη χρήση του ιόντος Mg^{2+} ακριβώς πάνω από τη φωσφορική ομάδα της αβασικής θέσης δημιουργώντας έτσι της απολήξεις 3'-OH και 5'-δεοξυριβόζη φωσφορικό άλας (dRP) [32].

Ακολουθεί μία **πολυμεράση β** (pol β) στον σύντομο (μικρής έκτασης) μηχανισμό BER (**short patch BER**) που πραγματοποιεί 2 λειτουργίες. Μετατρέπει το 5'-dRP σε 5' -



φωσφορικό άλας και μέσω του ιόντος Mg^{2+} προσδένει ένα μόνο νουκλεοτίδιο στην απόληξη 3'-OH. Καθώς η πρώτη λειτουργία της πολυμεράσης β είναι είναι 20 φορές γρηγορότερη από την δεύτερη, προβλέπεται πως η αντικατάσταση του 5'-dRP προηγείται και έπεται η επιτέλεση της δεύτερης [33].

Τέλος, η διαδικασία ολοκληρώνεται από το ένζυμο της **DNA λυάσης** η οποία μπορεί να είναι DNA λυάση 1 (Lig1) ή DNA λυάση 3 (Lig3). Οι δύο αυτές λυάσεις καταλύουν τη δημιουργία ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ της απόληξης 3'-OH του νέου νουκλεοτιδίου και της απόληξης 5' -φωσφορικό άλας του γειτονικού [32]. Για την πραγματοποίηση της λειτουργίας τους οι ανθρώπινες λυάσεις χρησιμοποιούν το μόριο ATP και το ιόν Mg^{2+} . Ακόμη απαραίτητη για την λειτουργία της Lig3 είναι η πρωτεΐνη XRCC1 η οποία συνδυάζεται μαζί της [27].

Εικόνα 2.6: Τα βήματα του σύντομου μηχανισμού BER όπου συμμετέχουν με τη σειρά τα ένζυμα: μία γλυκοσυλάση, η ενδονουκλεάση APE1, η πολυμεράση β και κάποια λυάση [32].

Η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω ονομάζεται σύντομος μηχανισμός BER. Σε περίπτωση που η ένωση 5'-dRP είναι τροποποιημένη η λειτουργία της πολυμεράσης β

μπλοκάρεται και ακολουθείτε ένας εναλλακτικός και λιγότερο σύντομος δρόμος επιδιόρθωσης που ονομάζεται μεγάλης έκτασης (**long-patch**) **BER (lp-BER)** [32,33]. Σε αυτή την περίπτωση ενσωματώνονται στην κενή θέση 2-6 νουκλεοτίδια συνήθως ή και περισσότερα και στην συνέχεια μια flap ενδονουκλεάση 1 (FEN1) κόβει και απομακρύνει την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων που έχει αντικατασταθεί και περισσεύει. Στη συνέχεια όπως και στην άλλη περίπτωση η διαδικασία ολοκληρώνεται με μια DNA λυάση 1 (lig1) [32].

2.2.6. Δυσλειτουργίες και προβλήματα στην επιδιόρθωση

Ελλιπής ανταπόκριση και λειτουργία

Είναι γνωστό πως αρκετές ανθρώπινες ασθένειες φαίνεται να σχετίζονται με δυσλειτουργίες και ελλιπή δραστηριοποίηση κάποιου μηχανισμού επιδιόρθωσης του πυρηνικού DNA. Οι ελαττωματικές λειτουργίες αυτές παρουσιάζονται στη μειωμένη ευαισθησία του κυττάρου απέναντι σε επιβλαβείς παράγοντες για το DNA και στη ελλιπή ανταπόκριση και επικοινωνία των στοιχείων που εμπλέκονται στις διαδικασίες επιδιόρθωσης και σηματοδότησης για τις βλάβες του DNA. Μπορεί να οφείλονται σε μετάλλαξη κάποιου γονιδίου ενός ενζύμου του μηχανισμού, στην ελλιπή ή καθόλου έκφρασή του ή στην έλλειψη κάποιου παράγοντα που συμμετέχει στη σηματοδότηση για την ανίχνευση ή επιδιόρθωση βλαβών DNA. Οι δυσλειτουργίες αυτές μπορεί να είναι κληρονομικές και οι ασθενείς που τις φέρουν παρουσιάζουν έντονη γενωμική αστάθεια και προδιάθεση για κακοήθεια. Η μελαγχρωματική ξηροδερμία (xeroderma pigmentosum), το σύνδρομο Μπλουμ (Bloom's syndrome) και η αναιμία Fanconi αποτελούν παραδείγματα αυτοάνοσων και σχετιζόμενων με τον καρκίνο ασθενειών που συνδέονται με τα παραπάνω φαινόμενα [11].

Μπορούμε να δούμε τώρα πιο συγκεκριμένα τι συμβαίνει σε σχέση με το μηχανισμό BER σε περίπτωση ελλιπούς λειτουργίας και με ποιόν τρόπο αυτή μπορεί να προκύψει. Είναι βέβαιο πως η σωστή λειτουργία κάθε ενός ενζύμου BER είναι απαραίτητη, μεταλλάξεις στα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τη παραγωγή των παραπάνω ενζύμων οδηγούν σε

ανεπαρκή λειτουργία ή αδρανοποίησή τους με σοβαρές συνέπειες για το κύτταρο και τον οργανισμό εν γένει. Για παράδειγμα η μετάλλαξη του γονιδίου OGG1, που οδηγεί στη απενεργοποίηση της αντίστοιχης γλυκοσυλάσης συνδέεται με καρκινογενέσεις στους πνεύμονες, τα νεφρά, στο γαστρικό και στον οισοφάγο [32]. Ομοίως, μεταλλάξεις στο γονίδιο MUTYH που παράγει την αντίστοιχη γλυκοσυλάση σχετίζεται με ένα συγκεκριμένο τύπο καρκίνου του παχέος εντέρου [34].

Με τον ίδιο τρόπο και πολυμορφισμοί του γονιδίου της APE1 συνδέονται με διάφορες μορφές εμφάνισης καρκίνου και προδιάθεση καρκινογένεσης. Ακόμη η παρουσία της APE1 είναι απαραίτητη για την επιβίωση του κυττάρου καθώς το 95% τις δραστηριότητας των ενδονουκλεασών οφείλονται σε αυτή [35]. Εν αντιθέσει με τις DNA πολυμεράσες, λιγάσες και γλυκοσυλάσες, οι οποίες μπορούν να αναπληρώσουν την ανεπαρκή λειτουργία κάποιου ενζύμου από τη συμπληρωματική δράση κάποιου άλλου του ίδιου είδους. Ακόμη, σε ποντίκια που παράγουν κατά 50% λιγότερη πολυμεράση β έχει βρεθεί πως προκύπτουν θραύσεις του κλώνου του DNA και χρωμοσωμικές εκτροπές. Οι σημασία των ενζύμων APE1 και της πολυμεράσης β επισημαίνεται και στη θεραπεία του καρκίνου όπου επάγεται η απενεργοποίηση τους οδηγώντας τα κακοήθη κύτταρα μέσω απόπτωσης σε θάνατο [32].

Προβληματική λειτουργία

Σε άλλες περιπτώσεις μπορεί ο επιδιορθωτικός μηχανισμός να μη λειτουργήσει σωστά και να μην διορθωθεί η βλάβη ή να προκύψουν νέες βλάβες. Παράδειγμα όπου ένας επιδιορθωτικός μηχανισμός μπορεί να συμβάλει στη γενετική αστάθεια αποτελεί η περίπτωση επιδιόρθωσης (μέσω του BER) της 8οξυ-γουανίνης στην αλληλουχία CAG/CTG του γονιδίου *Huntington* όπου η προβληματική αλληλουχία επεκτείνεται δημιουργώντας περισσότερες 8οξυ-γουανίνες η συσσώρευση των οποίων καθιστά δυσκολότερη την επιδιόρθωση από το την γλυκοσυλάση OGG1 [36]. Η επανάληψη της αλληλουχίας CAG στο γονίδιο αυτό πάνω από 40 φορές (η συσσώρευση αυτή ενισχύεται με τη πάροδο του χρόνου) θα οδηγήσει στην εμφάνιση της γνωστής νευροεκφυλιστικής

νόσου του Χάντινγκτον. Για όλους τους παραπάνω λόγω πολλές φορές τα λάθη δεν επιδιορθώνονται ή δημιουργούνται νέα όπως αβασικά σημεία και ρήξεις της αλυσίδας κατά την επιδιόρθωση των αλλοιωμένων βάσεων.

Το φαινόμενο της ελλιπούς επιδιόρθωσης των διαφόρων βλαβών DNA εμφανίζεται ιδιαίτερα συχνά στην περίπτωση των OCDL όπου λόγω της συσσώρευσης βλαβών ανά τμήματα καθυστερεί η επιδιόρθωση τους για αρκετή ώρα (μπορεί να παραμείνουν 24h – 72h μετά την ακτινοβολήση) καθιστώντας δυνατό το επικίνδυνο ενδεχόμενο να υπάρχουν ακόμα και κατά την είσοδο στη διαδικασία κυτταρικής διαίρεσης [14]. Ένας επιπλέον παράγοντας που συντελεί στην αδυναμία πλήρους επιδιόρθωσης αποτελεί το γεγονός πως σε αυτές τις περιπτώσεις απουσιάζει η πλήρης “εικόνα” της σωστής αλληλουχίας των βάσεων κάνοντας δύσκολη την ανίχνευση της κάθε βλάβης και την σωστή επιδιόρθωση αφού λείπει το κατάλληλο πλαίσιο αντιστοίχισης. Ως αποτέλεσμα των παραπάνω έχουμε τα αντίθετα από τα προβλεπόμενα αποτελέσματα, δηλαδή λανθασμένη ή ελλιπή επιδιόρθωση, μεταλλάξεις και χρωμοσωμικές θραύσεις.

2.3. Αποτελέσματα σε κυτταρικό επίπεδο

2.3.1. Γενωμική αστάθεια

Η έκθεση ενός οργανισμού στην ιοντίζουσα ακτινοβολία αποτελεί σημαντικό παράγοντα επαγωγής γενωμικής αστάθειας. Οι αλλοιώσεις του γονιδιώματος περιλαμβάνουν την αυξανόμενη τάση συσσώρευσης μεταλλάξεων οι οποίες οφείλονται σε αλλαγές στην αλληλουχία βάσεων του DNA ή σε διάφορες μορφές χρωμοσωμικών ανωμαλιών [9]. Μεγάλη βιολογική σημασία έχει η γενετική αστάθεια που παρουσιάζουν ακόμη τα κύτταρα που δεν έχουν ακτινοβληθεί αλλά είναι απόγονοι ακτινοβλημένων κυττάρων [37]. Τα φαινόμενα αυτά περνούν από τη μια γενιά στην άλλη, παρουσιάζονται νέες ανωμαλίες και εγκαθιδρύεται στο πληθυσμό των κυττάρων αυτών μια παρατεταμένη στρεσογόνος κατάσταση.

Γονιδιακές μεταλλάξεις

Η έκφραση ενός γονιδίου μετά την ακτινοβόληση του κυττάρου μπορεί να παρουσιαστεί προβληματική είτε για επιγενετικούς λόγους είτε λόγω γονιδιακής μετάλλαξης. Η γονιδιακή μετάλλαξη ορίζεται ως η μόνιμη αλλαγή της αλληλουχίας βάσεων ενός γονιδίου και προκαλείται από μη επιδιορθωμένες βλάβες του DNA είτε από λάθος κατά τη εξέλιξη διπλασιασμού του DNA [3]. Βλάβες που μπορούν να οδηγήσουν σε μετάλλαξη είναι οι SSB και οι DSB καθώς μπορεί να προκύψουν λάθη λόγω αντικατάστασης, ελλείμματος ή προσθήκης βάσεων. Αλλοιωμένες βάσεις επίσης οδηγούν σε μετάλλαξη, όπως για παράδειγμα η οξειδωμένη γουανίνη 8-Oxoguanine η οποία λόγω της δομής της δημιουργεί 2 δεσμούς υδρογόνου με την αδενίνη αντί της θυμίνης και στη συνέχεια κατά το διπλασιασμό του DNA αλλάζει την σειρά βάσεων του γονιδίου αντικαθιστώντας την γουανίνη με θυμίνη και την κυτοσίνη με αδενίνη [38]. Επιπλέον, τα αβασικά σημεία είναι γνωστό πως επάγουν μεταλλάξεις, ωστόσο σε μικρότερο βαθμό από τις από παραπάνω περιπτώσεις. Ακόμη σε ομαδοποιημένες βλάβες και πολύ περισσότερο όταν υπάρχουν αβασικά σημεία σε απέναντι θέσεις τότε η μετάλλαξη είναι πολύ πιθανή καθώς δεν υπάρχει το πρότυπο πλαίσιο αλληλουχίας βάσεων για να διορθωθεί το σημείο. Οι γονιδιακές μεταλλάξεις σε κάποιες μόνο περιπτώσεις μπορεί να προκαλέσουν αλλαγή στον φαινότυπο του οργανισμού. Αν μια μετάλλαξη συμβεί σε περιοχή του DNA η οποία ανήκει σε κάποιο γονίδιο τροποποιώντας στη συνέχεια και την παραγόμενη πρωτεΐνη ο πολυμορφισμός που θα προκύψει θα είναι κατά 70% επιβλαβής ενώ στις υπόλοιπες περιπτώσεις θα είναι ευεργετικός ή ουδέτερος για τον οργανισμό [39]. Οι μεταλλάξεις αυξάνονται με την αύξηση της δόση της ΙΑ, εμφανίζονται κυρίως μετά από αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα και γι αυτό το λόγο σχετίζονται πρωτίστως με τα στοχαστικά αποτελέσματα της ακτινοβολίας. Τέλος, η γονιδιακές μεταλλάξεις παρουσιάζουν τεράστια βιολογική σημασία καθώς συνδέονται με την βιολογική εξέλιξη, την σταθερότητα των λειτουργιών ενός οργανισμού και του ανοσοποιητικού του συστήματος και εμπλέκονται άμεσα στον κακοήγη μετασχηματισμό ενός κυττάρου.

Χρωμοσωμικές ανωμαλίες

Σε ανάλυση καρυότυπου, παρατηρούνται διάφορες χρωμοσωμικές αλλοιώσεις οποίες είναι εμφανείς μόνο στη φάση της μετάφασης και προκύπτουν από μη επιδιορθωμένες DSB βλάβες. Οι αλλοιώσεις αυτές προκύπτουν από διάφορους παράγοντες επιβλαβείς για το DNA συμπεριλαμβανομένης και της ιοντίζουσας ακτινοβολίας ακόμη και για την περιοχή των χαμηλών δόσεων (<1 Gy) [11]. Οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες αφορούν ανταλλαγές των θραυσμάτων του DNA μεταξύ διαφορετικών χρωμοσωμάτων, μεταξύ των χρωματίνων του ίδιου χρωμοσώματος ή ακόμα και μεταξύ περιοχών της ίδιας χρωματίδας (χρωματιδικές ανωμαλίες) [3]. Οι χρωμοσωμικές εκτροπές προκύπτουν όταν τα άκρα ενός θραύσματος ενώνονται με ένα άλλο δημιουργώντας δακτυλιοειδή, διακεντρικά, ακεντρικά και άλλα αναδιατεταγμένα χρωμοσώματα. Οι δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες που μπορεί να προκύψουν διακρίνονται σε ισοζυγισμένες και μη ισοζυγισμένες ανάλογα με τη ποσότητα γενετικό υλικού του κάθε χρωμοσώματος. Στις ισοζυγισμένες, τα χρωμοσώματα στο σύνολό τους περιέχουν τη σωστή ποσότητα γενετικού υλικού, με αποτέλεσμα να μην έχουν συνήθως επιπτώσεις στο φαινότυπο, αλλά να είναι επικίνδυνες όταν κληρονομηθούν. Στις ισοζυγισμένες αναδιατάξεις ανήκουν οι αναστροφές, οι μεταθέσεις, οι αμοιβαίες μεταθέσεις, οι μεταθέσεις κατά Robertson και οι ενθέσεις. Στις μη ισοζυγισμένες αναδιατάξεις, υπάρχει περισσότερο ή λιγότερο γενετικό υλικό από το φυσιολογικό, με αποτέλεσμα ο φαινότυπος να είναι σίγουρα παθολογικός. Στις μη ισοζυγισμένες αναδιατάξεις ανήκουν τα ελλείμματα ή ελλείψεις, οι διπλασιασμοί, τα χρωμοσώματα δείκτες, τα δακτυλιοειδή χρωμοσώματα, τα ισοχρωμοσώματα και τα δικεντρικά χρωμοσώματα [3,11].

Ορισμένες αναδιατάξεις είναι σταθερές και μπορούν να μεταβιβάζονται αναλλοίωτες στις επόμενες γενιές κατά τη μείωση και τη μίτωση, ενώ άλλες είναι ασταθείς. Το μέγεθος της βλάβης στα χρωμοσώματα εξαρτάται περισσότερο από τη διάρκεια της έκθεσης παρά από τη συνολική δόση ΙΑ. Έχει παρατηρηθεί γενικά πως η αύξηση του ρυθμού της δόσης αυξάνει τον αριθμό των χρωμοσωμικών θραύσεων [9].

2.3.2. Κυτταρικός θάνατος

Κάποιο κύτταρο θεωρείται βιολογικά νεκρό όταν έχει χάσει την πλήρη αναπαραγωγική του ικανότητα. Υπάρχουν διάφορα είδη κυτταρικού θανάτου τα οποία είναι η απόπτωση, νέκρωση και μιτωτική καταστροφή. Η απόπτωση είναι μια διαδικασία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, πραγματοποιείται από συγκεκριμένα είδη κυττάρων (γενετικά, ενδοθηλιακά, ολιγοδεντροκύτταρα και άλλα) και παίζει σημαντικό ρόλο στην εμβρυακή εξέλιξη και στην ελεγχόμενη αποβολή προβληματικών κυττάρων ενός οργανισμού. Η διαδικασία της απόπτωσης ενεργοποιείται και ρυθμίζεται μέσω αποπτωτικών σημάτων συγκεκριμένων πρωτεϊνών. Κατά την εξέλιξη της διαδικασίας η μορφολογία του κυττάρου συρρικνώνεται, παρουσιάζεται συρρίκνωση της χρωματίνης και του πυρήνα συνολικά, η μιτοχονδριακή μεμβράνη διαρρηγνύεται και το κύτταρο αποδομείται και σχηματίζονται αποπτωτικά σώματα, τα οποία φαγοκυτταρώνονται, χωρίς τη δημιουργία φλεγμονής. Πραγματοποιείται ακριβώς μετά από ανεπιτυχή κυτταρική διαίρεση λόγω ακτινοβόλησης κυρίως από χαμηλές δόσεις και όταν συμβαίνει σε φυσιολογικό βαθμό έχει θετικές επιπτώσεις στον οργανισμό με την αποφυγή μεταλλάξεων και καρκινογένεσης [3,5,11,40].

Από την άλλη, η νέκρωση αποτελεί μια μη ελεγχόμενη διαδικασία πρόωρου κυτταρικού θανάτου. Τα κύτταρα τα οποία πεθαίνουν λόγω νέκρωσης δεν ακολουθούν το σηματοδοτικό μονοπάτι της απόπτωσης αλλά υπάρχει εμπλοκή συγκεκριμένων υποδοχέων που ενεργοποιούνται από την απώλεια της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης και ακολουθεί ανεξέλεγκτη απελευθέρωση των προϊόντων του κυτταρικού θανάτου στον ενδοκυττάριο χώρο. Κατά τη διαδικασία αυτή υπάρχει ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης, διακοπή του μεταβολισμού και ακολουθεί φλεγμονώδης αντίδραση [11,41]. Η νέκρωση είναι μια διαδικασία που συντελείται ως επί το πλείστον σε ακτινοβόληση υψηλών δόσεων ΙΑ προκαλώντας γενικευμένες βλάβες με επιβλαβείς συνέπειες για τους ιστούς και τον οργανισμό συνολικά σε πολλές περιπτώσεις μέσω συστημικών ανοσολογικών αποκρίσεων.

Ο αναπαραγωγικός κυτταρικός θάνατος είναι αποτέλεσμα της μιτωτικής καταστροφής που πραγματοποιείται μετά από λίγες κυτταρικές διαιρέσεις σε περίπτωση ύπαρξης

βλάβης που δεν επιδιορθώνεται. Συντελείται μέσω καθυστερημένης νέκρωσης ή απόπτωσης και η πιθανότητα να συμβεί αυξάνεται σε μεγαλύτερες δόσεις.

Μια ιδιότυπη περίπτωση τερματισμού της αντιγραφικής διαδικασίας αποτελεί η κυτταρική γήρανση (cellular senescence) η οποία ωστόσο δε συνοδεύεται από θάνατο του κυττάρου. Ο παραπάνω φαινότυπος συνδέεται με τη γήρανση του οργανισμού, κυρίως στα θηλαστικά, και παρουσιάζεται ως εναλλακτική οδός από την απόπτωση για την προστασία του κυττάρου από πιθανό κακοήγη μετασχηματισμό. Τα γηρασμένα κύτταρα είναι οιδηματώδη, έχουν ελλιπή επικοινωνία μεταξύ τους, αυξημένη πολυπλοειδία, περιορισμένη ικανότητα έκφρασης κάποιων πρωτεϊνών και μικρότερα τελομερή [11].

2.4. Συστημικά αποτελέσματα και το κλασικό παράδειγμα

2.4.1. Γενικά στοιχεία

Η επίδραση της ΙΑ στα ακτινοβολημένα κύτταρα σε πολλές περιπτώσεις συνοδεύεται από διάφορες επιπτώσεις στους ιστούς, στα όργανα και στον οργανισμό συνολικά που εξαρτώνται από ένα πλήθος παραγόντων. Ορισμένοι από τους σημαντικότερους είναι το είδος της βλάβης στο DNA, το μέγεθος και ο ρυθμός δόσης της ΙΑ, το είδος των κυττάρων, τα επίπεδα οξυγόνου και αντιοξειδωτικών όπως επίσης η ηλικία και ο τρόπος ζωής του οργανισμού μαζί με πολλούς ακόμη περιβαλλοντικούς παράγοντες. Ο συνδυασμός των παραπάνω στοιχείων ορίζουν ένα παθολογικό υπόβαθρο και ένα πλαίσιο, περισσότερο ή λιγότερο αυστηρά καθορισμένο, ενδεχόμενων αποτελεσμάτων. Για παράδειγμα, τροποποίηση της αλληλουχίας του DNA σε γονιδιακή περιοχή οδηγεί σε προβληματική λειτουργία του οργάνου και σε κακοήγη μετασχηματισμό. Από την άλλη, αν η βλάβη επέλθει σε γαμετοκύτταρα οι επιπτώσεις είναι κληρονομήσιμες καθώς το γενετικό υλικό μεταβιβάζεται στους απογόνους [9]. Ακόμη, αν η επίδραση της ΙΑ οδηγήσει σε νέκρωση ένα μεγάλο αριθμό ακτινοβολημένων κυττάρων, αυτά δεν μπορούν να αναπληρωθούν και η λειτουργία του ιστού καθίσταται αδύνατη ή ανεπαρκής [42].

Καθώς εμπλέκονται πολλοί παράγοντες που επηρεάζουν την έκβαση της επίδρασης της ακτινοβολίας τα τελικά αποτελέσματα υπόκεινται σε στατιστικούς νόμους. Υπάρχει μια γενική κατηγοριοποίηση των αρνητικών αποτελεσμάτων της ΙΑ, σύμφωνα με την οποία διακρίνονται σε καθορισμένα και στοχαστικά αποτελέσματα.

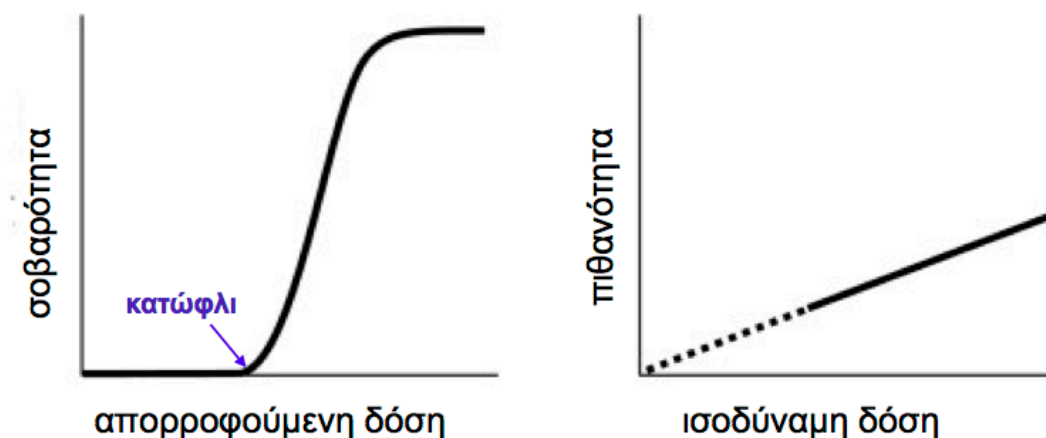
2.4.2. Καθορισμένα και στοχαστικά αποτελέσματα

Καθορισμένα αποτελέσματα (deterministic effects): Τα αποτελέσματα αυτά πλέον αναφέρονται ως αντιδράσεις των ιστών (tissue-reaction) και εμφανίζονται σε συγκεκριμένο και σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα μετά την ακτινοβολήση (με μεγάλες δόσεις). Οφείλονται στη θανάτωση ή την σοβαρή δυσλειτουργία των κυττάρων και συμβαίνουν μετά την υπέρβαση μιας συγκεκριμένης τιμής δόσης που ονομάζεται κατώφλι. Μόνο όταν η δόση υπερβεί το κατώφλι θα εμφανιστεί βλάβη (με πιθανότητα 100%) η σοβαρότητας της οποίας μεγαλώνει με την αύξηση της δόσης. Αν η δόση που έλαβε ένας ιστός ή όργανο είναι μικρότερη από τη δόση κατωφλίου η πιθανότητα εμφάνισης ενός άμεσου αποτελέσματος είναι μηδενική. Γενικά, το κατώφλι δόσης αλλάζει από ιστό σε ιστό (0.5 Gy το χαμηλότερο και 0.1 Gy στα έμβρυα) και ο ακριβής ορισμός του εξαρτάται από διάφορους παράγοντες αξιολόγησης (όπως ο χρόνος εμφάνισης) [12,43].

Στοχαστικά αποτελέσματα (stochastic effects): Τα στοχαστικά αποτελέσματα δεν παρουσιάζουν κατώφλι εμφάνισης και η πιθανότητα εμφάνισής τους ξεκινά από πολύ χαμηλές δόσεις. Οφείλονται σε μεταλλάξεις, που συνήθως συσσωρεύονται σε μεγάλο βαθμό στα κύτταρα, και οι βλάβες που προκαλούν γίνονται ορατές μετά από αρκετά χρόνια (εξαιρέση αποτελεί η εμφάνιση λευχαιμίας) στο οργανισμό ή στους απογόνους του. Η αύξηση της δόσης αυξάνει γραμμικά την πιθανότητα εμφάνισης κάποιας βλάβης, σύμφωνα με το γραμμικό χωρίς κατώφλι πρότυπο (Linear No-Threshold model - LNT), ενώ η σοβαρότητά της είναι ανεξάρτητη της δόσης [12]. Ο καρκίνος ο οποίος είναι το σημαντικότερο στοχαστικό αποτέλεσμα μπορεί να επέλθει λόγω πολυάριθμων εκθέσεων

σε ΙΑ. Η εκτίμηση κινδύνου εμφάνισης του οπότε οφείλει να εξετάζει τα δεδομένα συσσωρευτικά και σε βάθος χρόνου.

α) Καθορισμένα αποτελέσματα β) Στοχαστικά αποτελέσματα



Διάγραμμα 2.2: Διαγράμματα για τα καθορισμένα και στοχαστικά αποτελέσματα της ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Στο (α) διάγραμμα παρουσιάζεται η σοβαρότητα των καθορισμένων αποτελεσμάτων σε σχέση με την δόση και το κατώφλι εμφάνισης. Στο (β) διάγραμμα φαίνεται η πιθανότητα εμφάνισης των στοχαστικών αποτελεσμάτων συναρτήσει της δόσης όπου η διακεκομμένη γραμμή σημαίνει πως στο τμήμα αυτό οι επιπτώσεις δεν είναι απόλυτα μετρήσιμες.

Το κλασικό παράδειγμα

Οι παραπάνω θεωρήσεις ως προς την εμφάνιση και τη σοβαρότητα ενός αποτελέσματος σε σχέση με την δόση ακτινοβολίας μαζί με τη θεωρία στόχου συγκροτούν το κλασικό παράδειγμα που προβλέπει τον τρόπο εμφάνισης των αποτελεσμάτων της ΙΑ και την εκτίμηση κινδύνου. Η θεωρία στόχου προβλέπει πως για να προκύψει κάποιο βιολογικό αποτέλεσμα πρέπει κάποιο συγκεκριμένο σημείο του κυττάρου να έχει ακτινοβοληθεί. Συνεπώς, θάνατος ή κάποιο άλλο αποτέλεσμα δεν μπορεί να επέλθει σε κύτταρα εκτός της άμεσα ακτινοβολημένης περιοχής [38]. Κύριος στόχος για να επέλθει κάποια επίπτωση στο κύτταρο θεωρείται το πυρηνικό DNA. Βλάβη στο DNA μπορεί να συμβεί αμέσως μετά την ακτινοβολήση των κυττάρων και τα ενδεχόμενα βιολογικά αποτελέσματα εμφανίζονται μέσα σε μία ή δύο γενιές. Συνεπώς, όλες οι γενετικές αλλαγές θα μεταβιβαστούν καθολικά και με τον ίδιο τρόπο σε όλα τα κύτταρα απογόνους

[9,38]. Τα παραπάνω στοιχεία λοιπόν αποτελούν το κυρίαρχο πρότυπο εκτίμησης της εμφάνισης των βιολογικών αποτελεσμάτων της ΙΑ και έχουν επιβεβαιωθεί από πολλά επιδημιολογικά και κλινικά δεδομένα στο παρελθόν. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια συσσωρεύονται αρκετά στοιχεία που αμφισβητούν σημαντικές πτυχές αυτής της θεώρησης.

2.5. Μη στοχευμένες επιδράσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας

2.5.1. Γενικά στοιχεία και ορισμοί

Μια σειρά από αποτελέσματα ερευνών, κυρίως από τις αρχές της δεκαετίας του 90, ήρθαν να κλονίσουν τις κυρίαρχες αντιλήψεις της ακτινοβιολογίας και ειδικά τη θεωρία στόχου για την ακριβή εκτίμηση των επιπτώσεων της ΙΑ. Πολλές νέες προσεγγίσεις αναπτύχθηκαν έκτοτε ώστε να συμβαδίσει η θεωρεία στόχου με τα ανακύπτοντα δεδομένα [44], χωρίς να είναι αρκετά επιτυχημένες εν τέλει. Ακόμη, πολλά κλινικά δεδομένα δείχνουν πως καθορισμένα αποτελέσματα που θα έπρεπε να παρουσιάζονται σε υψηλές δόσεις ακτινοβολίας, μπορεί να εμφανιστούν ακόμη και σε πολύ χαμηλότερες. Με αυτό τον τρόπο παραβιάζεται η σχέση απορροφούμενης δόσης και βαρύτητας της επίπτωσης ενώ άλλα στοιχεία οδηγούν σε συνεχείς αναθεωρήσεις του κατωφλιού δόσης προς χαμηλότερες τιμές. Η αύξηση της δόσης ακτινοβολίας φαίνεται υπό συγκεκριμένες συνθήκες να μη συνοδεύεται από σημαντικές αλλαγές στην απόκριση των μη ακτινοβολημένων κυττάρων τα οποία υφίστανται αξιοσημείωτες επιδράσεις, ενώ αναντίστοιχα αποτελέσματα παρουσιάζονται επιπλέον σε χαμηλές δόσεις (<1 Gy) και πολύ χαμηλές δόσεις (<0.1 Gy) αποκλίνοντας από το μοντέλο LNT [38].

Αρκετές έρευνες, πλέον, υποδεικνύουν πως τα βιολογικά αποτελέσματα της ακτινοβόλησης δεν περιορίζονται μόνο στις βλάβες του πυρηνικό DNA των ακτινοβολημένων κυττάρων αλλά προκύπτει ακόμη πλήθος αλλοιώσεων στο γενετικό υλικό άλλων κυττάρων. Όπως επίσης σημαντικό ρόλο παίζουν επιγενετικές τροποποιήσεις και βλάβες άλλων βιομορίων τόσο εντός όσο και εκτός της ακτινοβολημένης περιοχής.

Ένα μεγάλο σύνολο ερευνών τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* έχει δείξει ξεκάθαρα πως κύτταρα στα οποία δεν έχει άμεσα αποθηκευτεί ενέργεια παρουσιάζουν σημαντικά βιολογικά αποτελέσματα όπως γονιδιωματική αστάθεια, ανταλλαγές αδελφών χρωματίδων, καρκινογένεση, μεγέθυνση μικροπυρήνων, πρόωρη χρωμοσωμική συμπύκνωση, κυτταρικός θάνατος, επιγενετικές αλλαγές και διάφορες βλάβες στο DNA (μεμονωμένες ή σύνθετες οξειδωτικές βλάβες και DSB ή SSB). Εκτός των παραπάνω παρατηρούνται συνέπειες που οφείλονται κυρίως στην ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος και δεν είναι απαραίτητα επιβλαβείς για το κύτταρο όπως η έκκριση ανασταλτικών αυξητικών παραγόντων, η μεγαλύτερη κυτταρική διαφοροποίηση, η ενισχυμένη ακτινοπροστασία και ο περιορισμός καρκινικών όγκων. Όλες αυτές οι επιδράσεις φαίνεται να αντιστοιχούν σε εκείνες των ακτινοβολημένων κυττάρων καταδεικνύοντας την ύπαρξη επικοινωνίας και αποστολής σημάτων από τα κύτταρα αυτά στα μη ακτινοβολημένα. Οι διαφορετικές εκφράσεις ωστόσο που παρουσιάζονται στα μη άμεσα ακτινοβολημένα περιπλέκουν τον προσδιορισμό της φύσης και του τρόπου επαγωγής τους [45,46,47,48].

Οι **μη στοχευμένες επιδράσεις (ΜΣΕ)** μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε **παρακείμενα αποτελέσματα μέχρι ~5 mm (bystander effects)**, **απόκριση απομακρυσμένων ιστών (abscopal effects)** και **προσαρμοσμένη απόκριση στην ΙΑ (adaptive response)** [47,49]. Η κατηγοριοποίηση αυτή που θα υιοθετήσουμε στο πλαίσιο αυτής της εργασίας προκύπτει κυρίως από μια φαινομενολογική προσέγγιση ως προς τις συνέπειες και τη διασπορά των αποτελεσμάτων αυτών και λιγότερο από τους μηχανισμούς που τα προκαλούν καθώς αυτοί μπορεί να διαφέρουν σε κάποιες περιπτώσεις και σε άλλες να αλληλοεπικαλύπτονται. Υπάρχουν αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία στις οποίες η γονιδιακή αστάθεια θεωρείται διακριτή κατηγορία των ΜΣΕ, επεκτείνοντας την έννοια των μη στοχευμένων αποτελεσμάτων λαμβάνοντας υπόψη τη διάσταση του χρόνου καθώς και κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που αυτή παρουσιάζει (όπως η ετερογενής μη κλωνική εμφάνιση διαφόρων αποτελεσμάτων, γεγονός που δεν προβλέπεται από τη θεωρία στόχου) [38,50].

