



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΚΗΣ

Ανίχνευση ομαδοποιημένων οξειδωτικών
βλαβών DNA υπό την επίδραση συστημικών
φαινομένων Ιοντίζουσας ακτινοβολίας

Διπλωματική εργασία

14/7/2016

Πότση Γιαννούλα

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

Αθήνα, Ιούλιος 2016



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΚΗΣ

Ανίχνευση ομαδοποιημένων οξειδωτικών βλαβών DNA υπό την επίδραση συστημικών φαινομένων Ιοντίζουσας ακτινοβολίας

Διπλωματική εργασία

Πότση Γιαννούλα

Επιβλέπων: Δρ. Αλέξανδρος Γεωργακίλας , Επ. Καθ. ΕΜΠ

Εγκρίθηκε από την τριμελή εξεταστική επιτροπή την Πέμπτη 14 Ιουλίου 2016

.....

Γεωργακίλας Αλέξανδρος

Επ. Καθηγητής ΕΜΠ

.....

Τερζούδη Γεωργία

Ερευνήτρια Β΄ Ε.Κ.Ε.ΦΕ

.....

Μακροπούλου Μυρσίνη

Αν. Καθηγήτρια ΕΜΠ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το κύριο αντικείμενο της ακτινοβιολογίας επικεντρωνόταν στην άμεση δράση της ακτινοβολίας. Μέχρι και τις τελευταίες δυο δεκαετίες θεωρούνταν πως η Ιοντίζουσα Ακτινοβολία (ΙΑ) έχει αμελητέες κυτταρικές επιπτώσεις σε γειτονικά μόρια ή και ειδικότερα σε εκείνα εκτός της ζώνης ακτινοβόλησης. Σχετικά πρόσφατα, παρατηρήθηκαν και άλλες επιπτώσεις της ΙΑ, όπως η παραγωγή έντονων αποτελεσμάτων σε Μη-Στοχευμένα κύτταρα, τα οποία περιλαμβάνουν γονιδιακή αστάθεια, καρκινογένεση, μεταλλάξεις, ανταλλαγή αδελφών χρωματίδων, πρόωρη χρωμοσωμική συμπίκνωση, αλλαγές στη γονιδιακή και πρωτεϊνική έκφραση, κυτταρικό θάνατο και βλάβες DNA, όπως οι SSBs και οι DSBs. Αυτά τα Μη-Στοχευμένα-Αποτελέσματα έχουν αποδοθεί, κάτω από ορισμένες συνθήκες, ως Παρακείμενα αποτελέσματα (bystander effects) ή Απόκριση Απομακρυσμένων ιστών (abscopal effects). Πολλά από αυτά τα αποτελέσματα μελετήθηκαν μετά την ακτινοβόληση και έχουν συνδεθεί με την επιρροή ενός όγκου σε ιστούς, εκτός του όγκου.

Για αυτό προχωρήσαμε στο σχεδιασμό και υλοποίηση ενός πειράματος, όπου ακτινοβολήθηκαν ποντίκια στο πόδι, με δυο τεχνικές και δυο διαφορετικές δόσεις, και μελετήσαμε τις ομαδοποιημένες βλάβες που επάχθηκαν σε απομακρυσμένους ιστούς, όπως οι ωοθήκες και η σπλήνα. Συγκεκριμένα, μετρήσαμε τις αβασικές περιοχές κάνοντας χρήση της ενδονουκλεάσης APE1 και τις οξειδωτικές βλάβες με την γλυκοσυλάση hOGG1. Οι μετρήσεις που πήραμε για τα δείγματα που είτε παραλήφθηκαν μετά από 24 είτε μετά από 96 ώρες έδειξαν αυξημένες βλάβες κατά 1.7-2.1 και 2.2-2.6 φορές σε σχέση με τα δείγματα των μη ακτινοβολημένων ποντικιών που μελετήθηκαν για το APE1 και hOGG1 αντίστοιχα. Ακόμη, δεν παρατηρήθηκε σημαντική ποσοτική διαφορά στις βλάβες που προκλήθηκαν από διαφορετική δόση και διαφορετική τεχνική ακτινοβόλησης.

Τα αποτελέσματα αυτά είναι πολύ σημαντικά για την ακτινοβιολογία και συγκεκριμένα την ακτινοθεραπεία, καθώς ενώ μπορεί με την ακτινοθεραπεία να στοχεύονται όγκοι σε συγκεκριμένα σημεία του σώματος αλλά να επάγονται βλάβες σε παρακείμενα κύτταρα που παραμένουν κατά την πάροδο του χρόνου.

ABSTRACT

Radiobiology has focused on the so called 'direct' action of radiation. Until the last two decades the central tenet has been that Ionizing Radiation(IR) has insignificant cellular effects on adjacent cells and especially those outside the radiation zone. Relatively recently, other effects from IR have been realized such that IR produces profound effects in non-targeted cells which include genomic instability, tumorigenesis, sister chromatid exchanges, mutations, premature chromosome condensation , gene and protein expression changes, cell death and DNA damage such as SSBs and DSBs. These Non-Targeted-Effects (NTEs) under specific circumstances, have been designated as bystander effects or abscopal effects. Many of these NTEs observed after irradiation have also been linked to the influence that a tumor has on extra-tumor tissues. Therefore, it is crucial to widen our knowledge on whether radiation doses induce effects in tissues distant from the radiation zone.

Thus, we proceeded in developing and carrying out an experiment, where mice were irradiated , with two different techniques and doses, on the leg and studied the damages induced in distant tissues, such as ovaries and spleen. Specifically, we quantified the abasic sites by using the APE1 endonuclease and the oxidative clustered damages with hOGG1 glycosylase. The measurements we recorded for the samples taken either 24 or 96 hours after irradiation, revealed increased level of damages up to 1.7-2.1 and 2.2-2.6 times above the unirradiated ones for the APE1 and the hOGG1 probe respectively. Yet, we did not observe a significant quantitative difference in lesions caused by the two different doses and techniques of irradiation.

These results are extremely important for radiobiology and specifically radiotherapy, since radiotherapy is used for targeting tumors in specific body parts and may induce damages in nearby cells , which remain over the course of time.

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT.....	5
Κεφάλαιο 1	8
Ιοντίζουσα ακτινοβολία.....	8
1.1 Εισαγωγή.....	8
1.2 Ιοντίζουσα Ακτινοβολία	8
1.3. Αλληλεπίδραση ακτινοβολίας με ύλη	9
Κεφάλαιο 2	15
2.1 Η ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ.....	15
2.2. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΘΑΝΑΤΟΣ	23
2.3 Το DNA και η δομή του.	29
2.4 ΒΛΑΒΕΣ ΣΤΟ DNA	32
2.4.1 Είδη βλαβών του DNA	32
2.4.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗΣ ΤΩΝ ΒΛΑΒΩΝ ΤΟΥ DNA.....	35
Κεφάλαιο 3	42
Ακτινοβιολογία	42
3.8. ΑΠΟΚΡΙΣΕΙΣ ΒΛΑΒΩΝ ΣΕ ΣΥΣΤΗΜΙΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ.....	52
3.9. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΤΗΣ ΒΛΑΒΗΣ	70
Κεφάλαιο 4	71
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ	71
Κεφάλαιο 5	77
ΠΕΙΡΑΜΑ και ΕΚΤΕΛΕΣΗ.....	77
5.1 Δείγματα DNA.....	79
5.2 Ενδονουκλεάση hAPE1	80
5.3 Γλυκοσυλάση hOGG1.....	81
5.4 ΥΛΙΚΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ.....	82

5.5 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ	85
5.6 Ανάλυση εικόνας πηκτώματος	87
Κεφάλαιο 6	88
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ	88
Απόκριση στα διαφορετικά χρονικά σημεία	95
Απόκριση στην τεχνική ακτινοβολήσης	97
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	99
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	106
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	113

Κεφάλαιο 1

Ιοντίζουσα ακτινοβολία

1.1 Εισαγωγή

Τα πιθανά οφέλη της Ιοντίζουσας Ακτινοβολίας για τη θεραπεία καρκίνου ανακαλύφθηκαν νωρίς μετά την ανακάλυψη των ακτίνων-Χ από το Rontgen το 1895. Από την εισαγωγή του στην κλινική πρακτική το 1896, από τον Emil Grubbe, η ακτινοθεραπεία υιοθετήθηκε για την δραστική της ικανότητα να προκαλεί κυτταρικό θάνατο του όγκου μέσω της πρόκλησης της ανεπανόρθωτης βλάβης στο DNA και της διακοπής του κυτταρικού κύκλου.

1.2 Ιοντίζουσα Ακτινοβολία

Ιοντίζουσα χαρακτηρίζεται η ακτινοβολία που μεταφέρει ικανή ενέργεια ώστε να προκαλεί ιονισμό των ατόμων της ύλης, κατά την αλληλεπίδραση της με αυτή.

Είδη Ιοντίζουσας ακτινοβολίας

Στις ιοντίζουσες ακτινοβολίες κατατάσσονται

- οι ηλεκτρομαγνητικές ακτινοβολίες, όπως η γ και η X ,
- οι σωματιδιακές, όπως οι α (πυρήνες He), β (πρωτόνια και ποζιτρόνια), τα νετρόνια και κάποια σωματίδια που παράγονται τεχνητά ή αποτελούν συνιστώσες της κοσμικής ακτινοβολίας.

1.3. Αλληλεπίδραση ακτινοβολίας με ύλη

Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, σύμφωνα με τον δυϊσμό της ύλης, έγκειται σε σύνολο κβαντισμένων κυματοπακέτων που ονομάζονται *φωτόνια*. Τα *φωτόνια* είναι ταξινομημένα σύμφωνα με τον τρόπο προέλευσής τους και όχι την ενέργειά τους. Έτσι, οι *ακτίνες-γ* είναι οι ηλεκτρομαγνητικές ακτινοβολίες, πολύ μικρού μήκους κύματος που συνοδεύουν τις πυρηνικές μεταβάσεις, οι *συνεχείς ακτίνες-Χ* είναι το αποτέλεσμα της επιτάχυνσης των ελεύθερων ηλεκτρονίων ή άλλων φορτισμένων σωματιδίων, και οι *χαρακτηριστικές ακτίνες-Χ* εκπέμπονται στις μεταβάσεις των ατομικών ηλεκτρονίων μεταξύ των στοιβάδων στα άτομα με την *ακτινοβολία εξαϋλωσης* να εκπέμπεται όταν συνδυάζεται ένα ποζιτρόνιο με ένα ηλεκτρόνιο .

Η κβαντική ενέργεια οποιασδήποτε από αυτές τις ακτινοβολίες μπορεί να εκφραστεί ως :

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

όπου το ν είναι η συχνότητα, h η σταθερά του *Planck*, c η ταχύτητα του φωτός και λ το μήκος κύματος της ακτινοβολίας.

Οι ακτίνες- Χ έχουν μήκος κύματος από 10 nm -10 pm και ενέργεια που κυμαίνεται από 100 eV- 100 keV. Οι ακτίνες –γ έχουν μήκος κύματος από 10 pm έως 0.1 pm και ενέργεια από 100 keV ως 10 MeV.

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.

Συγκεκριμένα, μετά την ακτινοβολήση με ακτίνες –Χ παρατηρούμε πως το ποσοστό απορρόφησης ενέργειας είναι ίδιο στις πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα ενός κυττάρου-στόχου.

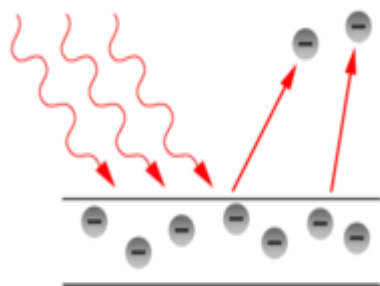
Πιο σπάνια, ως Ιοντίζουσα ακτινοβολία μπορεί να δράσουν σε μερικές περιπτώσεις και φωτόνια ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας του υπεριώδους φάσματος τους με μήκος κύματος από 210 nm έως 10 nm και ενέργεια μικρότερη των 100 eV καθώς κάποια μόρια μπορούν να ιοντιστούν με σχετικά μικρότερη ενέργεια.

Όλες οι αλληλεπιδράσεις, εκτός από ένα πολύ μικρό ποσοστό εξηγούνται από τις τρεις παρακάτω διαδικασίες:

- α) Το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο
- β) Η σκέδαση Compton
- γ) Η δίδυμη γένεση ή παραγωγή ζεύγους

1.2.2.1 Φωτοηλεκτρικό φαινόμενο

Κατά το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο, απελευθερώνονται ηλεκτρόνια από μια επιφάνεια αγωγού, όταν σε αυτή την επιφάνεια προσπέσει ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία *συχνότητας* τέτοιας ώστε τα ηλεκτρόνια να κατορθώσουν να υπερπηδήσουν το φράγμα δυναμικής ενέργειας που τα "εγκλωβίζει" στην επιφάνεια αυτή.



Εικόνα 1.1 Φωτοηλεκτρικό Φαινόμενο. Εξαγωγή ατομικού ηλεκτρονίου με κινητική ενέργεια $K = E_{\gamma} - \Phi$

Όταν η ενέργεια φωτονίου είναι μεγαλύτερη από την ενέργεια σύνδεσης ή τη συνάρτηση

έργου ηλεκτρονίου, τότε εκπέμπεται ένα ατομικό ηλεκτρόνιο με κινητική ενέργεια:

$$T = h\nu - \Phi$$

Το 80% περίπου των φωτοηλεκτρικών φαινομένων αφορά σε ηλεκτρόνια της Κ στοιβάδας. Το παραγόμενο φωτοηλεκτρόνιο έχει κινητική ενέργεια $K = E\gamma - \Phi$, όπου Φ είναι η ενέργεια σύνδεσης. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι να ισχύει η ανισότητα $E\gamma \geq \Phi$. Το κενό που δημιουργείται μετά την εκπομπή του φωτοηλεκτρονίου καλύπτεται από ένα άλλο ηλεκτρόνιο που προέρχεται από κάποιο ανώτερο ατομικό φλοιό ενέργειας σύνδεσης οδηγώντας σε δυο εναλλασσόμενους μηχανισμούς :

1. Φθορισμό ακτίνων-Χ: Κατά το φθορισμό των ακτίνων-Χ παράγονται δευτερεύουσες ακτίνες-Χ και το φορτίο του εναπομείναντος ιόντος διατηρείται.
2. Φαινόμενο Auger: Το φωτόνιο που έχει εκπεμφθεί από την αντικατάσταση του κενού μπορεί να απορροφηθεί από κάποιο άλλο ηλεκτρόνιο του ίδιου ατόμου δημιουργώντας νέο φωτοηλεκτρόνιο (ηλεκτρόνιο Auger) αφήνοντας νέο κενό.

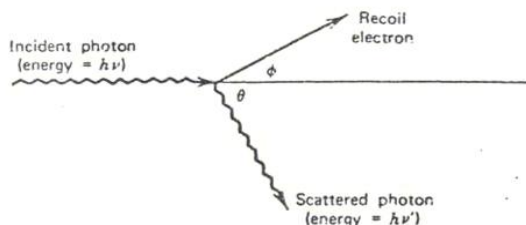
Το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο, παρατηρείται κυρίως σε ακτινοβολία σχετικά χαμηλής ενέργειας και για απορροφητές με υψηλό ατομικό αριθμό Z . Στη βιολογική ύλη (χαμηλό Z) η πιθανότητα εκπομπής χαρακτηριστικής ακτινοβολίας είναι πολύ μικρή.

1.2.2.2 Σκέδαση Compton

Στη σκέδαση Compton ένα φωτόνιο αλληλεπιδρά με ένα ηλεκτρόνιο μέσα του υλικού απορρόφησης. Κατά την διαδικασία αυτή η κινητική ενέργεια του ηλεκτρονίου αυξάνεται και μεταβάλλεται η διεύθυνση του φωτονίου. Το φωτόνιο μεταφέρει μέρος της ενέργειας του στο ηλεκτρόνιο το οποίο μετά τη σκέδαση ονομάζεται «ανακλώμενο ηλεκτρόνιο». Η ενέργεια του σκεδαζόμενου φωτονίου μετά από αυτήν την αλληλεπίδραση δίνεται από την παρακάτω εξίσωση :

$$E'_\gamma = \frac{E_\gamma}{1 + \frac{E_\gamma}{mc^2}} (1 - \cos\theta)$$

όπου E_γ είναι η ενέργεια του αρχικού φωτονίου, E'_γ η ενέργεια του σκεδασμένου φωτονίου, mc^2 είναι η μάζα ηρεμίας του ηλεκτρονίου και θ είναι η γωνία σκέδασης. Από την εξίσωση αυτή συνεπάγεται ότι αρκετά σημαντικές παρεκτροπές μπορεί να συμβούν με πολύ μικρή απώλεια ενέργειας (για παράδειγμα, για φωτόνια ενέργειας 511keV, ένα συμβάν αλληλεπίδρασης κατά Compton κατά το οποίο χάνεται το 10% της ενέργειας του φωτονίου, θα έχει ως αποτέλεσμα μια απόκλιση από την αρχική πορεία κατά 25 μοίρες.



Εικόνα 1.2 Σκέδαση Compton. Το προσπίπτον φωτόνιο, το ανακλώμενο ηλεκτρόνιο και το σκεδασμένο φωτόνιο.

Η πιθανότητα της σκέδασης Compton είναι ανάλογη του αριθμού των ηλεκτρονίων του απορροφητή (και συνεπώς του Z) και αντιστρόφως ανάλογη της ενέργειας E_γ της ακτινοβολίας-γ :

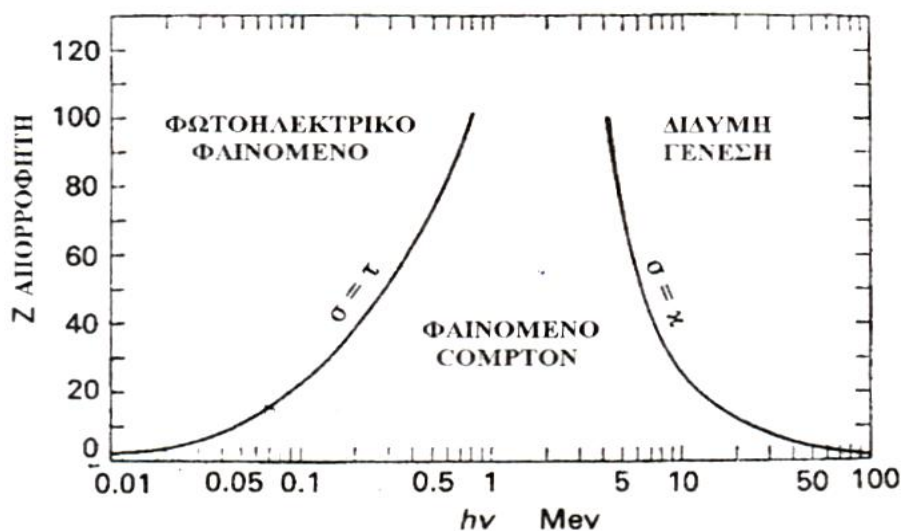
$$\sigma = \sigma_a + \sigma_s = \text{σταθερά} \times \frac{Z}{E_\gamma}$$

όπου οι παράγοντες σ_a και σ_s ($\sigma_s = \sigma_a Z$) αναφέρονται ως γραμμικός συντελεστής απορρόφησης (απορρόφηση Klein - Nishina) και γραμμικός συντελεστής σκέδασης (σκέδαση Klein-Nishina), και αφορούν τα δευτερογενή φαινόμενα της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας.

1.2.2.3 Δίδυμη Γένεση

Ο τρίτος μηχανισμός σύμφωνα με τον οποίο μπορεί να απορροφηθεί μια ακτινοβολία είναι η παραγωγή ενός ζεύγους ποζιτρονίου - ηλεκτρονίου. Εάν η ενέργεια είναι μεγαλύτερη από το άθροισμα των μαζών ηρεμίας του ηλεκτρονίου και του ποζιτρονίου ($2m_e c^2 = 1,02 \text{ MeV}$) είναι δυνατό, στη θέση της ακτίνας-γ να παραχθεί ένα ζεύγος ηλεκτρονίου-ποζιτρονίου. Η κινητική ενέργεια, T_{pair} , του ζεύγους ηλεκτρονίου-ποζιτρονίου θα είναι προφανώς ίση με τη διαφορά: $T_{\text{pair}} = E_\gamma - 2m_e c^2$

Η σχετική συνεισφορά των τριών διαδικασιών που είδαμε για τα διάφορα υλικά απορροφητών και τις ενέργειες των ακτίνων φαίνεται στην Εικόνα 1.3. Η γραμμή στα αριστερά αντιπροσωπεύει την ενέργεια στην οποία η φωτοηλεκτρική απορρόφηση και σκέδαση Compton είναι εξίσου πιθανές ως παράγοντας του ατομικού αριθμού του απορροφητή. Η γραμμή στα δεξιά αντιπροσωπεύει την ενέργεια στην οποία η σκέδαση Compton και η παραγωγή ζεύγους είναι εξίσου πιθανές, καθορίζοντας έτσι τις τρεις περιοχές μέσα, στις οποίες ο κάθε μηχανισμός υπερισχύει αντίστοιχα.



Εικόνα 1.3 : Στο σχήμα φαίνονται οι περιοχές, σε σχέση με τον ατομικό αριθμό του απορροφητή και την ενέργεια E της ακτινοβολίας, όπου καθένας από τους παραπάνω τρεις μηχανισμούς κυριαρχεί.

1.2.3 Απορρόφηση ακτινοβολίας

Οι τρεις κύριοι τρόποι αλληλεπίδρασης της ακτινοβολίας με την ύλη, που είδαμε μέχρι τώρα, είναι δυνατόν να συνεισφέρουν όλοι στην απορρόφηση της ακτινοβολίας μιας δεδομένης πηγής. Ποσοτικά έχει παρατηρηθεί ότι, καθώς μία παράλληλη μονοενεργειακή δέσμη ακτίνων- γ ή X , έντασης I_0 , διέρχεται από απορροφητικό υλικό πάχους x υφίσταται εκθετική μείωση της έντασης του, λόγω της απορρόφησης ή σκέδασης των φωτονίων, που δίδεται από την εκθετική σχέση:

$$I = I_0 e^{-\mu_0 x}$$

όπου μ_0 ο ολικός συντελεστής απορρόφησης και εκφράζει την πιθανότητα ανά μονάδα μήκους να απομακρυνθεί ένα φωτόνιο από τη δέσμη, δηλαδή είναι το άθροισμα των επιμέρους πιθανοτήτων απορρόφησης ή σκέδασης.

Ο ολικός μαζικός συντελεστής απορρόφησης, μ_0 , θα δίνεται από τη σχέση :

$$\mu_0 = \mu_{pe} + \mu_c + \mu_p,$$

όπου μ_{pe} ο συντελεστής απορρόφησης λόγω φωτοηλεκτρικού φαινομένου, μ_c ο συντελεστής απορρόφησης λόγω φαινομένου Compton και μ_p ο συντελεστής απορρόφησης λόγω δίδυμης γένεσης αντίστοιχα.

Όπως είδαμε, τόσο στο φωτοηλεκτρικό φαινόμενο όσο και στη δίδυμη γένεση, όλη η ενέργεια E_γ της ακτίνας γ απορροφάται, ενώ στο φαινόμενο Compton τμήμα μόνο της ενέργειας απορροφάται από το ηλεκτρόνιο Compton.

Κεφάλαιο 2

2.1 Η ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ

Το κύτταρο είναι η βασική μονάδα της ζωής. Αποτελεί μια ολοκληρωμένη μεταβολική μονάδα αφού περιέχει όλα εκείνα τα χημικά συστατικά που είναι απαραίτητα για τη διατήρηση και τον πολλαπλασιασμό του.

Όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί αποτελούνται από κύτταρα ή από προϊόντα κυττάρων. Τα νέα κύτταρα δημιουργούνται και προέρχονται από διαίρεση προϋπάρχοντων κυττάρων. Η χημική σύσταση και οι διεργασίες των κυττάρων είναι παρόμοιες.

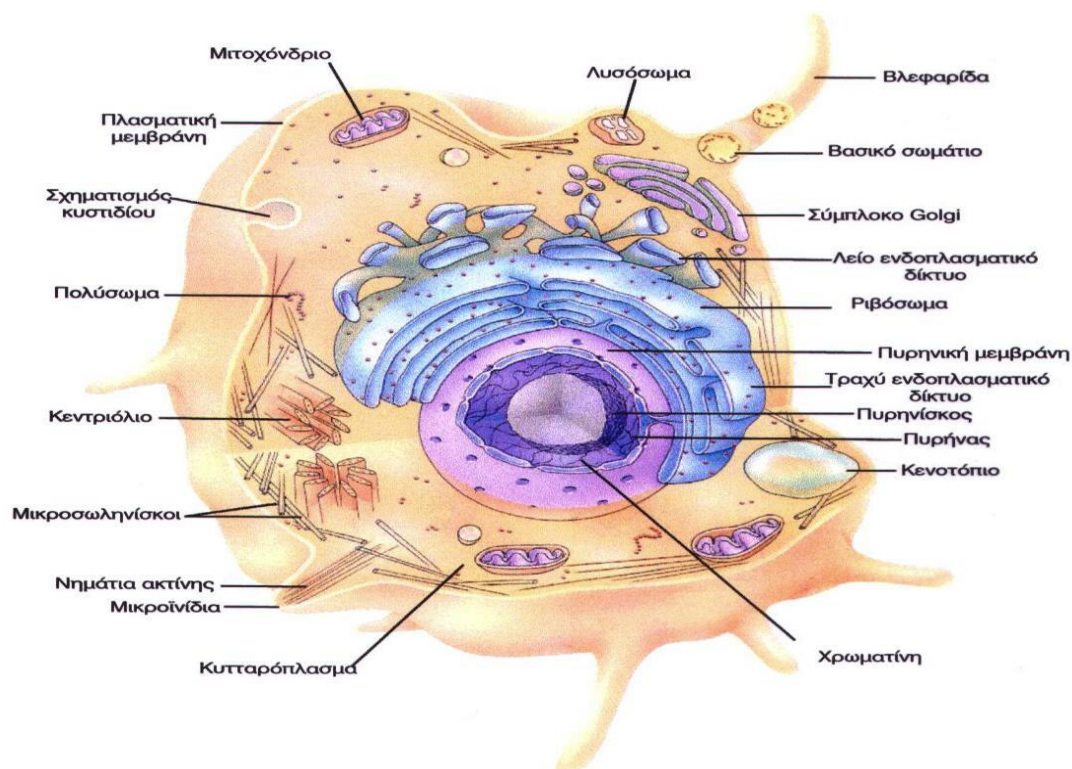
Τα κύτταρα διακρίνονται με βάση τη μορφολογία τους σε προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά. *Προκαρυωτικά* ονομάζονται τα απλοειδή κύτταρα που έχουν ως γενετικό υλικό ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA και περιέχουν ένα αντίγραφο του γονιδιώματος. Σε πολλά τέτοια κύτταρα υπάρχει η δυνατότητα μεταφοράς του κύριου μορίου DNA από το ένα στο άλλο, έτσι ώστε να μετασχηματίζονται και να αποκτούν καινούριες ιδιότητες.

Ευκαρυωτικά ονομάζονται τα κύτταρα των οποίων το γενετικό υλικό περικλείεται σε ένα συγκροτημένο πυρήνα. Όλο το κύτταρο περιβάλλεται από την κυτταροπλασματική μεμβράνη, μια δυναμική δομή που ως λόγο ύπαρξης έχει την απομόνωση του κυττάρου από το περιβάλλον του. Δύο από τις βασικότερες λειτουργίες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης είναι η εισαγωγή υλικών από το περιβάλλον μέσα στο κύτταρο (εσωκύττωση) αλλά και η εξαγωγή υλικών από το κύτταρο στο περιβάλλον (εξωκύττωση).