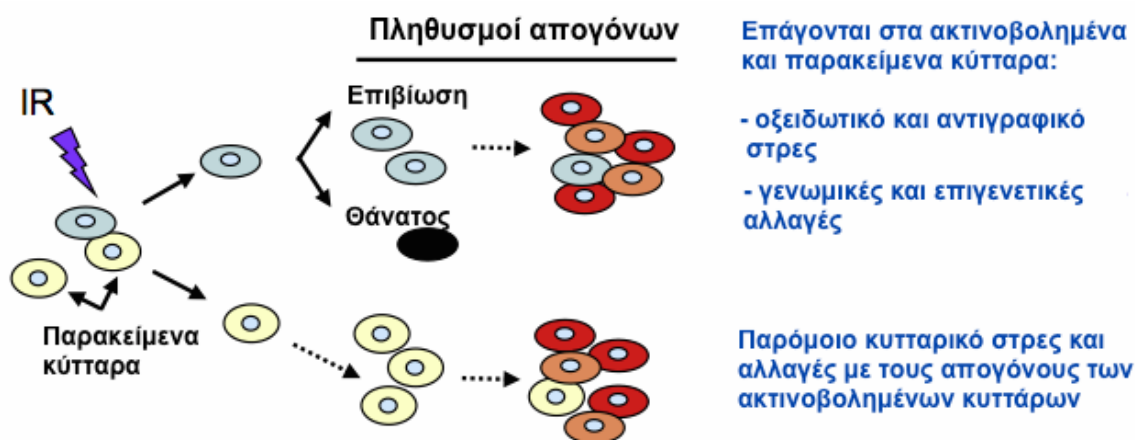
Τα τελευταία χρόνια υπάρχουν έρευνες που υποδεικνύουν πως παρόμοια μη στοχευμένα

αποτελέσματα παρουσιάζονται και λόγω άλλων παραγόντων κυρίως όπως η ύπαρξη όγκου σε παρακείμενη [51] ή απομακρυσμένη περιοχή [52]. Οι παράγοντες που επάγουν και επηρεάζουν αυτά τα αποτελέσματα, οι μηχανισμοί μετάδοσης και οι συνολικές συνέπειες στον οργανισμό αποτελούν ζητήματα που διερευνώνται εντατικά το τελευταίο διάστημα με τα συμπεράσματα συχνά να συγκλίνουν και άλλες φορές να διαφέρουν λόγω της πολυπλοκότητας του φαινομένου και των εφαρμοζόμενων πειραματικών μεθόδων. Ο κύριος παράγοντας που χρησιμοποιείται ευρέως ως ο πιο κατάλληλος σε σχέση με άλλες χημικές ουσίες για τη διερεύνηση των επιπτώσεων σε παρακείμενα ή απομακρυσμένα κύτταρα είναι η ΙΑ. Απ' ότι φαίνεται από διάφορα πειράματα, τα ΜΣΑ παρουσιάζονται σχεδόν σε όλα τα είδη των κυττάρων (με κάποιες διαφοροποιήσεις), σωματικά και αναπαραγωγικά. Τα περισσότερα σχετικά δεδομένα προήλθαν αρχικά από πειράματα *in vitro* σε κυτταρικές καλλιέργειες, ωστόσο τελευταία δίνεται βάρος στις *in vivo* συνθήκες όπου τα συμπεράσματα είναι ζωτικής σημασίας και οι παράγοντες που επηρεάζουν τα αποτελέσματα είναι προφανώς περισσότεροι εφόσον εμπλέκονται παράμετροι όπως το μικροπεριβάλλον, αποκρίσεις του ανοσοποιητικού συστήματος και άλλοι μηχανισμοί συστημικής σηματοδότησης [50,53].

Επιπτώσεις σε παρακείμενα κύτταρα

Τα αποτελέσματα σε παρακείμενα κύτταρα (*bystander effects*) λόγω ακτινοβόλησης ορίζονται ως οι συνέπειες που επάγονται σε κύτταρα που βρίσκονται γειτονικά ή σε επαφή με εκείνα της ακτινοβολημένης περιοχής. Πολλά πειράματα, κυρίως *in vitro*, έχουν πραγματοποιηθεί υπό διάφορες συνθήκες (διαφορετικά είδη ακτινοβολίας, ενέργειες, δόσεις, ώρες έκθεσης, κυτταρικά είδη κ.α.) και χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές παρέχοντας σημαντικές γνώσεις [46]. Η πειραματική τεκμηρίωση του φαινομένου αυτού ήρθε πρώτη φορά με το πείραμα των Nagasawa και Little κατά το οποίο σε μια κυτταρική καλλιέργεια όπου ακτινοβολήθηκε το 1% των κυττάρων με σωματίδια α , το 30% του κυτταρικού πληθυσμού παρουσίασε αυξημένο αριθμό ανταλλαγών αδερφών χρωματίδων [54]. Σε άλλα πειράματα έκτοτε χρησιμοποιήθηκε η μεταφορά του μέσου καλλιέργειας από τα ακτινοβολημένα στα μη ακτινοβολημένα κύτταρα αποδεικνύοντας την ύπαρξη

παραγόντων που εκλύονται στο μέσο και προκαλούν αντιδράσεις στα μη ακτινοβολημένα κύτταρα. Άλλη ένδειξη επικοινωνίας και επαγωγής γονιδιωματικής αστάθειας μεταξύ εφαπτόμενων κυττάρων φαίνεται να υπάρχει μέσω των χασμοσυνδέσεων (gap junctions) της κυτταρική μεμβράνης όπου φαίνεται να εμπλέκεται το σηματοδοτικό μονοπάτι της σφιγκομυελίνης [55]. Πειράματα ακόμη με μικροδέσμες ιοντίζουσας ακτινοβολίας φάνηκαν ιδιαίτερα χρήσιμα για την υποστήριξη της υπόθεσης ύπαρξης επιπτώσεων σε παρακείμενα κύτταρα [56]. Η ικανότητα στόχευσης μεγάλης ακρίβειας εκμηδένισε τις πιθανότητες για τυχόν διασπορά της ακτινοβολίας και αύξησε τις τεχνικές δυνατότητες για την εκτέλεση σχετικών πειραμάτων. Με τη βοήθεια, τέλος, υπολογιστικών μοντέλων για την 3D αναπαράσταση συστημάτων ανθρώπινου ιστού υπάρχουν πλέον αρκετές αξιόπιστες μέθοδοι για την διερεύνηση των παρακείμενων αποτελεσμάτων.



Εικόνα 2.7: Τα αποτελέσματα της ΙΑ στους πληθυσμούς των ακτινοβολημένων και παρακείμενων κυττάρων [5].

Προσαρμοσμένη απόκριση στην ΙΑ

Η προσαρμοσμένη απόκριση είναι το φαινόμενο που έχει παρατηρηθεί σε διάφορους οργανισμούς όπου μετά από έκθεση σε χαμηλή δόση ακτινοβολίας και ακόλουθη ακτινοβολία στην συνέχεια με μεγαλύτερη δόση παρουσιάζονται μειωμένες επιπτώσεις σε σχέση με τις προβλεπόμενες. Η αρχική έκθεση μπορεί να προκύψει με απευθείας ακτινοβολία των κυττάρων είτε μέσω έκθεσης μη ακτινοβολημένων κυττάρων σε μέσο

καλλιέργειας όπου υπάρχουν παράγοντες που επάγουν αντιδράσεις παρακείμενων κυττάρων. Για την εμφάνιση των παραπάνω αποτελεσμάτων η αρχική δόση δεν πρέπει να ξεπερνά τα 0.5 Gy και τα αποτελέσματα της δε διαρκούν συνήθως πάνω από 24 ώρες, κάτι που έχει ως συνέπεια να μη σχετίζονται με την εκτίμηση κινδύνου πολύ χαμηλών δόσεων [38,47]. Τα αποτελέσματα που επάγονται αρχικά μπορεί να είναι αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων, αυξημένη απόκριση στις βλάβες του DNA, επίδραση στο ρυθμό των μεταλλάξεων και του κυτταρικού θανάτου. Έρευνα έχει δείξει πως είναι πιθανό να σχετίζεται η προσαρμογή απόκρισης με τις ΜΣΕ μέσω του νιτρικού οξειδίου (NO) το οποίο παίζει ρόλο στην σηματοδότηση ενεργοποίησης μέσω φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης p53 [57]. Παρόλα αυτά δεν μπορούμε να είμαστε απόλυτα σίγουροι για την ύπαρξη και τον τρόπο εμφάνισης της προσαρμογής απόκρισης στην ΙΑ καθώς σε ορισμένα πειράματα παρουσιάζονται αντίθετα αποτελέσματα (ακτινοευαισθησία σε χαμηλές δόσεις) [58] ή μηδενικές συνέπειες [38]. Επιπλέον, δεν υπάρχουν πολλά πειράματα που να συσχετίζουν την προσαρμοσμένη απόκριση με τις ΜΣΕ και υπάρχει η αντίληψη πως δεν επαρκούν τα έως τώρα στοιχεία για να θεωρηθεί, σε σχέση με άλλες, διακριτή περίπτωση ΜΣΕ (όπως βλάβες στο DNA, καρκινογένεση, χρωμοσωμικές αλλοιώσεις, απόπτωση κ.α.). Κλείνοντας, αποτελεί βασικό πρόβλημα της ακτινοβιολογίας και είναι δύσκολο να εκτιμηθεί η ακριβής επίδραση της ΙΑ ειδικά σε τόσο χαμηλές δόσεις [38], παρά το γεγονός της αυξημένης πλέον γνώσης για τις ΜΣΕ και της γονιδιωματικής αστάθειας που επάγεται, και ως εκ τούτου δεν μπορούμε ακόμα με ασφάλεια και αυστηρότητα να ενσωματώσουμε στα μοντέλα εκτίμησης του βιολογικού κινδύνου την προσαρμογή της απόκρισης.

Απόκριση απομακρυσμένου ιστού

Ως απόκριση απομακρυσμένου ιστού (AAI) θεωρούνται οι διάφορες αποκρίσεις στην ιοντίζουσα ακτινοβολία διαφορετικών ή όμοιων ιστών σε απομακρυσμένες θέσεις από την περιοχή της άμεσης ακτινοβόλησης. Ο όρος προέρχεται από τον αγγλικό όρο *abscopal effect* που έχει ρίζα ετυμολογικά το λατινικό *ab* που σημαίνει «μακριά από» και την λέξη *scopus* (σκοπός) που έχει προέλευση από τα αρχαία ελληνικά και σημαίνει στόχος. Η

εισαγωγή του όρου προήλθε από τον Mole (1953) ως περιγραφή του γεγονότος της ακτινοθεραπείας όπου παρουσιάστηκε περιορισμός καρκινικών όγκων σε σημεία μακριά από την περιοχή στόχευσης [59]. Τα επόμενα χρόνια παρατηρήθηκαν και άλλα αποτελέσματα σε απομακρυσμένους φυσιολογικούς ιστούς όπως γονιδιωματική αστάθεια, κυτταρικός θάνατος, βλάβες στο DNA και κακοήθης μετασχηματισμός. Η AAI θεωρείται από αρκετούς ως μέρος των παρακείμενων αποτελεσμάτων και υφίσταται ως διακριτή ΜΣΕ. Σε άλλες προσεγγίσεις εντάσσεται αποκλειστικά στο πλαίσιο της ακτινοθεραπείας και υποστηρίζεται παράλληλα πως η δόση της ακτινοβολίας είναι τόσο μεγάλη που δεν απορροφάται όλη στη στοχευμένη περιοχή. Καθώς παρουσιάζονται διάφορα φαινόμενα εξωτερικής και εσωτερικής διασποράς τέτοια φαινόμενα θεωρείται πως οφείλονται σε χαμηλή έκθεση στην ακτινοβολία ολόκληρου του σώματος [53]. Ωστόσο πειράματα με μικροδέσμες όπου η διασπορά είναι από πολύ μικρή έως μηδαμινή και δυσανάλογη σε κάθε περίπτωση των αποτελεσμάτων, όπως και άλλες ενδείξεις ως προς την εκδήλωση των αποτελεσμάτων και τους μηχανισμούς μετάδοσής τους φαίνεται να αντικρούουν την παραπάνω υπόθεση. Πρέπει εντούτοις να σημειώσουμε εδώ πως η διάκριση μεταξύ των "κοντινών" και "μακρινών" αποτελεσμάτων δεν είναι απόλυτα ξεκάθαρη καθώς και οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην επαγωγή τους δεν έχουν αποκρυσταλλωθεί ακόμα πλήρως. Συνοψίζοντας, η AAI θεωρούμε πως ορίζεται ως ένα μακρινό "εκτός πεδίου στόχευσης" αποτέλεσμα, αναφέρεται σε *in vivo* συνθήκες και μπορεί να έχει είτε θετικές είτε αρνητικές συνέπειες στους ιστούς όπου εμφανίζεται. Εκτός από την ΙΑ όμως και άλλοι στρεσογόνοι παράγοντες και ιδιαίτερα η ύπαρξη καρκινικών κυττάρων φαίνεται να επάγουν επίσης αντιδράσεις σε απομακρυσμένα σημεία. Ένας μεγάλος αριθμός κλινικών δεδομένων και διάφορων εργαστηριακών πειραμάτων αποδεικνύουν την ύπαρξη, το εύρος, την ποσότητα και την ποιότητα των παραπάνω απομακρυσμένων αποτελεσμάτων. Από την άλλη, σχετικά πρόσφατα γίνεται προσπάθεια να αποκρυπτογραφηθεί ο ακριβής τρόπος και οι παράγοντες που διαμεσολαβούν την επαγωγή τους. Τα έως τώρα ευρήματα υποδεικνύουν τη συμβολή και σημαντική παρουσία οξειδωτικού και αντιγραφικού στρες συνοδευόμενο από τοπικές και συστηματικές φλεγμονώδεις αποκρίσεις, όπως θα δούμε και στη συνέχεια αναλυτικά.

2.5.2. Κλινικά και πειραματικά δεδομένα

2.5.2.1. Γενικά στοιχεία

Τα τελευταία 50 χρόνια αρκετά δεδομένα υπάρχουν για τις συστημικές επιπτώσεις της ΙΑ τόσο σε ανθρώπους όσο και σε ζώα, ψάρια, φυτά [46]. Τα in vivo δεδομένα για τις αποκρίσεις μη ακτινοβολημένων περιοχών σε ανθρώπους είναι λίγα και προέρχονται σχεδόν αποκλειστικά από την ακτινοθεραπεία. Ωστόσο υπάρχουν αρκετές ενδιαφέρουσες ενδείξεις για ένα πλήθος ιστών, ανθρώπων και ζώων, με διαφορετικά ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά για το κάθε είδος. Εκτός από την τις καρκινογένεσεις για τις οποίες έχουμε αρκετές πληροφορίες για την εμφάνισή τους, υπάρχουν πλέον στοιχεία και για τη σχέση της ΙΑ με άλλες παθήσεις και επιπτώσεις στον οργανισμό, μη σχετιζόμενες με τον καρκίνο (τουλάχιστον άμεσα).

Η εκτίμηση των αποτελεσμάτων της ΙΑ όπως προβλέπονται από το κλασικό παράδειγμα, τη δόση ακτινοβολίας και το νόμο Bergonie – Tribondeau (που προβλέπει πως η ακτινοευαισθησία ενός κυτταρικού τύπου είναι ανάλογη του μιτωτικού ρυθμού και αντιστρόφως ανάλογη του βαθμού εξειδίκευσης) τις περισσότερες φορές φαίνεται να είναι αρκετά συνεπής. Όμως, διάφορες περιπτώσεις καρκινογένεσεων, τοπικών και συστημικών ανοσολογικών αποκρίσεων, παρατεταμένης γονιδιωματικής αστάθειας αλλά και επιπτώσεις στο καρδιαγγειακό και Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) έχει φανεί πως παραβιάζουν διάφορα σημεία των παραπάνω προτύπων πρόβλεψης των αποτελεσμάτων της ΙΑ. Με αυτό τον τρόπο τα στοιχεία αυτά συνοδευόμενα από ένα πλήθος ΜΣΕ οδηγούν σε επανεκτίμηση του κινδύνου της ΙΑ τόσο ως παράγοντας καρκινογένεσης όσο και άλλων διαταραχών. Στην συνέχεια, θα εξετάσουμε τις συστημικές επιδράσεις της ΙΑ δίνοντας βάρος στη συμβολή των ΜΣΕ για την επαγωγή συστημικών βιολογικών αποτελεσμάτων λόγω της παρουσίας στρεσογόνων κυτταροτοξικών καταστάσεων οι οποίες διαταράσσουν την ισορροπία του οργανισμού.

Κύρια καθορισμένα αποτελέσματα

Υπάρχουν ασφαλώς πολλά δεδομένα που επιβεβαιώνουν τις κλασικές θεωρήσεις και

είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα άμεσα/καθορισμένα αποτελέσματα τις ακτινοβολίας, σε αντίθεση με τα στοχαστικά όπου η εκτίμηση είναι περισσότερο περίπλοκη και αποκλίνει ορισμένες φορές από το πλαίσιο του κλασικού παραδείγματος. Για παράδειγμα, τα περισσότερα στοιχεία δείχνουν πως τα καθορισμένα αποτελέσματα στο ΚΝΣ απαιτούν για τη πρόκλησή τους πολύ μεγάλες δόσεις ακτινοβολίας, δεδομένου ότι τα κύτταρα του ΚΝΣ είναι ιδιαίτερα ακτινοανθεκτικά. Οι δόσεις αυτές είναι ασύμβατες με την πιθανότητα επιβίωσης του ατόμου (δόση κατωφλίου 50 Gy), το οποίο εμφανίζει αστάθεια, διαταραχές προσανατολισμού, σπασμούς, κώμα και πεθαίνει σε διάστημα ωρών ή μίας – δύο ημερών (**Σύνδρομο ΚΝΣ**). Από την άλλη, είναι γνωστό πως τα κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος στο μυελό των οστών είναι τα πλέον ακτινοευαίσθητα. Βλάβες των προγονικών κυττάρων και μεταβολές στο περιφερικό αίμα, μπορούν να παρατηρηθούν σε σχετικά μικρότερες δόσεις (δόση κατωφλίου 2 Gy). Η γρήγορη αύξηση του αριθμού των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων, ακολουθείται από καταστολή της λευκής, ερυθράς και αιμοπεταλιακής σειράς και προκαλείται θάνατος συνήθως σε ένα με δύο μήνες (**Σύνδρομο αιμοποιητικού συστήματος**). Ακόμη, οι εντερικοί ιστοί είναι λόγω της σύστασης τους ιδιαίτερα ευαίσθητοι σε τοξικούς παράγοντες καθώς έχουν ένα μεγάλο αριθμό βλαστικών κυττάρων. Συμπτώματα όπως εξέλκωση του εντέρου, ναυτία, διάρροια και εντερική αιμορραγία (**Σύνδρομο γαστρεντερικού συστήματος**) αφορούν στην παρουσία άμεσα επαγόμενων αντιδράσεων λόγω ακτινοβόλησης με μεγάλες δόσεις (δόση κατωφλίου 7Gy). Γενικά, μαζί με τα παραπάνω, συμπτώματα όπως ναυτία, εμετός, ανορεξία, αναπνευστική δυσφορία και κατάπτωση λόγω του **Συνδρόμου οξείας ακτινοβόλησης** μετά από ολική έκθεση του σώματος παρουσιάζονται μετά από μερικές ώρες ή και μέρες και έχουν συστημικές επιπτώσεις [12,60].

2.5.2.2. Μη στοχευμένες επιδράσεις σε υγιής ιστούς

Αντίθετα, υπάρχει ένα σύνολο κλινικών και εργαστηριακών δεδομένων όπως τα παρακάτω, όπου παρουσιάστηκαν μη αναμενόμενα αποτελέσματα, τόσο άμεσα όσο και μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα, μαζί με διάφορους πιθανούς υποκείμενους παράγοντες. Ο Nobler ήταν από τους πρώτους που παρατήρησε τα φαινόμενα αυτά όταν

το 1969 διαπίστωσε πως η πλευρική συλλογή υγρού στους πνεύμονες ασθενή εξαφανίστηκε μετά από ακτινοβολή στην κοιλιακή χώρα για κακοήθες λέμφωμα [61]. Πειράματα σε ζώα από το 1968 έδειξαν πως ακτινοβολημένα κύτταρα εκλύουν διαλυτούς παράγοντες στο περιφερειακό σύστημα κυκλοφορίας οι οποίοι προκαλούν χρωμοσωμικές εκτροπές σε καλλιέργειες μη ακτινοβολημένων κυττάρων εκτεθειμένων στο πλάσμα των ακτινοβολημένων [62]. Αλλού, η μερική ακτινοβολή σε πνεύμονα ποντικού προκάλεσε βλάβες στο DNA κυττάρων σε απομακρυσμένα σημεία του ιστού και διαπιστώθηκε πως όταν χρησιμοποιήθηκαν αντιοξειδωτικές ουσίες το φαινόμενο περιορίστηκε, κάνοντας εμφανή την εμπλοκή ελεύθερων ριζών οξυγόνου και αζώτου [63]. Άλλη ομάδα βρήκε στα κύτταρα σπλήνας ποντικού μεταβλημένο ρυθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού, αυξημένα επίπεδα βλαβών DNA, αποπτώσεων και της πρωτεΐνης p53 μετά από έκθεση μόνο του κεφαλιού [64]. Πειράματα είτε με ευρεία δέσμη είτε με μικροδέσμες φαίνεται να υποδεικνύουν κατά αρχήν την ύπαρξη AAI. Ευρήματα όπως τα φανερώνουν έμμεσα υποδεικνύουν την παρουσία μεταλλαξογόνων παραγόντων οι οποίοι διαμεσολαβούν την επαγωγή ΜΣΕ με ανάλογο τρόπο που διαμεσολαβούν κυτοκίνες και χημοκίνες τη επαγωγή ναυτίας και κόπωσης μετά από μια κλινική συνεδρία ακτινοθεραπείας [47,53,60]. Σε άλλα πειράματα, η εμπλοκή της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης FasL (Fas ligand) του TNFα υποδεικνύει την πρόκληση στρες και φλεγμονώδους απόκρισης μέσω του μονοπατιού του ενζύμου COX-2 (cyclooxygenase-2). Στοιχεία από πειράματα του Chai κ.α. επιβεβαίωσε πως σε ΜΣΕ όπως οι βλάβες DNA και η μεταλλαξογένεση σημαντικό ρόλο παίζει το COX-2 και διάφορες προσταγλανδίνες. Τέλος, ένας μεγάλος αριθμός in vivo και in vitro πειραμάτων δείχνουν την διαμεσολάβηση πολλών κυτοκίνων (όπως οι IL-6, IL-8, IL-10, CCL2, CCL4, CCL7, CXCL7 και TNFα) και αυξητικών παραγόντων (TGFβ, PDGF και FGF) στην επαγωγή ΜΣΕ όπως θα δούμε και αναλυτικότερα στη συνέχεια [46,47].

Επιπτώσεις στο καρδιαγγειακό σύστημα

Όσον αφορά στο καρδιαγγειακό σύστημα είναι γνωστό πως σε υψηλή έκθεση ακτινοβολίας της καρδιάς και των στεφανιαίων αρτηριών υπάρχει μακροπρόθεσμα υψηλός κίνδυνος εμφάνισης κάποιας καρδιαγγειακής νόσου. Σε περιπτώσεις ασθενών

που έχουν εκτεθεί για λόγους ακτινοθεραπείας σε μεγάλες δόσεις ακτινοβολίας ή σε ακτινοβολημένα ζώα για πειραματικούς λόγους παρουσιάζονται καθορισμένα αποτελέσματα και οι βλάβες που έχουν προκληθεί είναι εύλογες όπως και σε μεγάλο βαθμό ο τρόπος επαγωγής τους, κυρίως λόγω του μεγάλου αριθμού νεκρών κυττάρων. Ωστόσο υπάρχουν τα τελευταία χρόνια ενδείξεις αυξημένων επιπτώσεων, σε σχέση με τις προβλεπόμενες, σε περιπτώσεις έκθεσης σε πολύ χαμηλότερες δόσεις, αναλογικά με τις συνέπειές τους, ενώ σε άλλες περιπτώσεις, ή και στις ίδιες, εμφανίζονται με σημαντική καθυστέρηση [38]. Τα δεδομένα αυτά οφείλονται κυρίως σε παρατηρήσεις πληθυσμών που επιβίωσαν από τις ατομικές βόμβες στην Ιαπωνία και σε ομάδες εργαζόμενων που εκτίθενται συστηματικά σε ΙΑ. Πιθανότερη εξήγηση της εμφάνισης καρδιαγγειακών νόσων σε αυτές τις περιπτώσεις αποτελεί η προσβολή ενδοθηλιακών κυττάρων και η επαγωγή φλεγμονώδους αντίδρασης γεγονός που υποστηρίζεται από τα αυξημένα επίπεδα των κυτοκινών IL-6, CRP, TNF α and INF-g και IL-10 [65,66]. Η άμεση δράση της ΙΑ δεν μπορεί να εξηγήσει το πως ακτινοβολία 0.1mGy, η οποία προκαλεί προσβολή ενός πυρήνα σε 10 κύτταρα από μια τροχιά ηλεκτρονίου, οδηγεί στην εμφάνιση καρδιαγγειακής ασθένειας με κάποιο τρόπο.

Επιπτώσεις στην κεφαλική περιοχή

Ο εγκέφαλος όπως είπαμε είναι ένα από τα πιο ακτινοανθεκτικά όργανα καθώς τα νευρικά κύτταρα διαιρούνται πολύ αργά, η ανάπτυξη φλεγμονής είναι περιορισμένη και τα ανοσοκύτταρα αδυνατούν να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Ωστόσο, υπάρχουν πλέον στοιχεία που δείχνουν πως η έκθεση είτε από μερική ακτινοβολία του εγκεφάλου είτε από ολική έκθεση του σώματος έχει μεγαλύτερες επιπτώσεις σε υγιή κύτταρα τόσο σε σύντομο χρονικό διάστημα όσο και αρκετά μετά την έκθεση. Τελευταίες μελέτες καταδεικνύουν ότι πολύ χαμηλή ακτινοβολία στον εγκέφαλο μπορεί να έχει πολύ περισσότερες παρενέργειες από πιστεύαμε όπως επισημαίνει και η ICRP με αναφορά της [71]. Κύριο ρόλο σε αυτά τα αποτελέσματα φαίνεται να έχει η παρουσία οξειδωτικού στρες και φλεγμονής. Μετά την ακτινοβολία παρουσιάζεται έκκριση προφλεγμονώδων κυτοκινών (IL-1 α /-1 β , IL-6 και TNF- α) και οι οποίες προκαλούν πολλαπλασιασμό των

αστροκυττάρων και των μικρογλοίων. Από τα κύτταρα αυτά και μικροαγγιακά ενδοθηλιακά κύτταρα στην συνέχεια επάγεται μια σειρά αυτοάνοσων αποκρίσεων μέσω της αυξημένης έκφρασης των χημοκίνων MCP-1 και ICAM-1. Τα μικρογλοιακά κύτταρα, ως τα ανοσοκύτταρα του εγκεφάλου παίζουν κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη φλεγμονώδους αντίδρασης. Η αυξημένη έκφραση του COX-2 και ο ρόλος του παράγοντα NF-κΒ φαίνεται και εδώ πως έχουν μεγάλη σημασία στην απόκριση του εγκεφάλου, όπως δείχνουν πειραματικά δεδομένα [72].

Ευρήματα που καταδεικνύουν τις επιπτώσεις της ΙΑ στα υγιή νευρικά κύτταρα και δεν σχετίζονται με την καρκινογένεση αφορούν κυρίως σε δυσλειτουργίες γνωσιακής φύσης. Έρευνες δείχνουν πως αλλοιώσεις της φαιάς ουσίας επάγουν τον εκφυλισμό γνωστικών, και άλλων, λειτουργιών προκαλώντας νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως η νόσος του Πάρκινσον [73] και το Αλσχάϊμερς [74] καθώς ακόμη και διάφορα άλλα προβλήματα στη μνήμη [75]. Επιπλέον, η σχέση της έκθεσης σε ΙΑ χαμηλής δόσης με την εμφάνιση σχιζοφρένειας έχει εξεταστεί στους ανθρώπους με αντικρουόμενα αποτελέσματα [76]. Πρόσφατη έρευνα σε ποντίκια έδειξε μειωμένη νευρωνική ανάπτυξη στην υποκοκκώδη περιοχή (subgranular zone) της οδοντωτής έλικας (dentate gyrus) του ιππόκαμπου και στην υποκοιλιακή ζώνη (subventricular zone) γεγονός που σχετίζεται με την εμφάνιση σχιζοφρένειας [77]. Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις έχουν βρεθεί στο πλάσμα και στα λεμφοκύτταρα στοιχεία που υποδεικνύουν οξειδωτική, φλεγμονώδη και σημαντική αποπτωτική δραστηριότητα που λογικά ακολουθούνται από βλάβες στο DNA λόγω της έκθεσης σε ΙΑ από χαμηλές έως υψηλότερες δόσεις [78].

Αρκετές ενδείξεις υπάρχουν, επίσης, πως χαμηλή χρόνια ακτινοβολία στο κεφάλι είναι ικανή να προκαλέσει μέσω του κυκλοφορικού συστήματος αυξημένο αριθμό καρδιαγγειακών νόσων. Ακόμη, οι βλάβες στους φακούς των ματιών παρότι θεωρούνταν αποκλειστικά καθορισμένο αποτέλεσμα επιδημιολογικές, μελέτες έδειξαν πως και σε δόσεις μικρότερες από 0.5 Gy για μακροχρόνια έκθεση υπάρχουν αυξημένες εμφανίσεις καταρράκτη. Τέλος, η ακτινοβόληση στο κεφάλι φαίνεται να έχει επιπτώσεις, με παρόμοιο πιθανώς τρόπο, και στο θυροειδή [38,79].

Καρκινογένεση

Η ακτινοβόληση αποτελεί βασική ακτινοθεραπευτική μέθοδο μέσω της καταστροφής των καρκινικών κυττάρων ωστόσο μπορεί να προκαλέσει και τα αντίθετα αποτελέσματα τόσο τοπικά όσο και σε απομακρυσμένα σημεία, σε σύντομο χρονικό διάστημα αλλά και σε πολύ μεταγενέστερο χρόνο. Η διαδικασία επαγωγής κακοήθους μετασχηματισμού είναι σε μεγάλο βαθμό γνωστή για έκθεση σε μεγάλες δόσεις ΙΑ για τοπική ακτινοβόληση ή και έκθεση όλου του σώματος. Η γονιδιωματική αστάθεια και η επαγωγή βλαβών στο πυρηνικό DNA είναι εκτεταμένη και η συσσώρευση τους καθιστά ανίκανους τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης να τις αντιμετωπίσουν. Για να προκύψει κακοήθης μετασχηματισμός, δηλαδή ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός, σε ένα φυσιολογικό κύτταρο πρέπει να υπάρξει μεγάλος αριθμός μεταλλάξεων σε ένα συγκεκριμένο σύνολο γονιδίων που αποτελούν το 10% του γονιδιώματος (10.000 γονίδια) [11]. Τα γονίδια αυτά σχετίζονται με διαδικασίες του κυττάρου όπως η διαφοροποίηση, η μετάσταση, η αγγειογένεση, η διάρκεια ζωής, η κυτταρική διαίρεση και ο έλεγχος αυτής αλλά και ο θάνατος και χωρίζονται σε 2 κατηγορίες. Υπάρχουν τα ογκογονίδια που ελέγχουν την ανάπτυξη και την κυτταρική διαίρεση και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια (ιδιαίτερα σημαντικό είναι το γονίδιο TP53 που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p53 και παρουσιάζει μετάλλαξη στο 50% των ανθρώπινων καρκίνων) που είναι υπεύθυνα για τη διακοπή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την επαγωγή αποπτωτικού θανάτου. Επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ο χρόνος μέχρι να εμφανιστεί καρκινογένεση είναι 4-8 χρόνια για τη λευχαιμία και πάνω από 15 χρόνια για στερεούς όγκους [53].

Απόκριση σε χαμηλές δόσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας

Έχει υπολογιστεί πως σε υψηλές δόσεις ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου αυξάνεται 5% για κάθε 1Sv ακτινοβολίας, από την άλλη για χαμηλότερες δόσεις η εκτίμηση των αποτελεσμάτων δεν είναι απόλυτα ξεκάθαρη. Ειδικότερα δόσεις <1 Gy επάγουν στοχαστικά αποτελέσματα που είναι δύσκολο να προβλεφθούν. Αυτό συμβαίνει λόγω της μη γραμμικότητας που παρουσιάζουν οι επιδράσεις αυτές στις χαμηλές δόσεις και της

συνθετότητας των αποκρίσεων [72]. Το φαινόμενο που παρατηρείται και για πολύ μικρούς ρυθμούς έκθεσης (<10mGy ανά χρόνο) όπου μεγαλώνοντας το χρονικό πλαίσιο δυσκολεύουν και τα μοντέλα πρόβλεψης. Πολλά στοιχεία που δείχνουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης λευχαιμίας ή άλλης καρκινογένεσης υπάρχουν για εκθέσεις εμβρύων σε ακτινοβολία 10-20 mGy για διαγνωστικούς λόγους [38]. Τα αποτελέσματα αυτά επαληθεύονται και από ανθρώπους που έχουν εκτεθεί σε πολύ μεγαλύτερες δόσεις κατά την κύηση ή σε μικρή παιδική ηλικία. Άλλη έρευνα πρόσφατα έχει δείξει αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης λευχαιμίας και καρκίνου στον εγκέφαλο σε περιπτώσεις έκθεσης σε αξονικό τομογράφο (CT) σε πολύ χαμηλές δόσεις (μικρότερες από 50mGy) [70].

Δευτερογενής καρκινογένεση

Ένα ακόμη γεγονός που συνδέεται με ΜΣΕ της ΙΑ ή με την απόκριση απομακρυσμένων ιστών λόγω παρουσίας μιας αρχικής κακοήθειας αποτελεί η εμφάνιση δευτερογενών καρκινογενέσεων. Ενδεικτικά, επιδημιολογική μελέτη ασθενών που είχαν υποβληθεί σε ακτινοθεραπεία για καρκίνο του προστάτη μετά από δέκα χρόνια εμφανίστηκε δημιουργία όγκου τόσο σε κοντινή θέση (κύστη και παχύ έντερο) όσο και σε μακρινή (πνεύμονας). Το 1% του συνόλου των ασθενών υπολογίζεται ότι έχει παρουσιάσει επανεμφάνιση αρχικά φαινομενικά αντιμετωπισμένου όγκου ενώ στο 6% των περιπτώσεων εμφανίζεται σε απόσταση μεγαλύτερη από 10 cm από τον αρχικό [49]. Διάφορες άλλες ερμηνείες έχουν προταθεί για την εξήγηση του φαινομένου αυτού όπως εγγενής ακτινοευαισθησία, προϋπαρξη μικρομετάστασης, αποβολή βιώσιμων καρκινικών κυττάρων από τα ακτινοβολημένα και διασπορά της ακτινοβολίας. Ωστόσο η δημιουργία οξειδωτικού στρες και χρόνιας φλεγμονής λόγω της ακτινοθεραπείας ή της αρχικής κακοήθειας μπορεί να προκαλέσει εκτεταμένη γονιδιωματική αστάθεια και κυτταροτοξικό περιβάλλον τέτοιο που αποτελεί πολύ πιθανή αιτία εμφάνισης δευτερογενούς καρκινογένεσης.

2.5.2.3. Μη στοχευμένες επιδράσεις μετά από ακτινοθεραπεία

Η ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος μετά από τη ακτινοβολήση έχει αποδειχτεί πως επιδρά σε απομακρυσμένες θέσεις με δύο αντίθετα αποτελέσματα (distant effect), τόσο με την επαγωγή καρκινογένεσης όσο και με περιορισμό καρκινικών κυττάρων. Έρευνα in vivo σε επιρρεπή σε καρκινογένεση ποντίκια έδειξε αυξημένο βαθμό εμφάνισης όγκων σε απομακρυσμένες περιοχές από το σημείο ακτινοβολήσης [78]. Η ίδια ομάδα ακόμη με τη χρήση παράγοντα που μπλοκάρει την κυτταρική επικοινωνία μέσω των χαμοσυνδέσεων βρήκε, μεταξύ άλλων, πως αυτές παίζουν σημαντικό ρόλο στην επαγωγή αυτών των απομακρυσμένων αποκρίσεων [80]. Εκτός αυτού, υπάρχουν επίσης αρκετές άλλες έρευνες που δείχνουν αυξημένα επίπεδα διάφορων παραγόντων σε απομακρυσμένες περιοχές που σχετίζονται με την εμφάνιση κακοήθους μετασχηματισμού (όπως αυξημένα επίπεδα μακροφάγων, κυτοκίνων και χημοκίνων) [49,52].