Μέσα στο κύτταρο και γύρω από τον πυρήνα βρίσκεται το κυτταρόπλασμα μέσα στο οποίο βρίσκονται μια σειρά από μικροσκοπικές δομές (100nm- 10μm), τα οργανίδια.

Τα βασικότερα οργανίδια του ευκαρυωτικού κυττάρου είναι τα μιτοχόνδρια, το ενδοπλασματικό δίκτυο, τα ριβοσώματα και το σύμπλεγμα Golgi, με διαφορετική λειτουργία το καθένα. Για παράδειγμα, το μιτοχόνδριο λειτουργεί ως μονάδα παραγωγής ενέργειας του κυττάρου. Ακόμη, όμως, σε αυτό βρίσκεται ένα απλό διπλό κυκλικό μόριο, το μιτοχονδριακό DNA, το οποίο έχει μικρή προστασία στην ΙΑ. Τέλος, ένα ακόμα

σημαντικό συστατικό του κυττάρου είναι ο κυτταρικός σκελετός που αποτελείται από 3 διαφορετικές κατηγορίες επιμηκών μορίων: τα ινίδια ακτίνης, τους μικροσωληνίσκους και τα ενδιάμεσα ινίδια. Όπως και με τα οργανίδια, κάθε κατηγορία μορίων του κυτταρικού σκελετού επιτελεί και διαφορετικές λειτουργίες μέσα στο κύτταρο.



Εικόνα 2.1: Η δομή και τα οργανίδια ενός ευκαρυωτικού ζωικού κυττάρου.

Το γενετικό υλικό αποτελείται από μεγάλα, επιμήκη μόρια DNA. Τα μόρια του DNA πακετάρονται με πρωτεΐνες και σχηματίζουν τα ινίδια χρωματίνης. Το νουκλεόσωμα αποτελεί τη βασική μονάδα οργάνωσης της χρωματίνης και αποτελείται από DNA μήκους 146 ζευγών βάσεων και από οκτώ μόρια πρωτεϊνών, που ονομάζονται ιστόνες. Το DNA είναι τυλιγμένο γύρω από το οκταμερές ιστονών. Τα νουκλεοσώματα αναδιπλώνονται, σχηματίζοντας τελικά τα ινίδια χρωματίνης. Τα ινίδια χρωματίνης συμπυκνώνονται περαιτέρω δημιουργώντας το χρωμόσωμα. Το γενετικό υλικό εμφανίζεται με διαφορετικές χαρακτηριστικές μορφές ανάλογα με το στάδιο του κυτταρικού κύκλου.

Το DNA διαθέτει μια ακόμα μοναδική ιδιότητα: την ικανότητα να αντιγράφει τον εαυτό του, δηλαδή να αναπαράγεται. Με τον τρόπο αυτό μπορούν από ένα αρχικό κύτταρο να παραχθούν, με διαδοχικές διαιρέσεις, εκατομμύρια κύτταρα τα οποία θα περιέχουν το ίδιο γενετικό υλικό.

2.1.1 Ο Κυτταρικός Κύκλος και τα στάδια του.

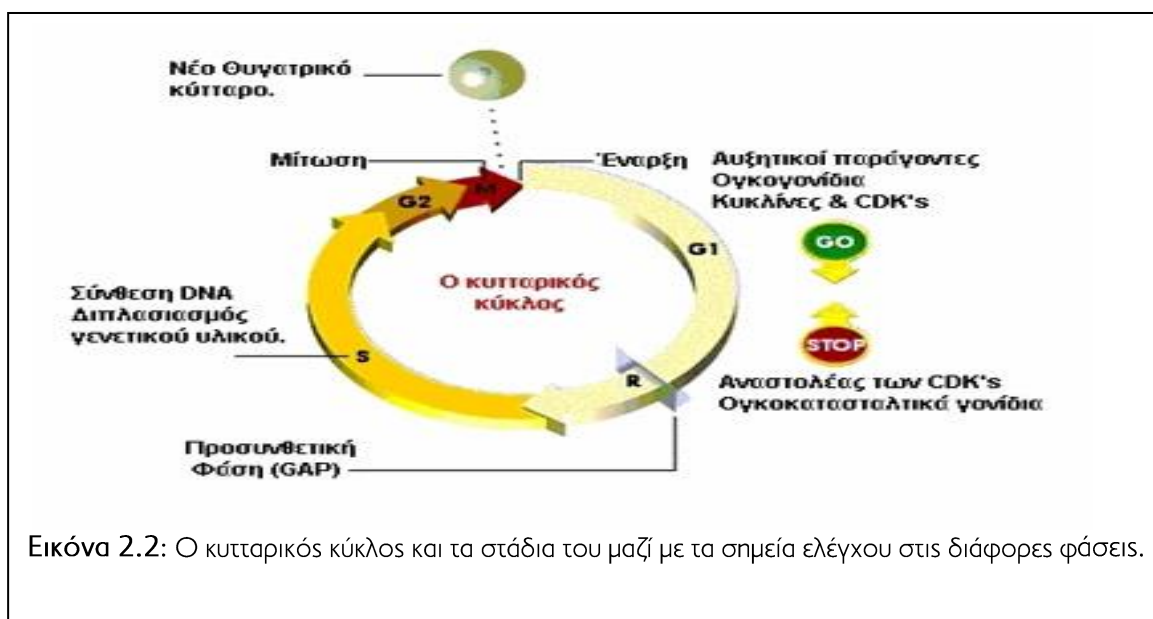
Ένα κύτταρο αναπαράγεται διεκπεραιώνοντας μια ιεραρχική ακολουθία γεγονότων κατά τη διάρκεια των οποίων διπλασιάζει το περιεχόμενο του και κατόπιν διαιρείται στα δυο. Αυτός ο κύκλος διπλασιασμού και διαίρεσης ονομάζεται κυτταρικός κύκλος και είναι ο βασικός μηχανισμός με τον οποίο αναπαράγονται όλα τα έμβια όντα. Η διάρκεια του κυτταρικού κύκλου ποικίλλει πολύ ανάλογα με το είδος του κυττάρου.

Ο *ευκαρυωτικός* κυτταρικός κύκλος διακρίνεται στη Μεσόφαση και στη φάση Μ. Η Μεσόφαση είναι η περίοδος ανάμεσα σε δύο διαδοχικές φάσεις Μ. Αποτελείται από τις φάσεις G1, S, G2. Κατά τη διάρκεια της φάσης S (S=synthesis), το κύτταρο αντιγράφει το DNA του πυρήνα του, που είναι μια απαραίτητη προϋπόθεση για να συμβεί η κυτταρική διαίρεση.

Η φάση S πλαισιώνεται από δυο φάσεις κατά τις οποίες το κύτταρο συνεχίζει να αυξάνει. Η φάση G1 (G=gap) είναι το διάστημα ανάμεσα στο τέλος της φάσης Μ και την αρχή της φάσης S, ενώ η φάση G2 το μεσοδιάστημα ανάμεσα στο τέλος της φάσης S και την αρχή της φάσης Μ. Υπάρχουν συγκεκριμένα χρονικά σημεία στις φάσεις G1 και G2 όπου το κύτταρο «αποφασίζει» αν θα προχωρήσει στην επόμενη φάση ή αν θα αναβάλλει για να προετοιμαστεί. Κατά τη διάρκεια όλης της μεσόφασης, ένα κύτταρο συνεχίζει να μεταγράφει τα γονίδια του, να συνθέτει πρωτεΐνες και να αυξάνει σε μάζα. Το πρώτο σαφές σήμα ότι ένα κύτταρο είναι έτοιμο να εισέλθει στη φάση Μ είναι η προοδευτική συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων του, τα οποία έχουν αντιγραφεί προηγουμένως κατά τη διάρκεια της φάσης S (στο στάδιο αυτό τα δυο αντίγραφα κάθε χρωμοσώματος παραμένουν ισχυρά συνδεδεμένα το ένα με το άλλο). Η συμπύκνωση των

χρωμοσωμάτων σηματοδοτεί το τέλος της φάσης G2, διευκολύνοντας το διαχωρισμό τους στη Μίτωση.

Η φάση M αποτελείται από τη Μίτωση, όπου πραγματοποιείται η διαίρεση του πυρήνα, και την κυτταροκίνηση, όπου διαχωρίζεται το κυτταρόπλασμα. Σ' ένα συνηθισμένο κύτταρο θηλαστικού, ολόκληρη η φάση M διαρκεί περίπου μια ώρα, δηλαδή αποτελεί ένα σύντομο κομμάτι του συνολικού κυτταρικού κύκλου.



2.1.2 Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου

Ένα κεντρικό σύστημα ελέγχου πυροδοτεί τις κύριες διεργασίες του κυτταρικού κύκλου

Τα γεγονότα του κυτταρικού κύκλου πρέπει να συμβαίνουν σύμφωνα με ορισμένη ακολουθία, η οποία πρέπει να τηρείται έστω και αν ένα από τα επιμέρους στάδια της διαρκεί περισσότερο από το κανονικό. Αυτό σημαίνει ότι πριν από τη φάση M πρέπει να έχει προηγηθεί μια πλήρης φάση S ή αν η σύνθεση του DNA επιβραδυνθεί ή σταματήσει, η μίτωση και η κυτταρική διαίρεση πρέπει επίσης να καθυστερήσουν. Το σύστημα ελέγχου

του κυτταρικού κύκλου επιτυγχάνει τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου με την ύπαρξη διάφορων **σημείων ελέγχου** (checkpoints). Με αυτόν τον τρόπο, το σύστημα ελέγχου δεν πυροδοτεί το επόμενο βήμα του κύκλου αν προηγουμένως δεν έχει προετοιμαστεί το κύτταρο.

Δύο σημαντικά σημεία ελέγχου υπάρχουν στις φάσεις G1 και G2. Το σημείο ελέγχου της φάσης G1 εξακριβώνει αν υπάρχουν οι κατάλληλες συνθήκες για τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου πριν μπει στη φάση S. Αν οι εξωκυττάρια συνθήκες είναι δυσμενείς, τα κύτταρα σταματούν στη φάση G1 και μπορεί ακόμα και να περάσουν σε μια κατάσταση ηρεμίας (G0). Πολλά κύτταρα, μεταξύ των οποίων τα νευρικά και τα γραμμωτά μυϊκά κύτταρα, παραμένουν σε φάση G0 δια βίου. Το σύστημα ελέγχου της φάσης G2 επιτρέπει στο σύστημα να σταματά προτού πυροδοτήσει τη μίτωση. Επιπλέον επιτρέπει στο κύτταρο να ελέγξει αν έχει ολοκληρωθεί η αντιγραφή του DNA προτού προχωρήσει στη μίτωση^[3]. Τα σημεία ελέγχου έχουν σημασία και από μία άλλη άποψη: είναι σημεία του κυτταρικού κύκλου στα οποία το σύστημα ελέγχου μπορεί να ρυθμιστεί από σήματα που προέρχονται από άλλα κύτταρα. Μερικά από αυτά τα σήματα προάγουν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου ενώ άλλα την αναστέλλουν^[3].

2.1.3 Το σύστημα ελέγχου του κυτταρικού κύκλου

Το σύστημα ελέγχου του κυτταρικού κύκλου διασφαλίζει τη σωστή εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου μέσω της κυκλικής ενεργοποίησης και απενεργοποίησης κρίσιμων πρωτεϊνών που πυροδοτούν ή ρυθμίζουν την αντιγραφή του DNA, τη μίτωση και την κυτταροκίνηση. Η φωσφορυλίωση/αποφωσφορυλίωση είναι ένας από τους πιο κοινούς μηχανισμούς που χρησιμοποιούν τα κύτταρα για να μεταβάλλουν τη δραστηριότητα μιας πρωτεΐνης.

Οι αντιδράσεις φωσφορυλίωσης που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο διενεργούνται από μια ειδική ομάδα πρωτεϊνικών κινασών, δηλαδή ενζύμων που καταλύουν τη μεταφορά μιας φωσφορικής ομάδας από το ATP στην πλευρική αλυσίδα ενός συγκεκριμένου αμινοξέος της πρωτεΐνης-στόχου. Οι συνέπειες της φωσφορυλίωσης μπορεί να

αναστραφούν γρήγορα με την αφαίρεση της φωσφορικής ομάδας (αποφωσφορυλίωση), μια αντίδραση που διεξάγεται από μια άλλη ομάδα ενζύμων, τις πρωτεϊνικές φωσφατάσες. Στα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, οι πρωτεϊνικές κινάσες του συστήματος ελέγχου του κυτταρικού κύκλου είναι παρούσες σε όλες τις φάσεις του κύκλου. Ωστόσο, ενεργοποιούνται μόνο σε ορισμένες κατάλληλες χρονικές περιόδους και αμέσως μετά απενεργοποιούνται. Επομένως, η ενεργότητα καθεμιάς από τις κινάσες αυξάνει και ελαττώνεται με κυκλικό τρόπο. Για παράδειγμα, μερικές πρωτεϊνικές κινάσες καθίστανται ενεργές προς το τέλος της φάσης G1 και προωθούν το κύτταρο στη φάση S, ενώ άλλη κινάση ενεργοποιείται λίγο πριν τη φάση M και προωθεί το κύτταρο στη μίτωση.

Για την ενεργοποίηση ή την απενεργοποίηση της ενζυμικής δράσης των κινασών στις κατάλληλες χρονικές περιόδους ευθύνεται, εν μέρει, μια δεύτερη ομάδα πρωτεϊνών του συστήματος ελέγχου που αποκαλούνται κυκλίνες (cyclins). Η ενεργοποίηση επιτυγχάνεται μέσω της πρόσδεσης των κυκλινών στις κινάσες. Για το λόγο αυτό οι κινάσες του συστήματος ελέγχου του κυτταρικού κύκλου αναφέρονται ως κυκλινο-εξαρτώμενες πρωτεϊνικές κινάσες (cyclin-dependent protein kinases, Cdk). Οι Cdk ρυθμίζονται από τη συσσώρευση και την αποδόμηση των κυκλινών.

Η κυκλίνη που προωθεί τα κύτταρα στη φάση M ονομάζεται M-κυκλίνη και το σύμπλοκο της με την αντίστοιχη Cdk ονομάζεται M-Cdk. Η σύνθεση της M-κυκλίνης αρχίζει αμέσως μετά τη διαίρεση του κυττάρου και συνεχίζεται σταθερά καθόλη τη διάρκεια της Μεσόφασης. Η κυκλίνη συσσωρεύεται και η συγκέντρωσή της σταδιακά αυξάνεται. Αυτό συμβάλλει στο χρονικό προγραμματισμό της αρχής της μίτωσης. Η επακόλουθη ταχεία ελάττωση της συγκέντρωσης της κυκλίνης πυροδοτεί την έξοδο από τη μίτωση.

Στην περίπτωση της M-κυκλίνης, ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο γνωστό και ως σύμπλοκο που προάγει την ανάφαση (anaphase promoting complex, APC) προσθέτει ουβικουιτίνη (πρωτεολυτικό σύστημα που οδηγεί σε αποδόμηση) στην κυκλίνη και σε άλλες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη ρύθμιση της μίτωσης. Ωστόσο, το APC δεν είναι ενεργό σε όλα τα στάδια του κυτταρικού κύκλου. Η δράση του ενεργοποιείται σε προχωρημένη φάση της μίτωσης σε μια διεργασία που εξαρτάται από τη δράση της M-Cdk. Η ενεργοποίηση της M-Cdk με λανθάνοντα χρόνο ενεργοποιεί το σύμπλοκο APC. Αυτό οδηγεί σε αποδόμηση της M-κυκλίνης και έτσι σε απενεργοποίηση της M-Cdk.

Η άνοδος και η πτώση των επιπέδων των κυκλινών παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της δράσης των Cdk κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Στην περίπτωση της M-Cdk, η συγκέντρωση της M-κυκλίνης αυξάνει σταδιακά σε όλη τη Μεσόφαση, ενώ η ενεργότητα της M-Cdk αυξάνει απότομα προς το τέλος της Μεσόφασης. Για την ενεργοποίηση της M-Cdk απαιτείται κάτι περισσότερο από την απλή συσσώρευση της κυκλίνης. Συγκεκριμένα προκειμένου να εκδηλώσει την ενζυμική της δράση η κινάση πρέπει να φωσφορυλιωθεί σε μια ή περισσότερες θέσεις και παράλληλα να αποφωσφορυλιωθεί σε άλλες θέσεις. Η αφαίρεση των ανασταλτικών φωσφορικών ομάδων από μια ειδική πρωτεϊνική φωσφατάση είναι το βήμα που ενεργοποιεί την M-Cdk στο τέλος της Μεσόφασης. Μόλις ενεργοποιηθεί το σύμπλοκο M-κυκλίνης – Cd κινάσης ενεργοποιούνται περισσότερα ανάλογα σύμπλοκα. Αυτή η θετική ανατροφοδότηση προκαλεί την αιφνίδια, εκρηκτική αύξηση της ενεργότητας της M-Cdk που προωθεί απότομα το κύτταρο στη φάση M.

Στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου των περισσότερων ευκαρυωτών εμπλέκονται πολλά είδη κυκλινών και Cd κινασών. Διαφορετικά σύμπλοκα κυκλίνης-Cd κινάσης πυροδοτούν διαφορετικά βήματα του κυτταρικού κύκλου (π.χ. η M-Cdk δρα στη φάση G2 και πυροδοτεί την είσοδο στη φάση M). Οι κυκλίνες S και G1/S ευθύνονται για την είσοδο στη φάση S, οι οποίες για το σκοπό αυτό προσδένονται σε διαφορετικά μόρια Cd κινασών προς το τέλος της φάσης G1 για την προώθηση του κυττάρου στη φάση S με τη δημιουργία συμπλόκων G1-κυκλινών - Cdk. Η βραδεία συσσώρευση μιας κυκλίνης έως ένα ορισμένο κρίσιμο επίπεδο αποτελεί έναν τρόπο με τον οποίο το σύστημα ελέγχου του κυτταρικού κύκλου μετρά τα μεσοδιαστήματα ανάμεσα στους διαδοχικούς κυτταρικούς κύκλους.

Κάθε σύμπλοκο κυκλίνης-Cdk επιδρά σε μια διαφορετική ομάδα πρωτεϊνών στόχων μέσα στο κύτταρο. Έτσι κάθε σύμπλοκο πυροδοτεί τη μετάβαση σ'ένα διαφορετικό βήμα του κύκλου. Για παράδειγμα, η M-Cdk φωσφορυλιώνει κρίσιμες πρωτεΐνες που προκαλούν συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων, αποδόμηση του πυρηνικού περιβλήματος και αναδιοργάνωση των μικροσωληνίσκων του κυτταροσκελετού για το σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου. Αυτά τα γεγονότα σηματοδοτούν την είσοδο στη μίτωση.

Σε ορισμένες περιπτώσεις εμπλέκονται ειδικοί αναστολείς των Cd κινασών (Cdk inhibitor proteins), οι οποίοι αναστέλλουν τη συναρμολόγηση ή τη δράση ενός ή περισσότερων

συμπλόκων κυκλίνης - Cd κινάσης ^[3]. Έτσι ώστε αν το DNA έχει υποστεί βλάβη, ένα από τα σημεία ελέγχου σταματά τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G1, εξασφαλίζοντας ότι το κύτταρο δεν θα αντιγράψει κατεστραμμένο DNA.

Οι βλάβες του DNA προκαλούν αύξηση της συγκέντρωσης και της δραστηριότητας της ρυθμιστικής πρωτεΐνης p53. Μόλις ενεργοποιηθεί, η πρωτεΐνη p53 εκκινά τη μεταγραφή ενός γονιδίου που κωδικοποιεί μια ανασταλτική πρωτεΐνη των Cd κινασών, την p21. Έτσι, αυξάνεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης p21, η οποία προσδένεται στις πρωτεΐνες G1/S-Cdk και S-Cdk που προωθούν το κύτταρο στη φάση S και αναστέλλει τη δράση τους. Η διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 προσφέρει στο κύτταρο την ευκαιρία να επιδιορθώσει το κατεστραμμένο DNA προτού το αντιγράψει. Αν η πρωτεΐνη p53 απουσιάζει ή αν είναι ελαττωματική, η απρόσκοπτη αντιγραφή του κατεστραμμένου DNA συνοδεύεται από υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων, με συνέπεια να παράγονται κύτταρα με προδιάθεση να γίνουν καρκινικά.

Ένα άλλο σημαντικό σημείο ελέγχου του κυτταρικού κύκλου υπάρχει στη Μίτωση. Σε αυτό το σημείο το κύτταρο καθορίζει αν όλα τα χρωμοσώματα του προσδένονται σωστά στη μιτωτική άτρακτο. Η μιτωτική άτρακτος είναι μια μηχανή του κυτταροσκελετού που διαχωρίζει τα διπλασιασμένα χρωμοσώματα και τα ισοκατανέμει στα δυο θυγατρικά κύτταρα, αποφεύγοντας έτσι μοιραίες καταστάσεις για το κύτταρο. Για να ελέγξει την πρόσδεση των χρωμοσωμάτων, το κύτταρο αξιοποιεί ένα αρνητικό σήμα: τα ελεύθερα χρωμοσώματα αποστέλλουν ένα σήμα «τερματισμού» στο σύστημα ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Το σήμα αναστέλλει την περαιτέρω εξέλιξη της μίτωσης εμποδίζοντας την ενεργοποίηση του APC. Όταν το APC είναι ανενεργό, τα χρωμοσώματα παραμένουν κολλημένα. ^[3]

2.1.4 Μείωση

Η διεργασία με την οποία σχηματίζονται τα γαμετικά κύτταρα είναι διαφορετική από εκείνη των διπλοειδών κυττάρων, εφόσον σε κάθε γαμετικό κύτταρο παραδίδεται μόνο μια

ομάδα χρωμοσωμάτων του αρχικού διπλοειδούς κυττάρου. Αυτή η διεργασία είναι γνωστή ως μείωση και συνίσταται σε διπλασιασμό κάθε χρωμοσώματος που ακολουθείται από δυο διαδοχικές κυτταρικές διαιρέσεις. Στους άνδρες η μείωση διαρκεί 24 ημέρες, ενώ στις γυναίκες μπορεί να διαρκέσει δεκαετίες.

Η πρώτη φάση στη μείωση, όπως και στη μίτωση, είναι ο διπλασιασμός των χρωμοσωμάτων των διπλοειδών κυττάρων. Τα νέα χρωμοσώματα αρχικά παραμένουν προσκολλημένα το ένα στο άλλο. Στην επόμενη φάση της μείωσης κάθε διπλασιασμένο πατρικό χρωμόσωμα ζευγαρώνει με το μητρικό ομόλογο του. Αυτό το εξειδικευμένο ζευγάρι διασφαλίζει ότι τα ομόλογα θα διαχωριστούν σωστά κατά τις επακόλουθες κυτταρικές διαιρέσεις, ώστε καθένας από τους παραγόμενους γαμέτες να παραλάβει μια πλήρη απλοειδή ομάδα χρωμοσωμάτων.

2.2. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΘΑΝΑΤΟΣ

2.2.1 Προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος

Όταν τα κύτταρα πάψουν να είναι απαραίτητα πεθαίνουν με μία διαδικασία γνωστή ως προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (programmed cell death, PCD) ή αλλιώς απόπτωση. Στους ενήλικους ιστούς, ο κυτταρικός θάνατος αντιρροπεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό έτσι ώστε οι ιστοί ούτε να αυξάνουν ούτε να συρρικνώνονται.

2.2.1.1 Μηχανισμός απόπτωσης : Ένα κύτταρο που υφίσταται απόπτωση συρρικνώνεται και συμπυκνώνεται, ο κυτταροσκελετός καταρρέει, το πυρηνικό περίβλημα αποσυναρμολογείται και το DNA του πυρήνα θρυμματίζεται σε μικρά κλάσματα. Ιδιαίτερα σημαντικό είναι το γεγονός ότι η κυτταρική επιφάνεια τροποποιείται και εκδηλώνει ιδιότητες που προκαλούν την άμεση φαγοκυττάρωση του είτε από τα γειτονικά κύτταρα

είτε από ένα μακροφάγο χωρίς καμία διαρροή των συστατικών του. Η ταχεία απομάκρυνση του θνήσκοντος κυττάρου αποτρέπει τις καταστροφικές συνέπειες της κυτταρικής νέκρωσης. Επίσης αποτρέπει να ανακυκλωθούν τα οργανικά συστατικά του αποπτωτικού κυττάρου από το κύτταρο που το καταβροχθίζει.

Ο μηχανισμός της απόπτωσης είναι παρόμοιος σε όλα τα ζωικά κύτταρα. Περιλαμβάνει μια οικογένεια πρωτεασών (ενζύμων που διασπούν άλλες πρωτεΐνες), οι οποίες ονομάζονται κασπάσες. Οι κασπάσες παράγονται ως ανενεργά μόρια (προκασπάσες) που ενεργοποιούνται με πρωτεόλυση σε απάντηση προς διάφορα σήματα που επάγουν απόπτωση. Οι ενεργοποιημένες κασπάσες διασπούν, και έτσι ενεργοποιούν, και άλλα μέλη της ίδιας οικογένειας. Στη συνέχεια, άλλες βασικής σημασίας πρωτεΐνες διασπώνται και θανατώνουν το κύτταρο γρήγορα και αθόρυβα, όπως η διάσπαση των λαμινών του πυρήνα με αποτέλεσμα τη μη αντιστρεπτή αποδόμηση του πυρηνικού υμένα. Αυτή η ακολουθία είναι καταστροφική, αυτοενισχυόμενη και μη αντιστρεπτή.

Για αυτό και η διαδικασία του κυτταρικού θανάτου πρέπει να ελέγχεται αυστηρά. Οι κύριες πρωτεΐνες που ρυθμίζουν την ενεργοποίηση των κασπασών είναι ενδοκυττάρια και ανήκουν στην οικογένεια της πρωτεΐνης Bcl-2. Ορισμένα μέλη αυτής της οικογένειας προάγουν την ενεργοποίηση των προκασπασών και άρα και τον κυτταρικό θάνατο (Bax, Bak), ενώ άλλα αναστέλλουν αυτές τις διεργασίες (η ίδια η Bcl-2) ^[3]

Το ενδοκυττάριο πρόγραμμα θανάτου επίσης ρυθμίζεται από σήματα που προέρχονται από άλλα κύτταρα, τα οποία είτε το ενεργοποιούν είτε το καταστέλλουν.

2.2.1.2. Δομικές και λειτουργικές αλλαγές του κυττάρου κατά την απόπτωση

Για να πολλαπλασιαστεί ένα κύτταρο δεν φτάνουν μόνο οι θρεπτικές ουσίες αλλά χρειάζονται επιπλέον και διεγερτικά χημικά σήματα από άλλα κύτταρα, συνήθως τα γειτονικά. Τα περισσότερα εξωκυττάρια σηματοδοτικά μόρια, τα οποία επηρεάζουν τη διαίρεση, την αύξηση και την επιβίωση των κυττάρων είναι διαλυτές πρωτεΐνες που

εκκρίνονται από άλλα κύτταρα ή πρωτεΐνες που προσδένονται στην επιφάνεια άλλων κυττάρων του εξωκυττάρου στρώματος. Τα περισσότερα επιδρούν θετικά στις παραπάνω διεργασίες, μερικά όμως αναστέλλουν επιλεκτικά μια από αυτές.

Οι σηματοδοτικές πρωτεΐνες με θετική δράση διακρίνονται με βάση τη λειτουργία τους σε τρεις βασικές κατηγορίες:

1. Μιτογόνα: διεγείρουν την κυτταρική διαίρεση, κυρίως υπερνικώντας τα ενδοκυττάρια «φρένα» που αναστέλλουν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου.
2. Αυξητικοί παράγοντες: διεγείρουν την αύξηση των κυττάρων (αύξηση της κυτταρικής μάζας) προάγοντας τη σύνθεση και αναστέλλοντας την αποδόμηση πρωτεϊνών και άλλων μακρομορίων.
3. Παράγοντες επιβίωσης: προάγουν την επιβίωση των κυττάρων, καταστέλλοντας την απόπτωση.

Υπάρχουν όμως και σηματοδοτικά μόρια που έχουν δύο ή και περισσότερες από τις παραπάνω λειτουργίες, όπως τα μιτογόνα και οι αυξητικοί παράγοντες. Πιο συγκεκριμένα, τα περισσότερα μιτογόνα είναι εκκρινόμενες σηματοδοτικές πρωτεΐνες που προσδένονται σε υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας. Μόλις συμβεί αυτό οι υποδοχείς ενεργοποιούν ποικίλες ενδοκυτταρικές σηματοδοτικές οδούς που διεγείρουν την κυτταρική διαίρεση. Οι σηματοδοτικές οδοί κυρίως δρουν για να αρθούν οι αναστολές της μετάβασης από τη G1 στη φάση S.

Σημαντικό παράδειγμα ενός τέτοιου περιοριστικού μηχανισμού είναι η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (Retinoblastoma protein, pRb). Το ρετινοβλάστωμα είναι ένας σπάνιος οφθαλμικός όγκος παιδιών, που χαρακτηρίζεται από έλλειψη ή δυσλειτουργία της πρωτεΐνης Rb, η οποία προσδένεται σε συγκεκριμένες ρυθμιστικές πρωτεΐνες γονιδίων και τις εμποδίζει να διεγείρουν τη μεταγραφή γονιδίων απαραίτητων για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Τα μιτογόνα ενεργοποιούν ενδοκυτταρικές σηματοδοτικές οδούς που οδηγούν σε ενεργοποίηση των συμπλόκων G₁Cdk και G1/S-Cdk. Αυτές οι κινάσες φωσφορυλιώνουν την πρωτεΐνη Rb και έτσι τροποποιούν τη διαμόρφωση της. Η φωσφορυλιωμένη Rb ελευθερώνει τις προσδεδμεμένες ρυθμιστικές πρωτεΐνες οι οποίες

μπορούν πλέον να ενεργοποιήσουν ανεμπόδιστα τα γονίδια που απαιτούνται για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Όπως τα περισσότερα μιτογόνα, οι *εξωκυτταριοί αυξητικοί παράγοντες* προσδένονται σε υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας που ενεργοποιούν ποικίλες ενδοκυττάρειες σηματοδοτικές οδούς. Η σηματοδοτική πρωτεΐνη PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), δρα ως αυξητικός παράγοντας και μιτογόνο και διεγείρει τόσο την αύξηση των κυττάρων όσο και την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Αυτές οι πρωτεΐνες διασφαλίζουν ότι τα κύτταρα θα διατηρούν το σωστό μέγεθος καθώς πολλαπλασιάζονται.

2.2.2. Μιτωτική Καταστροφή

Η Μιτωτική καταστροφή είναι μια καθυστερημένη μορφή κυτταρικού θανάτου που καταλήγει από την πρόωπη ή ακατάλληλη είσοδο του κυττάρου στη Μίτωση^[21]. Αυτή η μορφή κυτταρικού θανάτου καταλήγει από το συνδυασμό των ανεπαρκών τελικών σημείων του κυτταρικού κύκλου και της κυτταρικής βλάβης. Πυροδοτείται συνήθως σε μη-αιμοποιητικά κύτταρα όγκων, συγκεκριμένα εκείνα με μεταλλαγμένη ή ανενεργή p53, καθώς και στρωματικά ή παρεγχυματικά κύτταρα, ως απόκριση στην Ιοντίζουσα ακτινοβολία^[24]. Κυτταρικός θάνατος μέσω μιτωτικής καταστροφής, που επάγεται από ακτινοβολία έχει δειχθεί σε προ-κλινικά μοντέλα στερεού καρκίνου^[25,26] και θεωρείται να είναι ένας σημαντικός τρόπος ακτινοεπαγόμενου θανάτου σε κλινικά θεραπευμένους όγκους^[20].

2.2.3 Νέκρωση

Ο όρος νέκρωση αναφέρεται ως μια παθητική μορφή κυτταρικού θανάτου, η οποία χαρακτηρίζεται από την απώλεια της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης από την υποβάθμιση του DNA.^[27] Η νέκρωση σχετίζεται με υψηλές δόσεις της ακτινοθεραπείας

και μπορεί να πυροδοτήσει προστατευτική ανοσία κατά του όγκου μέσω της έκλυσης μοριακών προτύπων σχετιζόμενα με βλάβες (Damage- associated molecular patterns, DAMPs) ^[28] και νουκλεοτίδια που μπορούν να διεγείρουν χημοκίνηση μονοκυττάρων. Αυτές οι φλεγμονώδεις αποκρίσεις μπορούν να περιορίσουν την αντοχή αυτών των αντικαρκινικών ανοσοαποκρίσεων. ^[29]

2.2.4 Αυτοφαγία

Η αυτοφαγία είναι μια καταβολική διαδικασία που περιλαμβάνει τη λυσοσωμική υποβάθμιση παλιών, ελαττωματικών ή υπερδραστήριων κυτταροπλασματικών συστατικών ή οργανιδίων, τα οποία υπό φυσιολογικές συνθήκες βοηθούν στη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης και της βιωσιμότητας του κυττάρου. Παρατεταμένη ή υπερβολική επαγωγή της αυτοφαγίας, που έχει προκληθεί από έκθεση σε θεραπείες όπως η ακτινοθεραπεία, μπορούν να οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο μέσω της κατανάλωσης του κυττάρου από τον «ίδιο του τον εαυτό» σε μία προσπάθεια να απομακρύνει κυτταρικά συστατικά με βλάβες ^[30].

2.2.5 Γήρανση (Senescence)

Η γήρανση είναι μια μεταβολική ενεργή κατάσταση της προσωρινής διακοπής του κυτταρικού κύκλου, που προκαλείται συνήθως από τη φθορά των τελομερών ως απόκριση στη βλάβη DNA ^[31]. Παρ' όλα αυτά, η γήρανση που επάγεται από ακτινοβολία συνδέεται περισσότερο με την ενεργοποίηση της p53 και την έκφραση της ρυθμιστικής πρωτεΐνης p21 του κυτταρικού κύκλου και/ή ενεργοποίηση της οικογένειας p16INK4/pRb των κατασταλικών πρωτεϊνών ^[32]. Και η ιοντίζουσα και η μη-ιοντίζουσα ακτινοβολία μπορούν να πυροδοτήσουν γήρανση που επάγεται από στρες ^[33]. Γηρασμένα κύτταρα έχουν βρεθεί να εκκρίνουν πολλαπλούς φλεγμονώδεις παράγοντες, όπως οι IL-1 β , IL-6,

IL-8 και MCP-1/CCL2, οι οποίοι απαρτίζουν τον εκκριτικό φαινότυπο που σχετίζεται με τη γήρανση (Senescence-associated secretory phenotype, SASP) ^[34] .

2.2.6. Ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια

Τα προϊόντα των πρωτο-ογκογονιδίων υπό φυσιολογικές συνθήκες διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Οι μεταλλαγμένες μορφές των πρωτο-ογκογονιδίων, τα ογκογονίδια, εντοπίζονται στα καρκινικά κύτταρα και είτε είναι περισσότερο ενεργά, είτε είναι ενεργά σε ακατάλληλο χρόνο. Τα πρωτο-ογκογονίδια δρουν επιταχύνοντας την κυτταρική ανάπτυξη κατά την G1 φάση του κυτταρικού κύκλου. Πολλά πρωτο-ογκογονίδια παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμβρυογένεση γιατί συχνά εμπλέκονται στη διεγερση της κυτταρικής αύξησης και πολλαπλασιασμό κατά την ανάπτυξη ενός οργανισμού. Ορισμένα πρωτο-ογκογονίδια μπορεί να ρυθμίζουν αρνητικά την κυτταρική διαφοροποίηση. Τα πρωτο-ογκογονίδια παύουν τη δραστηριότητα τους όταν ολοκληρωθεί η αναπτυξιακή λειτουργία στην οποία συμμετέχουν. Όμως, αν διατηρήσουν τη δραστηριότητα τους ή επανενεργοποιηθούν τότε μπορεί να αναπτυχθεί καρκίνος.

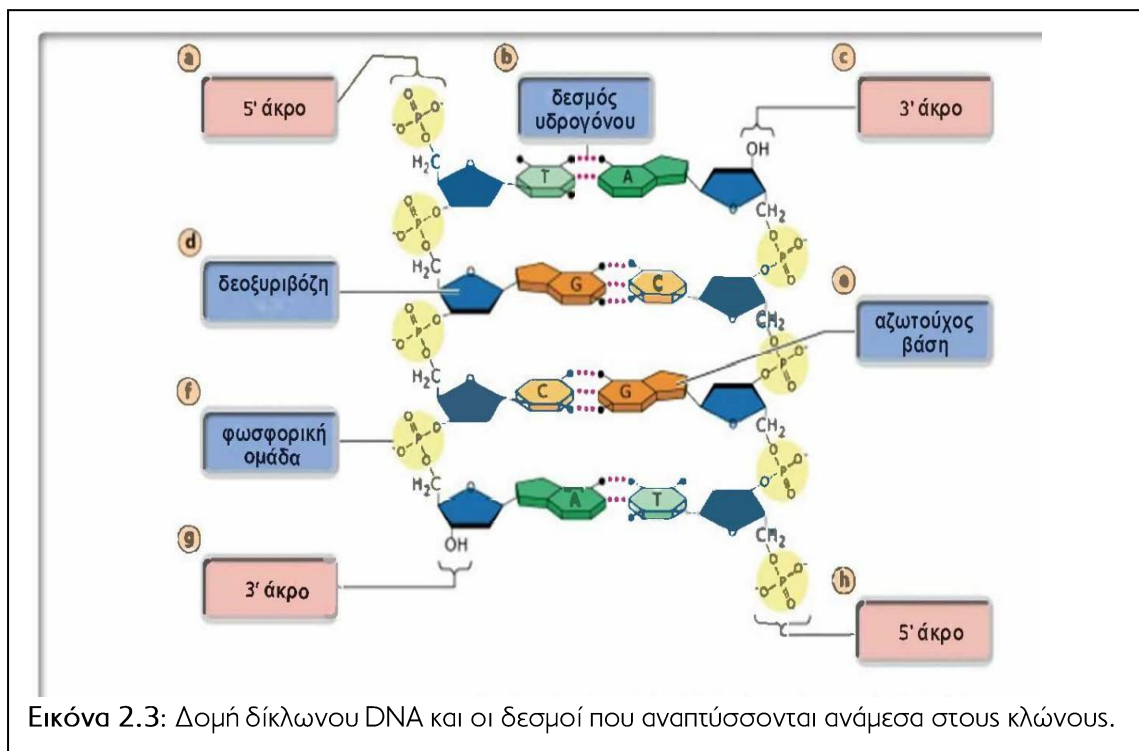
Τα προϊόντα των ογκοκατασταλτικών γονιδίων έχουν κατασταλτικό ρόλο στην ανάπτυξη και τη διαίρεση του κυττάρου . Όταν και τα δυο αλληλόμορφα ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου απενεργοποιηθούν χάνεται η κατασταλτική τους δράση και το κύτταρο οδηγείται σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό. Σημαντικό ογκοκατασταλτικό γονίδιο για την ομαλή λειτουργία του κυτταρικού κύκλου είναι οι ογκοκαταστολείς p53 .^[3]

2.3 Το DNA και η δομή του.

Η ανακάλυψη της δομής του DNA πραγματοποιήθηκε πριν 6 δεκαετίες από δύο ομάδες ερευνητών, της R. Franklin και M. Wilkins καθώς και των J. Watson και F. Crick, και αποτέλεσε εξαιρετικής σημασίας εξέλιξη για την επιστήμη και τον άνθρωπο.

2.3.1 Τι είναι το DNA

Το DNA (DeoxyriboNucleic Acid) ή δεοξυριβονουκλειϊκό οξύ είναι ένα μακρομόριο που αποτελείται από νουκλεοτίδια, το καθένα από τα οποία αποτελείται από μια πεντόζη, τη δεοξυριβόζη, ενωμένη με μια φωσφορική ομάδα και μια αζωτούχα βάση. Στα νουκλεοτίδια του DNA η αζωτούχος βάση μπορεί να είναι είτε μια πουρίνη: αδενίνη (A), γουανίνη (G) είτε μια πυριμιδίνη: θυμίνη (T) ή κυτοσίνη (C) . Σε κάθε νουκλεοτίδιο η αζωτούχος βάση συνδέεται με τον 1' άνθρακα της δεοξυριβόζης και η φωσφορική ομάδα με τον 5' άνθρακα.



Σύμφωνα με το μοντέλο της διπλής έλικας, που αναφέρεται στη δομή του DNA στο χώρο:

- Το DNA αποτελείται από δύο αντιπαράλληλες πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες που σχηματίζουν στο χώρο μία δεξιόστροφη διπλή έλικα.
- Η διπλή έλικα έχει ένα σταθερό σκελετό, που αποτελείται από επαναλαμβανόμενα μόρια φωσφορικής ομάδας-δεοξυριβόζης ενωμένων με φωσφοδιεστερικό δεσμό. Ο σκελετός αυτός είναι υδρόφιλος και βρίσκεται στο εξωτερικό του μορίου. Προς το εσωτερικό του σταθερού αυτού σκελετού βρίσκονται οι αζωτούχες βάσεις που είναι υδρόφοβες.
- Οι αζωτούχες βάσεις της μιας αλυσίδας συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου με τις αζωτούχες βάσεις της απέναντι αλυσίδας με βάση τον κανόνα της συμπληρωματικότητας. Η αδενίνη συνδέεται μόνο με θυμίνη και αντίστροφα με δυο δεσμούς υδρογόνου, ενώ η κυτοσίνη μόνο με γουανίνη και αντίστροφα, με τρεις δεσμούς υδρογόνου. Οι δεσμοί υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ των βάσεων σταθεροποιούν τη δευτεροταγή δομή του μορίου.
- Οι δυο αλυσίδες ενός μορίου DNA είναι συμπληρωματικές και αυτό υποδηλώνει ότι η αλληλουχία της μιας καθορίζει την αλληλουχία της άλλης. Η συμπληρωματικότητα έχει τεράστια σημασία για τον αυτοδιπλασιασμό του DNA, μια ιδιότητα που το καθιστά το καταλληλότερο μόριο για τη διατήρηση και τη μεταβίβαση της γενετικής πληροφορίας^[99].

Μια πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα σχηματίζεται από την ένωση πολλών νουκλεοτιδίων με ομοιοπολικό δεσμό. Ο δεσμός αυτός δημιουργείται μεταξύ του υδροξυλίου (OH⁺) του 3' άνθρακα της πεντόζης του 1^{ου} νουκλεοτιδίου και της φωσφορικής ομάδας που είναι συνδεδεμένη στον 5' άνθρακα της πεντόζης του επόμενου νουκλεοτιδίου. Ο δεσμός αυτός ονομάζεται 3'-5' φωσφοδιεστερικός δεσμός. Με τον τρόπο αυτό η πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα που σχηματίζεται έχει ένα σκελετό, που αποτελείται από επανάληψη των μορίων φωσφορική ομάδα-πεντόζη-φωσφορική ομάδα-πεντόζη. Η

ενέργεια που απαιτείται για τη δημιουργία του φωσφοδιεστερικού δεσμού προέρχεται από τη διάσπαση του ATP (μορίου που αποτελείται από αδενίνη και ριβόζη και στο οποίο έχουν προσκολληθεί τρεις φωσφορικές ομάδες) σε ADP, του αντίστοιχου μορίου στο οποίο έχουν προσκολληθεί δυο φωσφορικές ομάδες.

Κάθε αλυσίδα έχει κατεύθυνση 5' → 3', εφόσον το πρώτο της νουκλεοτίδιο έχει πάντα μια ελεύθερη φωσφορική ομάδα συνδεδεμένη στον 5' άνθρακα της πεντόζης του και το τελευταίο της νουκλεοτίδιο έχει ελεύθερο το υδροξύλιο του 3' της πεντόζης του^[99].

2.3.2 Βιολογική σημασία του DNA

Το DNA αποτελεί το γενετικό υλικό των περισσότερων κυττάρων και των περισσότερων ιών. Κάποιοι ιοί έχουν ως γενετικό υλικό RNA (RNA-ιοί). Οι τρεις βασικές διαφορές που το διακρίνουν από το DNA είναι η χρήση της ριβόζης, αντί της δεοξυριβόζης, της ουρακίλης (U) αντί της θυμίνης και ότι το RNA είναι σχεδόν πάντα μονόκλωνο. Οι διαφορές αυτές είναι που δίνουν στο RNA μια σειρά από ιδιότητες απαραίτητες για τη δράση του ως ενδιάμεσο μόριο με την εμφάνιση των τριών βασικών τύπων RNA: το αγγελιοφόρο RNA (mRNA), το μεταφορικό RNA (tRNA) και το ριβοσωμικό RNA (rRNA).

Οι λειτουργίες που καθιστούν το γενετικό υλικό το σημαντικότερο βιομόριο είναι ότι στο DNA αποθηκεύεται η γενετική πληροφορία. Στο DNA (ή στο RNA των RNA-ιών) περιέχονται οι πληροφορίες που καθορίζουν όλα τα χαρακτηριστικά ενός οργανισμού, οι οποίες οργανώνονται σε λειτουργικές μονάδες, τα γονίδια. Η έκφραση των γενετικών πληροφοριών επιτυγχάνεται με τον έλεγχο της πρωτεϊνοσύνθεσης. Χάρη στην ικανότητα του να αυτοδιπλασιάζεται διατηρείται και μεταβιβάζεται η γενετική πληροφορία από κύτταρο σε κύτταρο και από οργανισμό σε οργανισμό.

2.3.3 Αντιγραφή, έκφραση και ρύθμιση της γενετικής πληροφορίας

Οι Watson και Crick φαντάστηκαν μια διπλή έλικα, η οποία ξετυλίγεται και κάθε αλυσίδα λειτουργεί σαν καλούπι για τη σύνθεση μιας νέας συμπληρωματικής αλυσίδας. Έτσι, τα δύο θυγατρικά μόρια που προκύπτουν είναι πανομοιότυπα με το μητρικό και καθένα αποτελείται από μια καινούρια και μια παλιά αλυσίδα. Ο μηχανισμός αυτός ονομάστηκε ημισυντηρητικός. Για να αρχίσει η αντιγραφή του DNA, οι DNA ελικάσες διαρρηγνύουν τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των δυο αλυσίδων στις θέσεις έναρξης της αντιγραφής. Το κύτταρο έχει ένα ειδικό σύμπλοκο ενζύμων, το πριμόσωμα, το οποίο συνθέτει στις θέσεις έναρξης της αντιγραφής μικρά τμήματα RNA, συμπληρωματικά προς τις μητρικές αλυσίδες, και οι DNA πολυμεράσες επιμηκύνουν τα τμήματα αυτά, τοποθετώντας δεοξυριβονουκλεοτίδια σύμφωνα με τον κανόνα της συμπληρωματικότητας. Τα νέα μόρια DNA αρχίζουν να σχηματίζονται καθώς δημιουργούνται δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων των δεοξυριβονουκλεοτιδίων. Οι πολυμεράσες επιδιορθώνουν λάθη που συμβαίνουν κατά την αντιγραφή: αναγνωρίζουν και απομακρύνουν νουκλεοτίδια που οι ίδιες τοποθετούν κατά παράβαση του κανόνα της συμπληρωματικότητας, και τοποθετούν τα σωστά ενώ απομακρύνουν τα τμήματα RNA και τα αντικαθιστούν με τμήματα DNA ^[99].

2.4 ΒΛΑΒΕΣ ΣΤΟ DNA

Οι βλάβες στο DNA διακρίνονται σε ενδογενείς και εξωγενείς. Οι ενδογενείς βλάβες προκαλούνται κατά τη διάρκεια κυτταρικών διαδικασιών, όπως η αντιγραφή του DNA και ο μεταβολισμός. Οι εξωγενείς βλάβες προκαλούνται από εξωτερικούς παράγοντες όπως η υπεριώδης ακτινοβολία (UV), η θερμική διάσπαση ουσιών, τοξίνες, κάπνισμα, χημικά μεταλλαξογόνα. ^[3]

2.4.1 Είδη βλαβών του DNA

Οι βλάβες του DNA κατατάσσονται σε

- «Τυπογραφικά» λάθη της πολυμεράσης κατά την αντιγραφή του DNA
- Προσθήκη/απάλειψη 1-4 βάσεων ή εισδοχή μη συμπληρωματικής βάσης
- Αλλοιώσεις βάσεων (οξειδώσεις, μεθυλιώσεις, αποπουρινώσεις, απαμινώσεις)
- Υδρόλυση
- Θραύση της μίας αλυσίδας του DNA (Single Strand Break, SSB)
- Διμερή πυριμιδινών : Οφείλονται κυρίως στην υπεριώδη ακτινοβολία. Προκαλεί συνένωση γειτονικών βάσεων T ή C και δημιουργεί τα διμερή TT ή CC.
- Προσθήκη ογκωδών χημικών μορίων.
- Θραύση και των δυο αλυσίδων του DNA (Double Strand Break, DSB)

ΟΜΑΔΟΠΟΙΗΜΕΝΕΣ ΒΛΑΒΕΣ ή Oxidative Clustered DNA lesions (OCDLs)

Η ιδέα των ομαδοποιημένων βλαβών εισήχθη από τον Ward ως Τοπικές Περιοχές Πολλαπλών Βλαβών, δηλαδή διάφορες κοντινά τοποθετημένες βλάβες εντός ενός μικρού τμήματος DNA που μπορεί να παραχθούν από ΙΑ^[35, 36]. Ο Ward εισήγαγε την ιδέα των OCDLs για να αναφερθεί στην αυξημένη θνησιμότητα που επάγεται από την Ι.Α., η οποία δεν μπορεί να εξηγηθεί πλήρως από το ποσό των DSBs που σχηματίζονται, αν και οι συγκεκριμένες βλάβες, αν δεν επιδιορθωθούν ή επιδιορθωθούν εσφαλμένα, μπορούν να οδηγήσουν σε θανατηφόρο γεγονός^[37]. Όπως είδαμε η ακτινοβολία μπορεί να δημιουργήσει βλάβες στο DNA μέσω της άμεσης εναπόθεσης ενέργειας στο DNA, καθώς και μέσω της έμμεσης δράσης των δραστικών χημικών μορφών που σχηματίζονται κοντά στο DNA^[45, 46]. Οι έμμεσες βλάβες οφείλονται κυρίως στο σχηματισμό της ελεύθερης ρίζας υδροξυλίου(OH[·]) μέσω της ραδιόλυσης του νερού κοντά στο DNA (<10 nm). Η μέση απόσταση διάχυσης του OH[·] στο κυτταρικό περιβάλλον είναι περίπου 6nm^[47], περίπου 3 φορές η διάμετρος της έλικας του DNA. Λόγω του μικρού εύρους του OH[·] και

της αναγκαιότητας να σχηματίσει κοντινά τοποθετημένες βλάβες εντός του DNA, τα Clusters δημιουργούνται τυπικά μόνο όταν συμβούν τουλάχιστον 2-5 ιονισμοί εντός ή κοντά σε ένα τμήμα DNA 1-4 nm^[48]. Τα πολύ μικρά τμήματα DNA εντός σύνθετου SSB (1-2 νουκλεοτίδια) και εντός σύνθετου DSB (2-6 νουκλεοτίδια) πιθανόν θα καθούν κατά την εξαγωγή DNA και πιθανά στο κύτταρο εντός της χρωματίνης, επίσης.

Ένα σύνθετο SSB, όμως, όπως έχει προταθεί, μπορεί να οδηγήσει σε ένα DSB με απώλεια υλικού. Το σύνθετο SSB μπορεί να ειδωθεί ως ένα κενό 4 νουκλεοτιδίων. Σε κάθε περίπτωση, τέτοιες σύνθετες βλάβες δεν θα επιδιορθωθούν χωρίς λάθη και αναμένεται να οδηγήσουν σε μεταλλάξεις. Πειράματα έχουν δείξει ότι οι ομαδοποιημένες βλάβες εκτιμάται να είναι το 50-80% των συνολικών σύνθετων βλαβών DNA (DSB και μη-DSB ομαδοποιημένες βλάβες) που παράγονται από I.A.

Βάσει θεωρητικών υπολογισμών, προβλέπεται ότι ακτινοβολία χαμηλής LET (<1 keV/μm) μπορεί να δημιουργήσει συσσωματώματα μέχρι και 10 βλαβών προσθετικά στις μεμονωμένες βλάβες, ενώ υψηλή LET είναι ικανή να παράξει βλάβες ακόμη μεγαλύτερης πολυπλοκότητας. Οι μέγιστες δέκα ή παραπάνω βλάβες ανά συσσωμάτωμα προβλέπονται να συμβαίνουν με πολύ χαμηλότερη συχνότητα συγκριτικά με μεμονωμένες βλάβες.

Προσθετικά με τις βλάβες DSB που δημιουργούνται απευθείας από I.A., η επιχειρούμενη επιδιορθωτική εκτομή των συσσωματωμάτων που περιέχουν σάκχαρα και υπολείμματα βάσεων μπορούν μερικές φορές να παράξουν επιπλέον (ενζυματικές) DSB. Οι ομαδοποιημένες βλάβες DNA είναι ελλιπώς επιδιορθωμένες βλάβες που παράγουν κυτταροτοξικά και μεταλλαξογόνα φαινόμενα, καθώς και χρωμοσωμική αστάθεια. Αν και είναι πιθανές πολλαπλές διαδρομές για την επαγωγή και διαίωση της γονιδιακής αστάθειας, μελέτες που διεξήχθησαν με ελλιπείς επιδιορθωτικές κυτταρικές γραμμές δείχνουν ότι DSB και άλλες μορφές ομαδοποιημένων βλαβών συμμετέχουν στην γονιδιακή αστάθεια.

Οι δίκλωνες ομαδοποιημένες βλάβες (DSB Clusters) είναι πιθανώς κυτταροτοξικές και μεταλλαξογόνες σύνθετες βλάβες που αποτελούνται από τουλάχιστον δυο γειτονικές βλάβες (οξειδωμένες βάσεις, αβασικές περιοχές ή ρήξεις αλυσίδας) σε αντιπαράλληλες αλυσίδες σε μερικές περιστροφές της έλικας (σε απόσταση 1-10 bp). Έτσι, οι DSBs

μπορούν να θεωρηθούν, επίσης, ως ομαδοποιημένες βλάβες αποτελούμενες από δυο απέναντι , κοντά τοποθετημένες, βλάβες.

Τα clusters επάγονται στο DNA, και στα κύτταρα, από I.A. και από ραδιομιμητικά αντικαρκινικά φάρμακα και σχηματίζονται επίσης σε χαμηλές συχνότητες ως ενδογενείς βλάβες.

2.4.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗΣ ΤΩΝ ΒΛΑΒΩΝ ΤΟΥ DNA

Η επιδιόρθωση του DNA αναφέρεται σε ένα σύνολο διαδικασιών με το οποίο ένα κύτταρο αναγνωρίζει και διορθώνει τις βλάβες στα μόρια του DNA που κωδικοποιούν το γονιδίωμα του. Οι διαδικασίες αυτές περιλαμβάνουν την αναγνώριση των βλαβών στο DNA και τις επιδιορθώνουν χρησιμοποιώντας ως «καλούπι» την πληροφορία από τη συμπληρωματική αλυσίδα του DNA. Το κύτταρο διαθέτει αυτούς τους μηχανισμούς, έτσι ώστε , εν τέλει, να προστατευτεί από μεταλλάξεις και αστάθεια του γονιδιώματος.

Οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης του DNA διακρίνονται στους:

- Μηχανισμούς επιδιόρθωσης βλαβών της μίας αλυσίδας του DNA (π.χ. «τυπογραφικά» λάθη, αλλοιώσεις βάσεων, SSBs)
- Μηχανισμούς επιδιόρθωσης θραύσεων των δυο αλυσίδων του DNA (DSBs).

2.4.2.1 Μηχανισμοί επιδιόρθωσης βλαβών της μίας αλυσίδας του DNA

- Επιδιόρθωση αταίριαστου ζεύγους βάσης (Mismatch Repair , MMR)
Διορθώνει σφάλματα κατά την αντιγραφή του DNA , τα οποία οδηγούν στην εισαγωγή μίας ή λίγων (2-4) λανθασμένων (αλλά όχι αλλοιωμένων) βάσεων.
- Επιδιόρθωση Εκτομής βάσης (Base Excision Repair , BER)

Διορθώνει αλλοιώσεις μίας μόνο βάσης νουκλεοτιδίου (οξειδωση, μεθυλίωση, αποπουρίνωση ή απαμίνωση) και μονόκλωνες θραύσεις της αλυσίδας (Single Strand Breaks , SSBs).

- Επιδιόρθωση εκτομής Νουκλεοτιδίου (Nucleotide Excision Repair,NER)
Διορθώνει αλλοιώσεις που εκτείνονται σε δύο ή περισσότερα νουκλεοτίδια (για παράδειγμα διμερή θυμίνης) και την προσθήκη ογκωδών μορίων.

2.4.2.1.α) MisMatch Repair

Σχηματικά η αρχή λειτουργίας του MMR:

Αναγνώριση βλάβης → Ξετύλιγμα έλικας (ελικάση) → Αφαίρεση βλάβης (ενδονουκλεάση)
→ Πολυμερισμός και συγκόλληση (Πολυμεράση και λιγάση)

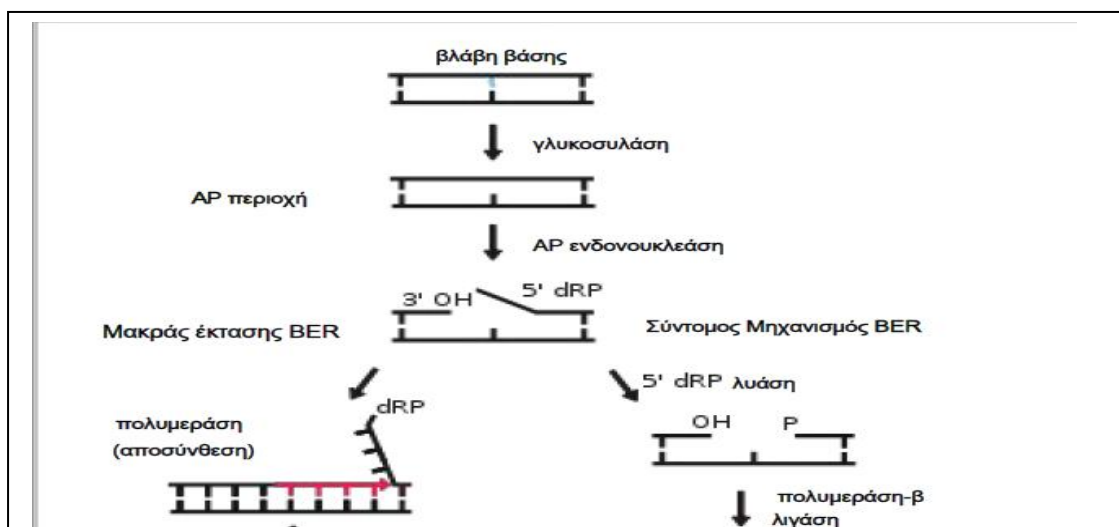
Η ανεπιτυχής λειτουργία του MMR μερικές φορές οδηγεί σε καρκινογένεση. Το πιο σύννηθες κρούσμα είναι το HNPCC: Hereditary Non Polyposis Colon Cancer ή σύνδρομο του Lynch, το οποίο είναι ένα κληρονομικό σύνδρομο στον άνθρωπο που προδιαθέτει στην εμφάνιση καρκίνου του παχέος εντέρου. Ευθύνεται για το περίπου 5% των καρκίνων του παχέος εντέρου. Ο μέσος όρος διάγνωσης του σε ασθενείς με HNPCC είναι τα 44 έτη, ενώ σε ανθρώπους χωρίς το σύνδρομο είναι τα 64 έτη. Οι ασθενείς με HNPCC παρουσιάζουν υψηλή συχνότητα μεταλλαξογένεσης, η οποία προδιαθέτει για καρκινογένεση. Κληρονομείται ως αυτοσωμικό επικρατές και η πλειονότητα των ασθενών είναι ετερόζυγοι για ένα φυσιολογικό και ένα μεταλλαγμένο MMR γονίδιο. Οφείλεται σε κληρονομική μετάλλαξη ενός από τα MMR γονίδια, συνήθως των MLH1 (50% των περιπτώσεων) ή MSH2(40%).

Καταστολή της έκφρασης του φυσιολογικού αλληλόμορφου γονιδίου MMR λόγω μετάλλαξης, απάλειψης του γονιδίου ή υπερμεθυλίωσης του υποκινητή οδηγεί σε συσσώρευση μεταλλάξεων. Τα φυσιολογικά τους κύτταρα διαθέτουν επαρκή ενεργότητα του μηχανισμού επιδιόρθωσης αταίριαστου ζεύγους βάσεων.

2.4.2.1.β) Μηχανισμός Εκτομής Βάσης - Base Excision Repair (BER)

Ο μηχανισμός Εκτομής Βάσης ή BER διορθώνει αλλοιώσεις (οξειδωση, μεθυλίωση, αποπουρίνωση, απαμίνωση) βάσης νουκλεοτιδίου και θραύσεις της μίας αλυσίδας του DNA (SSBs). Οι αλλοιώσεις βάσης είναι το συνηθέστερο είδος βλαβών του DNA αφού π.χ. αυθόρμητες απαμινώσεις συμβαίνουν σε τουλάχιστον 10000 βάσεις ανά κύτταρο ανά ημέρα^[3]. Προϊόντα του μεταβολισμού καθώς και όλες σχεδόν οι διαβρωτικές και τοξικές ουσίες του περιβάλλοντος δημιουργούν αλλοιώσεις βάσεων νουκλεοτιδίου ή και SSBs.

Η διαδικασία επιδιόρθωσης του BER εκκινάται από ένα ένζυμο, τη DNA γλυκοσυλάση, που διαβάζει την αλληλουχία των βάσεων προσπαθώντας να ανιχνεύσει εκείνες που έχουν αλλοιωθεί ή βρίσκονται σε λάθος θέση. Οι γνωστές ανθρώπινες DNA γλυκοσυλάσες είναι 11 και είτε είναι μονολειτουργικές είτε πολυλειτουργικές. Οι μονολειτουργικές μέσω ενός μορίου νερού υδρολύουν το γλυκοζιδικό δεσμό δημιουργώντας μια αβασική θέση. Ενώ, οι πολυλειτουργικές γλυκοσυλάσες μέσω μιας πυρηνόφιλης αμινομάδας τους, εκτός από τη ρήξη του γλυκοζιδικού δεσμού, καταλύουν τη ρήξη του φωσφοδιεστερικού δεσμού στο 3' του αβασικού σημείου και επάγουν επιπλέον τη ρήξη του κλώνου στη θέση αυτή. Έπειτα, δρα μια ενδονουκλεάση τύπου 1 (APE1), η οποία αναγνωρίζει την αβασική θέση (apurinic/apyrimidinic site, AP site) και κόβει τον 5' φωσφοδιεστερικό δεσμό στο σημείο της βλάβης. Προσελκύεται η XRCC1 και μαζί με την β-πολυμεράση και την λιγάση-III, προστίθεται το συμπληρωματικό νουκλεοτίδιο και συγκολλάται επιδιορθώνοντας πλήρως τη βλάβη. Ο παραπάνω μηχανισμός ονομάζεται σύντομος μηχανισμός BER^[100].



Στην Εικόνα 2.4 βλέπουμε σχηματικά τα βήματα και τα ένζυμα που εμπλέκονται στον σύντομο BER αλλά και στον μακράς έκτασης (long-patch, LP). Στον LP BER ενσωματώνονται στην κενή θέση μερικά νουκλεοτίδια και στη συνέχεια μια Flap ενδονουκλεάση (FEN1) κόβει και απομακρύνει την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων που έχει αντικατασταθεί και περισσεύει. Τέλος, η διαδικασία ολοκληρώνεται με μια λιγάση 1.

Στην επιδιόρθωση των SSBs συμμετέχουν και οι πρωτεΐνες PARP και PNK. Η **PARP** (Poly ADP ribose polymerase) είναι μια πυρηνική πρωτεΐνη που συναντάται στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Προσδένεται σε σπασίματα του DNA και συνθέτει αλυσίδες ολιγο-ή πολύ-ADP ριβόζης χρησιμοποιώντας NAD⁺. Τις αλυσίδες αυτές τις προσθέτει ομοιοπολικά στον εαυτό της ή άλλες πρωτεΐνες-στόχους. Η ενεργότητα της ρυθμίζεται από τα επίπεδα αυτό-τροποποίησης της (αλυσίδες ADP ριβόζης). Για πλήρη ενεργότητα απαιτείται πρόσδεση της PARP σε σπασίματα του DNA. Η προσθήκη αλυσίδων ADP ριβόζης σε πρωτεΐνες-στόχους είναι απαραίτητη για το σωστό εντοπισμό και λειτουργία αυτών. Η PARP συνεργάζεται με την p53 για προστασία έναντι της καρκινογένεσης^[3]. Οι ογκοκαταστολείς p53 συνδέουν την φλεγμονώδη απόκριση με τον Προγραμματισμένο Κυτταρικό Θάνατο (PCD) μέσω της μιτοχονδριακής αποπτωτικής οδού. Η **PNK** (polynucleotide kinase), με τη σειρά της, καταλύει την φωσφορυλίωση του DNA στο 5'-OH και μπορεί να αποφωσφορυλιώσει την 3'-φωσφορική ομάδα.

Η σωστή και απρόσκοπτη λειτουργία κάθε ενζύμου που συμμετέχει στον BER είναι απαραίτητη, ενώ μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν αυτά τα ένζυμα οδηγούν σε λειτουργική ανεπάρκεια ή αδρανοποίηση τους προκαλώντας σοβαρές συνέπειες στο κύτταρο και τον οργανισμό συνολικά. Συγκεκριμένα, η μετάλλαξη του γονιδίου OGG1 απενεργοποιεί την αντίστοιχη γλυκοσυλάση που συμμετέχει στον BER και συνδέεται με καρκινογένεσις στα νεφρά, τους πνεύμονες, τον οισοφάγο και το γαστρικό. Ακόμα, μεταλλάξεις στο γονίδιο MUTYH που παράγει τη γλυκοσυλάση σχετίζεται με συγκεκριμένο είδος καρκίνο του εντέρου.

Επίσης, ελλιπής λειτουργία της APE1 έχει συνδεθεί με προδιάθεση καρκινογένεσης και διάφορες μορφές καρκίνου εφόσον η παρουσία αυτής της ενδονουκλεάσης είναι απαραίτητη για την επιβίωση του κυττάρου, καθώς ευθύνεται για σχεδόν το σύνολο της δραστηριότητας ενδονουκλεάσης. Ακόμη, ανεπάρκεια της πολυμεράσης β σε ποντίκια έχει βρεθεί να οδηγεί σε θραύσεις κλώνου του DNA και χρωμοσωμικές εκτροπές.

Προβληματική λειτουργία του μηχανισμού εκτομής βάσης μπορεί να καταλήξει σε εσφαλμένη επιδιόρθωση της βλάβης ή στη δημιουργία νέας. Τέτοιο παράδειγμα είναι η περίπτωση επιδιόρθωσης της 8-οξογουανίνης στην αλληλουχία CAG/CTG του γονιδίου Huntington, όπου η προβληματική λειτουργία επεκτείνεται δημιουργώντας περισσότερες 8-οξογουανίνες, η συσσώρευση των οποίων καθιστά δυσκολότερη την επιδιόρθωση τους από το OGG1. Αν η αλληλουχία CAG εμφανιστεί πάνω από 40 φορές, θα οδηγήσει στην εμφάνιση της νευροεκφυλιστικής νόσου του Huntington^[101].

2.4.2.1.γ) Μηχανισμός Εκτομής Νουκλεοτιδίου - Nucleotide Excision Repair (NER)

Ο επιδιορθωτικός μηχανισμός εκτομής νουκλεοτιδίου διορθώνει βλάβες οι οποίες παραμορφώνουν το σχήμα της έλικας του DNA, όπως είναι ο σχηματισμός διμερών πυριμιδινών και η ομοιοπολική πρόσδεση ογκωδών χημικών ομάδων. Τέτοιου είδους

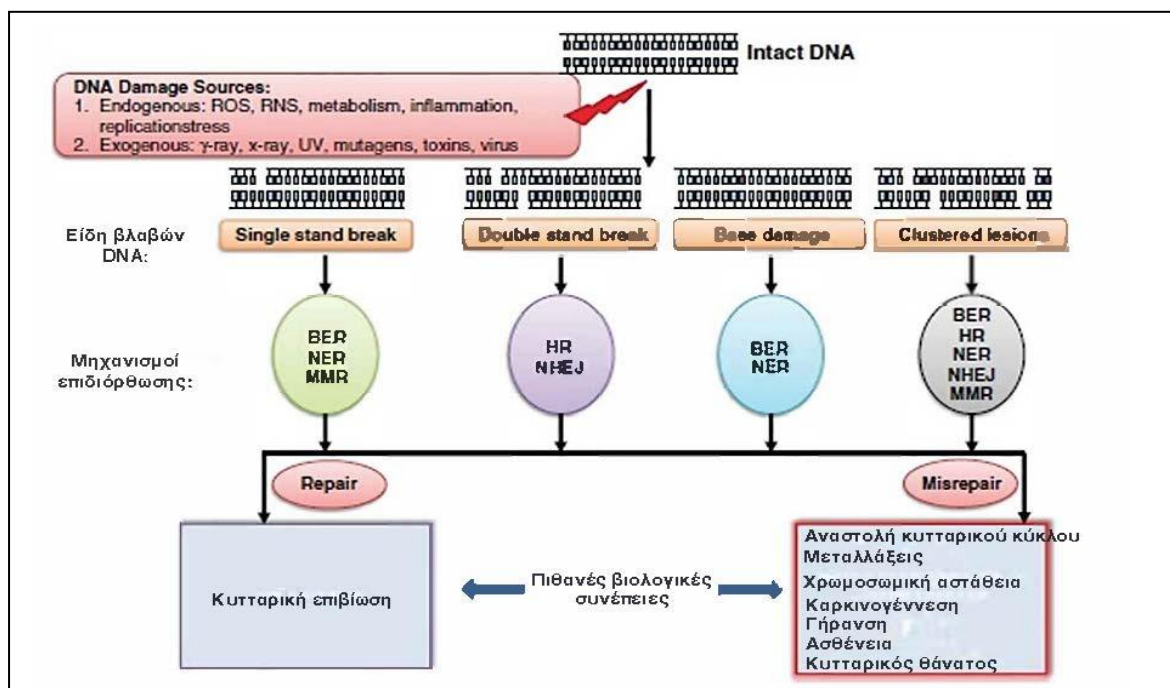
βλάβες προκαλούνται από την υπερϊώδη ακτινοβολία και χημικά καρκινογόνα. Στο NER συμμετέχουν περίπου 30 πρωτεΐνες σε κύτταρα θηλαστικών.

Ο NER διακρίνεται σε δυο υπομηχανισμούς:

- Transcription Coupled Repair (TCR): διορθώνει βλάβες που εμποδίζουν την RNA pol-II και επιδιορθώνει γονίδια που εκφράζονται.
- Global Genomic Repair(CGR): διορθώνει βλάβες σε περιοχές του γονιδιώματος, οι οποίες δεν εκφράζονται (ετεροχρωματίνη).

Οι δυο υπομηχανισμοί διαφέρουν μόνο στις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο αρχικό στάδιο αναγνώρισης της βλάβης.

Ενδεχόμενη μετάλλαξη σε ένα ή δυο γονίδια που συμμετέχουν στο NER προκαλεί το σύνδρομο Μελαχρωματικής Ξηροδερμίας (Xeroderma Pigmentosum, XP). Το σύνδρομο αυτό χαρακτηρίζεται από φωτοευαισθησία και οξεία προδιάθεση σε καρκίνο του δέρματος. Το συγκεκριμένο σύνδρομο κληρονομείται μάλιστα και ως αυτοσωμικό υπολειπόμενο σύνδρομο. Μεταλλάξεις σε γονίδια του NER, οι οποίες σχετίζονται με τη Μελαχρωματική Ξηροδερμία (XP), οδηγούν σε μείωση της ενεργότητας ή απενεργοποίηση του μηχανισμού NER, με αποτέλεσμα να μην επιδιορθώνονται επαρκώς οι βλάβες του DNA κατά την έκθεση σε υπερϊώδη ακτινοβολία με συνακόλουθη συσσώρευση μεταλλάξεων και προδιάθεση για καρκινογένεση. Καρκινικοί ιστών ασθενών με XP έχουν μεταλλάξεις, οι οποίες οδηγούν σε απενεργοποίηση της πρωτεΐνης p53 και σχεδόν όλες είναι UV-σχετιζόμενες [3].



2.4.2.2. Μηχανισμοί επιδιόρθωσης θραύσεων των *δυο αλυσίδων* του DNA (DSBs)

Το κύτταρο για να επιδιορθώσει τις δίκλωνες θραύσεις του DNA διαθέτει τους δυο παρακάτω μηχανισμούς:

- Τη Μη-Ομόλογη ένωση άκρων (Non- Homologous- End- Joining , NHEJ)

Στο μηχανισμό αυτόν, μετά την πρόσδεση της πρωτεΐνης Ku στα άκρα της βλάβης στους κλώνους του DNA , οι DNA πολυμεράσες και νουκλεάσες καθαρίζουν και διαμορφώνουν κατάλληλα τα άκρα έτσι ώστε να ενεργοποιηθεί το σύμπλεγμα XRCC4 / DNA λιγάσης IV και να επιτελεστεί η αποκοπή των δυο μερών. Ο NHEJ λειτουργεί κατά τη διάρκεια όλου του κυτταρικού κύκλου, αλλά κυριαρχεί κατά τις φάσεις G1 και S και είναι επιρρεπής στα λάθη ^[22] .

- Και τον ομόλογο ανασυνδυασμό (Homologous Recombination, HR)

Ο μηχανισμός αυτός προκειμένου να επιτελέσει την επιδιόρθωση βασίζεται στην αλληλουχία της αδελφής χρωματίδας. Δεν υποπίπτει σε σφάλματα κατά την επιδιόρθωση και είναι ενεργός στο τέλος της φάσης S και κατά την G2. Στον ομόλογο ανασυνδυασμό και 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. [22]

Κεφάλαιο 3

ΑΚΤΙΝΟΒΙΟΛΟΓΙΑ

3.1. ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ

Απορροφούμενη δόση ακτινοβολίας (D) : είναι το δοσιμετρικό μέγεθος που εκφράζει το ποσό της μέσης ενέργειας που εναποτίθεται από την ακτινοβολία στη μονάδα μάζας της προσβαλλόμενης ύλης.

Μονάδα απορροφούμενης δόσης είναι το 1 Gy (Gray). Ένα Gy αντιστοιχεί σε απορροφούμενη μέση ενέργεια 1 Joule ανά Kg προσβαλλόμενης ύλης (J/kg).

Για την περιοχή των δόσεων που αφορούν την έκθεση του ανθρώπου σε φυσικές και συνήθεις τεχνητές πηγές (διαγνωστικές εφαρμογές, καταναλωτικά αγαθά κτλ) χρησιμοποιούνται τα υποπολλαπλάσια του Gy, όπως το mGy και το μGy.

Ισοδύναμη δόση (H_t) : είναι το δοσιμετρικό μέγεθος που σχετίζεται με τη βλάβη που μπορεί να προκαλέσει σε έναν ιστό (t) η απορροφούμενη δόση D ενός συγκεκριμένου είδους ακτινοβολίας (R) που δίνεται από τη σχέση :

$$H_t = D \cdot W_R$$

Η μονάδα ισοδύναμης δόσης στο σύστημα SI είναι το Sievert (Sv).

Ενεργός δόση (E_{eff}) : είναι ένα δοσιμετρικό μέγεθος που σχετίζεται με τη συνολική βλάβη που μπορεί να προκαλέσει στην υγεία του ανθρώπου η ισοδύναμη δόση H_t που προκύπτει από την ακτινοβόληση του συγκεκριμένου ιστού (t) και δίνεται από τη σχέση:

$$E_{eff} = H_t \cdot W_t = D \cdot W_R \cdot W_t$$

Εάν κατά την έκθεση ενός ατόμου ακτινοβολήθηκαν περισσότεροι του ενός ιστοί, τότε η ενεργός δόση E_{eff} προκύπτει από το άθροισμα των επιμέρους ενεργών δόσεων των ακτινοβοληθέντων ιστών.

$$E_{eff} = H_t \cdot W_T = \sum D \cdot W_R \cdot W_t$$

Το άθροισμα $\sum W_t$ των συντελεστών στάθμισης για το σύνολο των ανθρωπίνων ιστών ισούται με τη μονάδα. Άρα η ενεργός δόση E_{ef} , αντιστοιχεί αριθμητικά στην ολοσωματική ισοδύναμη δόση H_b , που έπρεπε να δεχθεί το προσβληθέν άτομο ώστε να διατρέξει τον ίδιο κίνδυνο βλάβης της υγείας του με αυτόν που διατρέχει από την τοπική ακτινοβόληση ενός και μόνον ιστού με ισοδύναμη δόση H_t .^[10]

3.2. Στάδια αλληλεπίδρασης ακτινοβολίας με τη βιολογική ύλη

Φυσικό στάδιο : 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, τα φωτόνια περνούν χωρίς να απορροφηθεί μεγάλη ποσότητα ενέργειας από τα βιομόρια.

Φυσικοχημικό στάδιο : Στο στάδιο αυτό τα διεγερμένα και ιοντισμένα άτομα ή μόρια αντιδρούν, σπάνε τους χημικούς δεσμούς και δημιουργούν νέους. Αυτά τα μόρια και άτομα ονομάζονται ελεύθερες ρίζες και είναι ιδιαίτερα ασταθή με το ηλεκτρόνιο της εξώτατης στοιβάδας να είναι ασύζευκτο.

Χημικό στάδιο : Κατά το στάδιο αυτό, οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν μεταξύ τους ή με παρακείμενα μόρια σχηματίζοντας μόρια διαφορετικά από τα φυσιολογικά. Έτσι προκύπτουν βλάβες των βιολογικών μακρομορίων και δραστικές βιολογικές ελεύθερες ρίζες.

Βιολογικό στάδιο (10^{-3} sec- έτη) : Το στάδιο αυτό διακρίνεται στο βιοχημικό, το κυτταρικό και το συστημικό επίπεδο.

Στο βιοχημικό επίπεδο, η προσβολή σημαντικών βιομορίων για το μεταβολισμό των κυττάρων οδηγεί σε φαινόμενα όπως η αναστολή της πρωτεϊνσύνθεσης και μέσω διάφορων ενζύμων ξεκινάει η αναγνώριση και έπειτα η επιδιόρθωση των βλαβών που έχουν παραχθεί. Στο κυτταρικό επίπεδο παρατηρείται αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης και δημιουργία βλαβών στους ιστούς. Οι βλάβες που δεν επιδιορθώνονται οδηγούν σε μεταλλάξεις ή κυτταρικό θάνατο. Οι παραπάνω βλάβες επάγουν σε συστημικό επίπεδο την πρόκληση σημαντικών λειτουργικών βλαβών, ανοσολογικών και ορμονικών αποκρίσεων, καρκινογένεση ακόμα και θάνατο του οργανισμού

3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ

Στοχαστικά αποτελέσματα (*stochastic effects*) είναι εκείνα για τα οποία η πιθανότητα εμφάνισής τους και όχι η σοβαρότητα τους είναι συνάρτηση της δόσης χωρίς την ύπαρξη κατώφλιου. Το πιο σημαντικό στοχαστικό αποτέλεσμα είναι η εμφάνιση καρκίνου, για τον οποίο θεωρείται ότι ο κίνδυνος εμφάνισής του αυξάνει με την αύξηση της δόσης χωρίς κατώφλι.

Μη στοχαστικά αποτελέσματα (*deterministic effects*) είναι εκείνα για τα οποία η σοβαρότητα τους είναι συνάρτηση τη δόσης και για τα οποία επομένως υπάρχει κάποιο κατώφλι. Παραδείγματα τέτοιων αποτελεσμάτων είναι ο καταρράκτης των ματιών και οι βλάβες στα αιμοσφαίρια και στη γονιμοποίηση. Η σοβαρότητα των αποτελεσμάτων αυτών εξαρτάται από το μέγεθος της δόσης αλλά αυτά δεν ανιχνεύονται καθόλου παρά μόνο εάν η δόση υπερβαίνει ένα αρκετά υψηλό κατώφλι.

3.4. Γραμμική Μεταβίβαση Ενέργειας , (Linear Energy Transfer LET)

Όταν η ιοντίζουσα ακτινοβολία διέρχεται μέσω της ύλης, υπάρχει απώλεια ενέργειας μέσω διάφορων αλληλεπιδράσεων κατά το μήκος της διαδρομής του. Για συγκεκριμένο απορροφητή, ο ρυθμός απώλειας ενέργειας εξαρτάται από την ενέργεια και το είδος της ακτινοβολίας καθώς και από την πυκνότητα του υλικού. Η πυκνότητα της εναπόθεσης της ενέργειας σε ένα υλικό , όπως ο βιολογικός ιστός , ονομάζεται Γραμμική Μεταβίβαση Ενέργειας (Linear Energy Transfer, LET) της ακτινοβολίας. Ορίζεται ως η μέση ενέργεια που εναποτίθεται ανά μονάδα μήκους της τροχιάς της ακτινοβολίας και η μονάδα του είναι το keV/μm . Η LET ποικίλλει κατά το μήκος της τροχιάς φορτισμένων σωματιδίων διότι καθώς το φορτισμένο σωματίδιο εναποθέτει ενέργεια στον ιστό, επιβραδύνεται. Ο ρυθμός της μεταφερόμενης ενέργειας (- dE/dx , απώλεια ενέργειας ανά μονάδα μήκους) αυξάνει καθώς αυτό συμβαίνει , έτσι ώστε να υπάρχει μια κορυφή στην εναπόθεση ενέργειας στο τέλος της τροχιάς (κορυφή Bragg). Η LET ουσιαστικά υποδεικνύει την ποιότητα των διαφορετικών ειδών ακτινοβολίας και είναι σημαντική διότι η βιολογική

επίδραση της ακτινοβολίας (η σχετική βιολογική αποτελεσματικότητα της ακτινοβολίας, RBE) εξαρτάται από τη μέση τιμή της LET. Οι ακτινοβολίες κατηγοριοποιούνται σε χαμηλές και υψηλές LET ακτινοβολίες με τις σωματιδιακές ακτινοβολίες συνήθως να είναι υψηλού LET ενώ οι ακτίνες X και γ να είναι χαμηλού LET λόγω των αραιών ιονισμών. Γενικά το RBE μιας ακτινοβολίας αυξάνει με την LET μέχρι μια τιμή περίπου 100keV/μm και πάνω από αυτή την τιμή αρχίζει να φθίνει λόγω της εναπόθεσης ενέργειας παραπάνω από εκείνη που χρειάζεται για να προκαλέσει το βιολογικό αποτέλεσμα. Γεγονότα απώλειας ενέργειας είναι ουσιαστικά τυχαία κατανεμημένα κατά την τροχιά ενός φωτονίου ή φορτισμένου σωματιδίου. Για ακτινοβολίες χαμηλού LET τα γεγονότα εναπόθεσης ενέργειας στην τροχιά του φωτονίου είναι αραιά σε σχέση με τις διαστάσεις των βιομορίων, όπως το DNA με αποτέλεσμα τα φωτόνια να διασχίζουν ένα τέτοιο μόριο χωρίς να χάνουν εναποθέτουν καθόλου ενέργεια. Για τέτοιες ακτινοβολίες το ποσό της ενέργειας που εναποτίθεται σε μια περιοχή της τροχιάς, παρόμοια στις διαστάσεις των βιολογικών μορίων, επίσης ποικίλλουν ευρέως από μερικά eV μέχρι εκατοντάδες eV. Για υψηλού LET ακτινοβολία τα γεγονότα απώλειας ενέργειας είναι πολύ πιο πυκνά και σημαντικό ποσό ενέργειας θα εναποτεθεί κατά μήκος όλων των σημείων της τροχιάς παρομοίων διαστάσεων με τα βιομόρια^[39].