Από την άλλη, εδώ και πολλά χρόνια υπάρχουν αρκετά κλινικά δεδομένα για τον περιορισμό ή και την εξαφάνιση καρκινικών κυττάρων σε απομακρυσμένες θέσεις από την ακτινοβολημένη περιοχή αν και δεν είναι πολύ συχνό φαινόμενο. Ενδεικτική είναι η περίπτωση που παρουσιάστηκε το 1998 ασθενούς με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα καθώς είναι μια μορφή κακοήθειας που εξαιρετικά σπάνια μειώνεται αυθόρμητα. Ενώ ο ασθενείς υποβλήθηκε σε ακτινοθεραπεία για μετάσταση στα θωρακικά οστά ο ηπατικός όγκος εξαφανίστηκε, ενώ μετά από 10 μήνες οι βλάβες στα κύτταρα της περιοχής αυτής είχαν μειωθεί επίσης [81]. Ακόμη, η εύρεση αυξημένων επιπέδων της πρωτεΐνης TNF-α φανερώνουν την πιθανή εμπλοκή κυτοκίνων και του ανοσοποιητικού συστήματος στην καταστολή του όγκου, παράλληλα όμως έχουν συνδεθεί και με τα αντίθετα αποτελέσματα [82]. Η ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος λόγω της ευρείας δράσης του αποτελεί μια ακτινοθεραπευτική μέθοδο για την καταπολέμηση μεταστατικών όγκων η οποία όμως έρχεται σε αμφισβήτηση από τα όλο και αυξανόμενα δεδομένα για τις μακροπρόθεσμες αρνητικές συνέπειες της ΙΑ σε συστημικό επίπεδο λειτουργώντας ως παράγοντας γονιδιωματικής αστάθειας και αποσταθεροποίησης της ομοιόστασης των κυττάρων γενικότερα.

2.5.3. Μηχανισμοί επαγωγής μη στοχευμένων επιδράσεων

Σύμφωνα με πολλές *in vitro* και *in vivo* μελέτες, μερικές από τις οποίες παρουσιάστηκαν παραπάνω έχουμε πλέον αρκετά δεδομένα για τις χημικές ουσίες και τις διαδικασίες που εμπλέκονται στην επαγωγή ΜΣΕ από ΙΑ όσο και από άλλους παράγοντες. Μια προσεγγιστική χαρτογράφηση των βιοχημικών μηχανισμών που διαμεσολαβούν τη μετάδοση του κυτταρικού στρες είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί ως ένα σημείο. Οι μηχανισμοί αυτοί παρότι παρουσιάζουν μια σχετική αυτοτέλεια φαίνεται να διαπλέκονται σε μεγάλο βαθμό. Σε αυτούς περιλαμβάνονται: η μεταφορά παραγόντων μέσω τον χασμοσυνδέσεων, η εξωκυτταρική διάχυση χημικών ουσιών από τα ακτινοβολημένα κύτταρα που λειτουργούν ως σήματα κινδύνου και καθώς μεταφέρονται σε κοντινές ή/και μακρινές αποστάσεις προκαλούν επιμένουσες φλεγμονώδεις αποκρίσεις και συστημική ανοσολογική ενεργοποίηση.

Ιδιαίτερη βιολογική σημασία και κεντρικό ρόλο έχει η παρουσία οξειδωτικού στρες και για αυτό θα εξεταστούν αναλυτικά οι παράγοντες που το επάγουν και το μεταδίδουν. Ακόμη θα γίνει αναφορά στη σχέση μεταξύ ΜΣΕ και γενετικών και επιγενετικών λειτουργιών, όπως επίσης και στο πως επάγονται ΜΣΕ από την ύπαρξη ογκογένεσης καθότι φαίνεται πως ο τρόπος διάδοσης έχει πολλές ομοιότητες με εκείνον που σχετίζεται το στρες λόγω ακτινοβολήσης. Η επαγωγή ΜΣΕ φαίνεται να προκύπτει από ένα σύνολο σύνθετων και αλληλοτροφοδοτούμενων διαδικασιών για αυτό το λόγο θα τις παρουσιάσουμε ξεχωριστά, επιχειρώντας παράλληλα να σημειώσουμε τα σημεία όπου τέμνονται και διασυνδέονται.

2.5.3.1. Οξειδωτικό στρες

Η έντονη και παρατεταμένη παρουσία οξειδωτικού στρες, η διαταραχή δηλαδή της ισορροπίας μεταξύ των δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species - ROS) και αζώτου (Reactive Nitrogen Species – RNS) και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών των κυττάρων, σχετίζεται άμεσα με την εμφάνιση ΜΣΕ σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου αποτελούν σημαντικά μόρια για βασικές κυτταρικές λειτουργίες όπως η απόπτωση, η σηματοδότηση, η κυτταρική ανάπτυξη, η

φλεγμονή και η ανοσολογική απόκριση. Παράγονται είτε από εξωγενείς παράγοντες, όπως η ΙΑ, χημικές ουσίες κ.α., είτε από λειτουργίες του οργανισμού όπως είναι ο κυτταρικός μεταβολισμός και το ανοσοποιητικό σύστημα. Τα κύτταρα για να διατηρήσουν το πλήθος των ROS και RNS στα βιολογικώς απαιτούμενα επίπεδα επιστρατεύουν ρυθμιστικούς μηχανισμούς που περιλαμβάνουν μη-ενζυμικούς καθαριστές ριζών, διάφορες δηλαδή χημικές ουσίες όπως οι βιταμίνες Α, C και Ε, και αντιοξειδωτικά ένζυμα όπως η καταλάση και διάφορες περοξειδάσες, τα περισσότερα από τα οποία ρυθμίζονται από τον μεταγραφικό πυρηνικό παράγοντα Nrf2 [83]. Ο αυξημένος αριθμός ROS και RNS έχει σημαντικές βιολογικές επιπτώσεις καθώς μπορούν να αντιδράσουν με βιομόρια όπως το DNA, πρωτεΐνες και λιπίδια επάγωντας αλλαγές ενδοκυτταρικά, στο μικροπεριβάλλον και σε παρακείμενα κύτταρα. Ωστόσο, η σημαντικότερη παραγωγή ROS και RNS πραγματοποιείται σε δεύτερο χρόνο μέσω της ενεργοποίησης αποπτωτικών διαδικασιών με την διαμεσολάβηση σηματοδοτικών μονοπατιών του DDR [84].

Δραστικές μορφές οξυγόνου

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου μπορούν είτε να δημιουργηθούν άμεσα στα ακτινοβολημένα κύτταρα είτε μέσω σηματοδοτικών μονοπατιών να προκληθεί η παραγωγή τους σε παρακείμενα ή απομακρυσμένα κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα, οι ROS εκτός από την πρόκληση οξειδωτικού στρες τοπικά μπορούν να μεταφέρουν διακυτταρικά, ανάλογα με την εμβέλεια τους, και να λειτουργήσουν ως μεταδότες του στρες σε άλλες περιοχές. Αφού δημιουργηθούν ως προϊόντα της ραδιόλυσης ή έμμεσα από φλεγμονώδεις αντιδράσεις στη συνέχεια μεταφέρονται μέσω των χασμοσυνδέσεων στα κύτταρα που είναι σε επαφή ή μέσω διάχυσης στο μέσο σε παρακείμενα κύτταρα [83]. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου περιλαμβάνουν ελεύθερες ρίζες, όπως η υδροξυλική ρίζα, ιόντα όπως το υποχλωριώδες ανιόν (ClO^-), συνδυασμούς ελευθέρων ριζών και ιόντων, όπως το ανιόν υπεροξειδίου ($\cdot\text{O}_2^-$) και μόρια όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) [5]. Από αυτές ή μόνη που δεν είναι πολύ δραστική είναι το H_2O_2 καθώς οι υπόλοιπες αντιδρούν αφού διανύσουν σε λίγα νανόμετρα προκαλώντας αλλοιώσεις σε διάφορα βιομόρια. Η μεγαλύτερη διάρκεια ζωής της H_2O_2 (έχοντας σταθερά διάχυσης 2.3

$\times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$) της δίνει τη δυνατότητα να κινηθεί στον οργανισμό μέσω του πλάσματος και να προκαλέσει βλάβες σε μακρινές θέσεις. Παραγωγή H_2O_2 έχουμε και από ένζυμα όπως η NAD(P)H οξειδάση που είναι προσδεμένη στην κυτταρική μεμβράνη και φαίνεται να παίζει ρόλο στην αύξηση των ROS σε ακτινοβολημένα αλλά και παρακείμενα κύτταρα [83]. Ακόμη, η ενεργοποίηση του ενζύμου COX-2 που συμμετέχει στην δημιουργία προσταγλανδινών από προφλεγμονώδεις κυτοκίνες οδηγεί σε μεγάλη παραγωγή ROS στο εσωτερικό των κυττάρων [50].

Δραστικές μορφές αζώτου

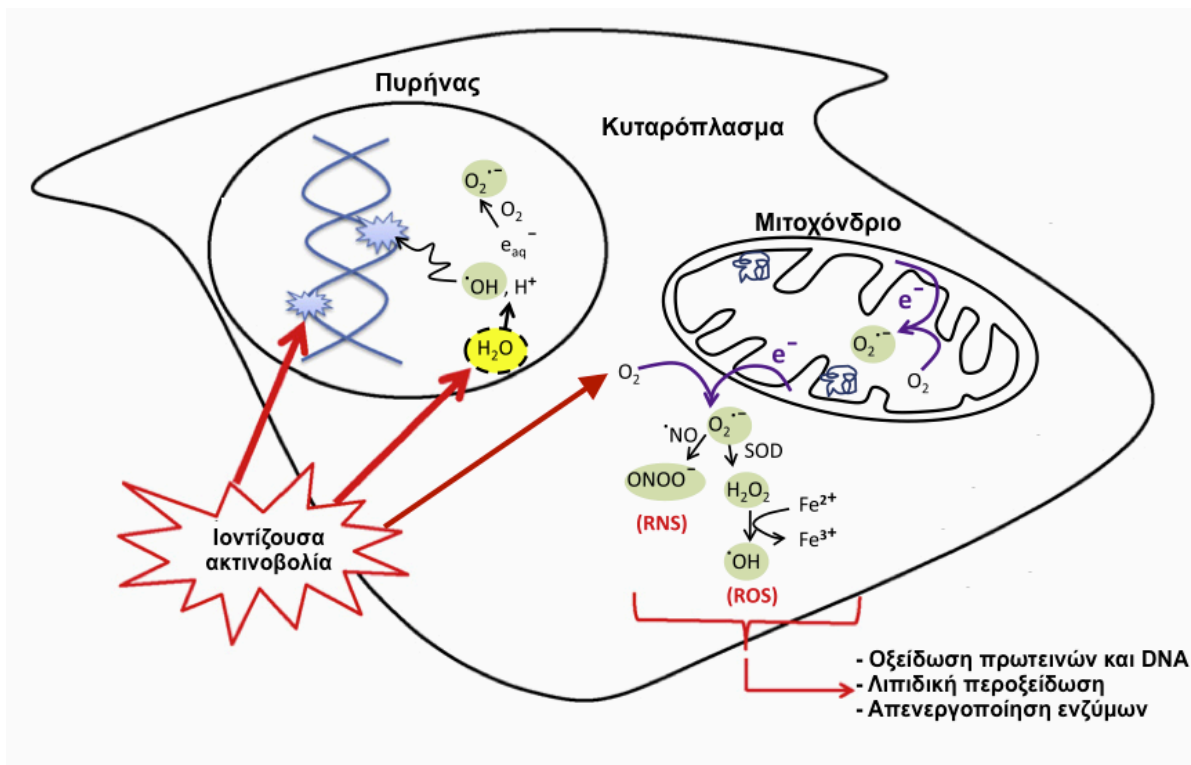
Η σημασία των δραστικών μορφών αζώτου, τόσο ως μέσο διάδοσης όσο και ως αιτία επαγωγής οξειδωτικού στρες, έχει αποδειχτεί σε πολλές περιπτώσεις και ειδικά μέσω πειραμάτων με χρήση συγκεκριμένων αντιοξειδωτικών ουσιών [85]. Ο ρόλος του νιτρικού οξειδίου (Nitric Oxide - NO) έχει μελετηθεί ιδιαίτερα καθώς φαίνεται να παίζει τον σημαντικότερο ρόλο. Το NO^* είναι ένα μικρό λιποφιλικό μόριο που διαχέεται σε σχετικά μεγάλες αποστάσεις ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά. Το ίδιο συνήθως δεν μπορεί να προκαλέσει σοβαρές βλάβες καθώς δεν αντιδρά με τα περισσότερα βιολογικά συστατικά των κυττάρων (εκτός της αίμης). Εντούτοις, αντιδρώντας με το $\cdot\text{O}_2^-$ δημιουργεί το περοξυνιτρικό ανιόν (ONOO^-) το οποίο είναι ιδιαίτερα δραστικό όπως η υδροξυλική ρίζα [5]. Αυξημένα επίπεδα NO^* προκαλούν βλάβες σε λιπίδια, θειόλες και στις βάσεις του DNA (μέσω απαμίνωσης) που μπορούν να οδηγήσουν, αν δεν επιδιορθωθούν σε μεταλλάξεις, μονόκλωνες ή δίκλωνες θραύσεις. Μπορούν, επίσης, να προκληθούν βλάβες στις πρωτεΐνες των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA (ή σε άλλες πρωτεΐνες) ή μέσω λιπιδικής περοξειδωσης και ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού του αρδονικού οξέος να παραχθούν φλεγμονώδεις παράγοντες, επιβλαβείς για το DNA [83]. Σε άλλα πειράματα φαίνεται πως το NO^* που εκλύεται από ακτινοβολημένα κύτταρα προκαλεί αυξημένη έκφραση των p53 και hsp72 σε παρακείμενα μη ακτινοβολημένα κύτταρα γλοιοβλαστώματος (wild type) μέσω της διακυτταρικής μεταφοράς τους στο μέσο καλλιέργειας [57]. Τέλος, αυξημένη παραγωγή NO^* μπορεί να επάγεται ενδοκρινικά και παρακρινικά μέσω της αυξορύθμισης της έκφρασης των γονιδίων iNOS και NOX μετά

από ακτινοβόληση, φαινόμενο που συνοδεύεται από προβληματική λειτουργία των μιτοχονδρίων [84].

Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν ιδιαίτερα σημαντική λειτουργική κυτταρική μονάδα καθώς μέσω της κατανάλωσης O_2 παράγεται το μόριο ATP, το οποίο είναι το ενεργειακό καύσιμο όλων των κυτταρικών λειτουργιών. Κατά την διαδικασία αυτή παράγονται ROS και RNS και γι' αυτό το λόγο τα μιτοχόνδρια αποτελούν την βασική πηγή προέλευσης των ενδογενών δραστικών μορφών οξυγόνου και αζώτου [5,84]. Αυξημένα επίπεδα RNS και ROS προκαλούν μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) και σταμάτημα ή τροποποίηση της έκφρασης συγκεκριμένων πρωτεϊνών που ελέγχουν σημαντικές μιτοχονδριακές και άλλες κυτταρικές λειτουργίες. Σοβαρές βλάβες στα μιτοχόνδρια προκαλούνται από την αλλαγή του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης ή λόγω αυξημένων διαρροών οδηγώντας σε έκλυση O_2^- στο κυτταρόπλασμα τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε $ONOO^-$ (αντιδρώντας με το νιτρικό οξείδιο) ή καταλύονται (superoxide dismutase – SOD) σε H_2O_2 [5]. Ακόμη, μέρος των μορίων H_2O_2 μετατρέπεται μέσω αναγωγής σε υδροξυλικές ρίζες. Με αυτό τον τρόπο μια αλυσιδωτή αντίδραση συντελείται, καθώς το ενδοκυτταρικό οξειδωτικό στρες αυξάνεται και τα παραπάνω προϊόντα επάγουν μια σειρά βλαβών με προεξέχουσες τις οξειδώσεις του μιτοχονδριακού και πυρηνικού DNA. Το mtDNA λόγω της μικρής προστασίας του, αποτελεί σχετικά εύκολο στόχο των ROS και RNS που έχουν δημιουργηθεί. Σαν συνέπεια, αυξημένη έκφραση ή μεταλλάξεις μπορούν να προκληθούν σε γονίδια όπως το Mt-COX2, της μιτοχονδριακής ATPάσης και του ενζύμου της δευδρογονάσης NADH (σύμπλεγμα 1) και της κυτοχρωμικής c οξειδάσης (cytochrome c oxidase) [86] που καθορίζουν την παραγωγή ROS, όπως και σε άλλα που αφορούν σε ζωτικές μιτοχονδριακές λειτουργίες (όπως της mtDNA πολυμεράσης γ) [87]. Οι παραπάνω αλλαγές οδηγούν σε ανεξέλεγκτη ενδοκυτταρική παραγωγή ROS, εντείνοντας το στρες και τη δυσλειτουργία του κυττάρου [83].

Επιπλέον, η διάχυση των RNS και ROS που ακολουθεί στο περιβάλλον εκτός του κυττάρου επάγει στρες σε παρακείμενα κύτταρα τα οποία με τη σειρά τους μεταδίδουν το στρες μέσω ελεύθερων ριζών ή έμμεσα με τη διαμεσολάβηση και άλλων παραγόντων. Με αυτό τον τρόπο τα μιτοχόνδρια αποτελούν σημαντική επιπρόσθετη πηγή οξειδωτικού στρες συμβάλλοντας σημαντικά στην πρόκληση βλαβών και κυτταροτοξικών αποκρίσεων ενδοκυτταρικά και διακυτταρικά [5].



Εικόνα 2.8: Η έμμεση και άμεση επαγωγή βλαβών στα μακρομόρια του κυττάρου. Η ραδιόλυση του νερού μαζί με προϊόντα των μιτοχονδρίων παράγουν ένα πλήθος ROS και RNS που πλήττουν πρωτεΐνες, λιπίδια, το πυρηνικό και μιτοχονδριακό DNA [5].

2.5.3.2. Ανοσοποιητικό σύστημα και φλεγμονώδεις αποκρίσεις

Κυτταρικές βλάβες, σήματα κινδύνου και εγγενής ανοσολογία

Οι πολυκύτταροι οργανισμοί όταν αντιμετωπίζουν προβλήματα τραυματισμού ή μόλυνσης ενός ιστού έχουν αναπτύξει τρόπους προστασίας μέσω διακυτταρικής

σηματοδότησης για να προετοιμάζουν και να διασφαλίσουν την ακεραιότητα των υπόλοιπων κυττάρων. Ωστόσο, η θεώρηση πως το ανοσοποιητικό προσπαθεί να αναπτύξει μηχανισμούς κυρίως για την αναγνώριση και την αντιμετώπιση ξένων στοιχείων στον οργανισμό (non-self) κρίνεται πλέον ελλιπής [88]. Μια σχετικά νέα υπόθεση (the danger theory) [89] που υποστηρίζει πως το ανοσοποιητικό ασχολείται περισσότερο με την προστασία από πιθανούς επιβλαβείς παράγοντες, ανεξαρτήτου προελεύσεως, παρά με την διάκριση ξένων και εγγενών μικροοργανισμών, κυττάρων και μορίων, κερδίζει έδαφος τα τελευταία χρόνια. Σύμφωνα με αυτή, κύτταρα τραυματισμένα ή υπό στρες στέλνουν σήματα που πυροδοτούν την ανοσολογική απόκριση.

Πλέον γνωρίζουμε πως το εγγενές ανοσοποιητικό σύστημα χρησιμοποιεί μια σειρά από υποδοχείς (germline-encoded) αναγνώρισης προτύπων PRRs (pattern recognition receptors) για την ανίχνευση σημάτων από αλλοιωμένα μακρομόρια ή κύτταρα που πεθαίνουν DAMPs (damage-associated molecular patterns), πέρα από την ανίχνευση μικροβιακών προϊόντων PAMPs (pathogen-associated molecular patterns). Οι υποδοχείς αυτοί βρίσκονται στην επιφάνεια και στο κυτταρόπλασμα των ανοσοκυττάρων, των ινοβλαστών και των επιθηλιακών κυττάρων. Μερικοί από αυτούς είναι η οικογένεια Toll-like receptors (TLRs), οι τύπου-C λεκτίνης (CLRs), οι NOD-like (NLRs), οι Rig-like (RLRs) και οι AIM2-like (ALRs). Ως σήματα κινδύνου εκλαμβάνονται από τους παραπάνω υποδοχείς διάφορες πρωτεΐνες και μόρια όπως: η πρωτεΐνη HMGB1, πρωτεΐνες θερμικού σοκ, εξωκυτταρική ATP, ROS, ουρικό οξύ, τμήματα RNA και DNA, οξειδωμένα μόρια και διάφορα μέρη κατεστραμμένων κυττάρων [88,90]. Μεγάλες δόσεις ΙΑ μπορούν να προκαλέσουν εκτεταμένες βλάβες στα κύτταρα λόγω οξειδωτικού στρες παράγοντας μεγάλο αριθμό μορίων DAMPs. Τα μόρια αυτά όταν αναγνωριστούν από τους PRRs κυττάρων τις γύρω περιοχής ή και πιο απομακρυσμένων πυροδοτούν σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν, ανάλογα με τον υποδοχέα, στην έντονη παραγωγή κυτοκίνων (IL-1, IL-6, IL-8, IL-18, IFN τύπου 1, TNFα), χημοκίνων, προσκολλητικών μορίων και ROS/RNS. Τα μονοπάτια αυτά περιλαμβάνουν ως βασικούς ρυθμιστές κινάσες της ομάδας MAPK (mitogen-activated protein kinase) που συντελούν στην ενεργοποίηση των πυρηνικών ρυθμιστικών παραγόντων NK-κΒ, IRF και AP-1 [84,91].

Κατά την επιδιόρθωση ή την αντιγραφή του DNA δημιουργούνται διάφορα παραπροϊόντα όπως τμήματα RNA και DNA που αν δεν αποσυντεθούν, λειτουργούν δυνητικά ως ρίζες που ενεργοποιούν τους υποδοχείς PRRs. Για το λόγο αυτά ειδικά ένζυμα (DNAάσες) αποδομούν τα παραπάνω μόρια για να μην αναγνωριστούν ως ξένα από αισθητήρες του κυτταροπλάσματος στο ίδιο κύτταρο ή από αισθητήρες άλλων αν εκλυθούν στο περιβάλλον. Ωστόσο, υπό συνθήκες κυτταρικού στρες ή έλλειψης των DNAασών τα μόρια αυτά εκλαμβάνονται ως σήματα κινδύνου και εμφανίζονται αυτοάνοσες αντιδράσεις [91].

Οξειδωμένο εξωπυρηνικό DNA

Το αλλοιωμένο ή οξειδωμένο DNA λειτουργώντας ως DAMP υποδεικνύεται από αρκετές έρευνες ως σημαντικό σήμα στρες για ολόκληρο τον οργανισμό, επάγοντας προσαρμογή απόκρισης, παραγωγή ROS και άλλες ΜΣΕ σε μακρινές περιοχές. Για το λόγο αυτό θα εξετάσουμε το ρόλο του, τα ιδιαίτερα ποιοτικά του χαρακτηριστικά και τα αποτελέσματα που προκαλεί σε αυτή την παράγραφο διακριτά. Όπως είδαμε, ακτινοβολημένα κύτταρα, καρκινικά κύτταρα ή γενικότερα κύτταρα που έχουν υποστεί έντονο στρες όταν πεθαίνουν απελευθερώνουν στο περιβάλλον το λεγόμενο εξωπυρηνικό DNA (extracellular DNA – ecDNA ή αλλιώς cell free DNA). Τα κύτταρα αυτά υφιστάμενα σοβαρές οξειδωτικές βλάβες και DSBs εκκινούν την αποπτωτική διαδικασία και εκλύουν πυρηνικό DNA που έχει υποστεί εκτεταμένες αλλοιώσεις [83,92]. Εκείνο, στην συνέχεια, όπως είδαμε ανιχνεύεται από τους ειδικούς αισθητήρες που βρίσκονται στην επιφάνεια ή στο εσωτερικό άλλων κυττάρων που έχουν την ικανότητα βιοχημικής αναγνώρισης της δομής του. Η διάκριση που κάνουν οι αισθητήρες PRR, όπως σημειώσαμε προηγουμένως, αφορά όχι μόνο στο ξένο-ενδογενές αλλά και στο αλλοιωμένο-ακέραιο DNA [90]. Οι αλλαγές που το μετατρέπουν σε σήμα κινδύνου πιθανότατα είναι η έκταση των οξειδωτικών βλαβών (κυρίως της 8-oxodG) και ο αυξημένος αριθμός ζευγών GC σε σχέση με τα AT. Υπάρχουν ενδείξεις πως CG-rich ολιγονουκεοτίδια αναγνωρίζονται καλύτερα τον υποδοχέα TLR9. Ακόμη, η πρωτεΐνη HMGB1 που ως σύμπλεγμα με τμήματα DNA ενεργοποιεί έντονα τον TLR9 φαίνεται να προσδένεται περισσότερο σε DNA πλούσιο σε αλλοιωμένες βάσεις. Στις παραπάνω περιπτώσεις παρατηρείται, διαμέσου του

μονοπατιού TLR9-MyD88, ενεργοποίηση των ρυθμιστικών παραγόντων NF-κB και IRF7 (IFN-regulatory factor 7) και ακόλουθη σύνθεση ROS και RNS ή παραγωγή των κυτοκίνων TNFα, IL-1, IL-6 και IFN τύπου 1. Πολλοί ακόμη υποδοχείς PRRs αναγνωρίζουν το dsDNA/ecDNA όπως ο STING, ο AIM2, ο IFI16, ο Ku-70, ο DAI και ο RIG-1 επάγοντας στην συνέχεια απόπτωση ή παραγωγή προφλεγμονώδων ή αντιφλεγμονώδων κυτοκίνων ανάλογα με τον ενεργοποιημένο υποδοχέα [84,90,92].

Ιδιαίτερη αναφορά αξίζει να κάνουμε στην απόκριση των ενδοθηλιακών κυττάρων στο ecDNA/dsDNA καθώς ως λειτουργικός και ανατομικός φραγμός μεταξύ του κυκλοφορικού συστήματος και των ιστών των οργάνων παίζει σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική απόκριση και την επαγωγή ΜΣΕ σε μακρινές αποστάσεις. Ήταν γνωστό έως τώρα πως τα κύτταρα αυτά αποκρίνονται έμμεσα μέσω κυτοκίνων, όμως πρόσφατα φάνηκε πως δύναται να πυροδοτήσουν φλεγμονώδεις αντιδράσεις αναγνωρίζοντας σήματα κινδύνου (μόρια DAMPs). Σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε σε εκτεθειμένα σε dsDNA επιθηλιακά κύτταρα παρουσιάστηκε ενεργοποίηση του παράγοντα NF-κB και των μονοπατιών MARK (συγκεκριμένα μέσω των κινασών JNK και p53) επάγοντας την έκφραση των προσκολλητικών μορίων ICAM1, VCAM1 και E-σελεκτίνη, με επακόλουθο την προσέλκυση λευκοκυττάρων. Παρατηρήθηκε, ακόμη, έντονη παραγωγή του TNFα με την απαραίτητη ενεργοποίηση των παραγόντων NF-κB και IRF3 [93]. Σε άλλο πείραμα, τόσο η ακτινοβολήση όσο και η έκθεση σε οξειδωμένο ecDNA ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων οδήγησε σε έντονη έκφραση της οξειδάσης NOX4 που εμπλέκεται στην παραγωγή ROS [92].

Με τους παραπάνω τρόπους το οξειδωτικό στρες και οι φλεγμονώδεις αποκρίσεις “μεταφέρονται” σε παρακείμενα αλλά και απομακρυσμένα κύτταρα καθώς το ecDNA/dsDNA έχει τη δυνατότητα να διανύει μεγάλες αποστάσεις μέσω του κυκλοφορικού συστήματος. Ο επιθηλιακός ιστός ίσως παίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία αυτή διαμεσολαβώντας και μεγεθύνοντας την ανοσολογική απόκριση των διάφορων οργάνων του σώματος. Επακόλουθο των προηγούμενων διαδικασιών αποτελεί η πρόκληση οξειδωτικών βλαβών στο πυρηνικό και μιτοχονδριακό DNA στα έμμεσα ή

άμεσα προσβεβλημένα κύτταρα τα οποία στη συνέχεια μέσω αποπτωτικών σημάτων που εκκρίνουν πολλαπλασιάζουν την εμφάνιση του φαινομένου αυτού.

Βλάβες DNA, DDR και διασυνδέσεις με το ανοσοποιητικό σύστημα

Εκτός από την ανίχνευση ξένου ή οξειδωμένου DNA στην επιφάνεια ή το εσωτερικό παρακείμενων ή μακρινών κυττάρων, ανοσολογική απόκριση και έκκριση προφλεγμονώδων σημάτων φαίνεται να επάγεται και από αλλοιώσεις στο DNA το οποίο παραμένει στον πυρήνα [91]. Αρκετά στοιχεία δείχνουν, παρά τις προηγούμενες πεποιθήσεις, πως το αλλοιωμένο πυρηνικό DNA δεν είναι μη ορατό από τους αισθητήρες του ανοσοποιητικού που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα. Όπως θα δούμε, φαίνεται πως πολλές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην απόκριση και επιδιόρθωση των βλαβών DNA παίζουν ακόμη λειτουργικό ρόλο στην εγγενή ανοσολογική σηματοδότηση. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, η Ku70 που ενεργοποιεί τον μηχανισμό NHEJ λειτουργεί και ως αισθητήρας στο κυτταρόπλασμα επάγοντας την έκκριση της ιντερφερόνης IFN-λ1 [94]. Η DNA-PK δρα και ως PRR οδηγώντας στην έκφραση γονιδίων κυτοκίνων, χημοκίνων και της IFN-β μέσω μονοπατιού των IRF3-TBK1-STING [95]. Άλλες πρωτεΐνες που ανιχνεύουν DSBs και SSBs όπως η MRE11 και rad50 εμπλέκονται επίσης σε προφλεγμονώδεις αποκρίσεις. Όπως φαίνεται και από πρωτεΐνες του επιδιορθωτικού μηχανισμού NER και άλλα αντίστοιχα πειραματικά δεδομένα υπάρχει επικοινωνία και αλληλοεπικάλυψη των παραπάνω διαδικασιών απόκρισης στις βλάβες DNA και αναγνώρισης ξένου DNA από αισθητήρες του εγγενούς ανοσοποιητικού [84,90,91].

Τέλος, η αναγνώριση αλλοιωμένου πυρηνικού DNA με τη διαμεσολάβηση των παραπάνω αισθητήρων λόγω της σύνθετης λειτουργίας τους όπως είδαμε, στέλνει σήματα κινδύνου από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα ενεργοποιώντας το ανοσοποιητικό σύστημα. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει την ενεργοποίηση ρυθμιστικών πυρηνικών παραγόντων, ρίζες κυτταρικής επιφάνειας (όπως οι MICA, MICB, ULBP1-6) και ενδοκυτταρικά προσκολλητικά μόρια [91]. Η έντονη παρουσία βλαβών DNA και η συνεχής ενεργοποίηση του DDR με την έκλυση φλεγμονώδων παραγόντων και την επαγωγή οξειδωτικού στρες

προκαλεί μια αυτοενισχυόμενη διαδικασία ανοσολογικής αντίδρασης οδηγώντας στην παρουσία χρόνιας φλεγμονής η οποία μπορεί να οδηγήσει σε εκφυλισμό, καρκινογενέσεις ή θάνατο των κυττάρων τόσο τοπικά όσο και συστηματικό επίπεδο.

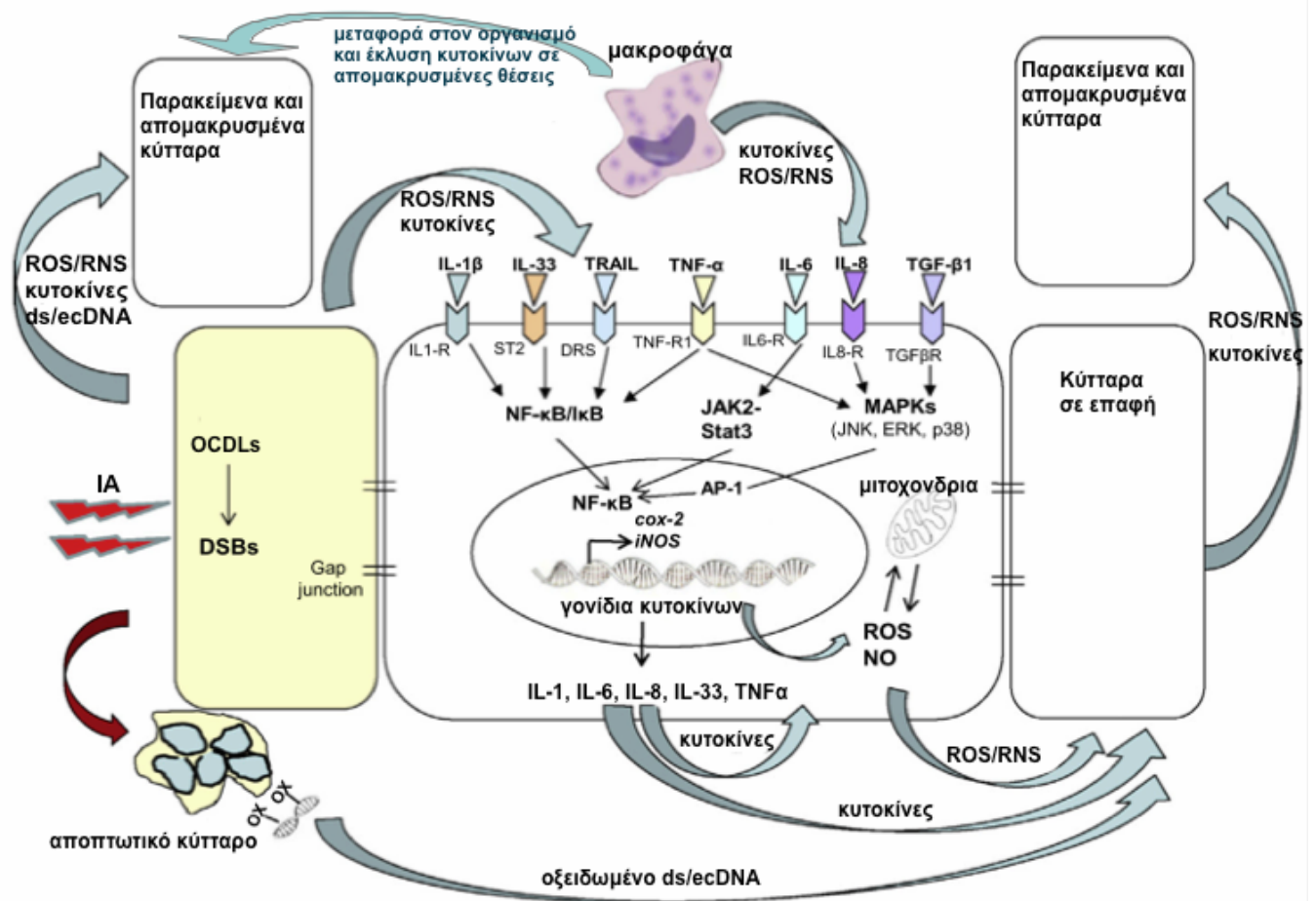
Κυτοκίνες

Οι κυτοκίνες αποτελούν κατηγορία μικρών πρωτεϊνών με κεντρικό ρόλο στη σηματοδότηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Δρουν μέσω της πρόσδεσης τους σε συγκεκριμένους επιφανειακούς υποδοχείς και ενεργοποιούν αντίστοιχα σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν συγκεκριμένες κυτταρικές λειτουργίες παρακρινικά είτε αυτοκρινικά. Με αυτό τον τρόπο φαίνεται να διαμεσολαβούν τόσο την άμεση όσο και την καθυστερημένη απόκριση των κυτταρικών ιστών στην ΙΑ σε θέσεις κοντά στον ακτινοβολημένο στόχο αλλά και σε απομακρυσμένες περιοχές αφού διαχυθούν στο κυκλοφορικό. Στις κυτοκίνες περιλαμβάνονται οι χημοκίνες, οι ιντερλευκίνες, οι ιντερφερόνες, οι λεμφοκίνες, οι παράγοντες νέκρωσης όγκων και ενίοτε αυξητικοί παράγοντες. Εκτός από διάφορα ανοσοκύτταρα, παράγονται ακόμη από ινοβλάστες, ενδοθηλιακά και στρωματικά κύτταρα [96].