3.5. Επίδραση των Ιοντιζουσών Ακτινοβολιών στους βιολογικούς οργανισμούς

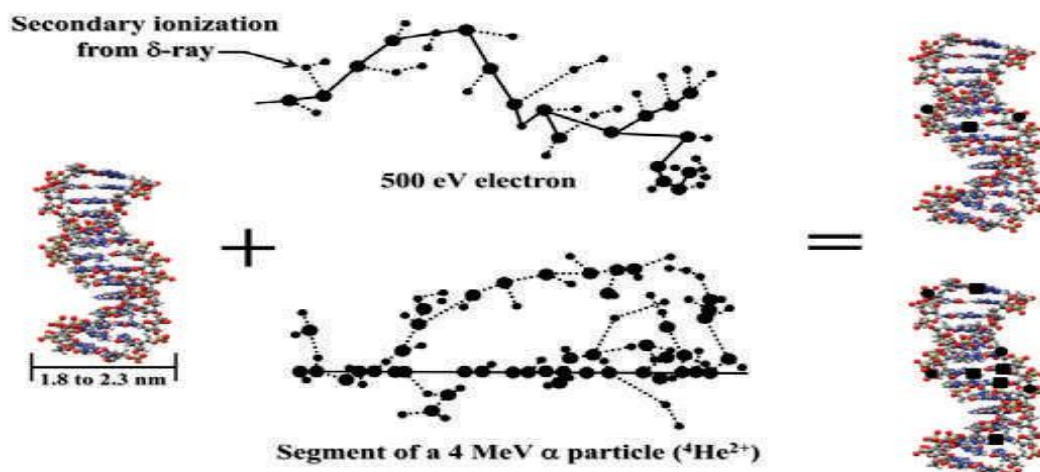
Η αλληλεπίδραση των Ι.Α. με το ανθρώπινο σώμα, που οφείλεται σε εξωτερικές πηγές είτε σε εσωτερική μόλυνση του σώματος από ραδιενεργές ουσίες, οδηγεί σε βιολογικά αποτελέσματα που μπορεί αργότερα να φανούν ως κλινικά συμπτώματα. Η φύση και η σοβαρότητα αυτών των συμπτωμάτων καθώς και η χρονική στιγμή κατά την οποία θα εμφανιστούν εξαρτώνται από την απορροφούμενη ποσότητα της ακτινοβολίας και τον ρυθμό με τον οποίο αυτή λαμβάνεται. Οι βλάβες από ιοντιζουσες ακτινοβολίες μπορούν να διακριθούν σε δυο κατηγορίες: τα σωματικά αποτελέσματα, στα οποία η βλάβη εμφανίζεται στο άτομο που ακτινοβολείται, και τα κληρονομικά αποτελέσματα, τα οποία

εμφανίζονται στους απογόνους του ατόμου που ακτινοβολείται εξ' αιτίας της βλάβης στα γονίδια των αναπαραγωγικών κυττάρων – τους γονάδες.

3.6. Τρόπος δράσης I.A.

Οι DBSs, που είτε δεν έχουν επιδιορθωθεί, είτε έχουν επιδιορθωθεί λάθος, οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο. Παράγονται σε αναλογία με τη δόση με δυο κύριες διαδικασίες:

- A. *Άμεση δράση I.A.* Υπάρχουν DSBs που απορρέουν από μία ενεργειακή εναπόθεση, η οποία ταυτόχρονα παράγει τη βλάβη και στις δυο αλυσίδες DNA και επίσης βλάβες που παράγονται από ένα συσσωμάτωμα «γεγονότων» στο DNA. Ένας άλλος πιθανός μηχανισμός της απευθείας δράσης είναι ότι ένα DSB θα μπορούσε να είναι το αποτέλεσμα δυο ή περισσότερων ενεργειακών εναποθέσεων, και η συσσωρευτική δράση της υποθανάτιας βλάβης θα μπορούσε να οδηγήσει σε τοπικώς πολλαπλές περιοχές βλαβών.



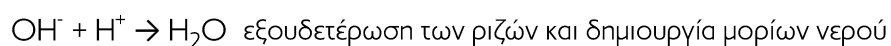
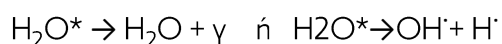
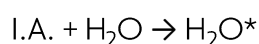
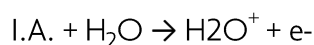
Εικόνα 3.1. Άμεση δράση ακτινοβολίας=> ρήξεις στις αλυσίδες του DNA

- B. *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} s) [38,39]

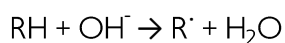
Η αλληλεπίδρασή της I.A. με το νερό δημιουργεί κατιόντα H_2O^+ διεγερμένα μόρια νερού (H_2O^*) καθώς και ελεύθερα ηλεκτρόνια (e^-). Τα κατιόντα H_2O^+ και τα διεγερμένα μόρια νερού αποσυντίθενται και οδηγούν άμεσα (10^{-13} s) στη δημιουργία των ελεύθερων ριζών υδρογόνου (H^\cdot) και υδροξυλίου (OH^\cdot), ενώ τα ελεύθερα ηλεκτρόνια, λόγω της πολικότητάς τους έλκουν τα μόρια του νερού γύρω τους δημιουργώντας τα λεγόμενα ενυδατωμένα ηλεκτρόνια (e_{aq}^-). [10, 38, 39]

Παρακάτω ακολουθούν οι αντιδράσεις της ακτινοβολίας με το νερό :

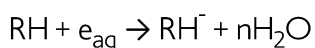
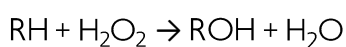
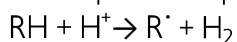


Όλες οι παραπάνω αντιδράσεις συμβαίνουν πολύ γρήγορα (10^{-7} sec) και έχουν σαν αποτέλεσμα τη παραγωγή των παραπάνω χημικά δραστικών μορίων (OH^\cdot , H^\cdot , e_{aq}^- , H_2O_2) που μπορούν να αντιδράσουν με άλλα μόρια προκαλώντας του χημικές μεταβολές.

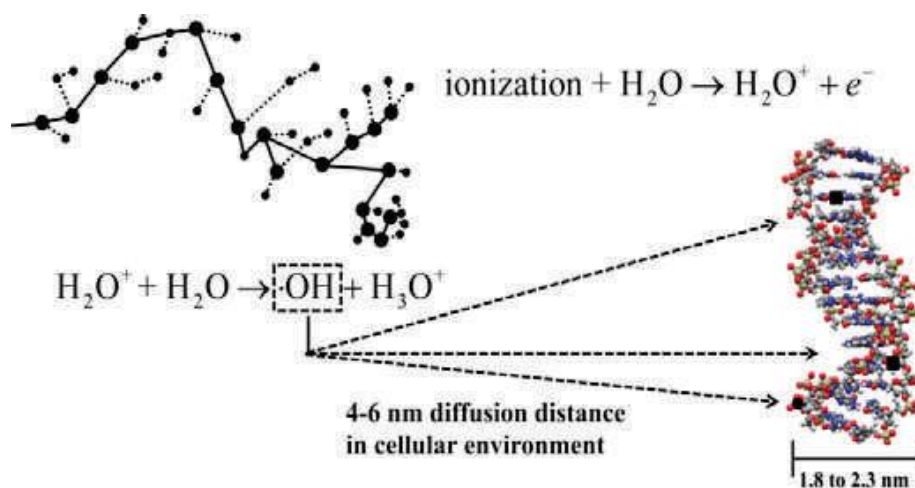
Για παράδειγμα, αν η υδροξυλική ρίζα (OH^\cdot), που είναι ιδιαίτερα δραστική με εμβέλεια μικρότερη από 100 Angstrom, βρεθεί σε απόσταση αλληλεπίδρασης με ένα οργανικό μόριο RH (όπως το DNA) θα προκύψει η εξής αντίδραση :



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.



Εικόνα 3.2. έμμεση δράση I.A. και ραδιόλυση του νερού

Οι DSBs αποτελούν τις πιο σημαντικές βλάβες προκαλώντας χρωμοσωμικές αλλοιώσεις και κυτταρική θνησιμότητα^[40]. Η άμεση δράση εξαρτάται κυρίως από τα φυσικά χαρακτηριστικά της διαδικασίας αλληλεπίδρασης, όπως είναι οι ιδιότητες και η ποιότητα της ακτινοβολίας (LET) και το μέγεθος του στόχου (DNA) που είναι σταθερό για όλα τα ανθρώπινα κύτταρα. Ως εκ τούτου, φαίνεται φυσιολογικό να σκεφτούμε ότι ο αριθμός των DSBs που παράγονται με αυτόν τον τρόπο είναι σταθερός. Από την άλλη πλευρά, έχει προταθεί ότι η πιθανότητα της ρήξης του DNA από οξειδωτικό στρες σε μία δεδομένη περιοχή καθορίζεται κυρίως από την εσωτερική δομή της διπλής έλικας^[44].

Υπάρχουν DSBs τα οποία καταλήγουν από μια επίθεση ελεύθερης ρίζας^[41]. Στοιχεία υποδεικνύουν ότι αυτή η διαδικασία είναι ο κύριος μηχανισμός σχηματισμού των DSBs με χαμηλή LET ακτινοβολία^[42, 43].

Στα θηλαστικά κύτταρα το φαινόμενο ρυθμού-δόσης παρατηρείται ως αλλαγή στο βαθμό της κυτταρικής νέκρωσης όταν η ακτινοβολία δίνεται σε ρυθμούς δόσεων εκτός του εύρους 0.01-1.0 Gy/min .

3.7. ΤΑ ΤΡΙΑ ΒΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΡΑΔΙΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ : μεταφορά, επικοινωνία και συνέπειες

Η ακτινοβόληση ενός βιολογικού συστήματος πυροδοτεί μια σειρά από διαδικασίες, οι οποίες είναι ευρέως διαχωρισμένες στο χρόνο.

Η **Μεταφορά** της ενέργειας αποτελείται από αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ακτινοβολίας και των ατόμων που απαρτίζουν το βιολογικό σύστημα. Αυτό το βήμα χαρακτηρίζεται από ιονισμούς, διεγέρσεις, ρήξεις δεσμών και σχηματισμό ελευθέρων ριζών.

Ως απάντηση στη βλάβη που παράγεται από I. A. , τα κύτταρα ενεργοποιούν μια σειρά βιοχημικών διαδικασιών, την **Επικοινωνία**, η οποία ξεκινά τη σηματοδότηση των βλαβών που επάχθηκαν από γονοτοξικούς παράγοντες. Η απόκριση βλάβης του DNA (**DDR**) είναι ένα πολύ σύνθετο συντονισμένο σύστημα που καθορίζει το κυτταρικό αποτέλεσμα τη βλάβης που προκαλείται από ακτινοβολία. Έτσι αυξάνεται η πιθανότητα επιβίωσης τους διατηρώντας το σύνολο του γονιδιώματος τους και τις αντίστοιχες δραστηριότητες. Αυτό απαιτεί ενεργοποίηση του αμυντικού συστήματος του κυττάρου, το οποίο αποτελείται από δυο μέρη: τους ανιχνευτές των βλαβών και τους ενεργοποιητές της απόκρισης βλάβης^[5].

Ο χρόνος που απαιτείται για να διαπεράσει η ακτινοβολία το κύτταρο είναι $t < 10^{-13}$ sec. Οι αρχικοί ιονισμοί και διεγέρσεις ακολουθούνται από μια σειρά φυσικο-χημικών διαδικασιών, κυρίως ο σχηματισμός των ελεύθερων ριζών. Ο χρόνος ημιζωής μιας ελεύθερης ρίζας είναι 10^{-5} s.

Συνοπτικά, μπορούμε να πούμε ότι το DDR καθορίζει

1. Την ευαισθησία των κυττάρων να πεθάνουν μετά από ακτινοβολία
2. Τον τύπο του κυτταρικού θανάτου
3. Το χρόνο του κυτταρικού θανάτου

Οι **Συνέπειες** για τον οργανισμό συνολικά είναι αποτέλεσμα δύο παραγόντων: α) της πιθανότητας ελέγχου του όγκου και β) της πιθανότητας δημιουργίας σοβαρών επιπλοκών σε υγιείς ιστούς.^[5]

Σε φυσιολογικές συνθήκες, το DNA υπόκειται σε υψηλά επίπεδα βλαβών, ειδικά από ενδογενείς δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS). Ο μέσος βαθμός είναι από 10^4 - 10^6 βλάβες ανά κύτταρο ανά ημέρα. Για κύτταρα εκτεθειμένα σε εξωγενείς γονοτοξικούς παράγοντες, το επίπεδο των ROS αυξάνει και ο αριθμός των βλαβών είναι, όντως, πολύ μεγαλύτερος^[23]. Η αρχική αντίδραση του κυττάρου στη βλάβη του DNA είναι να ενεργοποιήσει επιδιορθωτικές διαδικασίες του DNA για να απομακρύνει τις βλάβες. Οι HRR, NER, BER, MMR και NHEJ είναι οι πέντε κύριοι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί στα ανθρώπινα όντα, που ο καθένας ειδικεύεται σε συγκεκριμένους τύπους βλάβης. Όταν οι βλάβες υπερνικούν τις επιδιορθωτικές ικανότητες, μερικές βλάβες παραμένουν. Οι βλάβες που δεν επιδιορθώνονται μπορεί να αλλοιώσουν τις βάσεις του DNA, όπως στην περίπτωση που οι βλάβες επιδιορθώνονται ανακριβώς. Για να αποφευχθούν τέτοια λάθη οι επιδιορθωτικές πρωτεΐνες του DNA ανιχνεύουν υψηλά επίπεδα βλαβών DNA και επάγουν αναστολή της αύξησης (π.χ. ενεργοποιώντας την p53) για να παρατείνουν την επιδιόρθωση. Εάν αυτό αποτύχει, επάγουν την απόπτωση (παραδείγματος χάριν, μέσω της δράσης της p53 αυξάνεται η Bax ή και μέσω των διαδρομών ανεξάρτητων της p53).

Ο θάνατος των κυττάρων μετά από μικρές δόσεις ακτινοβολίας απαιτεί χρόνο και μπορεί να υποβληθούν σε μερικές μιτωτικές διαιρέσεις πριν πεθάνουν.

3.8. ΑΠΟΚΡΙΣΕΙΣ ΒΛΑΒΩΝ ΣΕ ΣΥΣΤΗΜΙΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ

3.8.1. Μη - Στοχευμένες Επιδράσεις (ΜΣΕ) της Ιοντίζουσας Ακτινοβολίας

Μια σειρά από έρευνες , κυρίως τις τελευταίες δυο δεκαετίες , ήρθαν να κλονίσουν το κυρίαρχο δόγμα της ακτινοβιολογίας, πως η Ι.Α προκαλεί δυσμενείς βλάβες μόνο στα στοχευμένα κύτταρα του ακτινοβολημένου όγκου.

Οι Μη- Στοχευμένες Επιδράσεις (Non-Targeted Effects, NTEs) της Ι.Α. είναι φαινόμενα που εκδηλώνονται σε μη-ακτινοβολημένα κύτταρα , τα οποία έλαβαν ένα σήμα (ή σήματα) από ακτινοβολημένο κύτταρο. Τα Μη-Στοχευμένα Αποτελέσματα περιλαμβάνουν μια πληθώρα από κυτταρικές αποκρίσεις που σχετίζονται, συνήθως, με έκθεση σε ακτινοβολία και ακόμη ένα πλήθος άλλων φαινοτυπικών αποκρίσεων. Οι αποκρίσεις σε γονοτοξικό στρες σε ένα βιολογικό σύστημα είναι ποικίλες και τα NTEs δεν παρατηρούνται σε όλα τα πειραματικά μοντέλα συστημάτων. Ο βαθμός της απόκρισης εξαρτάται από το χρόνο της ανάλυσης, τη δόση ακτινοβολήσης, το ρυθμό δόσης και την ποιότητα της ακτινοβολίας.

3.8.1.1. Ακτινοεπαγόμενα Παρακείμενα Αποτελέσματα (Radiation Induced Bystander Effects, RIBE)

Τα Παρακείμενα Αποτελέσματα (ΠΑ) ανήκουν στις Μη-Στοχευμένα Αποτελέσματα σε μια περιοχή συνήθως κοντινή αλλά έξω από την άμεσα ακτινοβολημένη περιοχή. Το άρθρο των Nagasawa και Little ήταν το πρώτο που παρείχε επίσημα στοιχεία για τα παρακείμενα αποτελέσματα *in vitro* , όπου το 1% της καλλιέργειας κυττάρων ακτινοβολήθηκε με σωματίδια-α και ένα εκπληκτικό ποσοστό της τάξης του 30% των κυττάρων έδειξε μια αύξηση στην ανταλλαγή των αδερφών χρωματίδων. Μερικά χρόνια αργότερα, οι Mothersill και Seymour εφάρμοσαν μεθόδους μεταφοράς μέσου καλλιέργειας παρέχοντας στοιχεία ότι ένας διαλυτός παράγοντας εκκρίνεται μέσα στο μέσο και

ευθύνεται για τα ΠΑ. Λίγο αργότερα αναγνωρίστηκε ότι οι χασμοσυνδέσεις (gap junctions) μπορούσαν να μεταδώσουν διακυτταρική επικοινωνία για να μεταβιβάσουν ένα bystander σήμα μεταξύ ενός ακτινοβολημένου κυττάρου και ενός μη-στοχευμένου παρακείμενου κυττάρου. Από τότε, έχουν πραγματοποιηθεί μια πληθώρα πειραμάτων κυταρικών καλλιιεργειών εξερευνώντας πολλές πτυχές των ΜΣΑ σε μια ποικιλία συνθηκών για το κύτταρο προκειμένου να διευρυνθεί η γνώση πάνω σε αυτή την έρευνα. Μερικές από αυτές τις συνθήκες που ερευνώνται περιλαμβάνουν διαφορετικές ενέργειες, ποιότητα δόσης, την LET , τον τύπο του κυττάρου, το είδος , τη δόση, τα πεδία ακτινοβολήσης , διάρκεια της διαδικασίας, μονοκυτταρικά, πολυκυτταρικά και in vivo μοντέλα. Μια ενδιαφέρουσα πτυχή των RIBEs είναι ότι έχουν χαμηλό κατώφλι δόσης (<1 Gy) και μετά είναι ανεξάρτητα της δόσης και ως εκ τούτου δεν ακολουθούν το πρότυπο LNT (Linear No Threshold) .

Ερευνες των τελευταίων χρόνων υποστηρίζουν ότι τα φαινόμενα «παρατηρητή» , ή RIBE , επάγουν και/ή τροποποιούν αποκρίσεις σε ένα μη-ακτινοβολημένο κύτταρο ως απόκριση σε σήμα (ή σήματα) από ακτινοβολημένα κύτταρα ^[7]. Αυτά τα μη-ακτινοβολημένα, bystander, κύτταρα μπορεί να έχουν υπάρξει στο ίδιο φυσικό περιβάλλον με τα ακτινοβολημένα κύτταρα χρησιμοποιώντας έκθεση σε μικροδέσμη ^[49, 50] ή να έχουν καλλιεργηθεί σε μέσο που έχει μεταφερθεί από κυτταρικές καλλιέργειες που έχουν , προηγουμένως, ακτινοβοληθεί. Τα RIBE έχουν παρατηρηθεί και σε in vitro συστήματα κυττάρων και σε in vivo πρότυπα συστημάτων και αποτελούν αντικείμενο μελέτης. [5]

Στα bystander φαινόμενα μπορεί να θεωρηθεί ότι ανήκουν και η ακτινοεπαγόμενη Γονιδιακή Αστάθεια (Radiation Induced Genomic Instability, RIGI) ^[51]. Τα φαινόμενα που συμβαίνουν στους απογόνους γενιών ενός ακτινοβολημένου κυττάρου μετά την ακτινοβολήση του γονικού κυττάρου. Οι απόγονοι προέρχονται κλωνικά από ένα ακτινοβολημένο κύτταρο, καθώς οι ίδιοι δεν έχουν ακτινοβοληθεί.

3.8.1.2. Απόκριση Απομακρυσμένου Ιστού (Abscopal Effects)

Η απόκριση απομακρυσμένου ιστού ή abscopal φαινόμενα είναι τα Μη-Στοχευμένα φαινόμενα μακράς εμβέλειας, που συμβαίνουν σε απόσταση από την περιοχή ακτινοβολήσης ή άλλο τοπικό στρες σε έναν οργανισμό, σε μη-ακτινοβολημένους ιστούς ή όργανα^[54]. Τα abscopal φαινόμενα είναι ιδιαίτερος σημαντικά για την ανθρώπινη υγεία και έχει προταθεί ότι μεταδίδονται από την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος και τις κυτοκίνες^[55]. Υπάρχουν καταγεγραμμένα παραδείγματα όπου η ακτινοθεραπεία έχει οδηγήσει σε παλινδρόμηση ενός όγκου εκτός της ζώνης ακτινοβολήσης, όπως στην περίπτωση όπου ακτινοθεραπεία του μεταστατικού καρκίνου στα οστά οδήγησε σε παλινδρόμηση ενός ηπατοκαρκινώματος^[2].

Όμως, αυξημένα επίπεδα δευτερευουσών κακοηθειών έχουν συσχετιστεί με την Απόκριση Απομακρυσμένου Ιστού που επάγεται από ακτινοβολία. Επιδημιολογική μελέτη διερεύνησε τη σχέση των δευτερευουσών κακοηθειών σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη κατά τη διάρκεια των 10 χρόνων μετά την ακτινοθεραπεία και ανακάλυψαν ότι αυτοί οι ασθενείς έχουν μια ανιχνεύσιμη αύξηση στις δευτερεύουσες κακοήθειες σε απομακρυσμένα σημεία από την περιοχή ακτινοβολήσης^[56]. Σε μερικές περιπτώσεις αυτές οι κακοήθειες μπορούν να αποδοθούν σε άλλους παράγοντες, όπως η ύπαρξη από πριν μικρομεταστάσεων ή εσωτερικής ακτινοευαισθησίας.

Πρώιμες ζωικές μελέτες έδειξαν ότι το πλάσμα από ακτινοβολημένα ζώα περιείχε ιδιαίτερα βλαβερούς παράγοντες για τη δομή και τη γονιδιακή σταθερότητα, καθώς η έκθεση των μη-ακτινοβολημένων σε τέτοιου είδους πλάσματος οδήγησε σε αύξηση των χρωμοσωμικών αλλοιώσεων^[57]. Ακολούθησαν και άλλες μελέτες πάνω σε ζώα, όπως αυτή των Camphausen κ.α. που ήλεγξαν την αύξηση του κύριου όγκου και τη μετάσταση στους πνεύμονες ποντικών που έπασχαν από το πνευμονικό καρκίνωμα Lewis (Lewis Lung Carcinoma, LLC)^[58]. Η μερική ακτινοβολήση του πνεύμονα οδήγησε σε βλάβη DNA σε απομακρυσμένες περιοχές που δεν είχαν ακτινοβοληθεί. Το φαινόμενο αυτό ανεστάλη από αντιοξειδωτικά μέσα υποδεικνύοντας ότι οι κύριοι υπαίτιοι ήταν οι ROS και το Νιτρικό οξύ^[59]. Μια άλλη μελέτη που έκανε χρήση ενός προτύπου για αρουραίους

έδειξε ότι τα επίπεδα των κυτοκινών και των μακροφάγων στις μη – ακτινοβολημένες περιοχές του πνεύμονα ήταν παραπλήσια με εκείνα των ακτινοβολημένων περιοχών^[60].

Τα abscopal φαινόμενα σχετίζονται γενικά με κλινική έκθεση σε I. A. σε καταστάσεις ακτινοθεραπείας. Κατά την ακτινοθεραπεία ο όγκος λαμβάνει μια πολύ μεγάλη δόση ακτινοβολίας, π.χ. 60-70 Gy, ενώ ο φυσιολογικός ιστός στο πεδίο της δέσμης λαμβάνει πολύ μικρότερη, σημαντική όμως, δόση, π.χ. 4-6 Gy. Ολόκληρο το σώμα εκτίθεται σε μια συγκριτικά χαμηλή δόση ακτινοβολίας μέσω διαφυγής από την κεφαλή της θεραπευτικής μονάδας, σκεδαζόμενη στους κατευθυντήρες δέσμης και το φίλτρο εξομάλυνσης καταλήγει σε προσπίπτουσα σκέδαση εντός της αίθουσας και σκεδάζεται από την απευθείας ακτινοβολημένη περιοχή του ασθενή π.χ. εσωτερική σκέδαση. Έτσι, επειδή όλο το σώμα λαμβάνει ορισμένη δόση, οποιοδήποτε «εκτός πεδίου» abscopal φαινόμενο πρέπει να θεωρηθεί ως «φαινόμενο χαμηλής δόσης ακτινοβολίας»^[5]. Τα φαινόμενα αυτά μας ενδιαφέρουν γιατί το οξειδωτικό στρες που επάγεται από όγκους- και/ή θεραπεία- , η επακόλουθη αστάθεια του γονιδιώματος και η δευτερεύουσα καρκινογένεση θα μπορούσε επίσης να συνεισφέρει σε μεταγενέστερους καρκίνους^[2].

3.8.1.3. Προσαρμοστική απόκριση στην I. A. (Adaptive response)

Η προσαρμοστική απόκριση αφορά τη γενική κατάσταση , όπου μία πρώτη έκθεση σε έναν παράγοντα «προστατεύει» από μια μελλοντική έκθεση, η οποία διαφορετικά θα ήταν πιο δυσμενής. Πρώιμα παραδείγματα της προσαρμοστικής απόκρισης από ακτινοβολία περιέγραφαν κύτταρα που είχαν εκτεθεί σε χαμηλά επίπεδα ακτινοβολίας και ακολούθως όταν εκτέθηκαν σε υψηλότερες δόσεις έγιναν λιγότερο επιρρεπή σε χρωμοσωμικές αλλαγές , στο σχηματισμό μικροπυρήνων και σε κακοήγη μετασχηματισμό^[52]. Η απόκριση αυτή έχει παρατηρηθεί μόνο σε χαμηλές δόσεις ακτινοβολίας (< 0.5 Gy) και επηρεάζει το ρυθμό μετάλλαξης και επιβίωσης^[53] καθώς και την κινητική και τα επίπεδα σχηματισμού των εστιών γ-H2AX σε κυτταρικές καλλιέργειες. Προστατευτικές και

ωφέλιμες επιδράσεις της ακτινοβολίας με χαμηλή δόση έχουν αναφερθεί σε ζωικές μελέτες. Οι Matsumoto κ.α. έχουν προτείνει ένα μοντέλο για την ακτινοπροσαρμοστική απόκριση, όπου το νιτρικό οξείδιο (NO) φαίνεται να είναι μόριο κλειδί που συνδέει τις bystander και προσαρμοστικές αποκρίσεις που μπορεί να περιλαμβάνει ενεργοποίηση της p53, μέσω μιας συγκεκριμένης φωσφορυλίωσης που επάγεται από το NO^[53]. Ακόμα, έχει υποστηριχθεί ότι βλάβες DNA επαγόμενες από χαμηλή δόση ευαισθητοποιεί τα κύτταρα να ενισχύσουν την επιδιόρθωση των επικείμενων βλαβών DNA.

Τα NTEs περιλαμβάνουν τα RIBE και τα RIGI, τα abscopal φαινόμενα και την προσαρμοστική απόκριση και αντανakλούν ένα πλήθος «τελικών σημείων» που περιλαμβάνουν -αλλά δεν περιορίζονται σε- αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση και κυτταρικό θάνατο. Κατά γενική ομολογία φαίνεται να υπάρχει μια ισχυρή σύνδεση μεταξύ των εκδηλώσεων των NTEs και αυτό έχει στηριχθεί πειραματικά. Τα RIGI μπορούν να χαρακτηριστούν υπό τον τίτλο RIBE. Διάφορες έρευνες τις τελευταίες δεκαετίες επικεντρώθηκαν στη μελέτη των NTEs και φαίνεται έντονα να είναι φαινόμενα χαμηλής δόσης ακτινοβολίας, αν και αυτό είναι αμφιλεγόμενο ακόμα^[5]. Σε υψηλές δόσεις τα φαινόμενα που παρατηρούνται, πιθανώς, θα επηρεαστούν σημαντικά από άμεση βλάβη στα κύτταρα. Καθώς μειώνεται η δόση, η εναπόθεση ενέργειας θα είναι ετερογενής σε τοπική κλίμακα του κυττάρου ή ιστού και δεν έχουν όλα τα κύτταρα άμεση αλληλεπίδραση και τα NTEs συμμετέχουν, πιθανώς, στην απόκριση που παρατηρείται. Αυτή είναι η περίπτωση, ειδικά, για εκθέσεις σε χαμηλή ακτινοβολία^[61].

3.8.2. Μηχανισμοί Επαγωγής των Μη-Στοχευμένων Αποτελεσμάτων ακτινοβολίας.

Φαίνεται να υπάρχουν διάφοροι κύριοι ανεξάρτητοι μηχανισμοί που εμπλέκονται στα Μη-Στοχευμένα αποτελέσματα της ακτινοβολίας:

1. Η άμεση κυτταρική επικοινωνία μεταξύ ακτινοβολημένων και μη ακτινοβολημένων κυττάρων, μέσω των χασμοσυνδέσεων (gap junctions)
2. οι παράγοντες που εκκρίνονται από τα ακτινοβολημένα κύτταρα στο περιβάλλον, οι οποίοι μπορούν να επηρεάσουν άμεσα πιο απομακρυσμένα κύτταρα και
3. οι αποκρίσεις του ανοσοποιητικού, περιλαμβάνοντας παράγοντες που εκκρίνονται από ενεργοποιημένα μακροφάγα ^[2]. Η σαφής και περιεκτική αναγνώριση των παραγόντων που συμμετέχουν στα ΜΣΑ είναι ένα εντατικό συνεχές πεδίο έρευνας που προωθείται από πρόσφατες εξελίξεις στην αναγνώριση μερικών μορίων που παίζουν ξεκάθαρα ρόλο στις ΜΣΕ^[2].

3.8.2.1 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Είναι ευρέως γνωστό ότι οι δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου, συμμετέχουν με ιδιαίτερο τρόπο σε πολλές φυσιολογικές κυτταρικές διαδικασίες, όπως η απόπτωση, η κυτταρική αύξηση και σηματοδότηση, η ανοσοαπόκριση και η φλεγμονή. Αυτές οι ελεύθερες ρίζες παράγονται είτε λόγω εξωγενών παραγόντων, όπως η ιοντίζουσα ή μη-ιοντίζουσα ακτινοβολία, τα φάρμακα και τα μέταλλα ή λόγω ενδογενών υποπροϊόντων του κυτταρικού μεταβολισμού, της απόκρισης του ανοσοποιητικού και της φλεγμονής ^[62] προκειμένου να διατηρήσει τη συγκέντρωση των ROS και RNS σε χαμηλά με μέτρια, ωφέλιμα, επίπεδα, τα κύτταρα έχουν αναπτύξει αμυντικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Αυτοί περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων, μη ενζυματικά δραστικά φαγοκύτταρα και αντιοξειδωτικά ένζυμα, με μερικά από αυτά να ρυθμίζονται από τον πυρηνικό παράγοντα –τύπου 2 (Nrf2) ^[63]. Τα κύτταρα για να αντιμετωπίσουν περαιτέρω τις βλαβερές συνέπειες του στρες που μεταδίδεται από ROS/RNS χρησιμοποιούν τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA. Αν αυτό το αμυντικό δίκτυο έχει καταστραφεί ή υπολειτουργεί, τότε υψηλά επίπεδα των ROS οδηγούν σε οξειδωτικό στρες. Αυτό έχει επιζήμιες συνέπειες στην φυσιολογική κυτταρική λειτουργία, καθώς οι δραστικές μορφές αντιδρούν με βασικά βιομόρια όπως το DNA, πρωτεΐνες και λιπίδια ^[64]. Αν το DNA που

έχει υποστεί βλάβη δεν επιδιορθωθεί κατάλληλα μπορεί να καταλήξει σε μακροπρόθεσμα γονοτοξικά αποτελέσματα^[65].

Χρόνια έκθεση σε οξειδωτικό στρες μπορεί να οδηγήσει σε αλλοιώσεις του γονιδιώματος λόγω της συγκέντρωσης των βλαβών DNA που έχουν επαχθεί οξειδωτικά προωθώντας την μεταλλαξογένεση και παθογένεια στον άνθρωπο^[66]. Οι οξειδωτικές βλάβες είναι συνήθως είναι AP (αβασικές) περιοχές, SSBs, τροποποιήσεις στα σάκχαρα ή απαμινώσεις^[67]. Η πιο συνηθισμένη οξειδωμένη βλάβη DNA είναι η 8-οξο-2'-δεοξυγουανοσίνη (8-οξο-dG), η οποία χρησιμοποιείται ως αξιόπιστος δείκτης για την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες σε διάφορα βιολογικά συστήματα, μαζί με 5,6-διυδροξυ-5,6-διυδροθυμίνη. Όταν 2 ή παραπάνω οξειδωτικές βλάβες συμβούν εντός 10 ζευγών βάσεων, θεωρούνται οξειδωτικές ομαδοποιημένες βλάβες DNA (OCDLs)^[68].

Το οξειδωτικό στρες και οι επακόλουθες οξειδωτικές βλάβες DNA σε RIBE κύτταρα επάγονται από διάφορους διαδότες στρες. Αυτά παράγονται από τα ακτινοβολημένα κύτταρα και μεταφέρονται στα μη-ακτινοβολημένα bystander κύτταρα είτε μέσω της συνεισφοράς των χασμοσυνδέσεων, δεδομένου ότι υπάρχει φυσική επαφή μεταξύ των κυττάρων, είτε του μέσου καλλιέργειας στο οποίο απελευθερώνονται. Επιπλέον, μεταδότες στρες μεταφέρονται από bystander κύτταρα μέσω σηματοδοτικών μηχανισμών του στρες οι οποίοι ενεργοποιούνται ενδοκυτταρικά, καταλήγοντας σε συνεχή τροφοδότηση δραστικών ριζών^[69].

ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ (ROS)

Υπάρχει πλήθος στοιχείων ότι οι ROS συνεισφέρουν στο RIBE και εξωκυτταρικά και ενδοκυτταρικά μέσω μιας συνεχούς ακολουθίας γεγονότων. Οι ROS παράγονται απευθείας από τα ακτινοβολημένα κύτταρα ως ραδιολυτικά προϊόντα ή έμμεσα μέσω φλεγμονώδους διαδικασίας και περνάνε σε γειτονικά bystander κύτταρα μέσω παθητικής διάχυσης, χασμοσυνδέσεων ή ενεργής μεταφοράς. Αν και οι περισσότερες δραστικές

μορφές οξυγόνου έχουν μικρό χρόνο ημιζωής και προκαλούν τοπικές βλάβες, το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) έχει σχετικά μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής. Μπορεί ακόμα να μεταφέρεται ελεύθερα μέσω των πλασματικών μεμβρανών και διανύουν μεγάλες αποστάσεις προκαλώντας βλάβες DNA σε μακρινές περιοχές^[70]. Ακόμη, οι ρίζες υδροξυλίου και σε ένα μικρότερο βαθμό το μοριακό οξυγόνο μπορούν να αντιδράσουν με το DNA, όπως και με τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια καταλήγοντας σε τροποποίηση της λειτουργίας τους. Η παρουσία της οξειδάσης NAD(P)H που είναι προσδεσμένη στην κυτταρική μεμβράνη παίζει σημαντικό ρόλο για την αυξημένη παραγωγή ενδοκυτταρικών ROS σε άμεσα ακτινοβολημένα κύτταρα, καθώς και για την επίμονη παραγωγή ROS στα παρακείμενα κύτταρα. Από την άλλη, στα κύτταρα παρατηρητές, το ένζυμο COX2 ρυθμίζει την παραγωγή των προσταγλανδινών-E2, μέσω της ενεργοποίησης των αντίστοιχων υποδοχέων κυτοκίνης, και δημιουργεί μαζική παραγωγή ROS^[71]. Οι παραγόμενες ρίζες εκλύονται στο εξωκυτταρικό περιβάλλον αλληλεπιδρώντας με γειτονικά κύτταρα διαδίδοντας το bystander φαινόμενο.

ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΑΖΩΤΟΥ

Ο ρόλος των RNS και συγκεκριμένα αυτός του νιτρικού οξειδίου (NO) στην μετάδοση του bystander φαινομένου έχει μελετηθεί εκτενώς. Το NO είναι ένα μικρό, λιπόφιλο μόριο, ικανό να διαχέεται ελεύθερα μέσα στα κύτταρα. Όπως και οι ROS, εκλύεται από ακτινοβολημένα κύτταρα και μεταδίδεται στα μη-ακτινοβολημένα παρακείμενα κύτταρα. Ειδικότερα, πειράματα έδειξαν ότι το NO προκάλεσε την αύξηση των p53 και hsp72 σε μη-ακτινοβολημένα κύτταρα γλοιοβλαστώματος (wild type), ως απόκριση στο οξειδωτικό στρες, μετά είτε την καλλιέργεια τους μαζί με ακτινοβολημένα μεταλλαγμένα p53 κύτταρα είτε την έκθεση τους σε μέσο καλλιέργειας αυτών. Αυτό το γεγονός υποδεικνύει ότι το NO μεταδίδεται από ακτινοβολημένα σε παρακείμενα κύτταρα χωρίς άμεση κυτταρική επαφή, όπως οι gap junctions, και επίσης δρα σαν εκκινητής / διαδότης του bystander φαινομένου^[72]. Η p53 όμως είναι γνωστό ότι επάγει την παραγωγή γονιδίων των ROS, τα οποία ρυθμίζουν την επαγωγή της απόπτωσης και την απόκριση βλάβης στο DNA

(DDR) ^[73]. Αντιθέτως, η παραγωγή του NO μπορεί να επαχθεί στα παρακείμενα κύτταρα από την αυξημένη έκφραση των γονιδίων iNOS και COX-2. Ακόμη, η αυξημένη παραγωγή του NO μπορεί να οδηγήσει σε σημειακές μεταλλάξεις προκαλώντας αμίνωση των βάσεων του DNA.

Τα υψηλά ενδοκυτταρικά επίπεδα NO και ROS , οδηγούν σε ελαττωματική μιτοχονδριακή λειτουργία λόγω της διαρροής των μιτοχονδριακών μεμβρανών, επιτρέποντας την έκλυση ανιόντων υπεροξειδίου στο κυτταρόπλασμα και αυξάνοντας το οξειδωτικό στρες στα παρακείμενα κύτταρα. ^[74]

Μιτοχόνδρια και συμβολή στο οξειδωτικό στρες

Υπάρχει πληθώρα ενδείξεων που καταδεικνύουν τα μιτοχόνδρια των παρακείμενων κυττάρων ως εξαιρετικής σημασίας οργανίδια που έχουν άμεση αλληλεπίδραση με τις ελεύθερες ρίζες και τον κρίσιμο ρόλο τους στη σηματοδότηση των μη-στοχευμένων κυττάρων ^[69]. Τα μιτοχόνδρια αποτελούν ιδιαίτερα σημαντική λειτουργική κυτταρική μονάδα καθώς μέσω της κατανάλωσης O₂ 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 ^[38,75]. Αυξημένα επίπεδα RNS και ROS προκαλούν μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) και διακοπή 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 οξύ) ή καταλύονται (superoxide dismutase – SOD) σε H_2O_2 ^[38]. 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. 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)^[76] που καθορίζουν την παραγωγή ROS, όπως και σε άλλα που αφορούν σε ζωτικές μιτοχονδριακές λειτουργίες (όπως της mtDNA πολυμεράσης γ). Οι παραπάνω αλλαγές οδηγούν σε ανεξέλεγκτη ενδοκυτταρική παραγωγή ROS, εντείνοντας το στρες και τη δυσλειτουργία του κυττάρου^[69]. 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^[38].

3.8.2.2 Κυτοκίνες

Η συμμετοχή του οξειδωτικού στρες στην επαγωγή των παρακείμενων αποτελεσμάτων λόγω I. A. μπορεί να ενισχυθεί περαιτέρω από τις κυτοκίνες. Οι κυτοκίνες είναι διαλυτά πολυπεπίδια που παίζουν σημαντικό ρόλο στη σηματοδότηση του κυττάρου κατά τη φλεγμονή, δημιουργώντας μια σύνδεση μεταξύ των μη-στοχευμένων αποκρίσεων και των φλεγμονωδών μηχανισμών. Συγκεκριμένα, οι κυτοκίνες, όπως οι TNF-α, η IL-1β και η IL-33 απελευθερώνονται από ακτινοβολημένα κύτταρα. Μετά την πρόσδεση τους στα

παρακείμενα κύτταρα μέσω των υποδοχέων των μεμβρανών τους, επάγουν την τοπική παραγωγή των ROS και NO μέσω της άμεσης ενεργοποίησης του παράγοντα μεταγραφής NF-κβ. Ο παράγοντας αυτός ευθύνεται για την έκφραση των γονιδίων iNOS και COX-2 [74]. Επιπλέον έχει αποδειχτεί ότι ο TNF-α μπορεί να ενεργοποιήσει μηχανισμούς της ενεργοποιημένης μιτογόνου πρωτεΐνη κινάσης (Mitogen - activated protein kinase, MAPK) και την p38, η οποία μέσω της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα της πρωτεΐνης-1 (AP-1) ρυθμίζει, επίσης, την έκφραση των γονιδίων COX-2 και iNOS [77]. Επιπρόσθετα η πρόσδεση της IL-6 στην επιφάνεια των bystander κυττάρων, ενεργοποιεί την JAK2- κινάση που μεταδίδει σήματα και ενεργοποιεί το μηχανισμό μεταγραφής STAT3. Με τη σειρά της η ενεργοποίηση του STAT3 οδηγεί σε μια επιμικυμένη διατήρηση του ενεργοποιημένου NF-κβ στον πυρήνα, ελέγχοντας μεταξύ άλλων την έκφραση του COX-2 και τελικά τα επίπεδα των ROS στα παρακείμενα κύτταρα [78,79]. Ακόμη, ο μετασχηματιστικός αυξητικός παράγοντας (Transforming growth factor, TGF-β1), που εκκρίνεται από τα ακτινοβολημένα κύτταρα, συνεισφέρει στην ενεργοποίηση του NAD(P)H καταλήγοντας έτσι στην ενδοκυτταρική αύξηση των ROS. Ο TGF-β1, όπως και η IL-8 μπορούν επίσης να ενεργοποιήσουν το μηχανισμό MAPK καταλήγοντας στην παραγωγή ελεύθερων ριζών στα bystander κύτταρα [74,80]. Από την άλλη πλευρά, αυτό το «φλεγμονώδες» περιβάλλον, στο οποίο εκτίθενται τα παρακείμενα κύτταρα, μπορούν επίσης να οδηγήσουν στην ενεργοποίηση της wt p53 ως απόκριση στη βλάβη DNA λόγω του οξειδωτικού στρες στα παρακείμενα κύτταρα και κατά συνέπεια στην αύξηση των προσφύσεων του μορίου ICAM-1 ανεξάρτητα από τον NF-κβ. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε περαιτέρω επιστράτευση μονοκύτταρων, όπως τα ενεργοποιημένα μακροφάγα, τα οποία συμμετέχουν στην επίμονη αύξηση του οξειδωτικού στρες. Επιπρόσθετα, τέτοιο φλεγμονώδες περιβάλλον μπορεί επίσης να οδηγήσει στην γήρανση τα παρακείμενα κύτταρα [81] που μεταδίδεται από το DDR. Είναι πιθανό η απόκριση με γήρανση να λειτουργεί ως αντιδραστικός μηχανισμός για να αποτρέψει οποιαδήποτε τοξική επίδραση στα παρακείμενα κύτταρα, όπως κακοήθεις μετασχηματισμοί [81, 82].

Καθώς οι ROS και οι κυτοκίνες και/ή τα ενεργοποιημένα μακροφάγα λειτουργούν ως μιτογόνα σήματα, μια πιθανή επίδραση από τέτοια διέγερση είναι η επαγωγή του

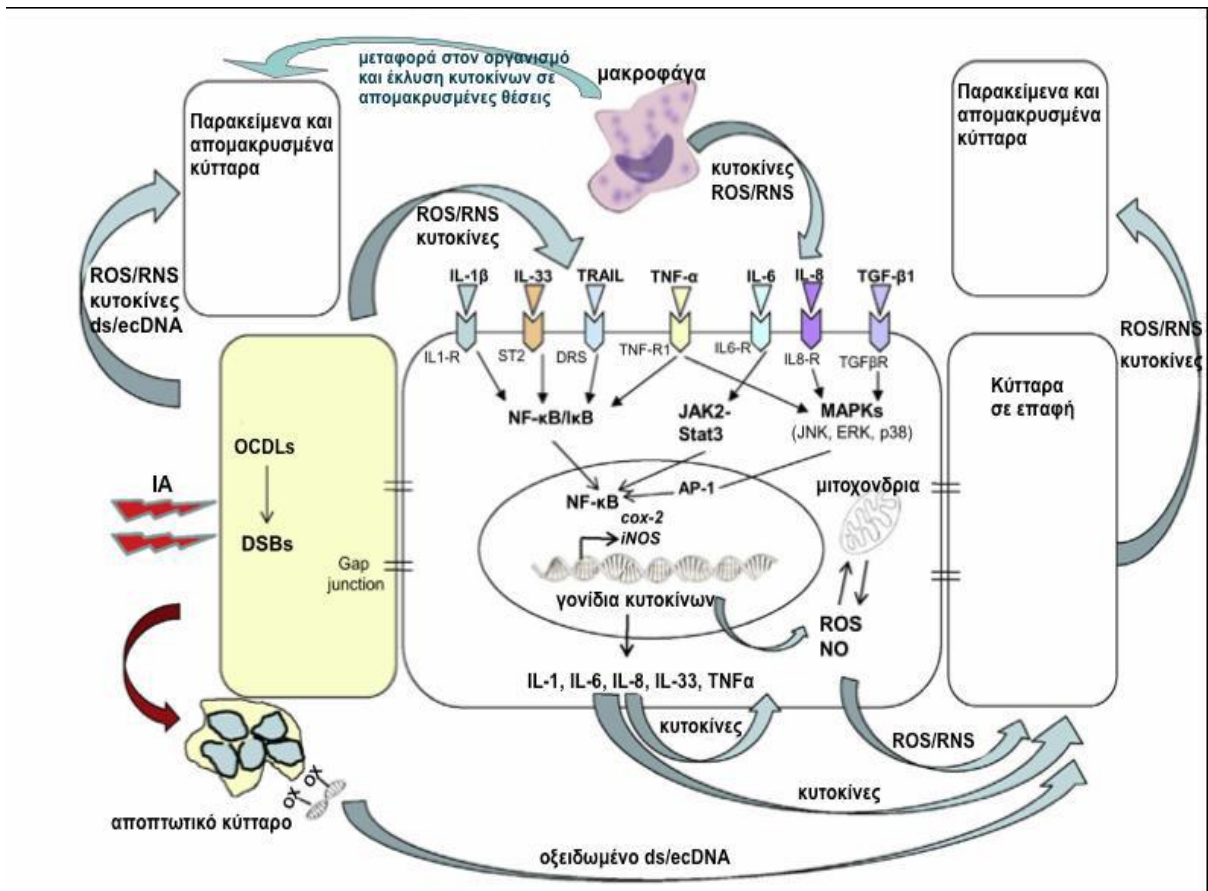
αντιγραφικού μηχανισμού. Έχει δείξει ότι η υπερέκφραση του Cdc6 (cell division cycle 6), ένας από τους αντιγραφικούς παράγοντες, οδηγεί σε αντιγραφικό στρες, τροφοδοτώντας την αστάθεια του γονιδιώματος και τον κακοήγη μετασχηματισμό. Ακόμα, οι Cdc6 μπορούν να δράσουν ως μεταγραφικοί καταστολείς των ογκοκατασταλτικών γονιδίων p16, ARF, CDH1^[74].

3.8.2.3.Οξειδωμένο εξωκυτταρικό DNA

Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι το οξειδωμένο εξωκυτταρικό DNA (extracellular DNA, ecDNA) που απελευθερώνεται από ακτινοβολημένα κύτταρα που πεθαίνουν, δρα επίσης ως ευρύ σήμα στρες, το οποίο συνεισφέρει στην ανάπτυξη των RIBEs. Τα κύτταρα αυτά υφιστάμενα σοβαρές οξειδωτικές βλάβες και DSBs εκκινούν την αποπτωτική διαδικασία και εκλύουν πυρηνικό DNA που έχει υποστεί εκτεταμένες αλλοιώσεις^[83]. Εκείνο, στην συνέχεια, 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^[84]. Οι αλλαγές που το μετατρέπουν σε σήμα κινδύνου (Damage-associated molecular Pattern, DAMP) 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 από τον υποδοχέα TLR9. 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^[85]. Σε άλλο πείραμα, τόσο η ακτινοβολία όσο και η έκθεση σε οξειδωμένο ecDNA ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων οδήγησε σε έντονη έκφραση της οξειδάσης NOX4 που εμπλέκεται στην παραγωγή ROS^[83].

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.



Εικόνα 3.3. Ενδοκυτταρικές και διακυτταρικές αποκρίσεις μετά από έκθεση σε ακτινοβολία. Παρουσιάζονται οι κύριοι μηχανισμοί επαγωγής των συστημικών φαινομένων μέσω της έκκρισης ROS/RNS, κυτοκινών, μακροφάγων και η εμπλοκή του ecDNA.

3.8.2.4. ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ

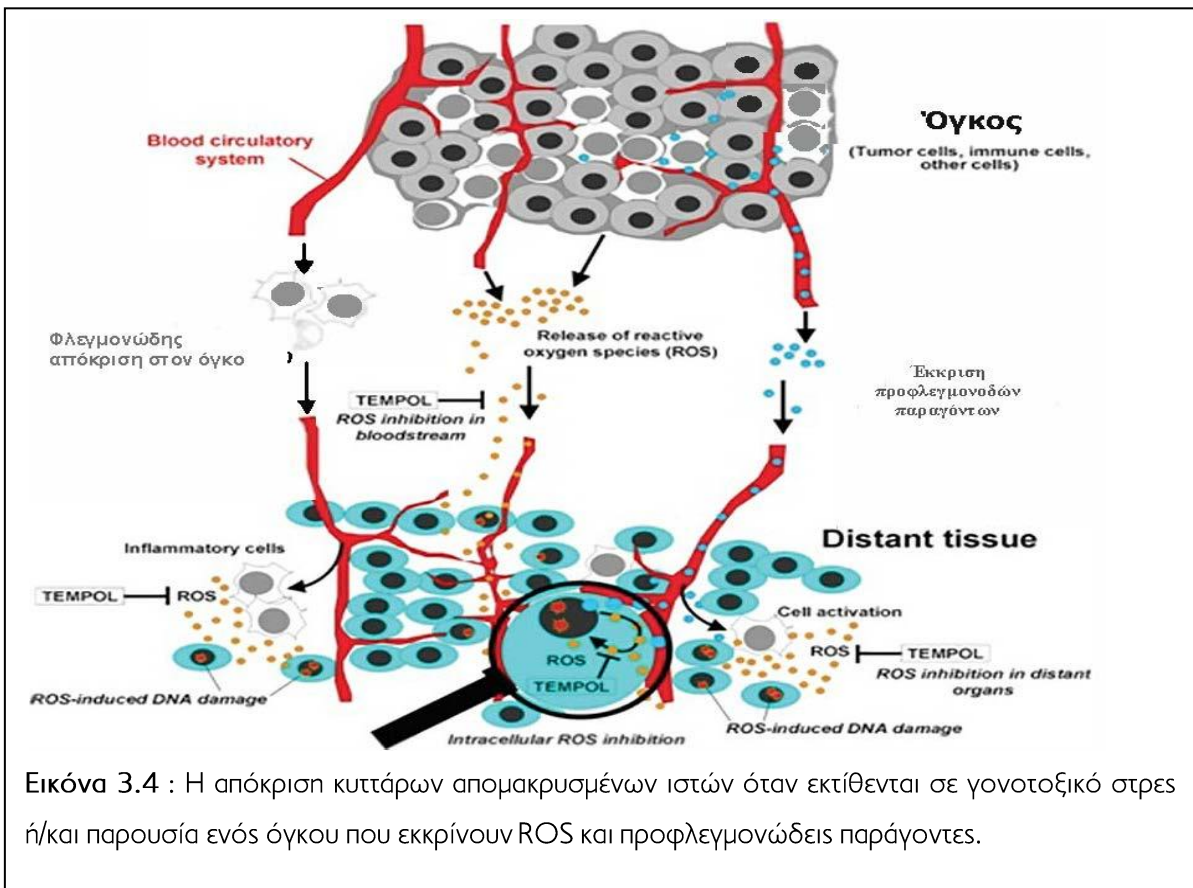
Μια πτυχή της φλεγμονής, συμπεριλαμβανομένου φλεγμονωδών αποκρίσεων που συμβαίνουν μετά την ακτινοβολήση, είναι ότι τα μακροφάγα ενεργοποιούνται και εκκρίνουν κυτοκίνες που προκαλούν NTEs.^[86,87] Αυτά τα φαινόμενα έχουν προταθεί να είναι το αποτέλεσμα της φαγοκυττάρωσης από τα μακροφάγα των ακτινοεπαγόμενων αποπτωτικών κυττάρων^[88]. Τα μακροφάγα που καταναλώνουν νεκρικά κύτταρα όγκων μπορούν να συμπεριφερθούν με παρόμοιο τρόπο. Ο παράγοντας TNF-α εκκρίνεται από μακροφάγα και μπορούν να παράγουν ΜΣΑ, όπως βλάβες DNA^[89,90]. Οι Lorrimore κ.α.