Μέχρι αυτό το σημείο έχουμε δει πολλές κυτοκίνες να συνοδεύουν την εμφάνιση διάφορων ΜΣΕ. Μερικές βασικές κυτοκίνες και ο τρόπος με τον οποίο εμπλέκονται στην επαγωγή ΜΣΕ θα μελετήσουμε στην συνέχεια. Κυτοκίνες όπως η TNF- α , η IL-1 β , η IL-33 και η PDGF επάγουν μέσω της ενεργοποίησης του παράγοντα NF- κ B, που ρυθμίζει την έκφραση των COX-2 και iNOS, την αυξημένη παραγωγή ROS και RNS αντίστοιχα [47,97]. Η TNF- α , ακόμα, μπορεί να ενεργοποιήσει τα σηματοδοτικά μονοπάτια της οικογένειας κινασών MAPK που περιλαμβάνουν τις: ERK (extracellular signal-related kinase), JNK (c-Jun N-terminal kinase) και p38 οι οποίες μέσω της ενεργοποίησης της ρυθμιστικής πρωτεΐνης AP-1 (activation protein-1) αυξάνουν επίσης την έκφραση των COX-2 και iNOS [83]. Οι TGF- β , IGF, IL-1 και IL-8 οδηγούν επίσης στην παραγωγή ROS και RNS μέσω της έκφρασης του COX-2 στα ίδια ή σε παρακείμενα κύτταρα μέσω του μονοπατιού των MAPK και ειδικότερα των κινασών MEK1/2 και MKK3/6 και p38 [84]. Για την επιβεβαίωση

του προηγούμενου μηχανισμού πραγματοποιήθηκε πείραμα όπου χρησιμοποιήθηκε αναστολέας της δράσης της MEK1 και στο οποίο εμφανίστηκε μειωμένη επίπτωση στα παρακείμενα κύτταρα [98]. Ο TGF-β1, επίσης, όταν εκλύεται από ακτινοβολημένα κύτταρα επάγει την παραγωγή ROS ενεργοποιώντας την οξειδάση NAD(P)H στην επιφάνεια άλλων κυττάρων. Η IL-6, από την άλλη, όταν προσδεθεί σε κάποιο παρακείμενο κύτταρο ενεργοποιεί την κινάση JAK2 (janus-kinase 2) και το μονοπάτι του STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) που οδηγεί στη συνέχεια στην ενεργοποίηση του παράγοντα NF-κβ [82]. Σε μεγάλο βαθμό, από όσα γνωρίζουμε ως τώρα, τα παραπάνω σηματοδοτικά μονοπάτια αποκρίνονται και μετά την ενεργοποίηση των υποδοχέων PRR [84,90].

Η χρήση αναστολέων της δράσης των κυτοκίνων έχουν δείξει αρκετά πειράματα πως μειώνει τις ΜΣΕ όπως την αύξηση των ROS και την μικροπυρήνωση [99]. Ωστόσο, η σηματοδότηση μέσω των κυτοκίνων και αυξητικών παραγόντων, όπως ο TGF-β1, συνδέεται και με την εμφάνιση θετικών πλευρών των ΜΣΕ σε περιπτώσεις καταστολής του καρκίνου και ανάπτυξης ίνωσης [46,47]. Τέλος, έρευνες έχουν δείξει πως φλεγμονώδεις αντιδράσεις διαμέσου κυτοκίνων, λόγω κυτταροτοξικού περιβάλλοντος, οδηγούν στην αυξορύθμιση του προσκολλητικού μορίου ICAM-1 σε παρακείμενα κύτταρα μέσω του NF-κβ και της ενεργοποίησης της p53 (wild type) [100]. Η αυξημένη έκφραση κυτοκίνων και προσκολλητικών μορίων έχει ως αποτέλεσμα την επιστράτευση των ανοσοκυττάρων στην περιοχή.



Εικόνα 2.9: Οι ενδοκυτταρικές και διακυτταρικές αποκρίσεις που επάγονται μετά από την ακτινοβολή των κυττάρων. Παρουσιάζονται τα κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται αυτοκρινικά και παρακρινικά από κυτοκίνες και ROS/RNS, βασικές κυτοκίνες που εκκρίνονται από ανοσοκύτταρα ή άλλα κύτταρα και η διαμεσολάβηση του οξειδωμένου εξωκυτταρικού DNA (ds/ecDNA) και των μακροφάγων στις αποκρίσεις παρακείμενων και απομακρυσμένων κυττάρων [47,83,84].

Μακροφάγα και άλλα ανοσοκύτταρα

Τα μακροφάγα είναι κύτταρα που χρησιμοποιούνται τόσο από το εγγενές όσο και από το επίκτητο ανοσοποιητικό σύστημα και επιστρατεύονται στα σημεία της φλεγμονής εκλύοντας ένα σύνολο κυτοκίνων, ROS και RNS. Ακτινοβολημένα ή προσβεβλημένα κύτταρα απελευθερώνουν παράγοντες (όπως οι κυτοκίνες) που διαφοροποιούν τα μονοκύτταρα σε μακροφάγα τα οποία στη συνέχεια προσελκύονται στα σημεία αυτά μαζί με άλλα ανοσοκύτταρα όπως είναι τα ουδετερόφιλα, τα Τ-λεμφοκύτταρα και τα δενδρικά

κύτταρα [101]. Ωστόσο, ανάλογα με τον τρόπο ενεργοποίησης τους τα μακροφάγα παρουσιάζουν διαφορετικούς φαινότυπους.

Υπάρχουν δύο τρόποι ενεργοποίησης: ο κλασικός και ο εναλλακτικός. Η κλασική ενεργοποίηση γίνεται από ένα πρωταρχικό σήμα μέσω της ιντερφερόνης IFN γ . Ακολουθεί η έκλυση χημοκίνων (όπως η IL-8/CXCL8, IP-10/CXCL10, MIP-1 α /CCL3, MIP-1 β /CCL4 και η RANTES/CCL5) οι οποίες προσελκύουν ουδετερόφιλα, φυσικά killer cells, ανώριμα δενδρικά κύτταρα και ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα. Επίσης, εκκρίνονται προφλεγμονικές κυτοκίνες (που περιλαμβάνουν τις: IL-1 β /IL-1F2, IL-6 και TNF- α) και πρωτεολυτικά ένζυμα. Η μη ελεγχόμενη έκκριση των παραπάνω μορίων συντελεί στην δημιουργία επιμένουσας φλεγμονής, δηλαδή ενός κυτταροτοξικού περιβάλλοντος που προκαλεί επιπλέον παράπλευρες βλάβες. Από την άλλη, η εναλλακτική ενεργοποίηση πραγματοποιείται μέσω των ιντερφερόνων IL-4 και IL-13 και οδηγεί στην έκλυση παραγόντων με αντιφλεμονώδη, ινωτική, πολλαπλασιαστική και αγγειογενετική δράση που συμβάλουν στην περιστολή της φλεγμονής και στην επούλωση του τραύματος [102].

Πολλές έρευνες υποδεικνύουν τη συμβολή των μακροφάγων στις ΜΣΕ όπως η ανίχνευση χρωμοσωμικής αστάθειας σε εκτεθειμένα αιμοποιητικά κύτταρα σε μέσο καλλιέργειας ακτινοβολημένων μακροφάγων. Η παραπάνω δράση των μακροφάγων είναι κυρίως αποτέλεσμα της φαγοκύττωσης ακτινοβολημένων αποπτωτικών κυττάρων όπως επίσης και νεκρών καρκινικών κυττάρων. Σε άλλα πειράματα έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα καταληκτικά σημεία (όπως οι βλάβες DNA) για την ανίχνευση ΜΣΕ που να εμπλέκουν τα μακροφάγα και την επιμένουσα φλεγμονώδη αντίδραση, επιβεβαιώνοντας την επιβλαβή δράση τους σε υγιείς ιστούς [47,101].

Εντούτοις, ο τρόπος που επάγονται οι ΜΣΕ, η επικοινωνία μεταξύ των μακροφάγων, η κίνηση τους στον οργανισμό και η αλληλεπίδρασή τους με τα υγιή ή προβληματικά κύτταρα αποτελούν μια περίπλοκη διαδικασία. Μερικά πιθανά ενδεχόμενα είναι τα παρακάτω. Είναι δυνατό μακροφάγα που έχουν εγκολπώσει αποπτωτικά κύτταρα να μετακινηθούν μέσω του κυκλοφορικού και να προκαλέσουν μέσω της έκλυσης RNS/ROS ή κυτοκίνων βλάβες σε απομακρυσμένα σημεία του οργανισμού. Η μετακίνηση αυτή μαζί με κινούμενες κυτοκίνες ενισχύει την κυκλοφορία παραγόντων που θα μπορούσαν να

προκαλέσουν ΜΣΕ σε διάφορες θέσεις στο σώμα, ωστόσο τα μακροφάγα φαίνεται να μεταφέρονται σε συγκεκριμένες περιοχές (όπως το δέρμα, το έντερο, η σπλίνα και σε άλλα προσβεβλημένα σημεία) [52,101]. Επίσης, ακόμα πιο πιθανό ενδεχόμενο είναι οι κυτοκίνες που έχουν απελευθερωθεί στο σημείο ακτινοβολήσης, είτε από τα μακροφάγα είτε από τα προσβεβλημένα κύτταρα, να μεταφερθούν και να προκαλέσουν φλεγμονώδη αντίδραση σε μακρινή θέση ενεργοποιώντας τα μακροφάγα που βρίσκονται στην περιοχή εκείνη. Τα ενεργοποιημένα (μέσω της κλασικής οδού) μακροφάγα τότε εκλύουν μια σειρά από προφλεγμονώδεις παράγοντες (όπως ROS, RNS, TNF- α , IL-6, COX-2 και iNOS) προκαλώντας τη δημιουργία οξειδωτικού στρες και οξειδωτικών βλαβών DNA οδηγώντας στην εγκαθίδρυση μια αυτοτροφοδοτούμενης κυταροτοξικής κατάστασης [47,102]. Με τους παραπάνω τρόπους επάγεται μια σειρά ΜΣΕ (λόγω ΙΑ ή καρκίνου) σε απομακρυσμένους ιστούς, οι οποίες εξαρτώνται άμεσα από το φαινότυπο των ενεργοποιημένων ανοσοκυττάρων.

2.5.3.3. Γενωμική αστάθεια και έκφραση DNA

Γενωμική αστάθεια

Η πολύπλευρη γενωμική αστάθεια είναι μια συνέπεια της ΙΑ που παρουσιάζουν εκτός από τα άμεσα ακτινοβολημένα κύτταρα και οι απόγονοι τους για πολλές γενιές αργότερα. Παρουσιάζεται σε κύτταρα της ακτινοβολημένης περιοχής όπως και σε εκείνα που βρίσκονται σε απομακρυσμένες περιοχές. Η σημασία της γενωμικής αστάθειας εκτός από καταληκτικό σημείο της ακτινοβολίας για τα εντός ή εκτός πεδίου κύτταρα αποτελεί βασικό ενισχυτικό παράγοντα διατάραξης της ομοιόστασης των κυττάρων [50]. Η διαταραχή αυτή συνήθως οδηγεί σε παρατεταμένες φλεγμονώδεις αποκρίσεις του οργανισμού, δημιουργία οξειδωτικού ή αντιγραφικού στρες και περαιτέρω βλάβες του γονιδιώματος. Ήδη έχουμε αναφερθεί σε στοιχεία που δείχνουν βλάβες στο γονιδίωμα κυττάρων εκτός πεδίου στόχευσης, όμως όταν αυτές αφορούν σε σημαντικά γονίδια για τη λειτουργία του κυττάρου, όπως γονίδια που έχουν σχέση με πρωτεΐνες που ρυθμίζουν της σύνθεση ROS και RNS ή με πρωτεΐνες που ελέγχουν την ανάπτυξη και τον

πολλαπλασιασμό του κυττάρου, τότε τα αποτελέσματα είναι καταστροφικά [47,53]. Οι συνέπειες αυτές μπορεί να είναι ο κυτταρικός θάνατος, ο κακοήθης μετασχηματισμός και οι OCDLs, εν μέσω της δημιουργίας και περεταίρω ενίσχυσης ενός έντονα κυτταροτοξικού περιβάλλοντος. Ακόμη, οι περισσότερες έρευνες δεν έχουν καθορίσει κάποια συσχέτιση μεταξύ δόσης και απόκρισης για τα λεγόμενα καθυστερημένα αποτελέσματα καθώς αυτά δε φαίνεται να διευρύνονται με την αύξηση της δόσης [38,50]. Επιπλέον, με την παρατήρηση διαφόρων καταληκτικών σημείων (αλλά κυρίως των χρωμοσωματικών ανωμαλιών) έχουν διαπιστωθεί αρκετές διαφορές στην έκφραση της γονιδιωματικής αστάθειας που ίσως οφείλονται στο κυτταρικό είδος ή το γενότυπο, με άλλους παράγοντες επίσης να εμπλέκονται όντας μη ξεκαθαρισμένο το τοπίο ακόμη.

Επιγενετικοί και άλλοι παράγοντες ρύθμισης της γονιδιωματικής έκφρασης

Σε όλα σχεδόν τα φαινόμενα γονιδιωματικής αστάθειας μη στοχευμένων κυτταρικών πληθυσμών τα πειραματικά δεδομένα φανερώνουν πως σημαντικό ρόλο παίζουν επιγενετικοί μηχανισμοί, τα σηματοδοτικά μονοπάτια των κινασών MARK και ρυθμιστικοί παράγοντες όπως ο NF-κB και η p53 [47,84]. Η διαταραγμένη ή τροποποιημένη έκφραση γονιδίων απαραίτητων για βασικές κυτταρικές λειτουργίες συνοδεύει και σε πολλές φορές καθορίζει την εμφάνιση των ΜΣΕ, γεγονός που έχουμε υποδείξει σε διάφορες περιπτώσεις παραπάνω. Η ΙΑ έχει αποδειχτεί ότι αποτελεί σημαντικό παράγοντα πρόκλησης επιγενετικών τροποποιήσεων. Όταν οι βλάβες που επάγονται στο DNA δεν περιλαμβάνουν μεγάλο αριθμό DSBs αλλά αντίθετα διάφορες άλλες οξειδωτικές βλάβες, παρατηρείται αύξηση των επιπέδων ROS για μεγάλο χρονικό διάστημα χωρίς όμως να ακολουθεί απόπτωση. Σε αυτό το φαινόμενο πιθανώς συμβάλουν επιγενετικές αλλαγές, με τις ROS να εμπλέκονται σημαντικά [103,104]. Με αυτό τον τρόπο ίσως εξηγούνται εν μέρει και οι καθυστερημένες αποκρίσεις στην ΙΑ σε τοπικό ή συστημικό επίπεδο.

Σε πολλά πειράματα έχουν εξεταστεί τα κυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια και οι παράγοντες που επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων που συνοδεύει την εμφάνιση ΜΣΕ της ΙΑ. Έρευνα πάνω στο σύνολο του γονιδιώματος ανθρώπινων πνευμονικών

ινοβλαστών ακτινοβολημένων και εκτεθειμένων στο μέσο καλλιέργειας ακτινοβολημένων κυττάρων, έχοντας ως καταληκτικό σημείο την μικροπυρήνωση, έδειξε πως γονίδια των οποίων η έκφραση ρυθμίζεται από τον παράγοντα NF-κβ, όπως το COX-2, το BCL2A1 ή το IL-8 παρουσίασαν παρόμοια έκφραση σε ακτινοβολημένα και παρακείμενα κύτταρα [105]. Αντίθετα, γονίδια εξαρτώμενα από τη ρυθμιστική πρωτεΐνη p53 εκφράστηκαν κυρίως στα ακτινοβολημένα κύτταρα. Ο ρυθμιστικός παράγοντας NF-κβ όπως έχουμε δει έως το σημείο αυτό, φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο στην επαγωγή ΜΣΕ. Καθότι αποτελεί κεντρικό κόμβο της εγγενούς ανοσολογικής απόκρισης διαμεσολαβεί στην παραγωγή κυτοκίνων και ROS, ενώ επιπλέον ενεργοποιείται από κυτοκίνες ή κυτταρικό στρες. Από την άλλη, η p53 επίσης συνδέεται με τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις και συμμετέχει στην εμφάνιση ΜΣΕ, λειτουργώντας ωστόσο με διαφορετικό τρόπο στη κυτταρική σηματοδότηση μέσω της μιτοχονδριακής αποπτωτικής οδού [47,84,97]. Σε άλλη έρευνα, με ανάλυση μικροσυστοιχίας DNA (microarray) και καταληκτικό σημείο την απόπτωση και τη μικροπυρήνωση παρακείμενων κυττάρων εμφανίστηκε αυξημένη έκφραση γονιδίων σχετιζόμενων με την εξωκυτταρική σηματοδότηση, αυξητικούς παράγοντες και διάφορους υποδοχείς δηλαδή στοιχείων που σχετίζονται με την κυτταρική επικοινωνία [106]. Ακόμη, η έκλυση ROS και κυτοκίνων είτε από τα ακτινοβολημένα κύτταρα είτε από τα μακροφάγα μπορεί να λειτουργήσει ως μιτογόνο ερέθισμα ενεργοποιώντας τη διαδικασία αντιγραφής. Με αυτόν τον τρόπο φαίνεται να επάγεται η έντονη έκφραση του Cdc6 (cell division cycle 6), παράγοντα με έντονη παρουσία στη φάση G1 που ρυθμίζει την αντιγραφή του DNA, οδηγώντας σε αντιγραφικό στρες που με τη σειρά του μπορεί να προκαλέσει γονιδιωματική αστάθεια και κακοήγη μετασχηματισμό [107]. Από την άλλη, ορισμένοι υποστηρίζουν ότι στην πραγματικότητα η εμφάνιση ενός από τα παραπάνω αποτελέσματα δεν προκύπτει από την αλλαγμένη έκφραση κάποιου μεμονωμένου γονιδίου ή ενός βιοχημικού μονοπατιού αλλά εμπλέκει πολλαπλά μοριακά μονοπάτια και γεγονότα σχετιζόμενα με τον ασταθή φαινότυπο των κυττάρων [38]. Ωστόσο, μπορούμε να συμπεράνουμε πώς, είτε λόγω βλάβης γονιδίων που ρυθμίζουν ζωτικές κυτταρικές λειτουργίες είτε λόγω της διακυτταρικής επικοινωνίας,

η ρύθμιση ενός ή πολλαπλών βιοχημικών σηματοδοτικών μονοπατιών τροποποιεί τους επιγενετικούς μηχανισμούς των κυττάρων επάγοντας ένα πλήθος σοβαρών επιπτώσεων.

2.5.3.4 Μη στοχευμένες επιδράσεις λόγω παρουσίας όγκου

Η ύπαρξη κακοήθειας ή κυττάρων που παρουσιάζουν γυρασμένο φαινότυπο έχει αποδειχθεί πως αποτελεί παράγοντα που δύναται να προκαλέσει ΜΣΕ σε διάφορα σημεία του οργανισμού. Οι κυτταροτοξικές συνθήκες που δημιουργούνται, οι φλεγμονώδεις αποκρίσεις και ο τρόπος επαγωγής αυτών των αποτελεσμάτων εμφανίζουν πολλές ομοιότητες με εκείνα της ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Γι αυτό το λόγο θα αναφερθούμε σε αυτά τα σημεία περιληπτικά στην ενότητα αυτή.

Κύτταρα που παρουσιάζουν γηρασμένο φαινότυπο, έχοντας επιμένουσες βλάβες στο DNA εκλύουν προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως η IL-6, μέσω μιας διαδικασίας εξαρτώμενης από τις DDR πρωτεΐνες ATM, NBS1 και CHK2 [47]. Με αυτόν τον τρόπο, δημιουργούν ένα χρόνιο φλεγμονώδες περιβάλλον το οποίο επάγει βλάβες σε παρακείμενα ή ακόμη και απομακρυσμένα κύτταρα.

Τα καρκινικά κύτταρα, όπως είδαμε, είτε μέσω της ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος (έκλυση κυτοκίνων και ενεργοποίηση μακροφάγων) είτε μέσω της απελευθέρωσης οξειδωμένου εξωκυτταρικού DNA μπορούν να έχουν διάφορες συστημικές επιπτώσεις, όπως είναι η επαγωγή οξειδωτικού στρες. Τα κακοήθη κύτταρα εκλύουν κυτοκίνες, χημοκίνες, αυξητικούς παράγοντες, προσταγλανδίνες και ROS τα οποία οδηγούν σε μεσεγχυματική μετατροπή των κυττάρων και φλεγμονή. Είναι ευρέως διαπιστωμένο πως το κυτταροξικό περιβάλλον που δημιουργείται προκαλεί βλάβες στο DNA και σε πρωτεΐνες στα κύτταρα που βρίσκονται κοντά στον όγκο [47,91].

Επιπλέον, σε πειράματα των Redon κ.α. (2010) [52] βρέθηκε ότι η παρουσία καρκίνου μπορεί να επιδράσει σημαντικά σε απομακρυσμένους ιστούς. Σε αυτό χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια με τρία είδη κακοήθειας και ως καταληκτικό σημείο οι σύνθετες βλάβες DNA OCDLs και DSBs σε διάφορους ιστούς. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν πως ιστοί με μεγάλο πολλαπλασιαστικό ρυθμό, όπως το δέρμα και το γαστρεντερικό, επηρεάστηκαν σε

μεγαλύτερο βαθμό. Ακόμη, αυξημένα επίπεδα ώριμων F4/80⁺ μακροφάγων βρέθηκαν σε όλους τους εξεταζόμενους ιστούς. Επίσης, ανάμεσα σε 40 κυτοκίνες που μελετήθηκαν διαπιστώθηκαν αυξημένα επίπεδα στις χημοκίνες CCL2, CCL4, CCL7 και CXCL10, ο ρόλος των οποίων είναι η προσέλκυση ή ενεργοποίηση διάφορων κυττάρων της ανοσοάμυνας. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως στο συκώτι, παρά τον υψηλό κυτταρικό πολλαπλασιαστικό ρυθμό του, βρέθηκαν αρκετά χαμηλότερα επίπεδα OCDLs και DSBs, φαινόμενο που πιθανώς αποδίδεται στην υψηλή συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών ουσιών του που παρέχουν προστασία του πυρηνικού DNA από τις ελεύθερες ρίζες.

Κεφάλαιο 3

Μέθοδος

3.1. Εισαγωγή

Για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων διαφόρων κυτταροτοξικών παραγόντων όπως η ΙΑ, η παρουσία καρκίνου ή επιβλαβών χημικών ουσιών βασικό στοιχείο αξιολόγησης αποτελούν οι βλάβες στο πυρηνικό DNA και ιδιαιτέρως σημαντικό βιολογικά δεδομένο αποτελούν οι ομαδοποιημένες και σύνθετες βλάβες. Ο ποσοτικός προσδιορισμός και η ταυτοποίηση των διάφορων πυκνά εντοπισμένων βλαβών DNA, τόσο των DSBs όσο και των διάφορων ειδών OCDLs, κρίνεται απαραίτητος για αυτό το σκοπό. Για τον εντοπισμό πολύ κοντινών βλαβών σε μικρή απόσταση ζεύγους βάσεων και σε απέναντι κλώνους έχει αναπτυχθεί για όλους τους κυτταρικούς τύπους μία σχετικά ακριβής τεχνική όπου χρησιμοποιείται ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αγαρόζης (gel), οπτική απεικόνιση και η μέθοδος της αριθμητικής ανάλυσης μέσου μήκους NALA (Number Average Length Analysis) [108, 109].

Στην περίπτωση που οι βλάβες βρίσκονται μόνο στον ένα κλώνο μπορούν να βρεθούν μέσω χημικής ή ενζυμικής υδρόλυσης του DNA και στην συνέχεια να ταυτοποιηθούν μέσω χρωματογραφικών ή φασματοσκοπικών τεχνικών. Ωστόσο, αυτές οι μέθοδοι επειδή αλλοιώνουν τη γεωμετρία των ομαδοποιημένων βλαβών καθίστανται ακατάλληλες για τον εντοπισμό βλαβών που βρίσκονται σε απέναντι κλώνους. Γι' αυτό το λόγο

προκειμένου να εξακριβωθεί ποσοτικά το ακριβές είδος των βλαβών αυτών πρέπει να χρησιμοποιηθούν ειδικοί παράγοντες που κόβουν τις αλυσίδες του DNA σε αυτά τα σημεία, δημιουργώντας διπλή ρήξη της αλυσίδας στη θέση που βρισκόταν η ομαδοποιημένη βλάβη. Το ρόλο αυτό μπορούν να τον επιτελέσουν ένζυμα με συγκεκριμένες λειτουργίες τα οποία συμμετέχουν στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA.

Εν συντομία, στη συνέχεια για την ανίχνευση των διάφορων μορφών OCDLs μέσω ηλεκτροφόρησης ειδικά επεξεργασμένου πηκτώματος με φθορίζουσα χημική ουσία (βρωμιούχο αιθίδιο) μπορούν να υπολογιστούν οι επιπλέον DSBs που έχουν δημιουργηθεί από τη δράση των ενζύμων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται κατάλληλο σύστημα ηλεκτρονικής απεικόνισης για την απόκτηση της εικόνας του πηκτώματος όπου φαίνεται η διασπορά των μορίων του DNA σύμφωνα με το μήκος τους. Η εικόνα υφίσταται επεξεργασία με πρόγραμμα πυκνομετρίας και ακολουθεί ανάλυση των δεδομένων μέσω της NALA για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ομαδοποιημένων βλαβών σε απέναντι κλώνους [108,109].

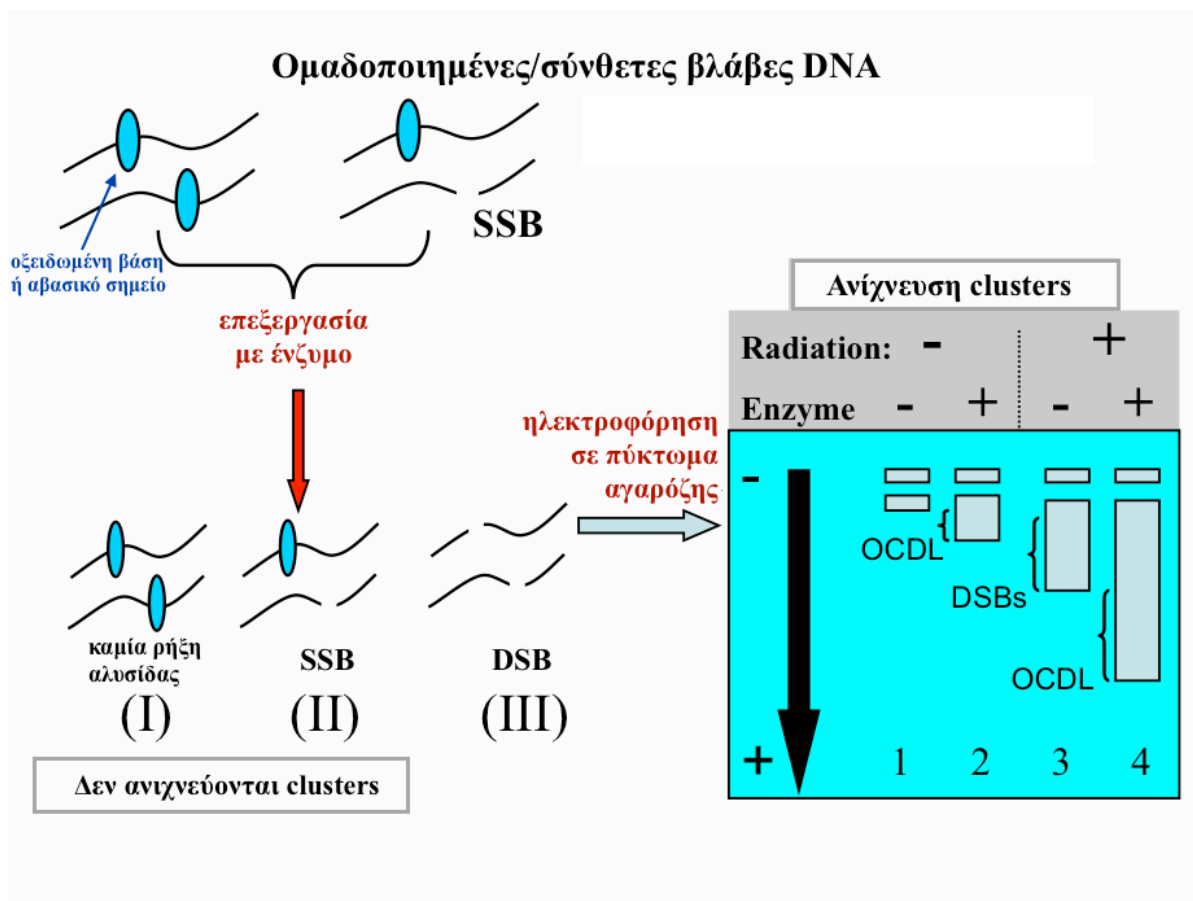
3.2. Η λειτουργία των ενζύμων

Η πρόκληση DSBs στο DNA που έχει απομονωθεί από ανθρώπινα κύτταρα ή θηλαστικών βασίζεται στην ιδέα πως τα επιδιορθωτικά ένζυμα του μηχανισμού BER θα δράσουν σε *in vitro* συνθήκες με τον ίδιο τρόπο με τον οποίο λειτουργούν *in vivo*, δηλαδή κόβοντας την αλυσίδα του DNA στην θέση που βρίσκεται η βλάβη που αναγνωρίζουν. Τα ένζυμα αυτά και το αντίστοιχο υπόβαθρο δράσης τους είναι τα εξής: οι ενδονουκλεάσες *E.coli* Nfo και hAPE1 ανιχνεύουν διάφορων ειδών αβασικά σημεία όπως τα οξειδωμένα αβασικά σημεία, οι γλυκοσυλάσες *E.coli* Fpg και hOGG1 ανιχνεύουν τις οξειδωμένες πουρίνες και ορισμένα αβασικά σημεία ενώ η ανθρώπινη ή προερχόμενη από την *E.coli* γλυκοσυλάση Nth1 ανιχνεύει τις διάφορες οξυπυριμιδίνες. Με αυτό τον τρόπο κάθε ένζυμο μπορεί να ανιχνεύσει ένα συγκεκριμένο σύμπλεγμα βλαβών. Για παράδειγμα, η hAPE1 δημιουργεί DSBs όταν υπάρχουν σε κοντινές απέναντι θέσεις διάφορων μορφών αβασικά σημεία ή

συνδυασμός αβασικού σημείου και μονόκλωνης ρήξης του DNA [108,110].

3.2.1. Ενζυμική επώαση του DNA

Αρχικά το DNA που θα χρησιμοποιηθεί θα πρέπει να έχει εξαχθεί με τέτοιο τρόπο ώστε να έχει το μέγιστο δυνατό μήκος και να αποφευχθούν μονόκλωνες ή δίκλωνες ρήξεις. Σημαντικό είναι να παραχθούν οι κατάλληλες συνθήκες (και το απαραίτητο υπόστρωμα) για να δράσει το περιοριστικό ένζυμο με το συγκεκριμένο τρόπο που προβλέπεται αποφεύγοντας άλλες επενέργειες. Ακόμη, πρέπει να συνεκτιμηθούν κατά τους υπολογισμούς δύο στοιχεία, δηλαδή ότι τα ένζυμα δρουν διαφορετικά σε συμπλέγματα βλαβών απ' ό,τι θα λειτουργούσαν σε μεμονωμένες βλάβες και πως ανάλογα με την μορφή του συμπλέγματος έχουν και διαφορετική αποτελεσματικότητα.



Εικόνα 3.1: Οι αρχές και η μέθοδος ανίχνευσης ομαδοποιημένων οξειδωτικών βλαβών DNA σε απέναντι κλώνους μέσω ηλεκτροφόρησης πηκτώματος αγαρόζης. Προϋπόθεση για την ανίχνευση των βλαβών είναι το ένζυμο με περιοριστική δράση με το οποίο θα επωαστούν τα δείγματα DNA να προκαλέσει ρήξη των κλώνων DNA στα σημεία όπου βρίσκονται οι βλάβες έτσι ώστε να

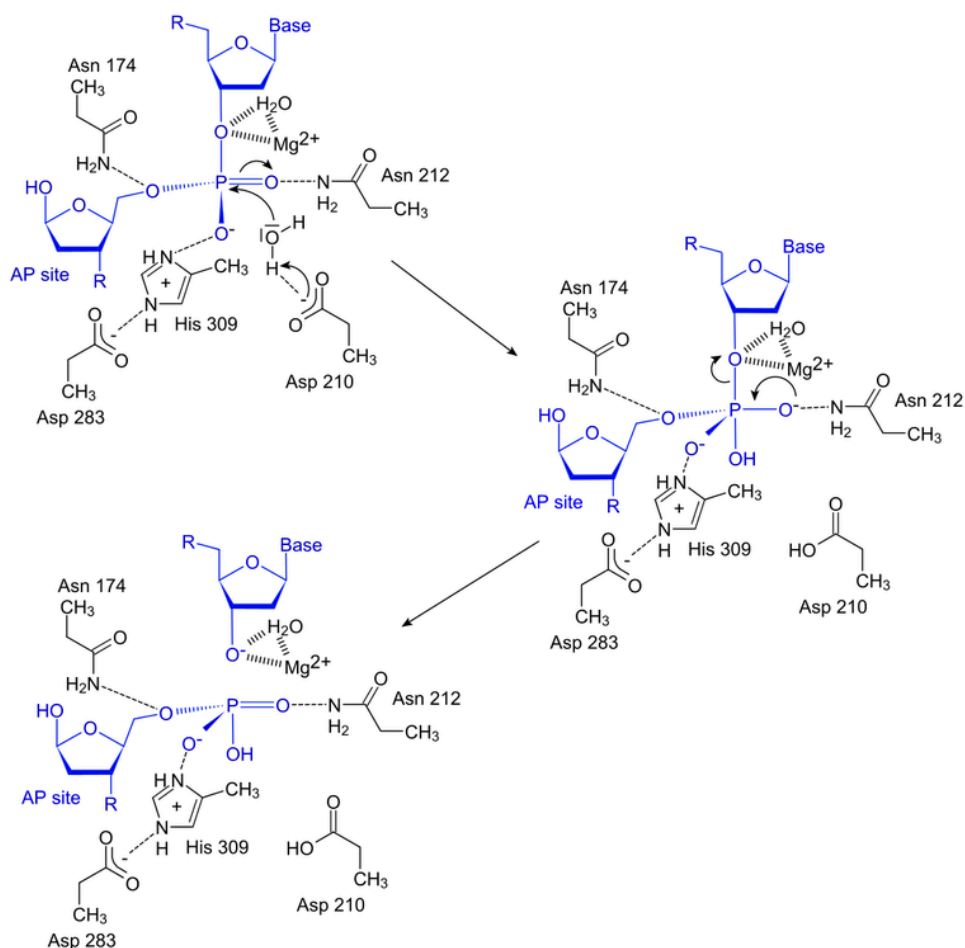
προκύψουν DSBs και ως εκ τούτου μικρότερα μόρια DNA [110].