βρήκαν ότι τα νιτρικά οξειδία (NO) και οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) είναι σημαντικά αφού οι αναστολείς αυτών των ελεύθερων ριζών οδήγησαν σε λιγότερες μη-κλωνικές παραγόμενες αλλοιώσεις. Αργότερα, η ίδια ομάδα αναγνώρισε ότι στα ευρήματά τους εμπλεκόταν το COX2^[91]. Τα αποτελέσματα ταίριαζαν με τα in vitro δεδομένα που έχει προτείνει η ομάδα του Hei, με το COX2 να έχει ένα κεντρικό ρόλο στα ΜΣΑ. Έρευνες που έχουν διεξαχθεί στο εργαστήριο του Wright έχουν αναγνωρίσει χρωμοσωμική αστάθεια στα Μη-Στοχευμένα αιμοποιητικά κύτταρα, όταν εκτίθενται σε μέσο από ακτινοβολημένα μακροφάγα^[87]. Επιπλέον, έδειξαν ότι μετά την in vivo ακτινοβολήση, ο αποπτωτικός καθαρισμός παρήγαγε μακροφαγική δραστηριότητα και φλεγμονώδεις αποκρίσεις. Επίσης, συμπέραναν ότι ο ακτινοβολημένος μυελός των οστών μπορεί να παραγάγει μια συνεχόμενη αποπτωτική απόκριση παρέχοντας μια ερμηνεία για την επίμονη φλεγμονή και επακόλουθη βλάβη DNA σε Μη-Στοχευμένους ιστούς, απομακρυσμένους από την ακτινοβολημένη περιοχή. [2]

Οι Rastogi κ.α. έχουν δείξει ότι in vivo NTEs μεταδίδονται από μακρόχρονα φλεγμονώδη σήματα που περιλαμβάνουν μια σύνθετη «συμπλοκή» μεταξύ των μακροφάγων^[92]. Είναι, επίσης, πιθανό απελευθερωμένες κυτοκίνες να ταξιδεύουν από ακτινοβολημένες περιοχές ή περιοχές που περιέχουν όγκους, σε μακρινές περιοχές του σώματος. Παρ' όλα αυτά, είναι επίσης πιθανό για κύτταρα που εκφράζουν κυτοκίνες, όπως τα μακροφάγα που έχουν εγκλωπώσει αποπτωτικά κύτταρα (είτε ως αποτέλεσμα ακτινοβολήσης είτε όγκου) ^[93] να μετακινούνται από αυτή την περιοχή σε μια απομακρυσμένη περιοχή του σώματος και μετά να απελευθερώνουν παράγοντες που μπορούν να επάγουν βλάβες DNA. Η μετακίνηση των παραγόντων που βλάπτουν το DNA μέσω μακροφάγων θα έδιναν μια σημαντικά αυξημένη συγκέντρωση σημάτων, συγκριτικά με τις κυκλοφορικές κυτοκίνες από απομακρυσμένες περιοχές αλλά θα ήταν επίσης συγκεκριμένες σε περιοχές όπου τα μακροφάγα είναι πιθανό να ταξιδέψουν (π.χ. στομάχι, σπλήνα, δέρμα, λεμφαδένες, περιοχές άλλων μολύνσεων). Ένας άλλος τρόπος να επαχθούν οξειδωτικές βλάβες σε Μη-Στοχευμένους ιστούς είναι οι κυτοκίνες που παράγονται από ανοσοκύτταρα στο σημείο ακτινοβολήσης να μετακινθούν και να ενεργοποιήσουν τοπικά μακροφάγα που βρίσκονται στους απομακρυσμένους ιστούς. Επαγόμενα μακροφάγα (M1) παράγουν προ-

φλεγμονώδη μόρια όπως οι COX2, NOS, IL-6, TNFα, υπεροξείδια, ROS και NO^[94]. Έκλυση αυτών των μορίων σε απομακρυσμένες περιοχές θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε οξειδωτικές βλάβες DNA στα κύτταρα για να παράξουν το παρατηρούμενο abscondal φαινόμενο μετά την ακτινοβόληση ή λόγω της παρουσίας ενός απομακρυσμένου όγκου^[2].

Ακόμα, βρέθηκε ότι τα ROS είναι κρίσιμα για τη διαφοροποίηση των μακροφάγων στα εναλλακτικά M2 ενεργοποιημένα μακροφάγα, που ο φαινότυπος είναι παρόμοιος με ογκο-σχετιζόμενα μακροφάγα (TAMs), τα οποία προωθούν την ογκογένεση που προκύπτει από την ανοσοκατασταλτική λειτουργία τους^[95].



Εικόνα 3.4 : Η απόκριση κυττάρων απομακρυσμένων ιστών όταν εκτίθενται σε γονοτοξικό στρες ή/και παρουσία ενός όγκου που εκκρίνουν ROS και προφλεγμονώδεις παράγοντες.

Για να συνοψίσουμε τους μηχανισμούς με τους οποίους επάγονται οι βλάβες σε απομακρυσμένους ιστούς και τη συμμετοχή του οξειδωτικού στρες μπορούμε να πούμε

ότι η κύρια υπόθεση είναι ότι και τα Στοχευμένα και τα Μη-Στοχευμένα Φαινόμενα οδηγούν στην ενεργοποίηση των φλεγμονωδών κυτοκινών. Σύμφωνα και με τη μελέτη των Schaefer κ.α. , υποτίθεται ότι αυτές οι κυτοκίνες διεγείρουν το εγγενές ανοσοποιητικό σύστημα εντός του οργάνου/οργανισμού π.χ. πυροδοτούν μια απόκριση στρες, και με τον καιρό διαρρηγνύουν την ομοιόσταση του ιστού και ακόμα και προκαλούν μια πληθώρα κατερχόμενων φαινομένων, μερικά από τα οποία μπορούν να καταλήξουν σε επιζήμια αποτελέσματα στην υγεία. Για παράδειγμα, η επαγόμενη έκλυση κυτοκινών λόγω ακτινοβολίας , μπορεί να είναι αποτέλεσμα της άμεσης δράσης της ακτινοβολίας ή το αποτέλεσμα διαδοχικών δραστικών μορφών οξυγόνου που επάγονται σε στοχευμένα ή μη-στοχευμένα κύτταρα. Κυτταρικοί πληθυσμοί που εκδηλώνουν γονιδιακή αστάθεια που έχει επαχθεί από ακτινοβολία δείχνουν επίμονα υψηλά επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). Η επίμονη αύξηση στα ROS που παρατηρούνται σε ασταθείς κλώνους εμφανίζεται εν μέρει για να μεταδοθούν από δυσλειτουργικά μιτοχόνδρια. Ομοίως, τα δυσλειτουργικά μιτοχόνδρια έχουν εμπλακεί και στα παρακείμενα αποτελέσματα ή RIBEs. [5]

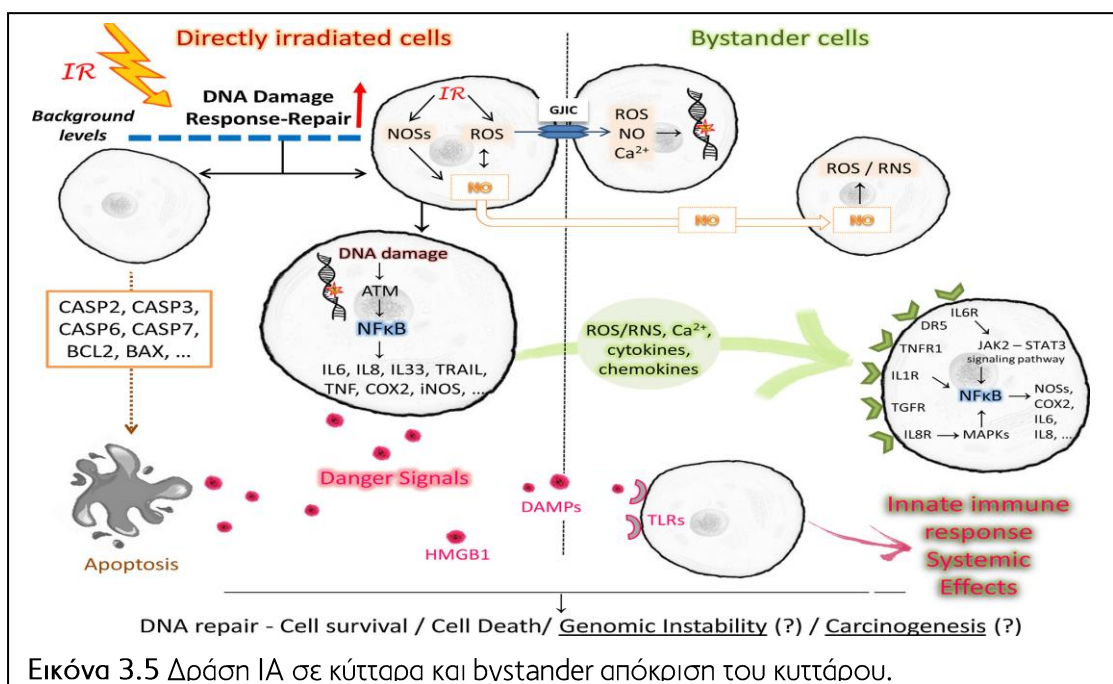
Πιθανοί Μηχανισμοί των RIBEs - μια απόκριση σε στρες;

Ένα ενοποιητικό μοντέλο έχει προταθεί από τον Hei κ.α. που σκιαγραφεί σε γενικές γραμμές τους πιθανούς σηματοδοτικούς μηχανισμούς που μπορεί να εμπλέκονται στη δημιουργία των NTEs. Μετά την ακτινοβολία, πολλαπλές σηματοδοτικές ακολουθίες εκκινούν τις σηματοδοτικές διαδικασίες που είναι απαραίτητες για να μεταδώσουν τη μη-στοχευμένη απόκριση. Αυτό το μοντέλο υποστηρίζει ότι η σύνδεση των κυτοκινών/χημοκινών και των αυξητικών παραγόντων μεταδίδει την απόκριση. Γενικά, οι κυτοκίνες και οι αυξητικοί παράγοντες προκαλούν ένα μεγάλο εύρος αποτελεσμάτων σε συγκεκριμένους ιστούς [5]. Μπορούν να επηρεάσουν το μικρο-περιβάλλον στην περιοχή του κυττάρου ή ιστού που έχει βλάβη επηρεάζοντας το στρώμα, την επιθηλιακή κυτταρική σύνθεση και τη διέγερση των αυξητικών παραγόντων. Οι κυτοκίνες διεγείρουν το εγγενές ανοσοποιητικό σύστημα εντός του οργάνου/οργανισμού π.χ. πυροδοτούν μια απόκριση στρες, και με τον καιρό διαρρηγνύουν την ομοιόσταση του ιστού και μπορούν να καταλήξουν σε επιζήμια αποτελέσματα στην υγεία. Για παράδειγμα, η επαγόμενη έκκριση

κυτοκινών λόγω ακτινοβολίας, μπορεί να είναι αποτέλεσμα της άμεσης δράσης της ακτινοβολίας ή το αποτέλεσμα διαδοχικών δραστικών μορφών οξειγόνου που επάγονται σε στοχευμένα ή μη-στοχευμένα κύτταρα. Μπορούν να αυξήσουν την γονιδιακή έκφραση και να καταλήξουν στην παρατηρούμενη βιολογική απόκριση. Αυτοί οι σηματοδοτικοί μηχανισμοί της απόκρισης σε στρες μπορούν να εκκινήσουν στην κυτταρική μεμβράνη με την ραγδαία ενεργοποίηση των υποδοχέων των κυτοκινών και των αυξητικών παραγόντων.

Εχει σκιαγραφηθεί ένα πλήθος ενδοκυτταρικών μετατροπέων και σηματοδοτικών μηχανισμών, αλλά ο μετασχηματιστικός αυξητικός παράγοντας β (TGFβ), όπως είδαμε και παραπάνω, διαφαίνεται να είναι εξαιρετικά σημαντικός μετά την έκθεση σε ακτινοβολία. Η σηματοδότηση TGFβ ενεργοποιείται μετά την ακτινοβόληση και σχεδιάζει ένα πολύπλοκο δίκτυο κυτταρικών αποκρίσεων. Ο TGFβ δρα μέσω αυτοκρινών, παρακρινών και ενδοκρινών μηχανισμών και ανάλογα με το κυτταρικό μικροπεριβάλλον μπορεί να προκαλέσει και ογκοπροωθητικά και ογκοκατασταλτικά αποτελέσματα.

Η φλεγμονή είναι ένα σημαντικό κομβικό σημείο της ενεργοποίησης της σηματοδότησης της απόκρισης σε στρες. Μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία δραστικών ελεύθερων ριζών και η ανάδραση μπορεί να πραγματοποιηθεί όταν η ακτινοβολία ενεργοποιεί ROS/RNS οδηγώντας σε μηχανισμούς που ενεργοποιούν περαιτέρω τα ROS/RNS. Αυτός ο θετικός βρόχος ανάδρασης πιθανώς στοχεύει τα μιτοχόνδρια και άλλες μεμβρανικές δομές για να συνεχίσουν την επαγωγή των δραστικών ελεύθερων μορφών.



Εικόνα 3.5 Δράση ΙΑ σε κύτταρα και bystander απόκριση του κυττάρου.

3.9. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΤΗΣ ΒΛΑΒΗΣ

Τα Radiation Induced Bystander Effects είναι ένα παράδειγμα από τα φαινόμενα, όπου οι παράγοντες που απελευθερώνονται από ακτινοβολημένα κύτταρα μπορούν να ενεργοποιήσουν διαδρομές-μηχανισμούς σε υγιή bystander κύτταρα οδηγώντας στην επαγωγή βλαβών DNA, αυξημένη γονιδιακή αστάθεια και μειωμένη βιωσιμότητα. Η μετάδοση του σήματος από ακτινοβολημένα σε bystander κύτταρα in vitro μπορεί να συμβεί και μέσω κυτταρικού μέσου και μέσω επαγωγής κενού και θυμίζει την φλεγμονώδη απόκριση που μεταδίδεται από τις COX-2 σχετιζόμενες διαδρομές, περιλαμβάνοντας τις κυτοκίνες, αυξητικούς παράγοντες και μεμβρανο-διαπερατές δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS). Επιπρόσθετα με κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβες από ακτινοβολία, πρόσφατες έρευνες αναφέρουν ότι γενετικά ασταθή, γηρασμένα και καρκινικά κύτταρα μπορούν επίσης να επηρεάσουν δυσμενώς τα γειτονικά τους κύτταρα, ^[1] υποδεικνύοντας ότι τα RIBE είναι ένα συγκεκριμένο γεγονός ενός πολύ πιο γενικού φαινομένου ενδοκυτταρικής επικοινωνίας από κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβη ή παρουσιάζουν ανωμαλία σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα. Καθώς αυτά τα bystander φαινόμενα έχουν καταγραφεί επαρκώς in vitro, με τα in vivo ομόλογα τους, αναφορές και μελέτες επεκτάσεων των πιο γενικών αυτών φαινομένων in vivo δεν αφθονούν.

Εξαιρετικής σημασίας αποτελεί και η εκτίμηση της επαγωγής βλάβης DNA, της επιδιόρθωσης και των συνεπειών αυτών των βλαβών. Η μέτρηση των εν λόγω βλαβών απαιτεί μεθόδους οι οποίες να είναι ανεξάρτητες των βιολογικών αποκρίσεων σε τέτοιες βλάβες.

Για να κατανοήσουμε τις συνέπειες της έκθεσης σε ιονίζουσα ακτινοβολία οφείλουμε να πραγματοποιήσουμε απαραίτητα τρεις τύπους μετρήσεων:

- A. μέτρηση της αρχικής βλάβης που επάγεται από την έκθεση σε ακτινοβολία.
- B. καθορισμό των ρυθμών και των διαδρομών επιδιόρθωσης

- C. αναγνώριση και μέτρηση των επιπέδων των βλαβών που παραμένουν μετά την κυτταρική διαδικασία

Ακριβής μέτρηση της επαγωγής και της επεξεργασίας των βλαβών απαιτεί η βλάβη να εκτιμηθεί αμέσως μετά την έκθεση (πριν από οποιαδήποτε βιολογική ή βιοχημική διαδικασία), κατά τη διάρκεια και μετά την κυτταρική διαδικασία.

Κεφάλαιο 4

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Πειραματικός σκοπός : Η ανίχνευση, η αναγνώριση και η ποσοτικοποίηση των βλαβών DNA και η επεξεργασία τους στα κύτταρα είναι ουσιαστική για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων των γονοτοξικών παραγόντων, όπως η ακτινοβολία, σε ζωντανούς οργανισμούς. Έχει αναπτυχθεί μια προσέγγιση για τη μέτρηση των επιπέδων βλαβών DNA –συμπεριλαμβανομένων και αυτών που σχηματίζονται από ακτινοβολία-, η οποία μπορεί να ποσοτικοποιήσει αλλοιώσεις DNA μέχρι και μερικών ανά Gbp, δεν απαιτεί ραδιενεργή σήμανση ή χρήση ραδιενέργειας στην ανάλυση.

3.1 Μέθοδος για την ποσοτικοποίηση των βλαβών DNA

Βλάβες που επηρεάζουν μόνο μια αλυσίδα μπορούν να μετρηθούν από χημική ή ενζυματική υδρόλυση του DNA και επακόλουθη αναγνώριση από τις χαρακτηριστικές φασματικές, χρωματογραφικές, φασματοφωτομετρικές μάζας ή άλλες ιδιότητες τους. Η υδρόλυση του DNA, ή ακόμα και ο διαχωρισμός των αλυσίδων, διαλύει τη γεωμετρία των ομαδοποιημένων βλαβών εμποδίζοντας τη μέτρηση τους από τις παραπάνω, συμβατικές, μεθόδους.

Ετσι μια διαφορετική προσέγγιση απαιτείται, η οποία να αντανakλά τη γεωμετρία του συσσωματώματος, να αναγνωρίζει συγκεκριμένες ομάδες βλαβών και να επιτρέπει άμεση ποσοτικοποίηση των συσσωματωμάτων.

Μια ιδανική λύση σε αυτό το πρόβλημα θα ήταν η ύπαρξη διαχωριστικών παραγόντων συγκεκριμένων για κάθε είδος συσσωματώματος, το οποίο θα παρήγαγε μια τομή και στις δυο αλυσίδες στις περιοχές των διαδοχικών βλαβών, παράγοντας μία εκ νέου DSB στην περιοχή του προηγούμενου συσσωματώματος.

Κυτταρικά ένζυμα τα οποία χωρίζουν DNA βλάβες παρέχουν μέσα αναγνώρισης και μέτρησης βλαβών, π.χ. η E. Coli Nfo πρωτεΐνη (που ανήκει στην ομάδα Ενδονουκλεάση IV) διαχωρίζει το DNA σε περιοχές απώλειας βάσεων (αβασικές περιοχές). Αλλά το εύρος υποστρώματος τέτοιων ενζύμων είναι γενικά μεγάλο, επεκτείνεται σε ολόκληρες ομάδες βλαβών (π.χ. οξειδωμένες πυριμιδίνες ή πουρίνες). Εφόσον, ανάλογα ένζυμα από διαφορετικά είδη μπορεί να έχουν ένα πιο περιορισμένο εύρος υποστρώματος, αυτές οι διαφορές μπορεί να εκμεταλλευθούν για να διαχωρίσουμε περαιτέρω τα είδη συσσωματωμάτων.

Πρέπει, όμως, να λαμβάνονται υπ' όψιν δυο διαχωρισμοί:

- i. Η δραστηριότητα αυτών των ενζύμων μπορεί να διαφέρει, σε μερικές περιπτώσεις, όταν η εξεταζόμενη βλάβη βρίσκεται ως μοναδική αλλοιωμένη

περιοχή σε ένα ολιγονουκλεοτίδιο παρά στο μέσο πολλών αλλοιωμένων περιοχών ακτινοβολημένου DNA.

- ii. Οι ενδονουκλεάσες και οι γλυκοσουλάσες/λιγάσες μπορεί να «κόβουν» ελλιπώς σε συγκεκριμένα συσσωματώματα, ειδικά σε εκείνα που οι διαδοχικές βλάβες είναι πολύ κοντά μεταξύ τους (υψηλής πυκνότητας συσσωματώματα) ή σε εκείνα συγκεκριμένης σύστασης και διαμόρφωσης.

Όμως οι ενδονουκλεάσες και οι γλυκοσουλάσες/λιγάσες παρέχουν χρήσιμα μέσα αναγνώρισης και μέτρησης ευρέων ομάδων συσσωματωμάτων.

Τέτοιοι διαχωρισμοί φαίνονται εύκολα στο DNA. Τα κύτταρα ακτινοβολούνται με I.A. ή διατηρούνται μη-ακτινοβολημένα, ως control. Τα δείγματα DNA είναι απομονωμένα και κάθε δείγμα χωρίζεται σε δυο: ένα μέρος έλαβε ένζυμο και το άλλο επώαστηκε χωρίς.

Το μη-ακτινοβολημένο DNA περιέχει λίγες βλάβες και παραμένει μεγάλο. Ο διαχωρισμός του DNA, σύμφωνα με το μέγεθος, σε ουδέτερο τζελ αгарόζης δείχνει ότι το μη-ακτινοβολημένο DNA παραμένει μεγάλο είτε λαμβάνει ένζυμο, είτε όχι.

Η ακτινοβολία επάγει και μεμονωμένες βλάβες (SSBs, οξειδωμένες βάσεις, αβασικές περιοχές) και ομαδοποιημένες βλάβες (π.χ. DSBs και οξυβασικά συσσωματώματα). Η ακτινοβολία παράγει μικρότερα τμήματα DNA, τα οποία καταλήγουν σε ακέραια ακτινοεπαγόμενα DSBs. Η επώαση του ακτινοβολημένου DNA με γλυκοσουλάση, όχι μόνο απελευθερώνει τις οξειδωμένες βάσεις αλλά επίσης παράγει μια ρήξη αλυσίδας στις περιοχές βλαβών παράγοντας ένα εκ νέου DSB (προσθετικά σε αυτά που παράγονται απευθείας από ακτινοβολία, μειώνοντας έτσι το μόριο του DNA περαιτέρω. Η χαρακτηριστική επιπρόσθετη μείωση του μεγέθους του DSB του DNA κατά την επώαση, με ένα εξειδικευμένο διαχωριστικό παράγοντα βλάβης είναι γνώρισμα των ομαδοποιημένων βλαβών DNA.^[4]

4.2. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια μέθοδος διαχωρισμού φορτισμένων ουσιών, βιομορίων και κυρίως πρωτεϊνών και DNA. Κατά την ηλεκτροφόρηση, ηλεκτρικά φορτισμένα μακρομόρια μεταναστεύουν προς τον έναν ή τον άλλον πόλο του ηλεκτρικού πεδίου. Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται ευρύτατα για το διαχωρισμό, απομόνωση και ανάλυση των πρωτεϊνικών μειγμάτων και ιδιαίτερα σε κλινικές αιματολογικές εξετάσεις. Είναι μια κλασική μέθοδος ανάλυσης τόσο στην βιοϊατρική έρευνα αλλά και στην καθημερινή κλινική πράξη.

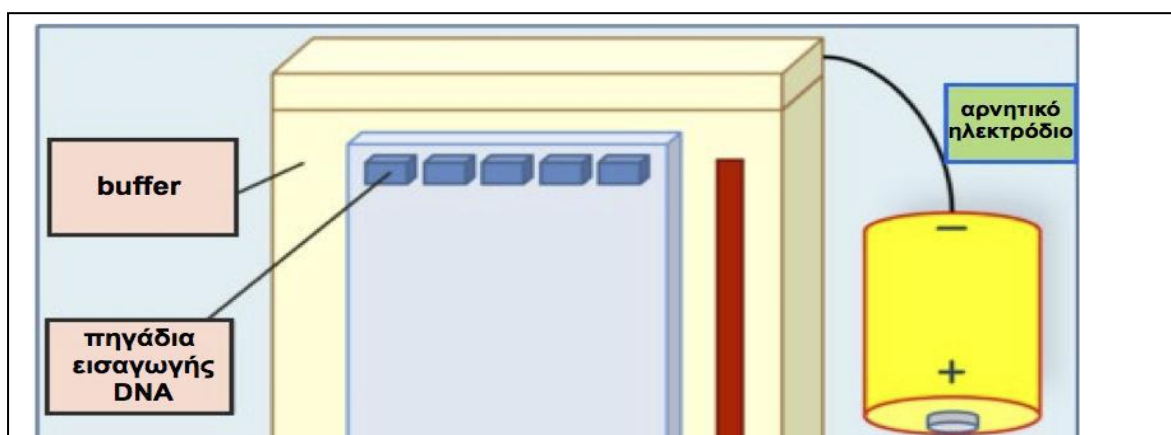
Το δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ σε διάλυμα παρουσιάζεται ιονισμένο λόγω των ομάδων COO^- και για αυτό μετακινείται. Αυτή η ηλεκτρική συμπεριφορά εξαρτάται βέβαια από τη χημική τους σύσταση αλλά και το pH του διαλύματος.

Ο ηλεκτροστατικός διαχωρισμός γίνεται σε ηλεκτροφόρηση κυρίως για δυο λόγους:

- I. Η ηλεκτροφόρηση καταστέλλει τα ρεύματα που δημιουργούνται από μικρές βαθμιδώσεις της θερμοκρασίας, το οποίο είναι απαραίτητη προϋπόθεση για σωστό διαχωρισμό
- II. Η ηλεκτροφόρηση λειτουργεί ως μοριακός φίλτρο (φίλτρο) καθιστώντας έτσι ευκολότερους τους διαχωρισμούς των μορίων. Τα μόρια που είναι μικρά σε σχέση με τους πόρους της ηλεκτροφόρησης μετακινούνται εύκολα διαμέσου της ηλεκτροφόρησης, ενώ τα μεγάλα μόρια μένουν σχεδόν αμετακίνητα. Μόρια ενδιαμέσου μεγέθους μετακινούνται μέσα από την ηλεκτροφόρηση σε διάφορες ταχύτητες. [6].

Η ποσοτική ηλεκτροφόρηση τζελ ηλεκτροφόρησης απαιτεί ένα πήκτωμα που όχι μόνο θα παρέχει ένα ομοιόμορφο μέσο για το διαχωρισμό του DNA σύμφωνα με το μοριακό βάρος, αλλά αξιοποιείται και ως οπτικό στοιχείο, από το οποίο θα καθοριστεί η ποσότητα του DNA.

Οι λειτουργίες της ηλεκτροφόρησης πρέπει να επιλεγθούν έτσι ώστε να διασπείρουν τα ενδιαφερόμενα μόρια του DNA. Επιπλέον το DNA πρέπει να μεταναστεύει ως μονοτονική συνάρτηση του μήκους.



4.3. ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΣΟΥ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΒΑΡΟΥΣ (Number Average Length Analysis)

Αν έχουμε ένα πληθυσμό N_U δίκλωνων μορίων DNA στα οποία το i -οστό μόριο L_i ζεύγη βάσεων, μπορούμε να περιγράψουμε το μέσο μήκος των μορίων στον πληθυσμό από την παρακάτω έκφραση

$$L_U = \frac{\sum_{i=1}^N L_i}{N_U} \quad (1)$$

Το δείγμα επωάζεται με ένζυμο και εμφανίζει M δίκλωνες θραύσεις αλυσίδας στα αρχικά N_U μόρια του πληθυσμού. Αυτές οι θραύσεις μπορεί να έχουν κατανομηθεί τυχαία, να έχουν παραχθεί σε συγκεκριμένες περιοχές στα μόρια ή να έχουν πολλές άλλες κατανομές. Τα DSBs που παράγονται από I.A. μπορούν να θεωρηθούν, περίπου, ως τυχαίες κατανομές. Οι ρήξεις των αλυσίδων που παράγονται από περιοριστικές ενδονουκλεάσες βρίσκονται σε συγκεκριμένες περιοχές/ αλληλουχίες του DNA. Για οποιαδήποτε κατανομή, κάθε ρήξη της αλυσίδας καταλήγει στη δημιουργία δύο (μικρότερων) μορίων για κάθε

γονικό μόριο. Έτσι, ο αριθμός, N_T , των μορίων στον πληθυσμό που έχει επωαστεί με το ένζυμο, περιέχει $N_U + M$ μόρια και το μέσο μήκος των μορίων στον πληθυσμό δίνεται από την παρακάτω σχέση:

$$L_T = \frac{\sum_{i=1}^{N_U+M} L_i}{N_U+M} \quad (2)$$

Η επαγωγή των θραύσεων αλυσίδας αυξάνει τον αριθμό των μορίων, αλλά ο αριθμός των ζευγών βάσεων δεν αλλάζει. Συνεπώς το άθροισμα στον αριθμητή της παραπάνω εξίσωσης είναι ίσος με την αντίστοιχη έκφραση της εξίσωσης (1).