Εφόσον εκτιμηθεί επακριβώς ποσοτικά η δραστικότητα του ενζύμου ακολουθεί η παρακάτω διαδικασία συνοπτικά. Το DNA πριν την επώαση συνήθως πρέπει να μείνει για λίγα λεπτά με το ένζυμο στον πάγο έτσι ώστε να μπορέσει να ενσωματωθεί κατάλληλα. Στη συνέχεια και αφού έχει προηγηθεί η επώαση του DNA σε συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας με την απαραίτητη ποσότητα ενζύμου στον απαιτούμενο χρόνο, ακολουθεί η διακοπή της αντίδρασης με κατάλληλο διάλυμα. Το διάλυμα αυτό πρέπει να σταματά πλήρως τη δράση του ενζύμου, να μην αλλοιώνει το DNA και να μην παρεμποδίζει την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης που έπεται. Το διάλυμα με το DNA που έχει επωαστεί με το ένζυμο μαζί με το αντίστοιχο που δεν έχει επωαστεί εισάγονται στο πήκτωμα για να ηλεκτροφορηθούν [108,110].

3.2.2. Η ενδονουκλεάση hAPE1

Η hAPE1 (human AP-endonuclease-1) είναι μια ανθρώπινη επιδιορθωτική πρωτεΐνη, του μηχανισμού επιδιόρθωσης με εκτομή βάσης BER όπως είδαμε, ανήκει στην οικογένεια 2 των ενδονουκλεασών και ανιχνεύει οξειδωμένα αβασικά σημεία και αβασικά σημεία που έχουν αλλοιωθεί από αλκυλαμίνες ή περιέχουν υπολείμματα ουρίας. Αποτελείται από διάφορες καταλυτικές αμινοξικές ομάδες που δρουν επιλεκτικά για κάθε είδος αβασικού σημείου. Εκτός από μεμονωμένες βλάβες, η ενδονουκλεάση αυτή είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική και στα περισσότερα συμπλέγματα βλαβών που περιέχουν αβασικά σημεία, αφήνοντας DSB αφού δράσει. Λιγότερο αποτελεσματική είναι στην περίπτωση όπου υπάρχουν αβασικά σημεία σε απέναντι κλώνους και μέσα σε απόσταση 3 ζ.γ. στην κατεύθυνση 3'. Ακόμη, σε σύγκριση με άλλα ένζυμα αντίστοιχης δράσης όπως η ενδονουκλεάση Nfo, παρουσιάζει περισσότερο αποδοτική λειτουργία. Η αποτελεσματικότητα στην επεξεργασία των AP σημείων εξαρτάται γενικά, εκτός των παραπάνω, από τη σχετική τους θέση και τον προσανατολισμό τους στο μόριο του DNA. Η hAPE1 όταν αναγνωρίσει μία θέση του DNA χωρίς βάση κόβει τον κλώνο στον φωσφοδιεστερικό δεσμό με τον παρακάτω τρόπο. Αρχικά, η υποομάδα Asp210 αφαιρεί

στην συγκεκριμένη περιοχή ένα πρωτόνιο από ένα μόριο νερού και πραγματοποιεί πυρηνόφιλη επίθεση στη φωσφορική ομάδα που βρίσκεται στο σημείο 5' προς την αβασική θέση. Στη συνέχεια, ηλεκτρόνια από το άτομο του οξυγόνου της φωσφορικής ομάδας διώχνοντας εκείνα του άλλου ατόμου οξυγόνου, δημιουργούν ένα άκρο 5'-dRP (5'-deoxyribose-5-phosphate) στο αβασικό σημείο και ένα άκρο 3'-OH στο κανονικό νουκλεοτίδιο. Απαραίτητο για τη δημιουργία και σταθεροποίηση της τομής είναι το ιόν Mg^{2+} [111].



Εικόνα 3.2: Ο μηχανισμός τομής του κλώνου DNA από την hAPE1 με την εξειδικευμένη δράση των υποομάδων της.

Γνωστές χημικές ουσίες με ανασταλτική δράση είναι το καρβοξυλικό οξύ NCA (7-nitroindole-2-carboxylic acid) και η λουκανθόνη (η οποία χρησιμοποιείται στην χημειοθεραπεία) που όταν βρίσκονται κοντά στο αβασικό σημείο παρεμποδίζουν την

λειτουργία της hAPE1 [112]. Η hAPE1 πέρα από τον βασικό ρόλο που έχει στον μηχανισμό BER έχει ακόμη και οξειδοαναγωγική λειτουργία που συντελεί στην ενεργοποίηση άλλων ενζύμων των επιδιορθωτικών μηχανισμών του DNA.

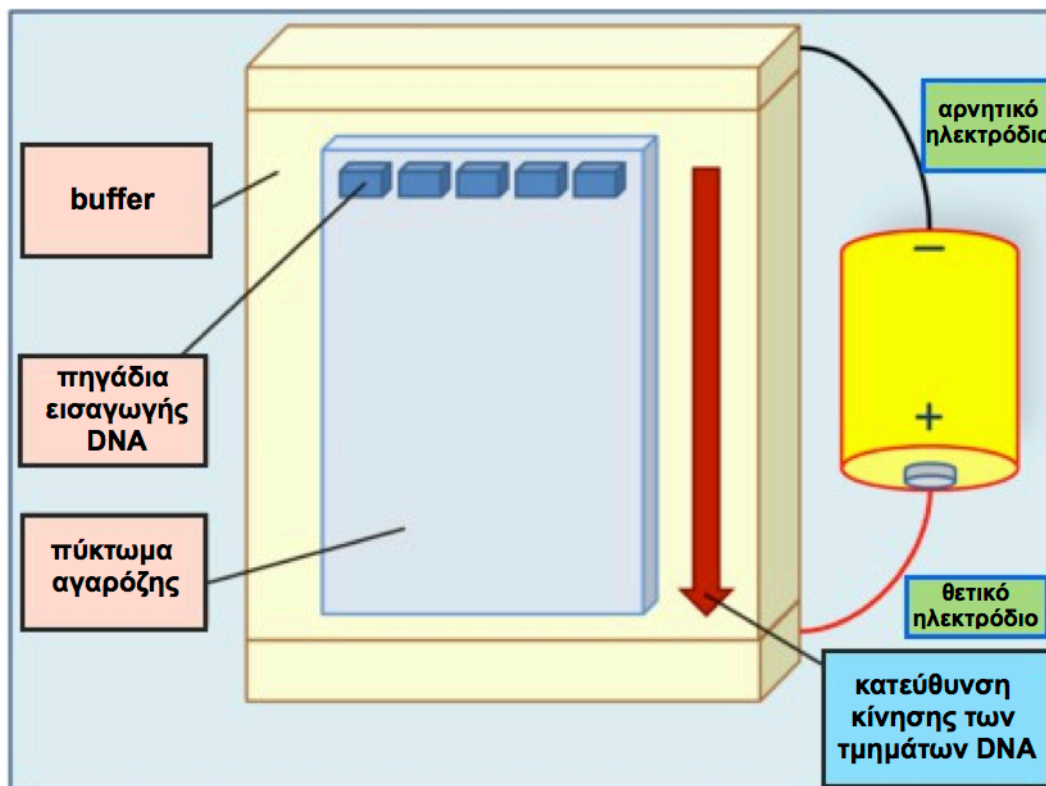
Τέλος, για εκτίμηση της δραστηριότητας των ενζύμων είναι απαραίτητη η γνώση τριών μεγεθών, της σταθερά k_{cat} , της αναλογίας k_{cat}/K_m και της σταθεράς χημικού ρυθμού $k_{chemistry}$. Η σταθερά $k_{chemistry}$ δείχνει το ρυθμό του πραγματοποιείται μια λειτουργία όπως το κόψιμο του φωσφοδιεστερικού δεσμού από την hAPE1. Η σταθερά k_{cat} αντιστοιχεί στον αριθμό των αντιδράσεων που καταλύει ένα ένζυμο ανά μονάδα χρόνου ενώ σε σχέση με την τιμή K_m (που δείχνει την συγκέντρωση του υποστρώματος όπου το ένζυμο φτάνει το μισό της μέγιστης ταχύτητάς του) μπορεί να καθοριστεί συνολικότερα η καταλυτική αποτελεσματικότητά του. Στα περισσότερα ένζυμα του BER η $k_{chemistry}$ είναι αρκετά μεγαλύτερη από την k_{cat} όπως στην hAPE1 που δημιουργεί τομές στο DNA με ρυθμό $>700/s$. Η hAPE1 είναι από τα πιο γρήγορα και αποδοτικά ένζυμα του BER καθώς ακόμη και η μικρή τιμή της k_{cat} (δημιουργία περίπου 2 προϊόντων/s) αντισταθμίζεται από την άφθονη παρουσία της (350.000 – 7.000.000 μόρια σε κάθε κύτταρο) [31].

3.3. Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια εργαστηριακή μέθοδος που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό φορτισμένων ουσιών (DNA, πρωτεΐνες) αναλογικά με το μοριακό τους βάρος. Το DNA όταν βρίσκεται σε διάλυμα είναι φορτισμένο λόγω του ιονισμού της ομάδας COO^- και γι' αυτό μετακινείται, καθώς του ασκείται η δύναμη Coulomb ($F = q \times E$), από τον αρνητικό πόλο του ηλεκτρικού πεδίου που εφαρμόζεται προς το θετικό [6]. Διάφορες ηλεκτροφορητικές ρυθμίσεις χρησιμοποιούνται, όπως η ένταση και το είδος του πεδίου, ανάλογα με το μέγεθος των μορίων που θέλουμε να διαχωρίσουμε. Για παράδειγμα, για μόρια DNA ως 40kbp χρησιμοποιούμε σταθερό ηλεκτρικό πεδίο έτσι ώστε να εξασφαλίσουμε τη διασπορά τους ως μονοτονική συνάρτηση του μήκους τους [108]. Για τον καλύτερο ηλεκτροστατικό διαχωρισμό χρησιμοποιείται πήκτωμα αγαρόζης για δύο

κύριους λόγους. Η πηκτή εμποδίζει, ως ένα βαθμό, τα ρεύματα που δημιουργούνται από μικρές βαθμιδώσεις της θερμοκρασίας στις διάφορες περιοχές του πηκτώματος έτσι ώστε να γίνει ομοιότροπα ο διαχωρισμός σε όλη την περιοχή. Ακόμη, το πήκτωμα λειτουργεί ως μοριακό φίλτρο ακινητοποιώντας τα μεγάλα μόρια (σε σχέση με τους πόρους της) και αφήνοντας να διέλθουν τα μόρια ενδιάμεσου μεγέθους σε διάφορες ταχύτητες [6].

Το πήκτωμα αγαρόζης εκτός από μέσο διαχωρισμού θα χρησιμοποιηθεί και ως οπτικό μέσο στη συνέχεια και γι' αυτό το λόγο η αγαρόζη θα πρέπει να διαλυθεί πλήρως σε αποστειρωμένο διάλυμα συγκεκριμένου pH δημιουργώντας ένα ομοιογενές διάλυμα. Πριν (ή και μετά) την ηλεκτροφόρηση εμποτίζουμε στο διάλυμα μια συγκεκριμένη χρωστική ουσία (συνήθως βρωμιούχο αιθίδιο) η οποία προσδένεται στο DNA και το σήμα της στην οπτική απεικόνιση θα είναι ανάλογο της ποσότητας του DNA αυτού [108].



Εικόνα 3.1: Διάταξη ηλεκτροφόρησης όπου φαίνεται η πηγάδια εισόδου των μορίων DNA στο πήκτωμα αγαρόζης, το οποίο βρίσκεται σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (buffer), και η

κατεύθυνση κίνησης του προς το θετικό ηλεκτρόδιο εφόσον έχουν αρνητικό φορτίο. Η ταχύτητα κίνησης των μορίων DNA είναι ανάλογη του μοριακού τους βάρους και γι' αυτό μπορούν να διακριθούν μεταξύ τους.

3.4. Απεικόνιση

Για την ακριβή ποσοτική απεικόνιση κάθε λωρίδας DNA από το πήκτωμα αγαρόζης είναι απαραίτητα τα παρακάτω οπτικά εργαλεία. Μία λάμπα UV από την οποία εκπέμπεται στο πήκτωμα το απαιτούμενο φως έτσι ώστε να προκληθεί ο φωσφορισμός της χρωστικής ουσίας σε όλα τα σημεία του. Ο φωτισμός λοιπόν πρέπει απαραίτητα να είναι ομοιόμορφος και με κατάλληλη διασπορά. Το οπτικό σύστημα συλλογής του φθορίζοντος φωτός, που χρησιμοποιείται επίσης, πρέπει να έχει τα απαραίτητα φίλτρα που να εμποδίζουν το φως που έρχεται απευθείας από την UV λάμπα. Για την καταγραφή του φθορισμού του χρησιμοποιείται μια κάμερα τύπου CCD. Η ανίχνευση με CCD κάμερες παρέχει ακριβή και γραμμική καταγραφή του σήματος φθορισμού σε υψηλής ανάλυσης ψηφιακή φωτογραφία που χρειάζεται για την περαιτέρω επεξεργασία [108].

3.5. Ανάλυση μέσου μοριακού βάρους

Μετά τη φωτογράφιση του πηκτώματος αγαρόζης μπορούμε με τη χρήση προγράμματος πυκνομετρίας να επιλέξουμε κάθε λωρίδα DNA και να πάρουμε τα αντίστοιχα διαγράμματα διασποράς. Στη συνέχεια θα βασιστούμε στις αρχές της ανάλυσης μέσου μοριακού βάρους - NALA για την απαιτούμενη επεξεργασία τους ώστε να εκτιμηθούν οι βλάβες κάθε δείγματος DNA. Η ανάπτυξη της μεθόδου αυτής είναι ιδιαίτερης σημασίας καθώς δεν υπάρχει θεωρητική πρόβλεψη για τη ακριβή διασπορά των ομαδοποιημένων βλαβών στο μόριο του DNA. Η NALA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό βλαβών αυτών στα μόρια DNA, που έχουν κοπεί σε μικρότερα τμήματα και διακριθεί μέσω ηλεκτροφόρησης, καθώς βασίζεται στην μέτρηση του μέσου μήκος ετερογενών πληθυσμών DNA [108,109].

Αν έχουμε ένα πληθυσμό N_a δίκλωνων μορίων DNA όπου το i -οστό μόριο έχει L_i ζεύγη βάσεων, τότε το μέσο μήκος των μορίων του πληθυσμού ορίζεται σύμφωνα με τον τύπο:

$$L_{\alpha} = \sum_{i=1}^N L_i / N_{\alpha} \quad (1)$$

όπου ο δείκτης "α" αναφέρεται στα μόρια DNA που δεν έχουν υποστεί ενζυμική επεξεργασία.

Στην συνέχεια αφού έχει προηγηθεί επώαση με την ενδονουκλεάση hAPE1 (ή κάποια άλλη ενδονουκλεάση) θα προκύψουν M DSBs μειώνοντας αντίστοιχα το μήκος των μορίων. Έτσι θα υπάρχουν πλέον $N_{\varepsilon} = N_{\alpha} + M$ μόρια DNA, όπου ο δείκτης "ε" αντιστοιχεί στα επωασμένα-επεξεργασμένα και το μέσο μήκος των οποίων δίνεται από τον τύπο:

$$L_{\varepsilon} = \sum_{i=1}^N L_i / N_{\varepsilon} \quad (2)$$

Καθώς ο αριθμός των ζευγών βάσεων παραμένει ίδιος στους δυο πληθυσμούς μπορεί να αντικατασταθεί από την έκφραση N_{bp} . Στη συνέχεια αν διαιρέσουμε τη σχέση $M = N_{\varepsilon} - N_{\alpha}$ με την ποσότητα N_{bp} προκύπτει ο τύπος:

$$\Phi = \frac{N_{\varepsilon}}{N_{bp}} - \frac{N_{\alpha}}{N_{bp}}$$

ο οποίος σύμφωνα με τις σχέσεις (1) και (2) γίνεται :

$$\Phi = \frac{1}{L_{\varepsilon}} - \frac{1}{L_{\alpha}} \quad (3)$$

Με αυτόν τον τρόπο το μέγεθος Φ δείχνει τη πιθανότητα ή συχνότητα επαγωγής DSBs ανά ζεύγη βάσεων εφόσον έχουμε καθορίσει πρώτα το μέσο μήκος των μορίων που έχουν επωαστεί με το ένζυμο και εκείνων που δεν έχουν. Καθώς το πλήθος των DSBs που θα έχει δημιουργηθεί αντιστοιχεί στις θέσεις των ομαδοποιημένων οξειδωτικών βλαβών σε απέναντι κλώνους, θα έχουμε τελικά μια αρκετά ακριβή ποσοτική εκτίμηση των βλαβών αυτών.

Εκτέλεση πειράματος

4.1. Σκοπός

Τα στοιχεία που συσσωρεύονται τα τελευταία χρόνια από κλινικές μελέτες και εργαστηριακές έρευνες για τις επιπτώσεις τις ιοντίζουσας ακτινοβολίας σε παρακείμενους και απομακρυσμένους ιστούς έχουν φέρει σημαντικές αλλαγές στην ανάπτυξη των μεθόδων ακτινοθεραπείας και σοβαρές τροποποιήσεις στην εκτίμηση της ακτινοευαισθησίας. Για την επαρκή αξιοποίηση και αξιολόγηση των δεδομένων αυτών απαιτείται τόσο ανάλυση των μηχανισμών επαγωγής και των εμπλεκόμενων παραγόντων όσο και ακριβής μέτρηση και ταυτοποίηση των αποτελεσμάτων αυτών. Συνεπώς, η ποιοτική και ποσοτική εξακρίβωση των βλαβών DNA, λόγω της τεράστιας βιολογικής τους σημασίας, αποτελεί βασικό στόχο για την μελέτη των ΜΣΕ της ΙΑ. Σε αυτό το πλαίσιο αντικείμενο έρευνας αυτής της εργασίας αποτελούν τα συμπλέγματα βλαβών DNA σε απομακρυσμένους ιστούς, βλάβες ιδιαίτερα ανθεκτικές στους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς των κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, θα επιχειρήσουμε να πραγματοποιήσουμε μια ποσοτική εκτίμηση των ομαδοποιημένων βλαβών με έλλειψη βάσης σε απέναντι κοντινές θέσεις (1-10 ζβ.) στους κλώνους του DNA. Τα συμπλέγματα αυτά που θα ανιχνεύσουμε αποτελούνται κυρίως είτε από 2 αβασικά σημεία είτε από ένα αβασικό σημείο και μία SSB. Για το σκοπό αυτό θα χρησιμοποιήσουμε την μέθοδο NALA, ηλεκτροφόρηση δειγμάτων DNA μετά από επώαση με την ενδονουκλεάση hAPE1 και

τεχνικές ακριβούς ποσοτικής απεικόνισης για τη μέτρηση των συμπλεγμάτων αυτών.

Για να συλλέξουμε στοιχεία για την απόκριση όλου οργανισμού σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο αξιοποιήσαμε τις δυνατότητες που παρέχει η χρήση ποντικών σε *in vivo* και *ex vivo* πειραματικές διαδικασίες. Για να έχουμε λοιπόν μια όσο το δυνατόν πληρέστερη εικόνα του τρόπου και της φύσης της απόκρισης αυτής μελετήσαμε διάφορα είδη ιστών, τις συνέπειες από διαφορετικές δόσεις ακτινοβολίας και τα αποτελέσματα σε διάφορους χρόνους μετά την ακτινοβολήση. Ακόμη, για να διερευνήσουμε τα πλεονεκτήματα μιας νέας τεχνικής ακτινοβολήσης (ακτινοβολήση μικροδεσμών) κατά την εφαρμογή της στο πλαίσιο της ακτινοθεραπείας μελετήσαμε το DNA ιστών που είχαν υποστεί έκθεση με την τεχνική αυτή σε αντιδιαστολή με τη συμβατική ακτινοβολήση ευρείων δεσμών.

4.2. Υλικά και μέθοδοι

Διαδικασία ακτινοβολήσης

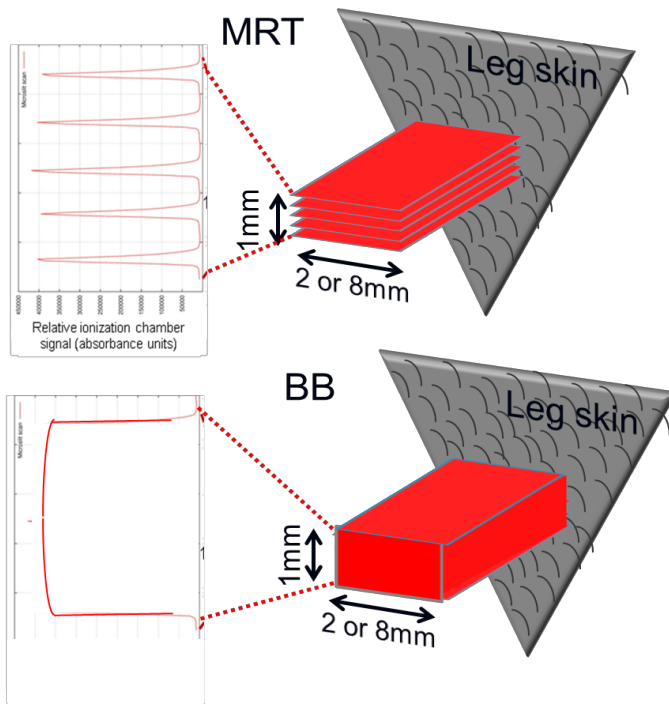
Τα συγκεκριμένα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε συνεργασία με την Δρ. Ολγα Μαρτιν (Olga Martin) ερευνήτρια του Peter McCallum κέντρου στη Μελβούρνη της Αυστραλίας. Για την ανάγκη των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν υγιή θηλυκά ποντίκια του γένους C57BL/6J (BJ6) από την Ozgene (Perth, Αυστραλία). Το γένος αυτό χρησιμοποιείται ευρέως σε για πειράματα βιολογίας και ιατρικής, δεν παρουσιάζεται επιρρεπές στην ανάπτυξη όγκου και κρίνεται κατάλληλο για τις πειραματικές συνθήκες που θα υποβληθεί. Τα ποντίκια τοποθετούνται με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι η δεξιά πλευρά τους εκτεθειμένη στην ακτινοβολία. Η ακτινοβολήση κατευθύνθηκε στο πίσω πόδι, με το υπόλοιπο μέρος του σώματος καλυμμένο για να αποφευχθεί απορρόφηση ακτινοβολίας λόγω διάχυσης.

Τα ποντίκια ακτινοβολήθηκαν στην επιταχυντική διάταξη Australian Synchrotron IMBL που παράγει ακτίνες-Χ υψηλού ρυθμού δόσης, με την ενέργεια των φωτονίων να είναι χαμηλή και να κυμαίνεται στο εύρος των kilovoltage (30-120 keV). Η διάταξη παρείχε την δυνατότητα να πραγματοποιηθεί η ακτινοβολήση με ρυθμό 49 Gy/sec έτσι ώστε το δείγμα να ακτινοβολείται πολύ γρήγορα. Υπό αυτές τις συνθήκες λειτουργίας και τα

τεχνικά χαρακτηριστικά του συγχροτρονίου έχουμε μικρή διασπορά δευτερευόντων ηλεκτρονίων, μικρό μέγεθος πηγής και σε συνδυασμό με τις παράλληλες - χαμηλής απόκλισης - δέσμες επιτυγχάνεται ελαχιστοποίηση της διασποράς σε αντίθεση με άλλες συμβατικές πηγές ΙΑ για θεραπευτικούς σκοπούς που λειτουργούν συνήθως στο εύρος των megavoltage. Με αυτόν τον τρόπο θα εξεταστεί και η ορθότητα της υπόθεσης πως οι αποκρίσεις των ιστών εκτός στόχου οφείλονται σε διασπορά και απορρόφηση χαμηλών δόσεων ΙΑ.

Η διάταξη επιτρέπει την ακτινοβολήση μικρών επιφανειών διαφόρων διαστάσεων με δυο διαφορετικούς τρόπους. Ο ένας τρόπος ακτινοβολήσης είναι με μια συμβατική τεχνική κάνοντας χρήση ευρείας δέσμης (broad beam – BB). Σε αυτή τη περίπτωση έγιναν ρυθμίσεις για να ακτινοβοληθούν επιφάνειες διαστάσεων 2x2 mm, 8x8 mm και 8x1 mm. Η άλλη μέθοδος ονομάζεται MRT (Microbeam Radiation Therapy) και βασίζεται σε μια νέα τεχνική που βρίσκεται σε προκλινικό στάδιο έχοντας μέχρι τώρα δείξει καλύτερα αποτελέσματα στην ακτινοθεραπευτική εφαρμογή της. Στόχος μας εδώ είναι να εξετάσουμε τις συνέπειες που μπορεί να έχει σε συστημικό επίπεδο σε σύγκριση με άλλες τεχνικές. Σε αυτή τη μέθοδο η ακτινοβολήση πραγματοποιήθηκε με παράλληλες επίπεδες

μικροδέσμες ακτίνων-Χ πάχους 25 μm σε απόσταση 200 μm μεταξύ των κέντρων κάθε μικροδέσμης. Με αυτόν τον τρόπο ακτινοβολήθηκαν επιφάνειες διαστάσεων 2x2 mm και 8x8 mm.



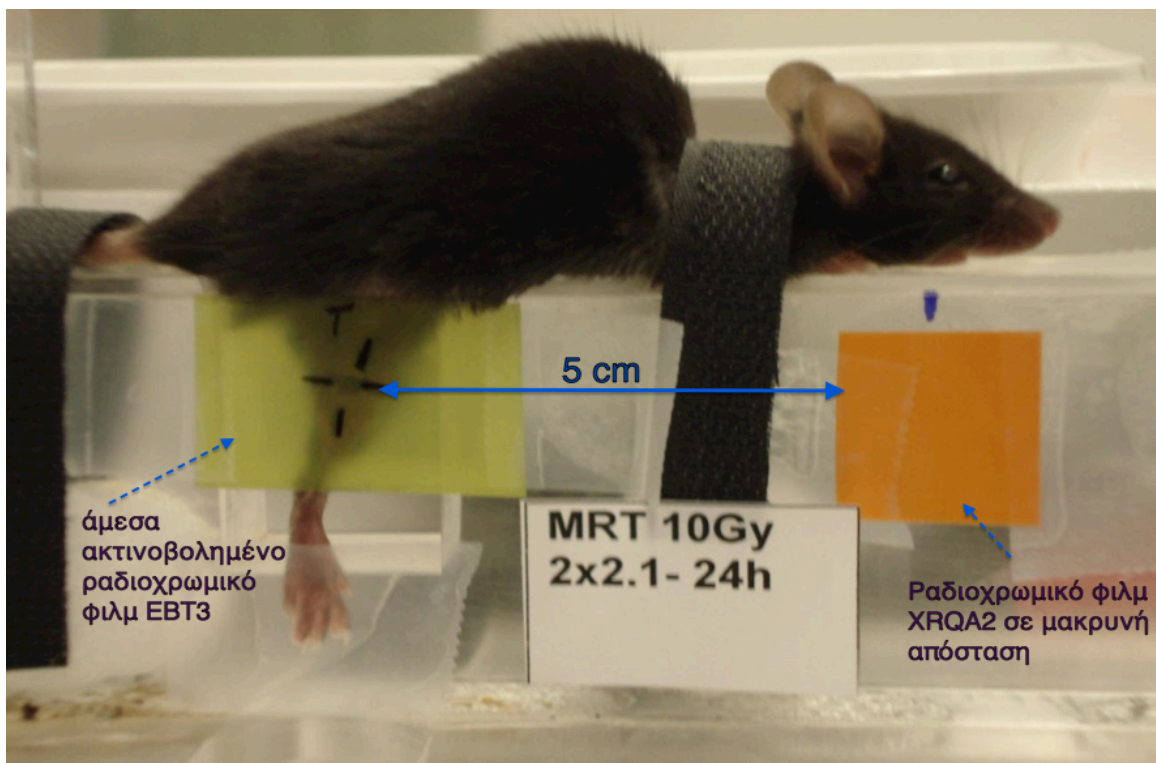
Εικόνα 4.1: Οι δέσμες ακτινοβολήσης των τεχνικών MRT και BB και οι τροποποιήσεις για την ακτινοβολήση διαφόρων επιφανειών.

Αξίζει να σημειωθεί πως και για τις 2 τεχνικές, παρά τη χαμηλή τους ενέργεια, οι ακτίνες-Χ ήταν πολύ διεισδυτικές. Για παράδειγμα μια MRT δέσμη φωτονίων διαπερνά 1cm ιστού σε ποσοστό μεγαλύτερο του 80%. Για να εξεταστεί το ενδεχόμενο επαγωγής ΜΣΕ λόγω διασποράς της ΙΑ πραγματοποιήθηκε μέτρηση της διάχυσης της ακτινοβολίας στο χώρο σε απόσταση 1.5 και 5 cm από το στόχο.

Δεδομένου ότι το χαμηλότερο κατώφλι δόσης που έχει παρατηρηθεί σε in vivo μελέτες αναφορικά με την εμφάνιση μη στοχευμένων επιδράσεων της ΙΑ βρίσκεται περίπου στα 10 Gy, πραγματοποιήθηκαν ακτινοβολήσεις με δόσεις 10 και 40 Gy, έτσι ώστε να διερευνηθεί ποσοτικά και ποιοτικά η σχέση της απορροφούμενης δόσης με τα αποτελέσματα αυτά. Η τοπική απορρόφηση ακτινοβολίας και διασπορά της στο χώρο μετρήθηκε και έδωσε τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο πίνακα 4.1.

Δείγματα	Απορρόφηση ακτινοβολίας (οπτική πυκνότητα)	Διασπορά στα 5 cm (mGy)	Διασπορά στο 1.5 cm (mGy)
MRT 10Gy 2x2	0.0215		
MRT 40Gy 2x2	0.0154		
MRT 10Gy 8x8	0.0167		
MRT 40Gy 8x8	0.0304	1.93	
BB 10Gy 2x2	0.0063		
BB 40Gy 2x2	0.0213		
BB 10Gy 8x8	0.0051		
BB 40Gy 8x8	0.0595	5.67	13.6
BB 10Gy 8x1	0.0208		
BB 40Gy 8x1	0.0362	2.68	

Πίνακας 4.1: Στοιχεία για την απορρόφηση της ακτινοβολίας και την διασπορά της σε απόσταση 5 και 1.5 cm από το στόχο για κάθε τρόπο ακτινοβολήσης. Όπου δε συμπληρώθηκαν τιμές στον πίνακα δεν υπήρξε ανιχνεύσιμη διασπορά.



Εικόνα 4.2: Πειραματική διάταξη ακτινοβολήσης των ποντικών και τα ραδιοχρωμικά φιλμ για τη μέτρηση της απορρόφησης και της διασπορά ακτινοβολίας.

Τέλος, για να εκτιμήσουμε την απόκριση του οργανισμού σε διάφορους χρόνους μετά την έκθεση στην ΙΑ εξετάσαμε τα δείγματα μετά από χρονικό διάστημα 24h (αρχική/ενδιάμεση απόκριση) και 96h (επιμένουσα/καθυστερημένη απόκριση). Τέλος, μια ομάδα ποντικών υποβλήθηκε στην διαδικασία χωρίς να ακτινοβοληθεί έτσι ώστε να χρησιμοποιηθεί ως συγκριτικό δείγμα. Τα ποντίκια χωρίστηκαν σε ομάδες των πέντε και για να εξεταστούν όλες οι παράμετροι κάθε ομάδα ακτιβολήθηκε με διαφορετικούς τρόπους, με διαφορετικές δόσεις και τα δείγματα εξήχθησαν σε διάφορους χρόνους όπως φαίνεται συγκεντρωτικά στον πίνακα 4.2. Προέκυψαν με τους παραπάνω συνδυασμούς 21 ομάδες που αντιστοιχούν σε διαφορετικές συνθήκες ακτινοβολήσης και εξέτασης. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 105 ποντίκια, 100 ακτινοβολημένα και 5 μη ακτινοβολημένα (ως ομάδα ελέγχου - control).

Ακτινοβολήση	Μέγεθος ομάδας	Χρονικά σημεία	Δόσεις	Επιφάνεια	Σύνολο ποντικών
Broad Beam	5	24h 96h	10Gy 40Gy	2x2mm 8x8mm 8x1mm	60
MRT	5	24h 96h	10Gy 40Gy	2x2mm 8x8mm	40
Control	5	24h	-	-	5

Πίνακας 4.2: Στοιχεία για τους διάφορους συνδιασμούς ακτινοβολήσης των ποντικών. Με αυτό τον τρόπο προέκυψαν 20 ομάδες ακτινοβολημένων ποντικών και μια control, που περιλάμβαναν 5 ποντίκια η κάθε μια για στατιστικούς λόγους.

Απομόνωση DNA

Για το σκοπό αυτής της εργασίας χρησιμοποιήθηκε απομονωμένο DNA από τον ιστό της γλώσσας και του παχέος εντέρου με μια τεχνική που έχει αναπτυχθεί στο εργαστήριο του Δρ. Γεωργακίλα (ΗΠΑ) . Η διαδικασία που ακολουθήθηκε βασίστηκε στις οδηγίες του High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Indianapolis, IN) και εκτελέστηκε με τέτοιο τρόπο ώστε να εξασφαλιστεί το μέγιστο μήκος των τμημάτων DNA με την ελαχιστοποίηση της επαγωγής μονόκλωνων και δίκλωνων θραύσεων.

Ομογενή τμήματα των ιστών μεγέθους 30-50 mg αφού αποψύχθηκαν τοποθετήθηκαν σε διάλυμα λύσης πρωτεΐνάσης K υψηλής αντιοξειδωτικής δράσης (5 mg/ml σε ρυθμιστικό διάλυμα με 4M ουρία, 200 mM Tris, 20 mM NaCl, 200 mM EDTA και pH 7.4). Μετά από επώαση στους 37°C για 3-12h πραγματοποιήθηκε η εξαγωγή και απομόνωση του DNA σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε στην κατάλληλη παρασκευή φρέσκων και αποστειρωμένων διαλυμάτων και στη διατήρηση της μέγιστης θερμοκρασίας κατά την εξαγωγή κάτω από τους 60°C αντί των 70°C που συνιστούσε ο κατασκευαστής. Η στήλη στην συνέχεια φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στα ~5000g. Τέλος, το DNA θα διαλυθεί σε πρότυπο διάλυμα TE (0 mM Tri-Cl, 1 mM EDTA, pH 7.5), θα

τοποθετηθεί σε σωληνάρια errendorf και θα αποθηκευτεί στους -20°C . Καθότι τα διαλύματα που προκύπτουν περιέχουν DNA σε διάφορες συγκεντρώσεις με μεγάλες αποκλίσεις μεταξύ τους, προχωρήσαμε σε αραιώσεις με απεσταγμένο νερό (dH_2O) έτσι ώστε τα διαλύματα με τα οποία θα εργαστούμε στη συνέχεια να έχουν όλα συγκέντρωση DNA $20\text{ng}/\mu\text{l}$.

Ενδονουκλεάση hAPE1

Ως περιοριστικός παράγοντας για την τομή των μορίων DNA στις αβασικές θέσεις χρησιμοποιήθηκε η ανθρώπινη ενδονουκλεάση APE1 από την New England Biolabs (Catalog#: M0282L). Το ένζυμο βρίσκεται στο σωληνάριο σε συγκέντρωση $10.000\text{ units}/\text{ml}$, όπου σύμφωνα με τον κατασκευαστή ως μονάδα ορίζεται η ποσότητα ενζύμου που απαιτείται για την τομή 20 pmol ολιγονουκλεοτίδιου 34 mer με ένα αβασικό σημείο μετά από επώαση σε διάλυμα συνολικού όγκου 10 ml για 1 ώρα στους 37°C . Το ένζυμο συνοδεύεται από το ρυθμιστικό διάλυμα 10X NEBuffer 4 (1X : 50mM οξικό κάλιο, 20 mM τρις-οξικό άλας, 10 mM οξικό μαγνήσιο, 1 mM DTT, $\text{pH } 7.9$). Το διάλυμα αυτό μετά από κατάλληλη αραιώση θα παρέχει το απαραίτητο υπόστρωμα για τη λειτουργία της ενδονουκλεάσης. Για την ακριβή εκτίμηση της δράσης του ενζύμου στις συνθήκες του παρόντος πειράματος πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις για διάφορες ποσότητες ενζύμου. Με αυτόν τον τρόπο καταλήξαμε στο ότι 1 μονάδα παρουσιάζει ικανοποιητική δράση κατά την επώαση 40ng DNA σε διάλυμα συνολικού όγκου αντίδρασης 7 ml για 1 ώρα στους 37°C .

Υλικά ηλεκτροφόρησης

- **Συσκευή**

Για τη διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκε η συσκευή ηλεκτροφόρησης $2314\text{ Horizontal Electrophoresis Device}$ με δεξαμενή χωρητικότητας 1000 ml . Ειδική φόρμα περιλαμβάνεται για τη κατασκευή του πηκτώματος αγαρόζης, όπου με την έγχυση 250 ml

ρυθμιστικού διαλύματος δημιουργούνται θέσεις για το φόρτωμα των δειγμάτων με χωρητικότητα 14 μl.

- **TAE**

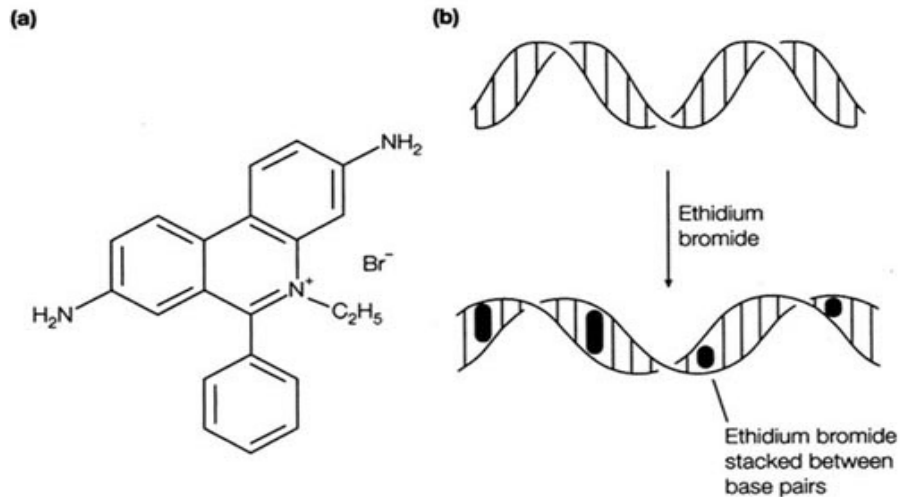
Το ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο χρησιμοποιείται, τόσο για την πλήρωση της δεξαμενής όσο και για τη δημιουργία του πηκτώματος αгарόζης, είναι το TAE (Tris-acetate-EDTA). Για την παρασκευή 1 L TAE συγκέντρωσης 10X χρειαζόμαστε 20 ml EDTA (0.5M, pH=8.0), 11.4 ml οξικού οξέως, 48.44 g Tris και τέλος προσθήκη dH₂O μέχρι τη συμπλήρωση του ενός λίτρου. Καθότι για τη δεξαμενή της ηλεκτροφορητικής διάταξης χρειαζόμαστε διάλυμα TAE συγκέντρωσης 1X και για την παρασκευή του πηκτώματος συγκέντρωση 0.5X, προχωράμε σε κατάλληλες αραιώσεις του αρχικού 10X διαλύματος.

- **Αγαρόζη**

Χρησιμοποιήθηκε σκόνη αгарόζης (Bio-rad, certified molecular biology agarose 125g, catalog#:161-3101) υψηλής ποιότητας, κατάλληλης για τη δημιουργία πηκτώματος για ηλεκτροφορήσεις.

- **Βρωμιούχο αιθίδιο**

Το βρωμιούχο αιθίδιο (Ethidium bromide - EtBr) είναι χημική ουσία που χρησιμοποιείται ευρέως για τη σήμανση νουκλεϊκών οξέων σε ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αгарόζης. Μπορεί να παρεμβάλει ανάμεσα στο μόριο του DNA, όπως φαίνεται στην εικόνα 4.2, και γι αυτό έχει έντονα μεταλλαξογόνο δράση. Την ιδιότητα του EtBr να φθορίζει κάτω από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία αξιοποιήσαμε για να ανιχνεύσουμε τα τμήματα DNA σε UV κάμερα μετά την ηλεκτροφόρηση. Στο πείραμα μας χρησιμοποιήσαμε διάλυμα EtBr συγκέντρωσης 1% από την Applichem (A1152).

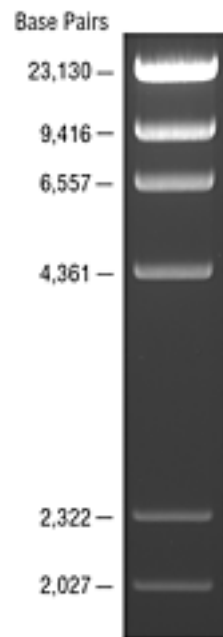


Εικόνα 4.3: α) Αναπαράσταση του μορίου του EtBr. β) Η παρεμβολή του EtBr ανάμεσα στα ζεύγη βάσεων του δίκλωνου DNA.

- **DNA Ladder**

Για την εκτίμηση του μοριακού βάρους των δειγμάτων DNA, που θα υποβληθούν σε ηλεκτροφόρηση, απαραίτητο είναι ένα διάλυμα μορίων DNA με συγκεκριμένα και γνωστά μεγέθη ώστε να πραγματοποιηθεί η απαιτούμενη αντιστοίχιση. Για τη κατασκευή του χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα Lambda DNA-Hind III Digest (New England Biolabs) που περιέχει κατάλληλα μεγέθη μορίων DNA τέτοια ώστε να καλύπτουν το απαιτούμενο εύρος ζευγών βάσεων. Το τελικό διάλυμα που θα χρησιμοποιηθεί στην ηλεκτροφόρηση προκύπτει με την προσθήκη 1 μέρους από το παραπάνω αρχικό διάλυμα και 1 μέρους της χρωστικής Gel loading dye Blue 6x (2.5% Ficoll-400, 11mM EDTA, 3.3mM Tris-HCl, 0.017% SDS, 0.015% κυανού της βρωμοφαινόλης) σε 4 μέρη dH₂O .

Εικόνα 4.4: Τα μόρια του διαλύματος DNA Ladder όπως έχουν διακριθεί μετά από ηλεκτροφόρηση σύμφωνα με το μήκος τους το οποίο μετριέται σε ζεύγη βάσεων.



4.3. Πρωτόκολλο πειράματος

Επεξεργασία δειγμάτων DNA και ηλεκτροφόρηση

Για τη διεξαγωγή του πειράματος, αρχίζουμε βγάζοντας τα προς μελέτη δείγματα DNA (δηλαδή τα αραιωμένα διαλύματα συγκέντρωσης 20ng/μl) από την κατάψυξη (-20 °C) όπου διατηρούνται όπως και το ρυθμιστικό διάλυμα της hAPE1 και τα αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να επανέλθουν πλήρως σε υγρή κατάσταση. Αραιώνουμε το ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου σε αναλογία 1 μέρος ρ.δ. : 3 μέρη dH₂O, δημιουργώντας ένα νέο διάλυμα, το οποίο εναποτίθεται σε δοκιμαστικό σωληνάριο για περαιτέρω χρήση. Εν συνεχεία προσθέτουμε σε PCR tubes 4 μl από το αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα μαζί με 2 μl από τα διαλύματα DNA και τα τοποθετούμε για προεπώαση σε πάγο για 30 λεπτά. Για κάθε υπό μελέτη δείγμα DNA πρέπει να φτιαχτούν δύο διαλύματα, στο ένα από τα οποία θα προστεθεί το ένζυμο (+ δείγμα) ενώ στο άλλο δεν θα προστεθεί καθώς θα λειτουργήσει ως control ή αλλιώς δείγμα αναφοράς (- δείγμα). Μετά την πάροδο των 30 λεπτών προσθέτουμε στα (+) δείγματα 1μl του διαλύματος της hAPE1, το οποίο έχει αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου, και επανατοποθετούμε τα νέα διαλύματα στον πάγο για ακόμα 15 λεπτά. Κατόπιν, βάζουμε όλα τα PCR tubes σε ειδική συσκευή για επώαση στους 37 °C για ακριβώς 1 ώρα (συνολικός όγκος αντίδρασης 7μl). Αφού περάσει η 1 ώρα βγάζουμε τα δείγματα από τη συσκευή και σταματάμε άμεσα την αντίδραση προσθέτοντας ειδικό διάλυμα ποσότητας 3μl σε όλα τα δείγματα (- και +, παρότι στα πρώτα δεν πραγματοποιήθηκε προφανώς ενζυμική επώαση). Το διάλυμα που δημιουργήσαμε για τον τερματισμό της διαδικασίας της επώασης αποτελείται από EDTA (0.5M, pH 8.0) και τη χρωστική gel loading dye Blue (6x) σε αναλογία 2:1. Στην συνέχεια τα δείγματα τοποθετούνται στον πάγο για 30 λεπτά.

Κατά τη διάρκεια της επώασης των δειγμάτων, προχωράμε παράλληλα στην κατασκευή του πηκτώματος αгарόζης το οποίο θα έχει συγκέντρωση 1%, θα περιέχει δηλαδή 2,5g σκόνη αгарόζης σε 250ml TAE 0.5X. Διαλύουμε πλήρως την αгарόζη στο διάλυμα TAE χρησιμοποιώντας φούρνο μικροκυμάτων και αφού προσθέσουμε 0,8μl από το διάλυμα του βρωμιούχου αιθιδίου εγχύουμε, έπειτα, το διάλυμα σε κατάλληλη φόρμα για τη

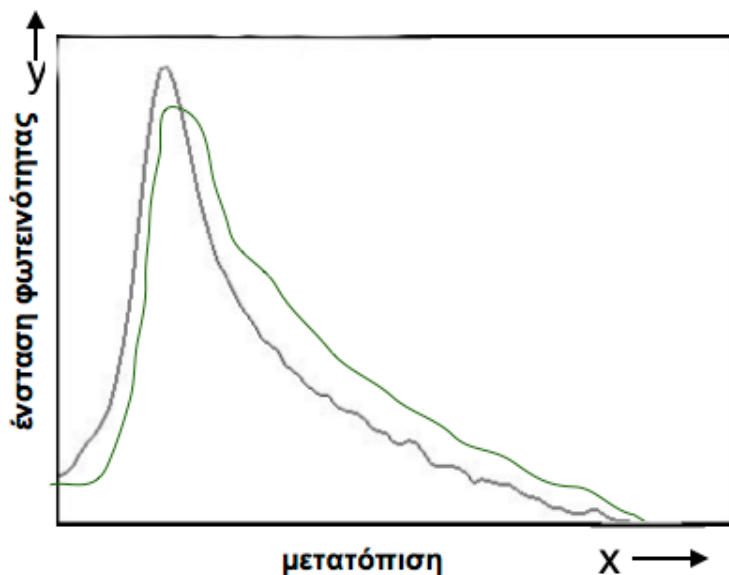
δημιουργία του πηκτώματος. Στην φόρμα έχουμε τοποθετήσει ειδικά χτένια για το σχηματισμό των θέσεων «φόρτωσης» των δειγμάτων. Η φόρμα τοποθετείται για διάστημα περίπου 40 λεπτών σε επίπεδη επιφάνεια για να στερεοποιηθεί πλήρως και καλύπτεται κατάλληλα για την προστασία από σκόνη και άλλες προσμίξεις. Η τοποθέτηση γίνεται σε περιβάλλον πολύ χαμηλού φωτισμού καθώς το βρωμιούχο αιθίδιο είναι ιδιαίτερα φωτοευαίσθητο. Όταν το πήκτωμα είναι έτοιμο το εμβαπτίζουμε στη δεξαμενή της ηλεκτροφόρησης, η οποία είναι γεμάτη με ποσότητα TAE 1X (περίπου 1L) τέτοια που να καλύπτει ολόκληρο το πήκτωμα. Φορτώνουμε τα δείγματα (τελικός όγκος 10μl) στα πηγάδια (όγκος πηγαδιού 15μl) του πηκτώματος και τα αφήνουμε για δέκα λεπτά να εξισορροπήσουν με το περιβάλλον των πηγαδιών. Το φόρτωμα των δειγμάτων πραγματοποιείται τοποθετώντας πρώτα το (-) και μετά το (+) δείγμα. Ακόμη, εγχέουμε 1μl DNA ladder, από το αραιωμένο διάλυμα που έχουμε κατασκευάσει, στα τέσσερα ακριανά πηγάδια του πηκτώματος (2 στην πάνω και 2 στην κάτω σειρά). Ενεργοποιούμε την ηλεκτροφόρηση σε ηλεκτρική τάση 110V και αφήνουμε τα δείγματα να "τρέξουν" για 80 λεπτά. Για την αποφυγή βαθμιδώσεων της θερμοκρασίας τοποθετείται πάγος περιμετρικά της δεξαμενής της ηλεκτροφόρησης έτσι ώστε τα δείγματα να ηλεκτροφορηθούν υπό τις ίδιες συνθήκες σε κάθε περιοχή του πηκτώματος.

Τέλος, μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης βγάζουμε το πήκτωμα από την δεξαμενή και το τοποθετούμε σε απεικονιστικό σύστημα (MiniBIS Pro της εταιρίας DNR Bio-Imaging Systems) που περιλαμβάνει κάμερα CCD και εκπομπέα UV ακτινοβολίας. Στη συνέχεια με τη χρήση ειδικού λογισμικού (Live off Gel Capture) και ρυθμίζοντας τις τιμές των παραγόντων Exposure-Gain-Brightness παίρνουμε φωτογραφίες του πηκτώματος, στις οποίες θα πρέπει να απεικονίζονται ευδιάκριτα και στην κατάλληλη φωτεινότητα τα μόρια του DNA.

Ανάλυση εικόνας πηκτώματος

Για την ανάλυση της εικόνας χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα πυκνομετρικής οπτικής ανάλυσης ImageJ του National Institute of Health (NIH). Αρχικά επιλέγουμε την πιο

κατάλληλη εικόνα του πήκτωματος, στην οποία απεικονίζονται επαρκώς οι λωρίδες του DNA με την ελάχιστη δυνατή φωτεινότητα υποβάθρου. Στην περίπτωση που η φωτεινότητα υποβάθρου είναι αρκετά υψηλή, υπάρχει η δυνατότητα μείωσης της μέσω ρύθμισης του προγράμματος. Για κάθε ζευγάρι λωρίδων DNA (- και + δείγμα) υπολογίζουμε τις καμπύλες μετατόπισης των μορίων DNA συναρτήσει του μοριακού τους βάρους στο πήκτωμα λόγω ηλεκτροφόρησης. Οι μετρήσεις γίνονται βάσει της έντασης της φωτεινότητας κάθε λωρίδας κατά μήκος του άξονα μετατόπισης (εικόνα 4.3). Από το εμβαδόν που ορίζεται από την κάθε καμπύλη και τους άξονες x,y υπολογίζεται η τιμή του X_{med} , η οποία αντιστοιχεί στη συντεταγμένη X του γεωμετρικού κέντρου του σχήματος.



Εικόνα 4.3: Διάγραμμα φωτεινότητας κατά τον άξονα μετατόπισης στο πήκτωμα, η μαύρη καμπύλη αντιστοιχεί στο (-) δείγμα και η πράσινη στο αντίστοιχο (+) η οποία είναι μετατοπισμένη ελαφρώς δεξιότερα.

Αφού ολοκληρώσουμε τη διαδικασία αυτή για όλα τα δείγματα προχωρούμε στη δημιουργία αριθμημένης/fitted καμπύλης ώστε να αντιστοιχήσουμε τις τιμές X_{med} με το μέσο μέγεθος του συγκεκριμένου πληθυσμού μορίων DNA L_{med} (μετρημένο σε ζεύγη βάσεων). Για τη δημιουργία αυτής της καμπύλης παίρνουμε το διάγραμμα διασποράς του DNA ladder και βρίσκουμε τις τιμές των X_{med} των 6 διακριτών καμπυλών του διαγράμματος που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένο αριθμό ζ.γ.. Επειδή γνωρίζουμε τον αριθμό των ζ.β. για κάθε X_{med} του DNA ladder προχωράμε στη δημιουργία καμπύλης διασποράς βάζοντας στους άξονες X-Y τις τιμές του X_{med} και των ζευγών βάσεων αντίστοιχα. Στη συνέχεια προσαρμόζουμε την καμπύλη που προκύπτει στην γραφική

παράσταση της συνάρτησης ExpDec2 του προγράμματος OriginPro 8 με τύπο:

$$y=A_1 * e^{x/t_1} + A_2 * e^{x/t_2} + y_0$$

απ' όπου παίρνουμε τις τιμές των παραμέτρων και τις προσθέτουμε στο excel. Περνώντας στο Excel και τις τιμές των X_{med} των δειγμάτων προκύπτουν οι αντίστοιχες τιμές L_{med} για κάθε πληθυσμό βάσει της διασποράς που ορίζουν οι παραπάνω παράμετροι. Τέλος από τον τύπο $\Phi = 1/L_{\epsilon} - 1/L_{\alpha}$ (όπου L_{ϵ} και L_{α} είναι οι τιμές των L_{med} για το + και - αντίστοιχα) υπολογίζονται οι τιμές που αναπαριστούν την συχνότητα AP clusters/Gbp των δειγμάτων.

Αποτελέσματα πειράματος και συμπεράσματα

5.1. Αποτελέσματα

Για τον προσδιορισμό της επαγωγής ομαδοποιημένων οξειδωτικών βλαβών σε συστημικό επίπεδο εκτελέστηκε ένα πλήθος πειραμάτων όπου σύμφωνα με τη μέθοδο NALA μετά από ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων DNA και πραγματοποιώντας οπτική ανάλυση των πηκτωμάτων στο ImageJ αποκτήθηκε ένα ικανοποιητικά μεγάλο σύνολο δεδομένων για τη συχνότητα των βλαβών σε κάθε περίπτωση. Στη συνέχεια, από τις στατιστικές αναλύσεις που διενεργήθηκαν προέκυψαν τα αποτελέσματα και οι μέσες τιμές που θα δούμε. Για την επιβεβαίωση της εγκυρότητας των μετρήσεων πραγματοποιήθηκε επανάληψη όλων των πειραμάτων. Ο όγκος και η αξιοπιστία των μετρήσεων είναι ικανά να δώσουν ξεκάθαρα ποιοτικά αποτελέσματα για την επαγωγή ομαδοποιημένων/σύνθετων AP βλαβών σε απέναντι κλώνους όπως και μια ικανοποιητική ποσοτική εκτίμησή τους.

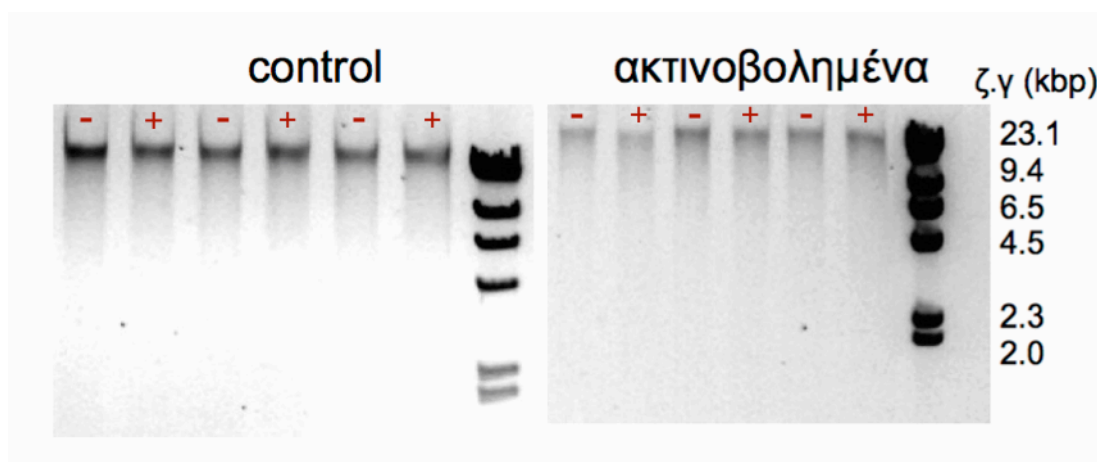
Τα δείγματα DNA όπως είδαμε προέρχονται από τους ιστούς της γλώσσας και του παχέος εντέρου, οι οποίοι δεν έχουν ακτινοβοληθεί άμεσα. Τα δείγματα αυτά συγκρίθηκαν με αντίστοιχα δείγματα (control) τα οποία προήλθαν από ποντίκια τα οποία υποβλήθηκαν στην ίδια διαδικασία με τα υπόλοιπα, χωρίς ωστόσο να ακτινοβοληθούν. Για κάθε ομάδα

δειγμάτων, εκτός από τη τιμή του μέσου όρου, υπολογίστηκε το αντίστοιχο τυπικό σφάλμα (standard error – SE) σύμφωνα με τον τύπο:

$$SE = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

όπου S η τυπική απόκλιση και δίνεται από τον τύπο: $S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x-\bar{x})^2}{n(n-1)}}$

με n το πλήθος των δειγμάτων.



Εικόνα 5.1: Ενδεικτικές φωτογραφίες ηλεκτωμάτων που πάρθηκαν από κάμερα CCD για ηλεκτροφορημένα δείγματα DNA ακτινοβολημένων και μη ποντικών. Στην συγκεκριμένη εικόνα τα δείγματα DNA προέρχονται από τον ιστό της γλώσσας. Οι λωρίδες (-) απεικονίζουν τα δείγματα DNA που δεν έχουν υποστεί επεξεργασία με ένζυμο (την hAPE1) ενώ οι (+) είναι δείγματα που ηλεκτροφορήθηκαν μετά από επώαση και λόγω του μέσου μικρότερου μήκους των μορίων DNA αυτών βρίσκονται σχετικά χαμηλότερα από τα (-). Στην άκρη κάθε ηλεκτωμάτος είναι τοποθετημένο DNA ladder που λειτουργεί ως αναφορά έτσι ώστε να υπολογιστεί το μήκος (σε ζεύγη βάσεων) των διάφορων πληθυσμών DNA. Φωτογραφίες όπως αυτές επεξεργάστηκαν από το ImageJ και στην συνέχεια ακολούθησε στατιστική ανάλυση απ' όπου προέκυψαν τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται.

Για τον υπολογισμό της στατιστικής σημαντικότητας των αποτελεσμάτων διενεργήθηκε *t-test* ανεξάρτητων δειγμάτων τόσο για τη σύγκριση της συχνότητας των βλαβών μεταξύ ακτινοβολημένων και μη ακτινοβολημένων αλλά και μεταξύ ακτινοβολημένων δειγμάτων υπό διαφορετικές συνθήκες. Το στατιστικό κριτήριο *t-test* (υπό τις συνθήκες που

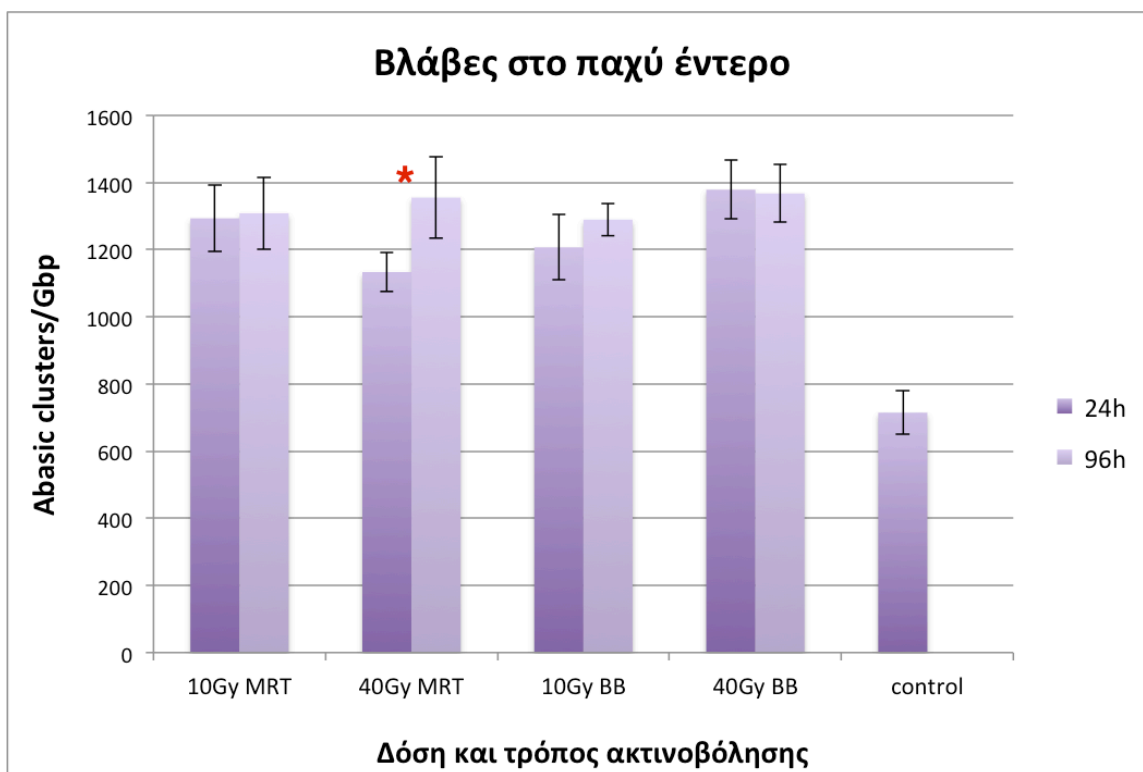
χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα ανάλυση) όταν δώσει αποτέλεσμα με τιμή $p < 0.05$, κατά τη σύγκριση μεταξύ δύο πληθυσμών δειγμάτων, σημαίνει ότι έχουμε στατιστικά σημαντικό διαφορά με διάστημα εμπιστοσύνης 95%. Αναλυτικά τα αποτελέσματα των 2 πειραμάτων για κάθε δείγμα βρίσκονται στο παράρτημα. Παρακάτω θα παρουσιάσουμε την ανάλυση των αποτελεσμάτων, πραγματοποιώντας σε κάθε περίπτωση τις απαραίτητες ομαδοποιήσεις, που προέκυψαν ξεχωριστά για τις εξής παραμέτρους: ιστός, δόση, χρονικό διάστημα μετά την ακτινοβολήση και τεχνική ακτινοβολήσης. Με αυτόν τον τρόπο εξετάστηκαν οι κύριες επιδράσεις των παραγόντων αυτών στη συχνότητα βλαβών στο DNA. Σε όλους τους παρακάτω πίνακες τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στη μορφή clusters/Gbp, όπου στο πλαίσιο αυτού του πειράματος αναφερόμαστε σε AP bistranded clusters ανά 1000 ζεύγη βάσεων (Mbp).

5.1.1. Απόκριση κάθε ιστού

Όπως είδαμε προηγουμένως τα ποντίκια ακτινοβολήθηκαν με 2 τρόπους (ευρεία δέσμη και μικροδέσμες) και με δόσεις 10 και 40 Gy. Τα αναλυτικά αποτελέσματα για τις μέσες τιμές για τις AP ομαδοποιημένες βλάβες σε κάθε ιστό φαίνονται στους πίνακες 5.1 και 5.2, από τους οποίους προέκυψαν και τα αντίστοιχα διαγράμματα.

Χρονικό σημείο	Δόση και τεχνική ακτινοβολήσης				
	10Gy MRT	40Gy MRT	10Gy BB	40Gy BB	control
24 h	1293	1134	1207	1379	715
Τυπικό σφάλμα(±)	99	58	96	88	64
96 h	1309	1355	1290	1368	
Τυπικό σφάλμα(±)	108	121	47	87	

Πίνακας 5.1: Πειραματικά αποτελέσματα σε clusters/Gbp με τα τυπικά σφάλματα στο παχύ έντερο για κάθε χρονικό σημείο μετά την έκθεση, για κάθε δόση και τρόπο ακτινοβολήσης.

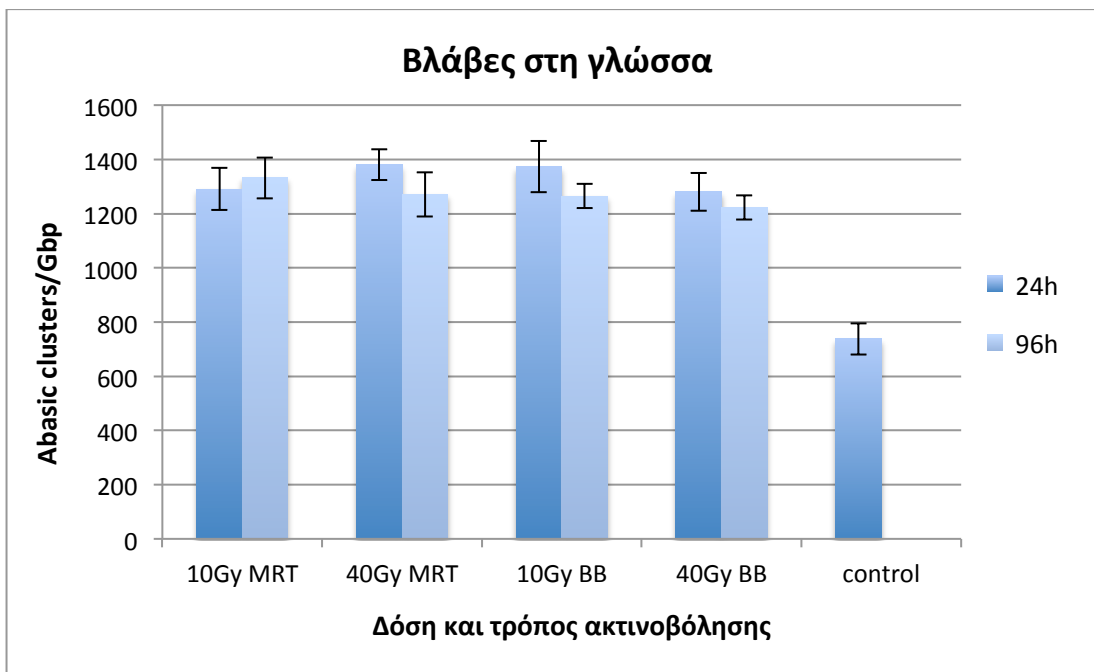


Διάγραμμα 5.1: Αβασικές βλάβες DNA ιστό (AP bistranded clusters) ανά Gbp στο παχύ έντερο ακτινοβολημένων και μη (control) ποντικών. Στατιστικά σημαντική διαφορά (* $p < 0.05$) μεταξύ 24 και 96 h.

- **Αποτελέσματα για τη γλώσσα**

Χρονικό σημείο	Δόση και τρόπος ακτινοβολήσης				
	10Gy MRT	40Gy MRT	10Gy BB	40Gy BB	control
24 h	1291	1381	1373	1281	738
Τυπικό σφάλμα(±)	77	57	94	70	58
96 h	1332	1271	1265	1222	
Τυπικό σφάλμα(±)	76	82	44	44	

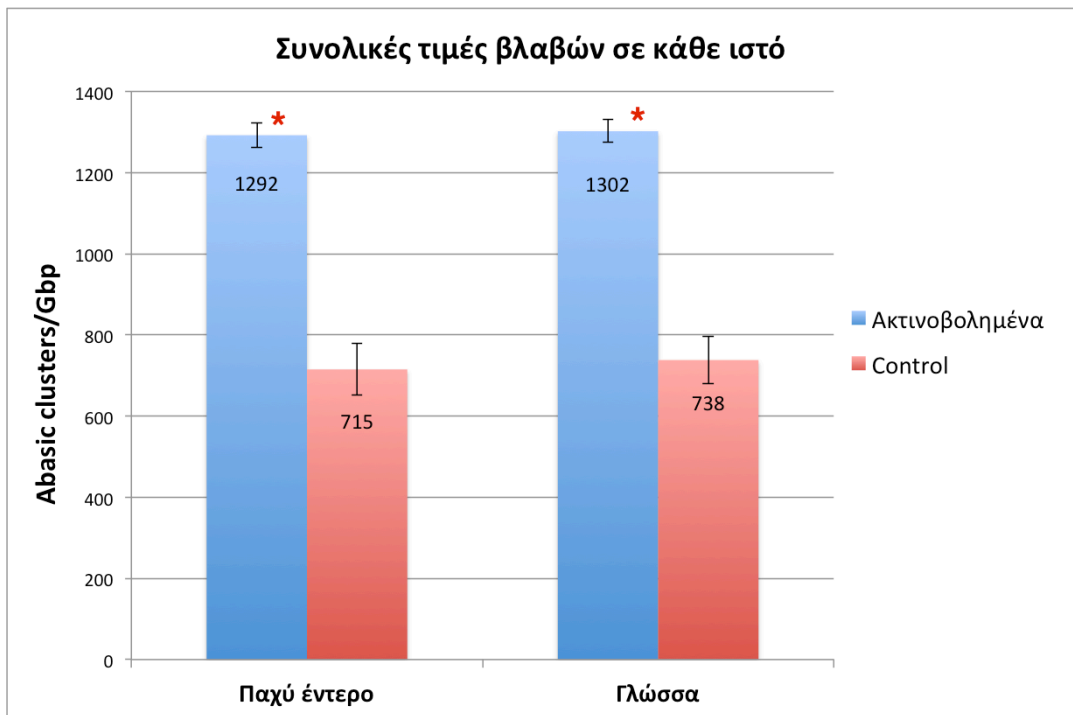
Πίνακας 5.2: Πειραματικά αποτελέσματα σε clusters/Gbp με τα τυπικά σφάλματα στη γλώσσα για κάθε χρονικό σημείο μετά την έκθεση, για κάθε δόση και τρόπο ακτινοβολήσης.



Γράφημα 5.2: Αβασικές βλάβες DNA (AP bistranded clusters) ανά Gbp στη γλώσσα ακτινοβολημένων και μη (control) ποντικών.

Με μια πρώτη ματιά βλέπουμε πως για κάθε συνδυασμό των τριών παραμέτρων (δόση, τεχνική ακτινοβολήσης και χρονικό σημείο μετά την έκθεση) οι βλάβες είναι αρκετά αυξημένες σε κάθε ιστό σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα από τα μη ακτινοβολημένα ποντίκια. Ακόμη, πριν δούμε τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα για κάθε παράμετρο, από τα πρώτα διαγράμματα φαίνεται πως παρά τη διαφορετική έκθεση στην ΙΑ οι βλάβες στο DNA παρουσιάζουν διακυμάνσεις που κινούνται σε μεγάλο βαθμό στα όρια του τυπικού σφάλματος. Μετά από t-test που πραγματοποιήθηκαν για τα αποτελέσματα των δειγμάτων κάθε ομάδας παραμέτρων, όπως αυτές παρουσιάζονται στα δύο γραφήματα 5.1 και 5.2, σε σύγκριση με τα control προέκυψαν τιμές $P < 0.001$. Αυτό σημαίνει πως σε αυτή την περίπτωση έχουμε σημαντικά αποτελέσματα με πιθανότητα μεγαλύτερη από 99.9%. Αναλυτική παρουσίαση των τιμών από τα t-test για όλες τις ομάδες δειγμάτων υπάρχει στο παράρτημα.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των βλαβών μεταξύ των δύο ιστών απ' όπου προέκυψε και το γράφημα 5.3 με τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της συχνότητας βλαβών μαζί τα αντίστοιχα τυπικά σφάλματα.



Γράφημα 5.3: AP bistranded clusters/Gbp σε κάθε ιστό. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές του (* $p < 0.001$) αφορούν στη σύγκριση ακτινοβολημένων ποντικών και μη (control) για κάθε ιστό.

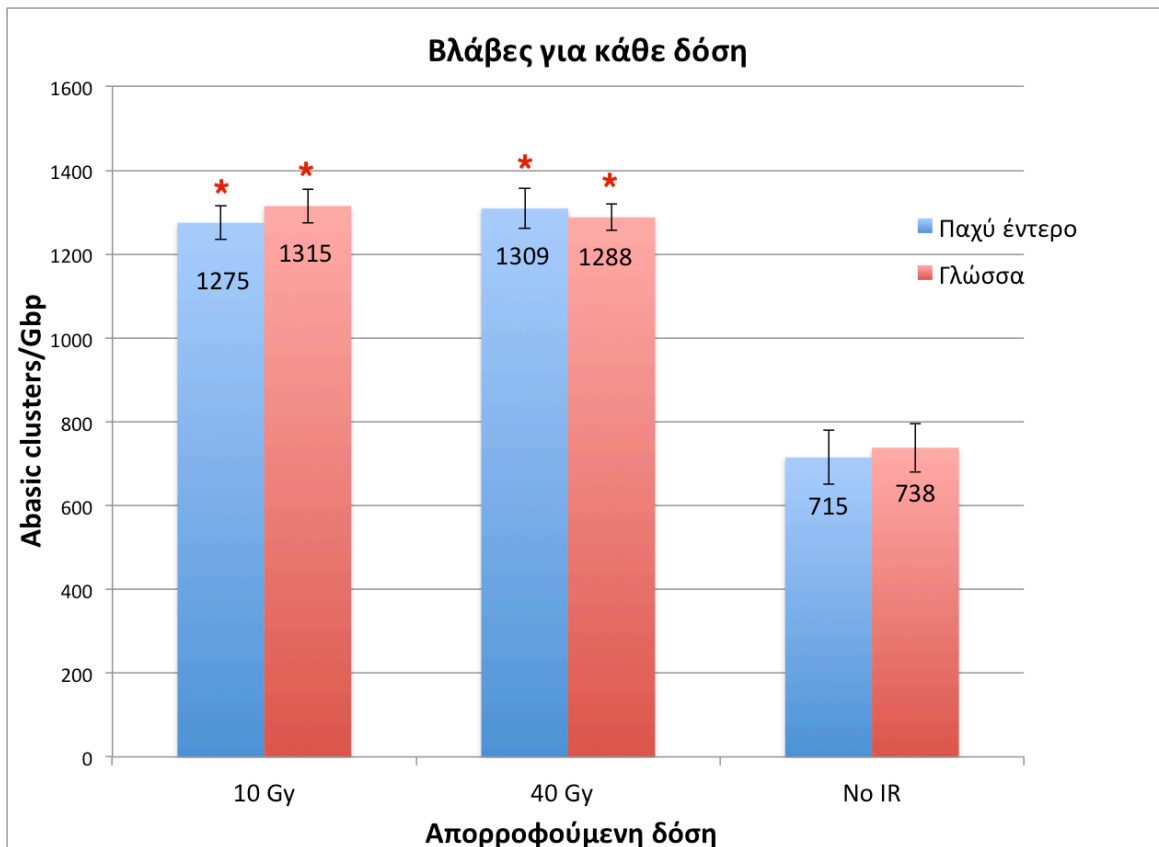
Το t-test για τα αποτελέσματα του συνόλου των δειγμάτων για κάθε ιστό ξεχωριστά (συνολικά και για τις 2 δόσεις) σε σχέση με τα μη ακτινοβολημένα δείγματα έδωσε τιμή $p < 0.001$. Αντίθετα, συγκρίνοντας τα ακτινοβολημένα δείγματα κάθε ιστού πήραμε $P > 0.5$ κάτι που σημαίνει ότι κατά 95% δεν προκύπτουν σημαντικές διαφορές. Γεγονός εύκολα αντιληπτό αφού η διαφορά μεταξύ των μέσων τιμών 1301 clusters/Gbp και 1297 clusters/Gbp είναι πολύ μικρή και εντός των ορίων του τυπικού σφάλματος. Ομοίως, η σύγκριση των μη ακτινοβολημένων δειγμάτων κάθε ιστού μεταξύ τους έδωσε $P > 0.05$. Ο μέσος όρος των βλαβών στα μη ακτινοβολημένα δείγματα (715 clusters/Gbp στο παχύ έντερο και 738 clusters/Gbp στη γλώσσα) δεν παρουσιάζει μεγάλη διαφορά, φαίνεται δηλαδή πως τα επίπεδα ενδογενών βλαβών σε κάθε ιστό δεν παρουσιάζουν σημαντικές αποκλίσεις.

5.1.2. Απόκριση στη δόση

Για να εκτιμήσουμε το πως αποκρίνονται σε διαφορετικές δόσεις ΙΑ τα κύτταρα ιστών σε περιοχές μακριά από το πεδίο ακτινοβολήσης εξετάσαμε δείγματα DNA ποντικών εκτέθηκαν σε υψηλή (10Gy) και πολύ υψηλή (40 Gy) δόση ακτινοβολίας. Στη συνέχεια θα δούμε στον πίνακα 5.3 τις μέσες τιμές που υπολογίστηκαν για την απόκριση στη δόση του παχέος εντέρου και της γλώσσας και το γράφημα 5.4 που προέκυψε για τα AP bistranded clusters κάθε ιστού.

Ιστός	Απορροφούμενη Δόση		
	10 Gy	40 Gy	0 Gy
Colon	1275	1309	715
Τυπικό σφάλμα	40	47	64
Tongue	1315	1288	738
Τυπικό σφάλμα	37	31	59
Συνολικά	1295	1299	727
Τυπικό σφάλμα	28	30	42

Πίνακας 5.3: Συγκεντρωτικά πειραματικά αποτελέσματα και τυπικά σφάλματα σε clusters/Gbp των βλαβών κάθε ιστού ξεχωριστά και συνολικά για κάθε δόση.



Γράφημα 5.4: Bistranded AP clusters/Gbp σε κάθε ιστό. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές (*) αφορούν στη σύγκριση ακτινοβολημένων ποντικών σε κάθε δόση και control για κάθε ιστό.

Σε κάθε ιστό βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.001$) και για τις δύο δόσεις ΙΑ όταν συγκρίναμε τις βλάβες στα ακτινοβολημένα ποντίκια με εκείνες στα αντίστοιχα control (0 Gy). Αντίθετα και για τους δύο ιστούς δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικές τιμές ($p > 0.05$) όταν συγκρίναμε τα αποτελέσματα των δειγμάτων σε έκθεση 10 Gy και 40 Gy μεταξύ τους. Οι μέσες τιμές 1295 (± 28) και 1299 (± 30) και των δύο ιστών συνολικά για τις απορροφούμενες δόσεις 10 Gy και 40 Gy αντίστοιχα, όπως και σε κάθε ιστό, παρουσιάζουν αποκλίσεις εντός του τυπικού σφάλματος. Η απουσία διαφορετικής απόκρισης σε κάθε δόση συμφωνεί με τα αποτελέσματα άλλων πειραμάτων [37,83] και είναι κάτι που αναμέναμε καθώς το φαινόμενο επαγωγής ΜΣΕ δείχνει να έχει χαμηλότερο κατώφλι δόσης από 10 Gy υπό τις παρούσες συνθήκες και να μην εντείνεται με την αύξηση της δόσης.

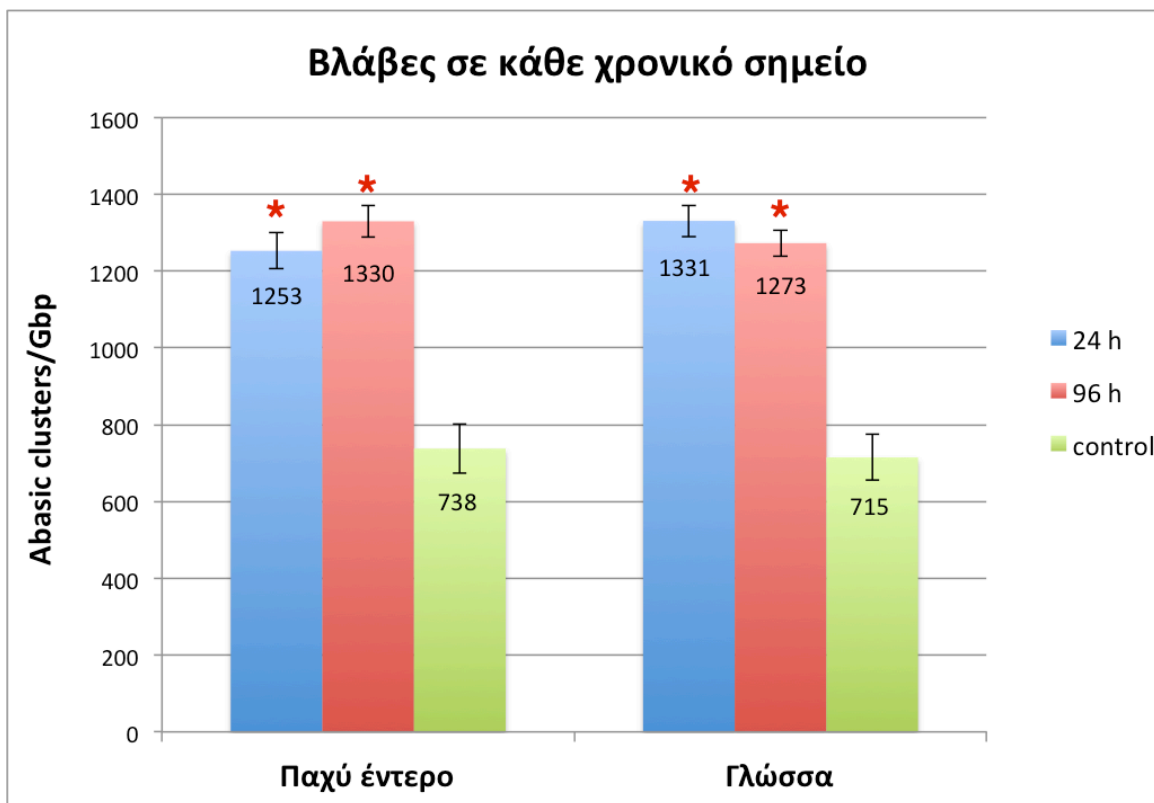
5.1.3. Απόκριση σε κάθε χρονικό σημείο μετά την ακτινοβόληση

Για να εξεταστεί ο βαθμός επιδιόρθωσης και τα επίπεδα των bistranded AP clusters μετά την έκθεση εξετάσαμε δείγματα DNA που πάρθηκαν 24 και 96 ώρες (repair time) μετά από την ακτινοβόληση. Τα αποτελέσματα μετά από 24 ώρες θα μας δώσουν μια εκτίμηση των βλαβών μετά από την αρχική (αλλά όχι άμεση) απόκριση του οργανισμού ενώ μετά από 96 ώρες θα δούμε σε ποιο βαθμό οι βλάβες παραμένουν για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα μετά από αρκετές κυτταρικές διαιρέσεις. Τα συγκεντρωτικά πειραματικά αποτελέσματα για κάθε ιστό για παρουσιάζονται στον πίνακα 5.4.

Χρονικό σημείο	Ιστός			
	Παχύ έντερο	Τυπικό σφάλμα	Γλώσσα	Τυπικό σφάλμα
24 h	1253	47	1331	41
96 h	1330	41	1273	34
control	738	64	715	59

Π
ί
ν
α
κ
α
ς
5
.

4: Συγκεντρωτικά πειραματικά αποτελέσματα και τυπικά σφάλματα των βλαβών κάθε ιστού σε κάθε χρονικό σημείο μετά την ακτινοβόληση.



Γράφημα 5.5: AP bistranded clusters/Gbp σε κάθε ιστό. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές (*) αφορούν στη σύγκριση ακτινοβολημένων ποντικών και control σε κάθε χρονικό για κάθε ιστό.

Σε αυτή την περίπτωση βρέθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά $p < 0.001$ συγκρίνοντας σε κάθε ιστό ξεχωριστά τις βλάβες μετά από 24 και 96 ώρες σε σχέση με τις ενδογενείς βλάβες των μη ακτινοβολημένων ποντικών. Στατιστικά σημαντικές τιμές στο t-test για τα πειραματικά αποτελέσματα ανάμεσα στις 24 και 96 ώρες γενικά δεν βρέθηκαν. Εξαίρεση αποτελεί η περίπτωση των δειγμάτων του παχέος εντέρου που υποβλήθηκαν σε ακτινοβολήση με 40 Gy MRT, όπου βρήκαμε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p = 0.012$) συγκρίνοντας τους μέσους όρους των βλαβών για τις 24 και 96 ώρες (διάγραμμα 5.1).

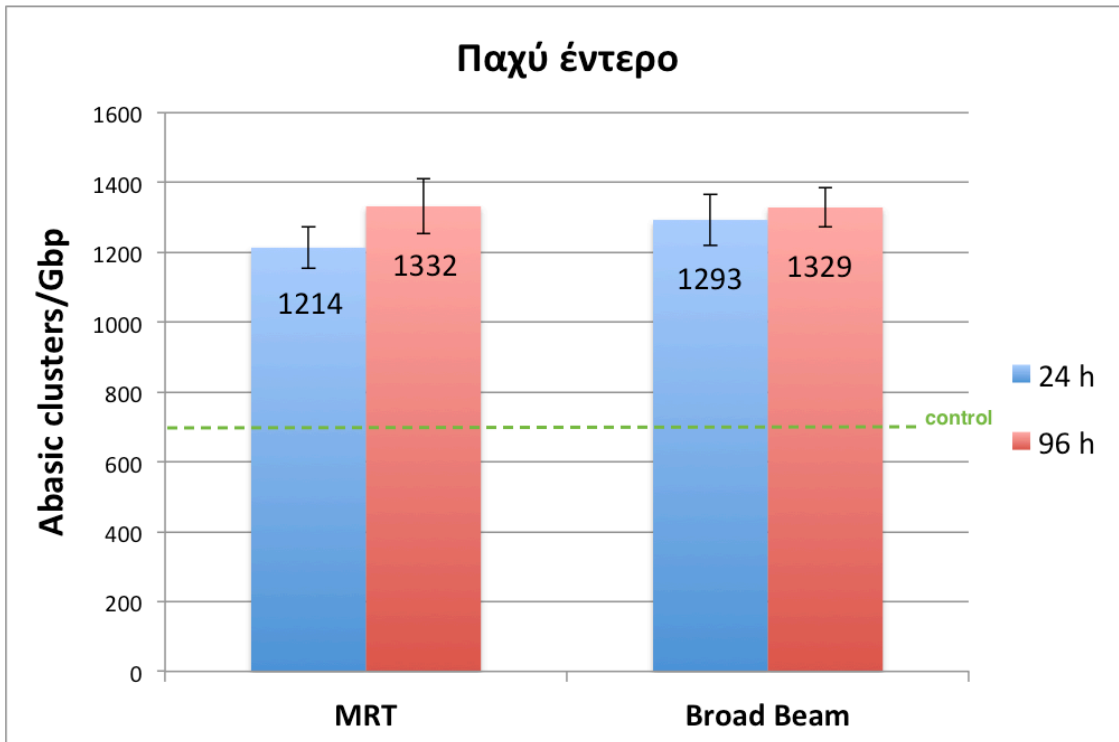
Στο παχύ έντερο παρατηρούμε μια μικρή αυξητική τάση των βλαβών μετά από 96 ώρες ενώ αντίθετα μικρή μείωση στη γλώσσα, όπως φαίνεται στα γραφήματα 5.1, 5.2 και 5.5. Οι μέσες τιμές, ωστόσο, κυμαίνονται οριακά εντός του τυπικού σφάλματος. Ακόμη, εξετάζοντας το ρόλο που παίζει η απορροφούμενη δόση στη χρονική εξέλιξη των επιπέδων των βλαβών δεν προέκυψε κάποιο σημαντικό στοιχείο.

5.1.4. Απόκριση σε κάθε τεχνική ακτινοβολήσης

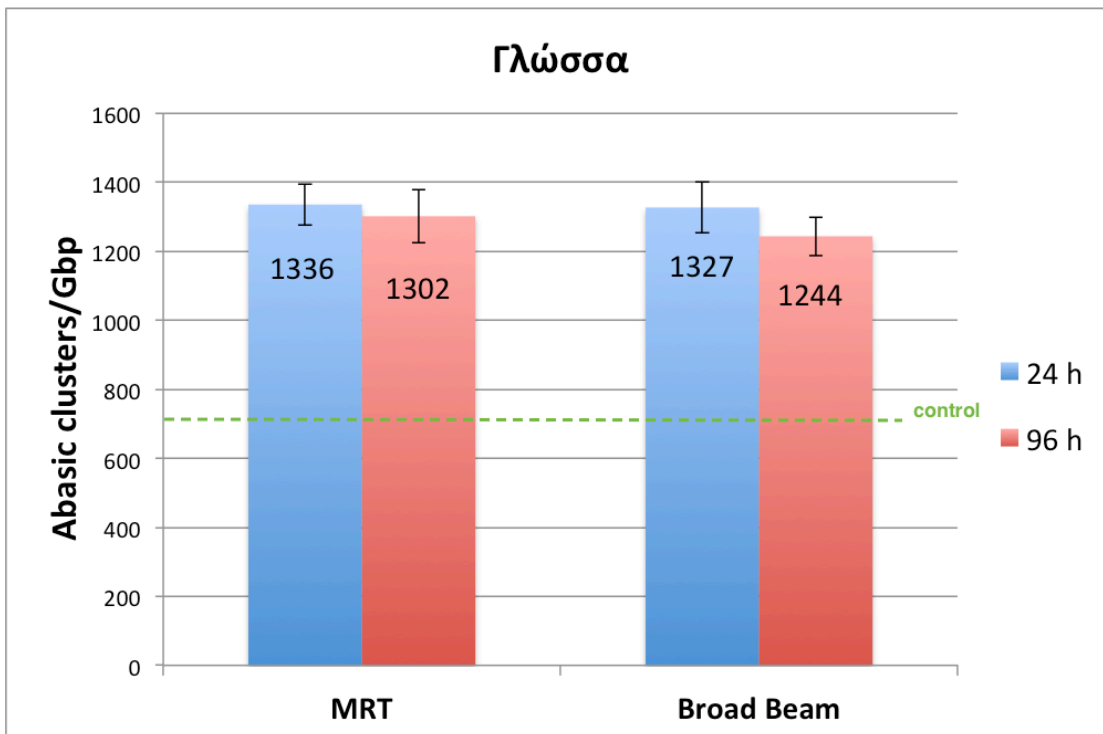
Για να διερευνηθούν αν και σε ποιο βαθμό επηρεάζει τα μη στοχευμένα αποτελέσματα της ΙΑ ο τρόπος ακτινοβολήσης, τα δείγματα ακτινοβολήθηκαν με ευρεία δέση και μικροδέσμες MRT. Η ακτινοβολήση έγινε με δόσεις 10 και 40 Gy, όπως και σε επιφάνειες διαφόρων διαστάσεων. Η έκθεση διαφορετικών επιφανειών δεν θα μας απασχολήσει στο πλαίσιο αυτής της εργασίας καθώς δεν προκύπτουν ενδείξεις συσχέτισης με τις αποκρίσεις απομακρυσμένων ιστών, τα αναλυτικά αποτελέσματα ωστόσο και γι' αυτή την παράμετρο υπάρχουν στο παράρτημα. Στον πίνακα 5.5 παρουσιάζονται τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα των μέσων συχνοτήτων των βλαβών στους δύο ιστούς και στη συνέχεια τα αντίστοιχα διαγράμματα 5.7 και 5.8.

	Τεχνική ακτινοβολήσης			
	MRT		Broad Beam	
Χρονικό σημείο	Παχύ έντερο	Γλώσσα	Παχύ έντερο	Γλώσσα
24 h	1214	1336	1293	1327
Τυπικό σφάλμα	60	58	73	62
96 h	1332	1302	1328	1244
Τυπικό σφάλμα	78	72	56	67

Πίνακας 5.5: Πειραματικά αποτελέσματα και τυπικά σφάλματα των βλαβών σε κάθε τεχνική ακτινοβολήσης για κάθε χρονικό σημείο μετά την ακτινοβολήση.



Γράφημα 5.7: AP bistranded clusters/Gbp για κάθε τεχνική ακτινοβόλησης σε κάθε χρονικό σημείο.



Γράφημα 5.8: AP bistranded clusters/Gbp για κάθε τεχνική ακτινοβόλησης σε κάθε χρονικό σημείο.

Σε κάθε χρόνο μετά την ακτινοβόληση δεν παρατηρούνται και στους δύο ιστούς σημαντικές διαφορές. Μπορούμε να δούμε μόνο μια μικρή αύξηση των βλαβών της τάξης των 100 clusters/Gbp στο παχύ έντερο στην MRT ακτινοβόληση, ενώ παρουσιάζεται μικρή υποχώρηση παρόμοιου μεγέθους στην γλώσσα μετά από Broad Beam ακτινοβόληση. Οι αποκλίσεις αυτές, ωστόσο, κινούνται απολύτως μέσα στο όριο του σφάλματος. Στο t-test που πραγματοποιήθηκε για κάθε ιστό, δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p > 0.05$) στη σύγκριση των πειραματικών αποτελεσμάτων μεταξύ Broad Beam και MRT ακτινοβόλησης.

5.2. Συζήτηση και συμπεράσματα

Το κυτταρικό στρες που αναπτύσσεται σε μία έντονα εκτεθειμένη σε ιοντίζουσα ακτινοβολία περιοχή φαίνεται, σύμφωνα και με τα πειραματικά αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, να επηρεάζει σημαντικά τους ιστούς απομακρυσμένων περιοχών του οργανισμού. Η ΙΑ προκαλεί μια σειρά αποτελεσμάτων στον ακτινοβολημένο ιστό όπως είναι η απόπτωση, ο γηρασμένος κυτταρικός φαινότυπος, μεμονωμένες και σύνθετες βλάβες στο DNA, αυξημένα επίπεδα ROS και RNS και επιμένουσα ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι βιολογικές επιπτώσεις της ΙΑ σε τοπικό επίπεδο μετά από έκθεση τόσο σε υψηλές δόσεις, αλλά και σε χαμηλότερες με παρόμοιο τρόπο, επιδρούν και σε κύτταρα εκτός της περιοχής ακτινοβόλησης σε κοντινές αλλά και απομακρυσμένες περιοχές σύμφωνα με αρκετές πειραματικές ενδείξεις. Η ανάπτυξη παρατεταμένου στρες υποθέσαμε πως παίζει βασικό ρόλο στην εμφάνιση αυτού του φαινομένου και για το λόγο εξετάσαμε τη συχνότητα σύνθετων οξειδωτικών βλαβών DNA σε ιστούς που δεν έχουν εκτεθεί στην άμεσα ακτινοβολία όπως και το πως αυτές εξελίσσονται με την πάροδο του χρόνου. Ειδικότερα, εκτιμήθηκε ποσοτικά με σχετικά ικανοποιητική προσέγγιση, σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε στο 3^ο κεφάλαιο και περισσότερο συγκεκριμένα στο 4^ο, η συχνότητα σχηματισμού δίκλωνων αβασικών ομαδοποιημένων βλαβών και με αυτό τον τρόπο πάρθηκαν εν τέλει σημαντικά βιολογικά

δεδομένα.

Τα επίπεδα ενδογενών βλαβών στα μη ακτινοβολημένα ποντίκια βρέθηκαν 715 clusters/Gbp (ή 0.715 clusters/Mbp) στο παχύ έντερο και στη γλώσσα 738 clusters/Gbp (ή 0.734 clusters/Mbp), δηλαδή περίπου ίδια. Το ότι υποβλήθηκαν τα ποντίκια αυτά στην ίδια διαδικασία με τα ακτινοβολημένα δε φαίνεται επηρεάζει σημαντικά τα επίπεδα ενδογενών βλαβών, όπως έχει δείξει προηγούμενη έρευνα [113]. Το γεγονός αυτό δείχνει πως η απόκριση του οργανισμού υπό αυτές τις συνθήκες δεν αλλάζει με τρόπο τέτοιο που να τροποποιεί τα αποτελέσματα των ΜΣΕ. Τα αποτελέσματά, ακόμη, για τις ενδογενείς βλάβες της ίδιας έρευνας που κυμαίνονταν μεταξύ 0.6 με 0.9 clusters/Mbp συμφωνούν σε μεγάλο βαθμό με δικές μας μέσες τιμές των πειραματικών αποτελεσμάτων που κυμαίνονται μεταξύ ~0.5 και 0.9 clusters/Mbp. Πειραματικά δεδομένα ακόμα από έρευνες σε ιστούς ποντικών και ανθρώπων δείχνουν συνολικό αριθμό αβασικών βλαβών συχνότητας 10-60 βλάβες/Mbp [114,115]. Η συχνότητα αυτή συμφωνεί ποιοτικά με τα δικά μας δεδομένα καθώς ένα σχετικά μικρό αλλά σημαντικό ποσοστό βλαβών βρίσκεται υπό μορφή συμπλεγμάτων πέρα από τις μεμονωμένες. Αντίθετα, έρευνα σε καλλιέργειες ανθρωπίνων κυττάρων έδειξε επίπεδα βλαβών 0.02-0.04 clusters/Gbp [116], γεγονός που παρά την εξ ολοκλήρου διαφορετική μέθοδο που ακολουθήθηκε, εξηγείται εφόσον είναι γνωστό πως το οξειδωτικό στρες που αναπτύσσεται είναι πολύ εντονότερο στα ποντίκια απ' ό,τι στον ανθρώπινο οργανισμό.

Η μέση συχνότητα βλαβών στο παχύ έντερο για κάθε ομάδα δειγμάτων κυμάνθηκε μεταξύ 1053 και 1500 clusters/Gbp (γενική μέση τιμή ακτινοβολημένων 1292 clusters/Gbp) δηλαδή 1.5 με 2.1 φορές πάνω από τα μη ακτινοβολημένα ποντίκια με μέση τιμή 715 clusters/Gbp. Στη γλώσσα έχουμε τα ίδια δεδομένα: 1051-1511 clusters/Gbp (γενική μέση τιμή ακτινοβολημένων 1302 clusters/Gbp) και μέση τιμή control δειγμάτων 738 clusters/Gbp. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζουν ομοιότητες με εκείνα προηγούμενης έρευνας σε μη εκτεθειμένο ιστό δέρματος ποντικίου για έκθεση σε 12.5 Gy ακτίνων X [113]. Στη έρευνα αυτή βρέθηκαν επίπεδα AP ομαδοποιημένων βλαβών 1000 με 1400 clusters/Gbp μετά από 20 εβδομάδες.

Μετά από 96 ώρες από την ακτινοβόληση τα επίπεδα βλαβών εμφανίζονται υψηλά και στους δύο ιστούς χωρίς να παρατηρείται αξιόλογη πτώση ενώ σε μια περίπτωση στο παχύ έντερο είχαμε σημαντική άνοδο. Τα συμπλέγματα αυτά δεν γίνεται να είναι ίδια με εκείνα της άμεσης απόκρισης του οργανισμού καθώς λόγω κυτταρικής διαίρεσης οι βλάβες σε απέναντι κλώνους γίνονται μονόκλωνες και δε θα μπορούσαμε να τις ανιχνεύσουμε. Γενικά, η επιδιόρθωση ενός συμπλέγματος πραγματοποιείται σε διάστημα μικρότερο των 2.6 ημερών. Επομένως, η διαφαινόμενη επαγωγή και αναδημιουργία των οξειδωτικών βλαβών DNA σε απομακρυσμένους ιστούς υποδεικνύει παρατεταμένη και εκτεταμένη χωρικά ανάπτυξη στρες.

Μετά την ακτινοβόληση με τόσο υψηλές δόσεις ΙΑ (10 και 40 Gy) γνωρίζουμε πως οι βλάβες που προκαλούνται στον ιστό είναι τόσο εκτεταμένες που το μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων δεν επιβιώνει. Λόγω του μεγάλου αριθμού DSBs που δημιουργούνται τα κύτταρα οδηγούνται σε αποπτωτικό θάνατο ή/και παράγουν σήματα κινδύνου. Τα ακτινοβολημένα κύτταρα λόγω των βλαβών DNA (μέσω απόκριση του DDR) και του έντονου οξειδωτικού στρες επάγουν την έκλυση κυτοκίνων οι οποίες αυτοκρινικά ή παρακρινικά δύναται να πυροδοτήσουν αποπτωτικά μονοπάτια και την παραγωγή ROS και RNS. Ακόμη, χημοκίνες και προφλεγμονώδεις κυτοκίνες που εκλύονται από τα ακτινοβολημένα ή τα παρακείμενα κύτταρα ενεργοποιούν κύτταρα του ανοσοποιητικού όπως τα μακροφάγα τα οποία με τη σειρά τους εκκρίνουν κυτοκίνες, αυξητικούς παράγοντες και ROS/RNS που μπορούν προκαλέσουν βλάβες στα κύτταρα της περιοχής. Παράλληλα, σήματα κινδύνου από αποπτωτικά κύτταρα όπως το οξειδωμένο εξωκυτταρικό DNA που όπως είδαμε σε προηγούμενο κεφάλαιο αναγνωρίζεται από ανοσοκύτταρα, ινοβλάστες και επιθηλιακά κύτταρα τα οποία πιθανώς με αυτό τον τρόπο διαμεσολαβούν στην απόκριση ιστών μακριά από το σημείο της αρχικής κυτταρικής βλάβης. Επιπλέον, κυτοκίνες και ROS λειτουργώντας ως μιτωτικά σήματα μπορούν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη αντιγραφικού στρες στα ακτινοβολημένα ή παρακείμενα κύτταρα συντελώντας στη διαταραχή της ομοιόστασης των κυττάρων. Πέρα από την αρχική παραγωγή και διάχυση των ελεύθερων ριζών, τα παραπάνω γεγονότα λογικά θα

παρατείνουν το αρχικό οξειδωτικό στρες στον ακτινοβολημένο ιστό και τις γύρω περιοχές επάγοντας νέες OCDLs και DSBs.

Το πλήθος ROS και RNS που έχει παραχθεί στην ακτινοβολημένη περιοχή του ποδιού στο ποντίκι, καθότι αποτελείται από ιδιαίτερα ασταθή μόρια και ιόντα, εκτός από κοντινές περιοχές δεν έχει την ικανότητα να βλάψει τον ιστό της γλώσσας και του παχέος εντέρου παράγοντας τέτοιο αριθμό συσσωρευμένων βλαβών. Ωστόσο, μακρομόρια όπως ανοσοκύτταρα, κυτοκίνες και σήματα κινδύνου (μόρια DAMPs) μπορούν να μεταφερθούν μέσω του κυκλοφορικού σε μακρινούς ιστούς, εφόσον όπως έχουμε δει ο επιθηλιακός φραγμός αίρεται. Τα μακροφάγα, ακόμη, είναι δυνατόν να ταξιδέψουν στον οργανισμό εκλύοντας κυτοκίνες και ROS άλλες περιοχές, αλλά και να ενεργοποιηθούν στους απομακρυσμένους ιστούς από μεταφερόμενες κυτοκίνες και άλλα σήματα κινδύνου. Αυτά τα προφλεγμονώδη σήματα μαζί με την άμεση απόκριση του εγγενούς ανοσοποιητικού δύναται να οδηγήσουν σε ανάπτυξη οξειδωτικού στρες και σημαντικό αριθμό βλαβών όπως παρατηρείται 24 ώρες μετά. Οι πρώτες AP σύνθετες βλάβες που εμφανίζονται σε αυτό το χρονικό σημείο, λόγω της δυσκολίας του μηχανισμού BER μαζί με την προσβολή σημαντικών βιομορίων (π.χ. μόρια των μηχανισμών επιδιόρθωσης), συμβάλουν στην παρεμπόδιση της ομαλής λειτουργίας και επιδιόρθωσης των βλαβών των κυττάρων [117]. Η επιμονή των OCDLs και η μετατροπή μέρους τους σε DSBs πιθανώς να επάγουν τη συνεχή ενεργοποίηση του DDR οδηγώντας σε εμφάνιση γηρασμένου φαινότυπου, απόπτωση και νέα ανοσολογική απόκριση [15,90,117]. Η παρατεταμένη διαταραχή της ομοιόστασης των κυττάρων μαζί με τη διατήρηση των βλαβών στην ακτινοβολημένη περιοχή μπορούν να προκαλέσουν σε αυτή την περίπτωση επιμένουσα φλεγμονώδη απόκριση στον ιστό του εντέρου και της γλώσσας που πιθανότατα συντηρεί τα επίπεδα βλαβών που παρατηρήσαμε σε υψηλά επίπεδα. Η μετατροπή AP clusters σε DSBs είναι φαινόμενο που παρατηρείται κυρίως σε έντονα πολλαπλασιαζόμενους ιστούς [118] όπως το παχύ έντερο, γεγονός που εξηγεί την επιμονή των βλαβών εκεί και ίσως την αύξηση τους μετά από 96 ώρες λόγω της ανάπτυξης οξειδωτικού στρες. Τα πολλαπλά μιτωτικά σήματα που ίσως παράγονται δύναται να οδηγούν σε επιγενετικές τροποποιήσεις και εμφάνιση αντιγραφικού στρες, δυσκολεύοντας επιπλέον τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης

των βλαβών DNA, με επακόλουθο ελλειμματική επιδιόρθωση ή/και δημιουργία νέων βλαβών. Ακόμη, πρόσφατη έρευνα [119] έδειξε πως AP βλάβες δημιουργούνται σε μεγαλύτερο βαθμό στους ιστούς κατά την διαδικασία της αντιγραφής, γεγονός που ίσως εξηγεί εν μέρει το σχηματισμό AP clusters.

Από την άλλη παρατηρήσαμε πως σε γενικές γραμμές αύξηση της απορροφούμενης δόσης IA δεν επηρεάζει σημαντικά σε καμία από τις δύο τεχνικές ακτινοβολήσης. Αυτό μας δείχνει πως δόση 10 Gy είναι ικανή να προκαλέσει τέτοιο στρες και βλάβες στην ακτινοβολημένη περιοχή πυροδοτώντας τις διαδικασίες που αναφέραμε χωρίς να αλλάζει σημαντικά κάτι με την αύξηση της δόσης. Η διασπορά της ακτινοβολίας στο χώρο δεν μπορεί να εξηγήσει την επαγωγή βλαβών σε αυτούς τους ιστούς καθώς σε απόσταση μεγαλύτερη από 5 cm ανιχνεύτηκε μηδενική διασπορά ή έως 1 mGy σε λίγες περιπτώσεις.

Στα αποτελέσματα μας παρουσιάστηκαν υψηλά επίπεδα AP clusters σε κάθε διαφορετικό τρόπο ακτινοβολήσης με παρόμοια συχνότητα σε κάθε ιστό. Γενικά, η προστασία των κυττάρων από την δημιουργία βλαβών DNA από τις παραπάνω διαδικασίες εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως η αποτελεσματικότητα των επιδιορθωτικών μηχανισμών, η συγκέντρωση αντιοξειδωτικών, ο πολλαπλασιαστικός ρυθμός και διεύθυνση ανοσοκυττάρων στους ιστούς. Η επαγωγή και παραμονή σε υψηλά επίπεδα των βλαβών για μέρες σε απομακρυσμένους μη ακτινοβολημένους ιστούς είναι ένα πολυπαραγοντικό και σύνθετο φαινόμενο. Προφλεγμονώδεις αποκρίσεις, η συνεχής ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού και το οξειδωτικό και το αντιγραφικό στρες αποτελούν πιθανούς τρόπους σύνθεσης ενός κυτταροτοξικού περιβάλλοντος όπου η ομαλή λειτουργία των κυττάρων διαταράσσεται. Η επιμονή των AP clusters μετά από τόσες μέρες υποδεικνύουν πως πέρα από την άμεση φλεγμονώδη απόκριση, η επαγωγή επιμένουσας φλεγμονής που περιλαμβάνει αλλαγή της ομοιόστασης του ιστού ενδεχομένως εξηγεί το σχηματισμό των σύνθετων οξειδωτικών βλαβών που ανιχνεύσαμε.

Καθότι η επαγωγή OCDLs σε συστηματικό επίπεδο αποτελεί βασικό στοιχείο αξιολόγησης των αποτελεσμάτων της ακτινοθεραπείας αλλά και γενικότερα της IA απαιτείται διεξοδική ανάλυση τόσο του τρόπου επαγωγής τους όσο και μια ακριβέστερη ποσοτική τους εκτίμηση στους ιστούς όλου του οργανισμού. Χρειάζεται να μελετηθούν διεξοδικά οι

διαφορετικοί πιθανοί τρόποι ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού, τα σήματα κινδύνου, το είδος των μακροφάγων και των κυτοκίνων που εμπλέκονται όπως επίσης και η αναλογία των διάφορων ομαδοποιημένων βλαβών στο DNA. Με αυτό τον τρόπο θα μπορέσουμε να αποκτήσουμε καλύτερη εικόνα του φαινομένου, αξιοποιώντας επίσης *in vivo* και *in vitro* πειράματα σε ανθρώπινα κύτταρα. Παράλληλα, καθότι λόγω της πολυπλοκότητας του φαινομένου και των αποκρίσεων του οργανισμού καθίσταται δύσκολο να εκτιμηθεί ο ρόλος του κάθε παράγοντα αυτόνομα, κρίνεται απαραίτητος ο σχεδιασμός και η ανάπτυξη υπολογιστικών μοντέλων για το σκοπό αυτό.

Βιβλιογραφία

1. Σαρρής, Π. (2004). *Εισαγωγή στην κυτταρική βιολογία και γενετική*.
2. Wolfe, S.L. (1972). *Biology of the cell*, Wadsworth Pub. Co.
3. Alberts, B., et al. (2009). *Essential cell biology*. 3rd edition, New York: Garland Science.
4. Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D. & Darnell, J. (2007). *Molecular Cell Biology*. 6th edition, W.H. Freeman and Company.
5. Azzam, E.I., Jay-Gerin, J.P. & Pain, D. (2012). Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett.*, 327, 48–60.
6. Μακροπούλου, Μ. (2010). *Σημειώσεις Βιοφυσικής*.
7. Nigg, E.A., (1995). Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *BioEssays*, 17(6), 471–80.
8. Cooper, G.M. (2000). *The Cell: A molecular approach*. 2nd ed., Sunderland (MA): Sinauer Associates.
9. Μαργαρίτης, Χ.Λ. (1998). *Ραδιοβιολογία*, Επτάλοφος.
10. Edward, L.A. (1998). *Radiation Biophysics*, 2nd ed., Academic Press.
11. International Atomic Energy Agency (2010). *Radiation Biology*, IAEA.
12. Ελληνική Επιτροπή Ατομικής Ενέργειας (2011). *Μαθήματα ακτινοπροστασίας για χειριστές ιατρικών μηχανημάτων ιοντίζουσων ακτινοβολιών*.
13. Γαζής, Ε.Ν. (1999). *Ιοντίζουσες ακτινοβολίες*, εκδ. ΕΜΠ.
14. Spinks, J.W.T. & Woods, R.J. (1990). *An introduction to Radiation Chemistry*, 3rd ed., Wiley-Interscience.
15. Georgakilas, A.G., Neill, P.O. & Stewart, R.D. (2013). Induction and repair of clustered DNA lesions: What do we know so far? *Rad. Res.*, 180(1), 100-109.
16. Ward, J.F. (1988). DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation and repairability, *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 35 (3), 95-125.
17. De Bont R. & Van Larebeke N. (2004). Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis*, 19(3), 169-185.
18. Lhomme, J., Constant, J.F. & Demeunynck, M. (1999). Abasic DNA Structure Reactivity and Recognition. *Biopolymers*, 52(2), 65-83.
19. Boieux, S. & Guillet, M. (2004). Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair*, 3(1), 1-12.
20. Ward, J.F. (1981). Some biochemical consequences of the spatial distribution of ionizing radiation produced free radicals. *Radiat. Res.*, 86, 185-195.

21. Hada, M. & Georgakilas, A.G. (2008). Formation of clustered DNA Damage after high-LET irradiation: A review. *Radiat. Res.*, *49*, 203-210.
22. Godhead, D.T., (1994). Initial events in the cellular effects of ionizing radiation: clustered damage in DNA. *Radiat. Biol.*, *65*, 7-17.
23. Grenon, M., Gilbert, C. & Lowndes N.F. (2001). Checkpoint activation in response to double-strand breaks requires the Mre11/Rad50/Xrs2 complex. *Nat. Cell Biol.*, *3*, 844–847.
24. Durocher, D. & Jackson, S.P. (2001). DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme? *Cur. Op. in Cell Biol.*, *13*(2), 225-231.
25. Ashcroft, M., Kubbatat, M.G. & Vousden, K.H. (1999). Regulation of p53 Function and Stability by Phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.*, *19*(3), 1751-1758.
26. Bartek, J. & Lukas, J. (2003). Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell*, *3*, 421–429.
27. Wen-Cheng, C. et al. (2008). Chk2-dependent phosphorylation of XRCC1 in the DNA damage response promotes base excision. *EMBO J.*, *27*, 3140-3150.
28. Chiruvella, K.K., Liang, Z. & Wilson, T.E. (2013). Repair of double-strand breaks by end joining. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, *5*(5), a012757.
29. Price, B.D. & D’Andrea, A.D. (2013). Chromatin remodeling at DNA double-strand breaks. *Cell*, *152*, 1344–1354.
30. Pena-Diaz, J. & Jiricny, J. (2012). *Mammalian mismatch repair: error-free or error-prone? Trends Biochem. Sci.* *37*, 206–214.
31. Kamileri, I., Karakasilioti, I. & Garinis, G.A. (2012). Nucleotide excision repair: new tricks with old bricks. *Trends Genet.*, *28*, 566–573.
32. Schermerhorn, K.M. & Delaney, S. (2014). A Chemical and Kinetic Perspective on Base Excision Repair of DNA. *Acc. Chem. Res.*, *47* (4), 1238–1246.
33. Beard, W. A. & Wilson, S. H. (2006) *Structure and Mechanism of DNA Polymerase β* . *Chem. Rev.*, *106*, 361–382.
34. Al-Tassan, N. et al., (2002). Inherited Variants of MYH Associated with Somatic G:C→T:A Mutations in Colorectal Tumors. *Nat. Genet.*, *30*, 227–232
35. Doetsch, P. & Cunningham, R. (1990). The Enzymology of Apurinic/Apyrimidinic Endonucleases. *Mutat. Res.* *236*, 173–201.
36. Kovtun, I. V., et al. (2007). OGG1 Initiates Age-dependent CAG Trinucleotide Expansion in Somatic Cells. *Nature*, *447*, 447–452.
37. Walker, F.O. (2007). Huntington's disease, *Lancet*, *369*, 218–28
38. M. Kadhim et al. (2013) Non-targeted effects of ionising radiation—Implications for low dose risk. *Mutation Research*, *752*, 84–98.

39. Cheng, K.C., Cahill, D.S., Kasai, H., Nishimura, S. & Loeb, L.A. (1992). 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G-T and C-A substitutions. *Biol Chem.*, 267 (1), 166–72.
40. Sawyer, S.A., Parsch, J., Zhang, Z. & Hartl, D.L. (2007). Prevalence of positive selection among nearly neutral amino acid replacements in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104 (16), 6504–10.
41. Majno, G. and I. Joris (1995). Apoptosis, oncosis and necrosis: An overview of cell death. *Am. J. Pathol.*, 146, 3-15.
42. Cohen, B.L. (2007). The cancer risk from low-level radiation. Radiation Dose from Adult and Pediatric Multidetector Computed Tomography. *Medical Radiology*, 33-49.
43. International Commission on Radiological Protection (2012). ICRP statement on tissue reactions and early and late effects of radiation in normal tissues and organs – threshold doses for tissue reactions in a radiation protection context, *ICRP publ. 118, Ann. ICRP 41(1-2)*, 1–322.
44. Takuma, N. (2013). Discussions on target theory: past and present, *Radiat Res.*, 54(6), 1161–1163.
45. Smilenov, E.J. Hall, W.M. Bonner & O.A. Sedelnikova (2006). A microbeam study of DNA double-strand breaks in bystander primary human fibroblasts. *Radiation protection dosimetry 122*, 256-259.
46. Hatzi, I.V., et al. (2015). Non-targeted radiation effects in vivo: A critical glance of the future in radiobiology. *Cancer Letters*, 356(1),34-42.
47. Sprung, C.N., Ivashkevich, A., Forrester, H.B., Redon, C.E., Georgakilas, A. & Marti, O.A. (2015). Oxidative DNA damage caused by inflammation may link to stress-induced non-targeted effects. *Cancer Letters*, 356(1), 72-81.
48. Ermolaeva, M.A. & Schumacher, B. (2013) The innate immune system as mediator of systemic DNA damage responses. *Commun. Integr. Biol.*, 13;6(6), e26926.
49. Siva, S., MacManus, M.P., Martin, R.F. & Martin, O.A. (2015). Abscopal effects of radiation therapy: A clinical review for the radiobiologist. *Cancer Letters*, 356(1), 82–90.
50. Wright, E. G. (2010). Manifestations and mechanisms of non-targeted effects of ionizing radiation. *Mutation Research*, 687(1-2), 28-33.
51. Mantovani A., Allavena P., Sica A., Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature*, 454, 436–444.
52. Redon, C. E. et al., (2010). Tumors induce complex DNA damage in distant proliferative tissues in vivo. *PNAS*, 107(42), 17992-7.

53. Morgan, W.F. & Sowa, M.B. (2015). Non-targeted effects induced by ionizing radiation: Mechanisms and potential impact on radiation induced health effects. *Cancer Letters*, 356(1), 17-21.
54. Nagasawa, J.B. Little (1992). Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles. *Cancer research*, 52, 6394-6396.
55. Shao, C. et al. (2004). Targeted cytoplasmic irradiation induces bystander response, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(37), 13495-500.
56. G. Schettino, S.T., Rashid A.I. & Prise, K.M. (2010). Radiation microbeams as spatial and temporal probes of subcellular and tissue response. *Mut. Res.*, 704, 68-77.
57. Matsumoto, H. & Ohnishi T. (2004). Contribution of radiation-induced, nitric oxide-mediated bystander effect to radiation-induced adaptive response. *Biol. Sci. Space* 18(3), 108-9.
58. Joiner, M.C. et al. (1996). Hypersensitivity to very-low single radiation doses: its relationship to the adaptive response and induced radioresistance. *Mutat. Res.*, 358, 171– 183.
59. Mole, R. (1953). Whole body irradiation – radiobiology or medicine?. *Br J. Radiol.*, 26, 234–241.
60. Τσίντου Μαγδαληνή (2011). Μη στοχευμένες επιδράσεις της ιοντίζουσας ακτινοβολίας. *Helmedica* 8.
61. Nobler, M.P. (1969). The abscopal effect in malignant lymphoma and its relationship to lymphocyte circulation. *Radiology* 93, 410–412.
62. Goh, K.O. & Sumner, H. (1968). Breaks in normal human chromosomes: Are they induced by a transferable substance in the plasma of persons exposed to total-body irradiation? *Radiat. Res.* 35(1), 171-81.
63. Khan, M.A., Hill, R.P. & Van Dyk, J. (1998). Partial volume rat lung irradiation: an evaluation of early DNA damage. *Int. J. Radiat. Oncology Biol. Phys.*, 40, 467–476.
64. Koturbash, I. et al. (2008). In vivo bystander effect: cranial X-irradiation leads to elevated DNA damage, altered cellular proliferation and apoptosis, and increased p53 levels in shielded spleen. *Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.*, 70(2), 554-62
65. Hayashi, Y. et al. (2005). Long-term effects of radiation dose on inflammatory markers in atomic bomb survivors, *Am. J. Med.*, 118, 83–86.
66. T. Hayashi, Y. et al (2003). Radiation dose-dependent increases in inflammatory response markers in A-bomb survivors. *Int. J. Radiat. Biol.*, 79, 129–136.
67. R. Wakeford, M.P. Little (2003) Risk coefficients for childhood cancer after intrauterine irradiation: a review. *Int. J. Radiat. Biol.* 79, 293–309.
68. International Commission on Radiological Protection (2003). Biological effects after prenatal irradiation (embryo and fetus), *Ann. ICRP* 33, 5–206.

69. Preston, D.L., Cullings, H., A. Suyama, Funamoto S., Nishi N., Soda M., Mabuchi K., K. Kodama, F. Kasagi, Shore R.E. (2008). Solid cancer incidence in atomic bomb survivors exposed in utero or as young children. *J. Natl. Cancer Inst.* 100, 428–436.
70. Pearce, M.S., Salotti, J.A., Little M.P., McHugh K., C. Lee, K.P. Kim, N.L. Howe, C.M. Ronckers, P. Rajaraman, A.W. Sir Craft, L. Parker, G.A. Berrington de (2012) Radiation exposure from CT scans in childhood and subsequent risk of leukaemia and brain tumours: a retrospective cohort study. *Lancet* 380, 499–505.
71. Annals of the ICRP (2012). *Early and late effects of radiation in normal tissues and organs: threshold doses for tissue reactions and other non-cancer effects of radiation in a radiation protection context.* public draft;. published at ICRP website: www.icrp.org
72. Laskaratou, D. A., Mavragani, I.V. & Georgakilas, A.G. (2014). Cancer and Inflammation Mechanisms: Chemical, Biological and Clinical Aspects. *Ch 18: Inflammatory pathways of radiation-induced tissue injury.* 1st Edition. John Wiley & Sons.
73. Doty, R.L. (2009) The olfactory system and its disorders. *Semin Neurol*, 29, 74–81.
74. Rodgers, C.C. (2011). Dental X-ray exposure and Alzheimer's disease: a hypothetical etiological association. *Med Hypotheses*, 77, 29–34
75. Lazarini, F. et al. (2009). Cellular and behavioral effects of cranial irradiation of the subventricular zone in adult mice. *PLoS One* 4, e7017.
76. Loganovsky, K.N., Volovik, S.V., Manton K.G., Bazyka DA & Flor-Henry P. (2005). Whether ionizing radiation is a risk factor for schizophrenia spectrum disorders? *World J Biol Psychiatry*, 6, 212–230
77. Iwata, Y., Suzuki K., Wakuda T., Seki N., Thanseem I, Matsuzaki H, Mamiya T, Ueki T, Mikawa S, Sasaki T, Suda S, Yamamoto S, Tsuchiya KJ, Sugihara G, Nakamura K, Sato K, Takei N, Hashimoto K, Mori N. (2008). Irradiation in adulthood as a new model of schizophrenia. *PLoS One*, 3:e2283.
78. Acharya, M.M., Lan, M.L., Kan, V.H., Patel, N.H., Giedzinski, E., Tseng B.P., Limoli, C.L. (2010). Consequences of ionizing radiation-induced damage in human neural stem cells. *Free Radic Biol Med*, 49, 1846–1855.
79. Picano, E. et al. (2012). *Cancer and non-cancer brain and eye effects of chronic low-dose ionizing radiation exposure.* *BMC Cancer*, 12, 157.
80. Mancuso, M. et al. (2011). Oncogenic bystander 705 radiation effects in Patched heterozygous mouse cerebellum, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 105 (2008), 12445–12450.
81. Ohba, K., Omagari, K., Nakamura T., Ikuno, N., Saeki, S., I. Matsuo, H. Kinoshita, J. Masuda, Hazama, H., Sakamoto, I. (1998). Abscopal regression of hepatocellular carcinoma after radiotherapy for bone metastasis, *Gut* 43, 575–577.

82. Balkwill, F. & Joffroy, C., (2010). TNF: a tumor-suppressing factor or a tumor-promoting factor? *Future Oncol.*, 6(12), 1833-6
83. Havaki, S. et. al. (2015). The role of oxidative DNA damage in radiation induced bystander effect, *Cancer Letters*, 356, 43–51
84. Klammer, H., MLadenov, E. & Iliakis, G. (2015). Bystander effects as manifestation of intercellular communication of DNA damage and of the cellular oxidative status. *Cancer Letters*, 356, 58-71
85. Azzam, E.I., de Toledo, S.M. & Little, J.B., (2003). Oxidative metabolism, gap junctions and the ionizing radiation-induced bystander effect, *Oncogene*, 22, 7050–7057.
86. Prithivirajsingh, S., Story, M.D., Bergh, S.A., Geara F.B., K.K. Ang, Ismail S.M., et al., (2004). Accumulation of the common mitochondrial DNA deletion induced by ionizing radiation, *FEBS Lett.* 571, 227–232.
87. Graziewicz, M.A., Day, B.J., Copeland W.C. (2002). The mitochondrial DNA polymerase as a target of oxidative damage, *Nucl. Acids Res.* 30, 2817–2824.
88. Land, G. L. & Messmer, K. (2012). The danger theory in view of the injury hypothesis: 20 years later. *Front. Immunology*, 3, 349.
89. Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 991–1045.
90. Heil, M. & Land, W. G. (2014). Danger signals – damaged-self recognition across the tree of life. *Front. Plant Sci.*, 5, 578.
91. Chatzinikolaou, G., Karakasilioti, I. & Garinis, G.A. (2014) DNA damage and innate immunity: links and trade-offs, *Trends in Immunology*, 35,(9), 429-435.
92. Glebova, K. et al. (2015). Oxidized extracellular DNA as a stress signal that may modify response to anticancer therapy. *Cancer Letters*, 356, 22-33.
93. Patel, S.P. (2011). The Inflammatory response to double stranded DNA in endothelial cells is mediated by NFkB and TNFa. *Plosone*, 6(5): e19910.
94. Zhang, X. et al. (2011) Cutting edge: Ku70 is a novel cytosolic DNA sensor that induces type III rather than type I IFN. *J. Immunol.*, 186, 4541–4545.
95. Ferguson, B.J. et al. (2012) DNA-PK is a DNA sensor for IRF-3-dependent innate immunity. *Elife*, 1, e00047.
96. Aivaliotis, I. L., Pateras, I.S., et. al. (2012). How do cytokines trigger genomic instability? *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2012, 536761.
97. Zhou, H. et al. (2008). Mitochondrial function and nuclear factor-kappaB-mediated signaling in radiation-induced bystander effects, *Cancer Res.*, 68, 2233–2240.
98. Zhou, H. et al. (2005). Mechanism of radiation-induced bystander effect: role of the cyclooxygenase-2 signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102, 14641–14646.

99. J.S. Dickey, B.J. Baird, C.E. Redon, M.V. Sokolov, O.A. Sedelnikova, W.M. Bonner,(2009). Intercellular communication of cellular stress monitored by gamma-H2AX induction. *Carcinogenesis* 30, 1686-1695.
100. Gorgoulis V.G., et al. (2003). P53 activates ICAM-1 (CD54) expression in an NF-kappaB-independent manner, *EMBO*, 22, 1567–1578.
101. Sprung, C.N. Forrester, H.B., Siva, S. & Martin, O.A. (2015). Immunological markers that predict radiation toxicity. *Cancer Lett.* 368(2), 191-197.
102. Klimp, A.H. et al. (2002). A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. *Crit. Rev. Onc. Hematol.* 44(2), 143-61.
103. Tawa, R. et al. (1998). Effects of X-ray irradiation on genomic DNA methylation levels in mouse tissues. *Radiat. Res.* 39(4), 271-8.
104. Franco, R. et al. (2008). DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Letters*, 266:6-1.
105. Ghandhi, S.A., Yaghoubian, B. & Amundson S.A. (2008). Global gene expression analyses of bystander and alpha particle irradiated normal human lung fibroblasts: synchronous and differential responses, *BMC Med. Genomics* 1, 63.
106. Chaudry, M.A. (2006). Radiation-induced gene expression profile of human cells deficient in 8-hydroxy-2'-deoxyguanine glycosylase, *Int. J. Cancer* 118(3), 633-42
107. Lontos, M. (2007). Deregulated overexpression of hCdt1 and hCdc6 promotes malignant behavior, *Cancer Res.* 67(22), 10899-909.
108. Sutherland, B.M., Georgakilas, A.G., Bennett, P.V. et. al. (2003). Quantifying clustered DNA damage induction and repair by gel electrophoresis, electronic imaging and number average length analysis. *Mutat. Res.*, 531, 93–107
109. Sutherland B.M., Bennett, P.V & Georgakilas, A.G. (2003). Evaluation of number average length analysis in quantifying double strand breaks in genomic DNAs. *Biochemistry*, 42, 3375-84.
110. Hada, M. & Georgakilas, A.G. (2008). Formation of clustered DNA damage after high-LET irradiation: a review. *Radiat. Res.* 49(3), 203-10.
111. Clifford, D.M., Izumi, T., Mitra, S. & Tainer, J.A. (2000). DNA-bound structures and mutants reveal abasic DNA binding by APE1 DNA repair and coordination. *Nature* 403 (6768), 451–456.
112. Kelley, M.R. & Fishel, M.L. (2007). The DNA base excision repair protein Ape1/Ref-1 as a Therapeutic and chemopreventive target. *Molecular Aspects of Medicine*, 28 (3-4), 375–395.
113. Gollapalle, E. et al. (2007). Detection of oxidative clustered DNA lesions in X-Irradiated mouse skin tissues and human MCF-7 breast cancer cells. *Radiation Research*, 167, 207-216.
114. Cadet, J., Douki, T., Gasparutto, D. & Ravanat, J. (2003). Oxidative damage to DNA:

Formation, measurement and biochemical features. *Mutat. Res.*, 531, 5–23.

115. Gedik, C. M., A. Collins & EESCOD (2005). Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: Results of an in terlaboratory validation study. *FASEB*, 19, 82–84.
116. Bennett, P.V. et al (2005). Endogenous DNA damage clusters in human skin, 3-D model and cultured skin cells. *Free Radic. Biol. Med.*, 39, 832–839.
117. Georgakilas, A. G., Bennett, P. V. and Sutherland, B. M. (2002). High efficiency detection of bistranded abasic clusters in γ -irradiated DNA by putrescine. *Nucleic Acids Res.*, 30, 2800–2808.
118. Redon, C., Dickey, J.S., Nakamura, A., Kareva, I., Naf, D., Nowsheen, S., et al. (2010). Tumors induce complex DNA damage in distant proliferative tissues in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 17992–97.
119. Chastain, P.D., Nakamura, J., Rao, S., Chu, H., Ibrahim, J.G., Swenberg, J.A. et al. (2010). Abasic sites preferentially form at regions undergoing DNA replication. *FASEB*, 24, 3674–80.

Παράρτημα

I. Ιστός γλώσσας

α) Αναλυτικά πειραματικά αποτελέσματα

Δείγμα	Δόση και τεχνική ακτινοβολήσης	Χρονικό σημείο	1η εκτέλεση Clusters/Gbp	2η εκτέλεση Clusters/Gbp	Μέση τιμή Clusters/Gbp
1.1T	10 Gy MRT 2x2	24 h	1030	1232	1131
1.2T			931		931
1.3T			1186	1069	1127
1.4T			1526	1685	1606
1.5T			1008	1074	1041
2.1T		96 h			
2.2T			1717	1098	1407
2.3T			1374		1374
2.4T			1103	1041	1072
2.5T			1263		1263
3.1T	40 Gy MRT 2x2	24 h	-	-	-
3.2T			1555		1555
3.3T			865	1227	1046
3.4T			1656	1503	1579
3.5T			1494	1245	1370
4.1T		96 h	1512	1508	1510
4.2T			1108	913	1010
4.3T			1368	1483	1425
4.4T			938	1243	1091
4.5T			1426	1137	1282

5.1T	10 Gy MRT 8x8	24 h	1451	1032	1242
5.2T			1583		1583
5.3T			1392	1609	1501
5.4T			1566	1097	1332
5.5T					
6.1T		96 h	1231		1231
6.2T			1148	1100	1124
6.3T			1625	1955	1790
6.4T			1163		1163
6.5T			1805	1427	1616
7.1T	40 Gy MRT 8x8	24 h			
7.2T			1279	1140	1210
7.3T			1383	1531	1457
7.4T			1547	1339	1443
7.5T			1633	1138	1385
8.1T		96 h	1471	1347	1409
8.2T			1852	1519	1685
8.3T			1162	926	1044
8.4T					
8.5T			979		979
9.1T	10 Gy BB 2x2	24 h		1140	1140
9.2T				1124	1124
9.3T			1889	2064	1977
9.4T					
9.5T			1295	988	1142
10.1T		96 h	1070	960	1015
10.2T			1332		1332
10.3T					
10.4T			1149	1287	1218
10.5T			1442	1438	1440
11.1T	40 Gy BB 2x2	24 h	983		983
11.2T			965	1133	1049
11.3T			1028	1130	1079
11.4T					
11.5T			1166	1023	1094
12.1T		96 h		1288	1288
12.2T			1093	946	1019
12.3T			1084	980	1032
12.4T			1310	1502	1406
12.5T			1129	968	1048

13.1T	10 Gy BB 8x8	24 h	1635	1369	1502
13.2T				1050	1050
13.3T			1253	1196	1224
13.4T					
13.5T			1874	1658	1766
14.1T		96 h	967	1279	1123
14.2T				1440	1440
14.3T			1470		1470
14.4T			1527	1302	1415
14.5T			1390	1132	1261
15.1T	40 Gy BB 8x8	24 h			
15.2T			1859	1469	1664
15.3T			1328	929	1129
15.4T			1665	1247	1456
15.5T			1490	1528	1509
16.1T		96 h	1219	1158	1188
16.2T			1225	1259	1242
16.3T				964	964
16.4T			1294	1359	1327
16.5T				1297	1297
17.1T	10 Gy BB 8x1	24 h		1222	1022
17.2T			1485	1626	1555
17.3T			1606	1634	1620
17.4T			1231	1165	1198
17.5T			1305	1788	1547
18.1T		96 h	1173	1364	1268
18.2T			1015		1015
18.3T			1236	1513	1375
18.4T					
18.5T			1067	1235	1151
19.1T	40 Gy BB 8x1	24 h	842	1212	1027
19.2T			1637		1637
19.3T			1178		1178
19.4T			1690	1462	1576
19.5T			1340		1340
20.1T		96 h	1199		1199
20.2T			1490	1387	1439
20.3T					
20.4T			1345	1077	1211
20.5T				1371	1371

21.1T	control (0 Gy)	24 h	602	731	666
21.2T			906	744	825
21.3T			537	611	574
21.4T			724		724
21.5T				902	902

β) Μέση τιμή ομάδας δειγμάτων και αποτελέσματα t-test

Δείγμα	Δόση και τεχνική ακτινοβολήσης	Χρονικό σημείο	Μέση τιμή ομάδας CI/Gbp	Τυπική απόκλιση και τυπικό σφάλμα	t-test			
1.1T 1.2T 1.3T 1.4T 1.5T	10 Gy MRT 2x2	24 h	1167	258	0.0015			
				115				
2.1T 2.2T 2.3T 2.4T 2.5T				96 h		1279	151	0.0017
							68	
3.1T 3.2T 3.3T 3.4T 3.5T							24 h	
	110							
4.1T 4.2T 4.3T 4.4T 4.5T	96 h	1264	213		0.0002			
			95					

5.1T	10 Gy MRT 8x8	24 h	1414	156	0.0001
5.2T					
5.3T					
5.4T					
5.5T					
6.1T	40 Gy MRT 8x8	96 h	1385	299	0.0007
6.2T					
6.3T					
6.4T					
6.5T					
7.1T	10 Gy BB 2x2	24 h	1374	114	0.0000
7.2T					
7.3T					
7.4T					
7.5T					
8.1T	40 Gy BB 2x2	96 h	1279	330	0.0019
8.2T					
8.3T					
8.4T					
8.5T					
9.1T	10 Gy MRT 8x8	24 h	1346	421	0.0052
9.2T					
9.3T					
9.4T					
9.5T					
10.1T	40 Gy MRT 8x8	96 h	1251	182	0.0001
10.2T					
10.3T					
10.4T					
10.5T					
11.1T	10 Gy BB 2x2	24 h	1051	49	0.0012
11.2T					
11.3T					
11.4T					
11.5T					
12.1T	40 Gy BB 2x2	96 h	1159	177	0.0007
12.2T					
12.3T					
12.4T					
12.5T					

13.1T	10 Gy BB 8x8	24 h	1386	314	0.0013
13.2T					
13.3T					
13.4T					
13.5T				141	
14.1T	10 Gy BB 8x8	96 h	1342	147	0.0001
14.2T					
14.3T					
14.4T					
14.5T				66	
15.1T	40 Gy BB 8x8	24 h	1439	225	0.0002
15.2T					
15.3T					
15.4T					
15.5T				101	
16.1T	40 Gy BB 8x8	96 h	1204	144	0.0002
16.2T					
16.3T					
16.4T					
16.5T				64	
17.1T	10 Gy BB 8x1	24 h	1388	263	0.0000
17.2T					
17.3T					
17.4T					
17.5T				118	
18.1T	10 Gy BB 8x1	96 h	1202	155	0.0002
18.2T					
18.3T					
18.4T					
18.5T				69	
19.1T	40 Gy BB 8x1	24 h	1352	259	0.0005
19.2T					
19.3T					
19.4T					
19.5T				116	
20.1T	40 Gy BB 8x1	96 h	1305	119	0.0000
20.2T					
20.3T					
20.4T					
20.5T				53	

21.1T	control (0 Gy)	24 h	738	129
21.2T				
21.3T				
21.4T				
21.5T				

II. Ιστός παχέος εντέρου

α) Αναλυτικά πειραματικά αποτελέσματα

Δείγμα	Δόση και τεχνική ακτινοβολήσης	Χρονικό σημείο	1η εκτέλεση Clusters/Gbp	2η εκτέλεση Clusters/Gbp	Μέση τιμή Clusters/Gbp
1.1T	10 Gy MRT 2x2	24 h	1090	1339	1215
1.2T				1015	1015
1.3T			1612	1944	1778
1.4T			1048	1165	1106
1.5T			830	1073	952
2.1T		96 h	-	-	
2.2T				1408	1408
2.3T			1620	1570	1595
2.4T				1387	1387
2.5T			1107	1234	1171
3.1T	40 Gy MRT 2x2	24 h	819	1006	912
3.2T			1027	1055	1041
3.3T					
3.4T			1187	1088	1137
3.5T			1221		1221
4.1T		96 h			
4.2T			1024	927	976
4.3T				1144	1144
4.4T			1446	1973	1710
4.5T				1013	1013

5.1T	10 Gy MRT 8x8	24 h	1754	1461	1608
5.2T			1261	1192	1226
5.3T			1342	1194	1268
5.4T			1436	1349	1393
5.5T			-	-	-
6.1T		96 h	1289	1045	1167
6.2T			1487	1809	1648
6.3T			963	1046	1004
6.4T				1227	1227
6.5T				1089	1089
7.1T	40 Gy MRT 8x8	24 h	893	1017	955
7.2T			1308	964	1136
7.3T			1343	1506	1425
7.4T			1025	1096	1061
7.5T			1369		1369
8.1T		96 h	1759	1498	1628
8.2T				1020	1020
8.3T			1734	1934	1834
8.4T				1517	1517
8.5T			-	-	-
9.1T	10 Gy BB 2x2	24 h	901	1030	965
9.2T				1048	1048
9.3T			930	1136	1033
9.4T			1538	1097	1318
9.5T			1343	1234	1288
10.1T		96 h	1771	1251	1511
10.2T				1083	1083
10.3T			1367		1367
10.4T				1411	1411
10.5T			1013	1487	1250
11.1T	40 Gy BB 2x2	24 h	1010	965	987
11.2T			1506	1472	1489
11.3T				1793	1793
11.4T			1016	1199	1108
11.5T			2124	1633	1879
12.1T		96 h	-	-	-
12.2T			1663	1393	1528
12.3T			1762	2186	1974
12.4T			1004	1297	1151
12.5T				970	970

13.1T	10 Gy BB 8x8	24 h	1110	1020	1065
13.2T			938	1142	1040
13.3T				1034	1034
13.4T			1562	1848	1705
13.5T					
14.1T		96 h	865	1538	1202
14.2T			-	-	-
14.3T			1416	1052	1234
14.4T			1234	1530	1382
14.5T			960	1262	1111
15.1T	40 Gy BB 8x8	24 h	1420	1333	1376
15.2T				1244	1244
15.3T			871	927	899
15.4T			1044	1247	1146
15.5T			1025	1078	1052
16.1T		96 h	1239	978	1109
16.2T			-	-	-
16.3T			1202		1202
16.4T			1481	1566	1524
16.5T			1690	1997	1844
17.1T	10 Gy BB 8x1	24 h		1766	1766
17.2T			996	1182	1089
17.3T					
17.4T			1052	965	1008
17.5T			1153	1356	1255
18.1T		96 h		991	991
18.2T			1323	1605	1464
18.3T			1279	1458	1369
18.4T			1598		1598
18.5T			920	1362	1141
19.1T	40 Gy BB 8x1	24 h	1473	1917	1695
19.2T				1895	1895
19.3T			1196	1554	1375
19.4T				1527	1527
19.5T			1219		1219
20.1T		96 h	1014	1052	1033
20.2T			1417	1472	1444
20.3T			1622	1746	1684
20.4T			1090	863	977
20.5T			1337	1161	1249

21.1T	control (0 Gy)	24 h	518	625	572
21.2T			840	901	870
21.3T			714	604	659
21.4T			624	891	757
21.5T					

β) Μέση τιμή ομάδας δειγμάτων και αποτελέσματα t-test

Δείγμα	Δόση και τεχνική ακτινοβολήσης	Χρονικό σημείο	Μέση τιμή ομάδας Clusters/Gbp	Τυπική απόκλιση και τυπικό σφάλμα	t-test												
1.1T 1.2T 1.3T 1.4T 1.5T	10 Gy MRT 2x2	24 h	1213	331 148	0.0050												
2.1T 2.2T 2.3T 2.4T 2.5T						96 h	1390	174 78	0.0012								
3.1T 3.2T 3.3T 3.4T 3.5T										24 h	1078	133 59	0.0232				
4.1T 4.2T 4.3T 4.4T 4.5T														96 h	1211	340 152	0.0114
5.1T 5.2T 5.3T 5.4T 5.5T																	
6.1T 6.2T 6.3T 6.4T 6.5T	96 h	1227	250 112	0.0032													

7.1T	40 Gy MRT 8x8	24 h	1189	201	0.0016
7.2T					
7.3T					
7.4T					
7.5T					
8.1T	40 Gy MRT 8x8	96 h	1500	346	0.0002
8.2T					
8.3T					
8.4T					
8.5T					
9.1T	10 Gy BB 2x2	24 h	1131	161	0.0028
9.2T					
9.3T					
9.4T					
9.5T					
10.1T	10 Gy BB 2x2	96 h	1324	164	0.0002
10.2T					
10.3T					
10.4T					
10.5T					
11.1T	40 Gy BB 2x2	24 h	1451	398	0.0010
11.2T					
11.3T					
11.4T					
11.5T					
12.1T	40 Gy BB 2x2	96 h	1406	445	0.0087
12.2T					
12.3T					
12.4T					
12.5T					
13.1T	10 Gy BB 8x8	24 h	1211	330	0.0108
13.2T					
13.3T					
13.4T					
13.5T					
14.1T	10 Gy BB 8x8	96 h	1232	113	0.0010
14.2T					
14.3T					
14.4T					
14.5T					

15.1T	40 Gy BB 8x8	24 h	1143	182	0.0051
15.2T					
15.3T					
15.4T					
15.5T					
16.1T	40 Gy BB 8x8	96 h	1420	334	0.0003
16.2T					
16.3T					
16.4T					
16.5T					
17.1T	10 Gy BB 8x1	24 h	1280	340	0.0029
17.2T					
17.3T					
17.4T					
17.5T					
18.1T	10 Gy BB 8x1	96 h	1312	245	0.0002
18.2T					
18.3T					
18.4T					
18.5T					
19.1T	40 Gy BB 8x1	24 h	1542	265	0.0001
19.2T					
19.3T					
19.4T					
19.5T					
20.1T	40 Gy BB 8x1	96 h	1277	293	0.0031
20.2T					
20.3T					
20.4T					
20.5T					
21.1T	control (0 Gy)	24 h	715	129	
21.2T					
21.3T					
21.4T					
21.5T					