Και τα δυο μπορούν να αντικατασταθούν από το N_{bp} , με τον αριθμό των ζευγών βάσεων στον πληθυσμό.

Με αναδιάταξη της εξίσωσης $N_T = N_U + M$, λαμβάνουμε $M = N_T - N_U$.

Διαιρούμενο με την ποσότητα N_{bp} , δίνει το μέγεθος Φ , τη συχνότητα των θραύσεων όπως φαίνεται στην παρακάτω εξίσωση:

$$\Phi = \frac{M}{N_{bp}} = \frac{N_T}{N_{bp}} - \frac{N_U}{N_{bp}} \quad (3)$$

Αντικαθιστώντας το N_{bp} για το άθροισμα στις εξισώσεις (1) και (2),

παίρνουμε $L_U = N_{bp} / N_U$ και $L_T = N_{bp} / N_T$. Αντικατάσταση αυτών των εκφράσεων στην εξίσωση (3) δίνει την έκφραση για την ποσότητα Φ :

$$\Phi = \frac{1}{L_T} - \frac{1}{L_U} \quad (4)$$

Για μόρια των οποίων το μήκος μετρώνται σε ζεύγη βάσεων (ή kbp, Mbp, Gbp), Φ είναι η πιθανότητα μιας θραύσης αλυσίδας ανά ζεύγος βάσεων (ή ανά kpb, Mbp, Gbp).

Έτσι, το Φ είναι η συχνότητα των θραύσεων που επάγονται από την επώαση με ένζυμο και ορίζουμε τη συχνότητα (σε μονάδες όπως θραύσεις/Mbp) ή πιθανότητα ανά ζεύγος βάσης να παράξει ένα DSB από τη μέτρηση του μέσου μήκους των μορίων πριν και μετά την επώαση του ενζύμου που παράγει θραύσεις στις αλυσίδες. Το μέσο μήκος των μορίων στον πληθυσμό μπορεί να ληφθεί μετρώντας το μέσο μήκος των μορίων στον

πληθυσμό σε ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα. Εφόσον, και ο αριθμητής και ο παρανομαστής των εξισώσεων (1) και (2) αναλογούν στη μάζα του DNA, δεν χρειάζεται να μετρηθούν όλα τα μόρια του DNA, αλλά μόνο ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα του πληθυσμού. Έτσι, ο καθορισμός των μέσων μηκών είναι ανεπαίσθητη στη μάζα του επιλεγμένου δείγματος (εφόσον η συγκέντρωση του DNA είναι τόσο χαμηλή ώστε τα διακριτά μόρια να μετακινούνται ως συνάρτηση των μηκών τους. Έτσι μικρές διαφορές στις μάζες του DNA δεν έχουν σημαντική επίδραση στον καθορισμό της συχνότητας των θραύσεων. ^[4]

Κεφάλαιο 5

ΠΕΙΡΑΜΑ και ΕΚΤΕΛΕΣΗ

Μια νέα λειτουργικότητα βασισμένη σε σύγχροτρο, η ραδιοθεραπεία με Μικροδέσμη (Microbeam Radiotherapy, MRT), που χρησιμοποιεί υψηλής έντασης ακτίνες-Χ ευθυγραμμισμένες με επίπεδες μικροδέσμες, έχει δείξει να αφαιρεί αποτελεσματικά όγκους αλλά προκαλεί λιγότερη βλάβη σε φυσιολογικούς ιστούς συγκρινόμενη με τη συμβατική ραδιοθεραπευτική τεχνική ευρείας δέσμης (broad beam, BB). Λίγα είναι γνωστά για τους υποκείμενους μηχανισμούς και οι επιπτώσεις τους δεν έχουν μελετηθεί. Στο πείραμα μας, μελετήσαμε τα bystander/ abscopal φαινόμενα της MRT και της BB ακτινοβολήσης που παράγεται από το Imaging and Medical Beamline (IMBL) και το Αυστραλιανό Σύγχροτρο σε ένα μοντέλο ποντικών C57BL/6.

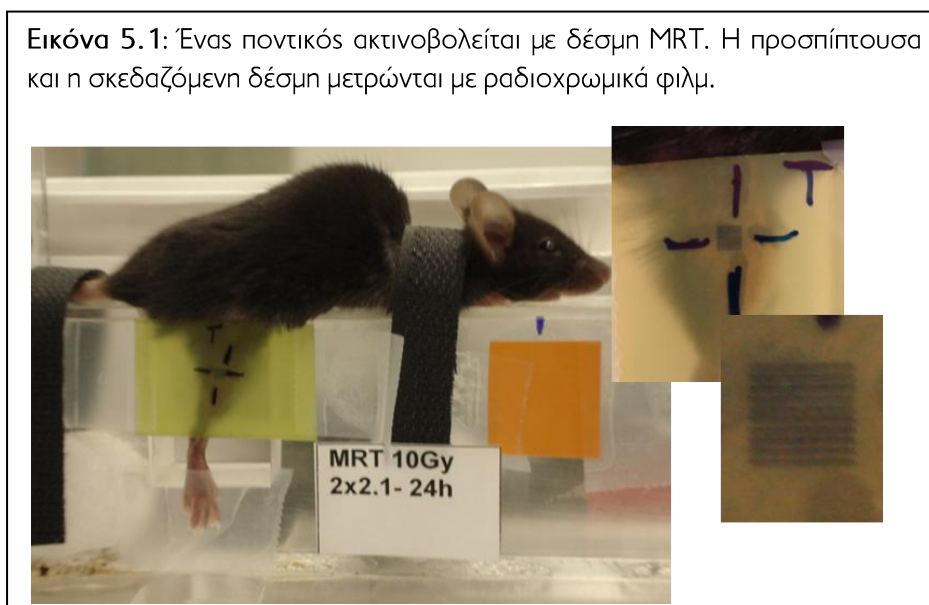
Οι ποντικοί ακτινοβολήθηκαν με δόση 10 ή 40 Gy MRT (μέγιστη τιμή δόσης) ή BB σε επιφάνειες 8x8, 8x1, ή 2x2 mm του πίσω δεξιού ποδιού με δέσμη ακτίνων-Χ, με ρυθμό δόσης 49Gy/sec, η οποία παράχθηκε από το IMBL υπό συνεχές ρεύμα 200 mA. Για την

ακτινοβολήση MRT, ένας κατευθυντήρας παράγαγε εύρος δέσμης 25 μm και μικροδέσμη διακεντρικής απόστασης 200 μm . Η προσπίπτουσα και η σκεδαζόμενη δόση ακτινοβολήσης μετρήθηκαν με το ραδιοχρωμικά φιλμ EBT3 και XRQA2.

Επειτα, συλλέχθηκαν δείγματα αίματος, ακτινοβολημένου δέρματος και μια ποικιλία φυσιολογικών μη-ακτινοβολημένων ιστών, 24 και 96 ώρες μετά την ακτινοβολήση για την ανάλυση των DSBs που ποσοτικοποιήθηκαν σε τμήματα ιστών και οξειδωμένες ομαδοποιημένες βλάβες DNA που μετρήθηκαν μέσω ηλεκτροφόρησης τζελ συνεχούς πεδίου γονιδιακού DNA με χρήση εξειδικευμένων ενζύμων για πουρίνες, πυριμιδίνες και

αβασικές

Εικόνα 5.1: Ένας ποντικός ακτινοβολείται με δέσμη MRT. Η προσπίπτουσα και η σκεδαζόμενη δέσμη μετρώνται με ραδιοχρωμικά φιλμ.



περιοχές.

Ενώ μια ομάδα ποντικών υποβλήθηκε στη διαδικασία χωρίς να ακτινοβοληθεί. Τα δείγματα

αυτής της ομάδας θα χρησιμοποιήθηκαν ως μέτρο σύγκρισης και ελέγχου (control samples). Τα ποντίκια χωρίστηκαν σε ομάδες των 5, ανάλογα με την τεχνική ακτινοβολήσης (οι πρώτες 8 ομάδες), με τη δόση (εναλλαγή ανά 2 ομάδες) και με το χρονικό διάστημα λήψης του δείγματος μετά την ακτινοβολήση (εναλλαγή ανά ομάδα).

Ετσι, προέκυψαν 21 ομάδες με βάση τους παραπάνω συνδυασμούς, που αποτελούνται από 100 ακτινοβολημένα ποντίκια και 5 μη-ακτινοβολημένα.

5.1 Δείγματα DNA

Για το σκοπό της εργασίας μελετήσαμε DNA από ιστό σπλήνας, ωοθηκών και εντοσθίων. 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 DNA περί τα 50mg , αφού αποψύχθηκαν τοποθετήθηκαν σε διάλυμα λύσης πρωτεΐνάσης K υψηλής αντιοξειδωτικής δράσης (5mg/ml σε ρυθμιστικό διάλυμα με 4M ουρία, 200mM Tris, 20mM NaCl, 200mM 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 παρασκευή φρέσκων αυτόκαυστων διαλυμάτων και στη διατήρηση της μέγιστης θερμοκρασίας κατά την εξαγωγή κάτω από τους 60°C αντί των 70°C που συνιστούσε ο κατασκευαστής.

Εν συνεχεία η στήλη φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στα ~5000γρ. Τέλος, το DNA θα διαλυθεί σε πρότυπο διάλυμα TE (10mM Tris-Cl, 1mM EDTA , pH=7.5), θα τοποθετηθεί σε eppendorfs - σωληνάρια 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 (distilled water, dH₂O) έτσι ώστε τα διαλύματα , τα οποία θα εξετάσουμε στη συνέχεια να έχουν όλα τελική συγκέντρωση DNA 20 ng /μL.

5.2 Ενδονουκλεάση hAPE1

Η ανθρώπινη απουρινική / απυριμιδινική (AP) ενδονουκλεάση APE1, είναι ομόλογη της πρωτεΐνης εξωνουκλεάση III της *Escherichia coli*. Η APE1 διαρρηγνύει άμεσα τον 5' φωσφοδιεστερικό δεσμό σε μια αβασική περιοχή, μέσω της υδρόλυσης, για να δημιουργήσει μία μονόκλωνη θραύση αλυσίδας, SSB, αφήνοντας ελεύθερα τα άκρα του 3'-υδροξυλίου και της 5'-δεοξυριβόζης. Εκτός της δραστηριότητας της AP ενδονουκλεάσης, η APE1 έχει αναφερθεί να έχει μια αδύναμη δραστηριότητα DNA 3-διεστεράσης, 3'-5' εξωνουκλεάσης και ριβονουκλεάσης.

Επιπρόσθετα στην ικανότητα επιδιορθωσης DNA, η APE1 είναι ικανή να ρυθμίσει την ικανότητα του DNA να δεσμεύει πολλούς μεταγραφικούς παράγοντες *in vitro* μέσω οξειδοαναγωγικών μηχανισμών . Ως μέρος αυτής της διαδικασίας η APE1 έχει αποδειχθεί πως διεγείρει την ικανότητα του DNA να δεσμεύει Fos-Jun ετεροδιμερή, Jun-Jun ομοδιμερή και HeLa κύτταρα AP-1 πρωτεϊνών καθώς και διάφορων άλλων μεταγραφικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένου των NF-κB, Myb και μέλη της ATF/CREB οικογένειας.

Ως περιοριστικός παράγοντας των μορίων του DNA , λοιπόν, χρησιμοποιήθηκε η ανθρώπινη ενδονουκλεάση APE1 από την New England Biolabs (Catalog#: M0282L). Η συγκέντρωση του ενζύμου είναι 10.000 units/mL, όπου σύμφωνα με τον κατασκευαστή ως μονάδα ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την τομή 20pmol ολιγονουκλεοτιδίου 34 mer με ένα αβασικό σημείο μετά από επώαση σε διάλυμα συνολικού όγκου 10 μL για 1 ώρα στους 37°C .

Το ένζυμο συνοδεύεται από το ρυθμιστικό διάλυμα 10X NEBuffer 4 . Τα συστατικά του 1X NEBuffer 4 είναι 50mM οξικό Κάλιο , 20mM οξικό Tris, 10mM οξικό Μαγνήσιο και 1mM DTT έτσι ώστε το διάλυμα να έχει pH 7.9, στους 25 °C.

Το διάλυμα μετά από κατάλληλη αραιώση θα παρέχει το απαραίτητο υπόστρωμα για τη λειτουργία της ενδονουκλεάσης. Μετά από δοκιμές με διάφορες ποσότητες ενζύμου, καταλήξαμε ότι το αραιωμένο διάλυμα ενζύμου, 1:10, παρουσιάζει ικανοποιητική δράση κατά την επώαση 20 ή 40 ng DNA (ανάλογα με την συγκέντρωση των αρχικών δειγμάτων DNA) σε διάλυμα συνολικού όγκου αντίδρασης 7μL για 1h στους 37°C.

5.3 Γλυκοσυλάση hOGG1

Το ένζυμο hOGG1 είναι μια 8-οξογουανίνη DNA γλυκοσυλάση, η οποία συμπεριφέρεται και ως N- γλυκοσυλάση και λυάση απουρινικών / απυριμιδινικών περιοχών. Η δραστηριότητα N- γλυκοσυλάσης απελευθερώνει πουρίνες που έχουν υποστεί βλάβες από δίκλωνες θραύσεις DNA, δημιουργώντας μια απουρινική περιοχή (AP). Η δραστηριότητα AP-λυάσης κόβει το 3' στην AP περιοχή αφήνοντας το 5' και το 3'-φωσφο-α, β-ακόρεστη αλδεΐδη. Μερικές από τις βάσεις που έχουν υποστεί βλάβη, αναγνωρίστηκαν και απομακρύνθηκαν από το hOGG1 περιλαμβάνουν 7,8-διυδρο-8-οξογουανίνη (8-οξογουανίνη) όταν η βάση ζευγάρωσε με κυτοσίνη, 8-οξοαδενίνη όταν η βάση ζευγάρωσε με θυμίνη, φοραμιδοπυριμιδινο-γουανίνη και μεθυ-φοραμιδοπυριμιδινο-γουανίνη.

Χρησιμοποιήθηκε η ανθρώπινη γλυκοσυλάση OGG1 από την New England Biolabs (Catalog#: M0241L). Η συγκέντρωση του ενζύμου είναι 1600 units/mL, όπου σύμφωνα με τον κατασκευαστή ως μονάδα ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την τομή 1 pmol ολιγονουκλεοτιδίου 34 mer που περιέχει μια οξο-γουανίνη που έχει ζευγαρώσει με κυτοσίνη μετά από επώαση σε διάλυμα συνολικού όγκου 10 μL για 1 ώρα στους 37°C.

Το ένζυμο συνοδεύεται από το ρυθμιστικό διάλυμα 1X NEBuffer2. Τα συστατικά του 1X NEBuffer2 είναι: 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT έτσι ώστε το διάλυμα να έχει pH= 7.9 στους 25 °C.

5.4 ΥΛΙΚΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ

➤ Διάταξη

Για τη διεξαγωγή του πειράματος έγινε χρήση της συσκευής ηλεκτροφόρησης 2314 Horizontal Electrophoresis Device με δεξαμενή χωρητικότητας 1000mL. Η διάταξη περιλαμβάνει και ειδική φόρμα (tray) , όπου εγχύουμε το τζελ αγαρόζης μέχρι να πήξει και ειδικές «χτένες» , οι οποίες θα δημιουργήσουν τις θέσεις υποδοχής («πηγάδια») του διαλύματος του DNA, με συνολική χωρητικότητα 15μL.

➤ TAE (Tris-Acetate –EDTA)

Το ρυθμιστικό διάλυμα TAE (Tris-Acetate-EDTA) χρησιμοποιείται για την πλήρωση της δεξαμενής και τη δημιουργία του πηκτώματος αγαρόζης. Για την παρασκευή 1L TAE συγκέντρωσης 10X χρειαζόμαστε 20mL EDTA (0.5M, pH=8), 11.4mL οξικού οξέος, 48.44gr Tris και τέλος προσθήκη dH₂O μέχρι τη συμπλήρωση του ενός λίτρου. Εναλλακτικά, πραγματοποιήσαμε αραιώση στο διάλυμα TAE 50X. Για την πλήρωση της δεξαμενής απαιτούνται 1.2 L TAE 1X ενώ για την Παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης απαιτούνται 250mL TAE 0.5X. Και τα δυο διαλύματα παράγονται με κατάλληλες αραιώσεις είτε του TAE 10X είτε του 50X.

➤ Αγαρόζη

Εγινε χρήση σκόνης αγαρόζης (BIO-RAD, Certified TM Molecular Biology Agarose , 125g, Catalog#: 16 1-3 101), κατάλληλη για τη δημιουργία πηκτώματος για ηλεκτροφορήσεις.

➤ Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr)

Το βρωμιούχο αιθίδιο (Ethidium Bromide - EtBr) είναι χημική ουσία που χρησιμοποιείται ευρέως για τη σήμανση νουκλεϊκών οξέων σε ηλεκτροφόρηση τζελ αγαρόζης. Το EtBr έχει έντονα μεταλλαξογόνα δράση λόγω της μεγάλης ικανότητας του να παρεμβάλλεται ανάμεσα στα μόρια DNA. Το σήμα που δίνει είναι αναλογικό με την ποσότητα του DNA με το οποίο είναι προσδεδεμένο. Το EtBr είναι φτηνό και είναι γραμμικό με το σήμα του DNA , για ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων DNA.

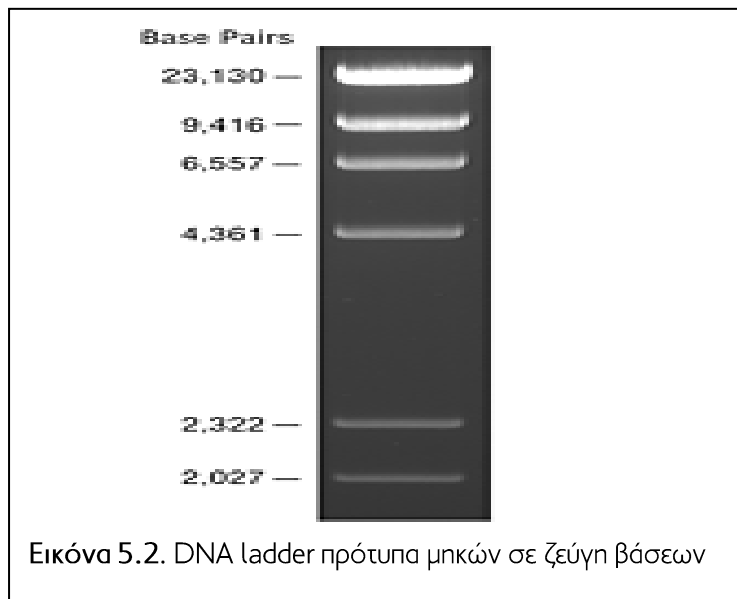
Την ιδιότητα του EtBr να φθορίζει κάτω από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία αξιοποιήσαμε για να ανιχνεύσουμε τα τμήματα DNA σε UV κάμερα μετά την ηλεκτροφόρηση.

Στο πείραμα μας χρησιμοποιήσαμε διάλυμα EtBr συγκέντρωσης 1% από την Applichem (A1152).

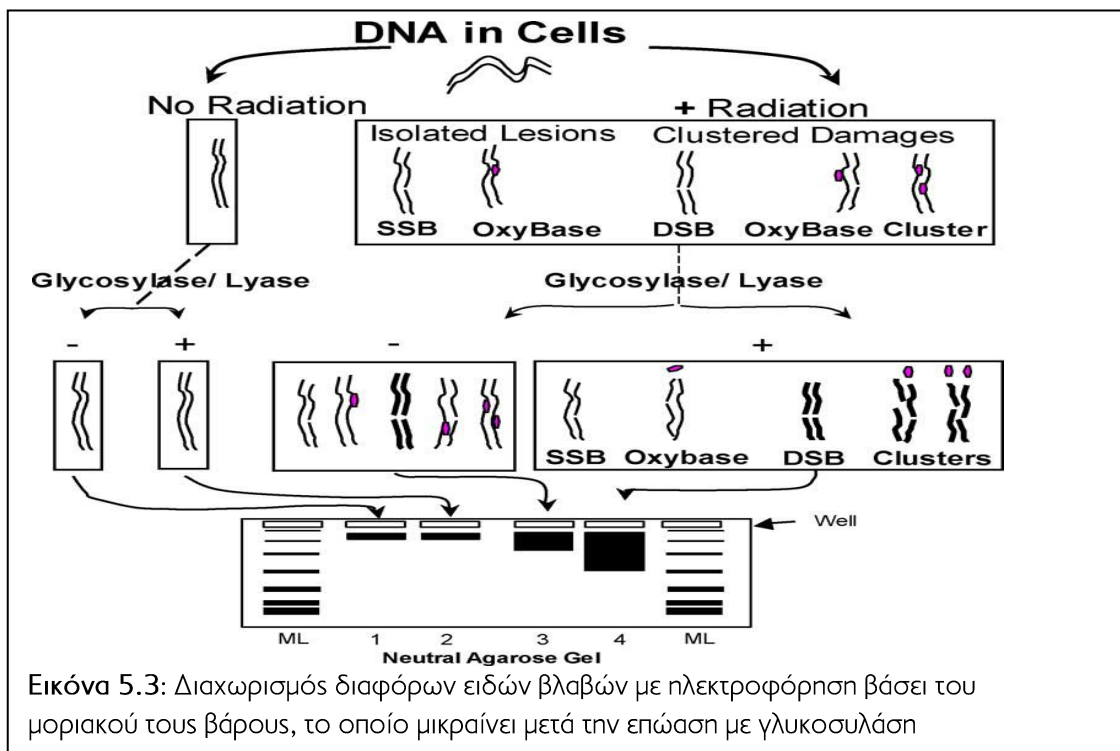
➤ DNA ladder

Για την εκτίμηση του μοριακού βάρους των δειγμάτων DNA που ηλεκτροφορούνται χρησιμοποιούμε ένα διάλυμα DNA ως marker, του οποίου γνωρίζουμε τα μήκη των τμημάτων τους μετρούμενα σε ζεύγη βάσεων, έτσι ώστε να γίνει η απαιτούμενη αντιστοίχιση. Το διάλυμα που χρησιμοποιούμε το παρασκευάζουμε από το συσκευασμένο lambda-DNA HindIII Digest (New England Biolabs, συγκέντρωσης 500μg/mL), που περιέχει το κατάλληλα μεγέθη μορίων DNA τέτοια ώστε να καλύπτει το απαιτούμενο εύρος ζευγών βάσεων, dH₂O και το Gel loading Dye blue 6X (New England Biolabs, Catalog# : B7021S) . Για το διάλυμα του marker απαιτείται 1.5 μέρος του λ-DNA HindIII Digest, 4 μέρη dH₂O και 2 μέρη L. Dye .

Ακολουθούν τα γνωστά, από τον κατασκευαστή, τμήματα του λ-DNA μετά από ηλεκτροφόρηση σε 1% τζελ αγαρόζης.



Παρακάτω ακολουθεί παράδειγμα οπτικοποίησης της ανίχνευσης διαφόρων ειδών βλαβών DNA σε ουδέτερο τζελ αγαρόζης ^[4]



5.5 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

Βγάζουμε τα προς μελέτη δείγματα DNA (δηλαδή τα αραιωμένα διαλύματα συγκέντρωσης 20ng/μl) από την κατάψυξη (-20 °C) όπου διατηρούνται καθώς και το ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου που θα χρησιμοποιήσουμε και τα αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να επανέλθουν πλήρως σε υγρή κατάσταση.

Αραιώνουμε το ρυθμιστικό διάλυμα με αποσταγμένο νερό σε αναλογία 1:3 δημιουργώντας νέο διάλυμα.

Εν συνεχεία προσθέτουμε σε PCR tubes ποσότητα 4 μl από το αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα μαζί με ποσότητα 2 μl από τα διαλύματα DNA και τα τοποθετούμε για προεώαση 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 (+ sample/δείγμα) ενώ στο άλλο δεν θα προστεθεί και θα λειτουργήσει σαν control ή αλλιώς δείγμα αναφοράς (- sample/δείγμα).

Μετά την πάροδο των 30 λεπτών προσθέτουμε λοιπόν στα (+) δείγματα 1μl του διαλύματος ενζύμου (hAPE1 ή hOGG1), 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 +). Στην συνέχεια τοποθετούνται στον πάγο για 30 λεπτά. 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.

Κατά τη διάρκεια της επώασης των δειγμάτων, προχωράμε στην κατασκευή του gel αγαρόζης το οποίο θα έχει συγκέντρωση 1%, δηλαδή 2,5g σκόνη αγαρόζης σε 250ml TAE 0.5X. Διαλύουμε πλήρως την αγαρόζη στο διάλυμα TAE χρησιμοποιώντας φούρνο μικροκυμάτων και αφού προσθέσουμε 0,8ml από το διάλυμα του βρωμιούχου αιθιδίου εγχύουμε 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. Η τοποθέτηση γίνεται σε περιβάλλον πολύ χαμηλού φωτισμού καθώς το βρωμιούχο αιθίδιο είναι ιδιαίτερα φωτοευαίσθητο. Όταν το gel είναι έτοιμο το εμβαπτίζουμε στη δεξαμενή της ηλεκτροφόρησης, η οποία είναι γεμάτη με ποσότητα TAE 1X (περίπου 1L) τέτοια που να καλύπτει ολόκληρο το πηκτώμα.

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 γίνεται τοποθετώντας πρώτα το (-) και στη συνέχεια το (+) δείγμα.

Ακόμη εγχύουμε 1,5 μl DNA ladder στα τέσσερα ακριανά πηγάδια του πηκτώματος (2 στην πάνω και 2 στην κάτω σειρά) . Το διάλυμα του ladder αποτελείται από dH₂O, gel loading dye και τον λHindIII σε αναλογία 4 : 2 : 1,5 .

Ενεργοποιούμε την ηλεκτροφόρηση με ηλεκτρική τάση 110V και αφήνουμε τα δείγματα να "τρέξουν" για 70 λεπτά.

Τέλος, μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης βγάζουμε το gel 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 σε κατάλληλη φωτεινότητα τα μόρια του DNA.

5.6 Ανάλυση εικόνας πηκτώματος

Για την ανάλυση της εικόνας που λαμβάνουμε από την UV κάμερα χρησιμοποιήσαμε το πρόγραμμα πυκνομετρίας εικόνας ImageJ του National Institute of Health (NIH). Ρυθμίζοντας κατάλληλα την κάμερα, επιλέγουμε την καλύτερη εικόνα του πηκτώματος που να φαίνονται επαρκώς οι λωρίδες του DNA, με την ελάχιστη δυνατή φωτεινότητα υποβάθρου. Για κάθε ζεύγος του δείγματος (- και +) υπολογίζουμε τις καμπύλες μετατόπισης των μορίων DNA συναρτήσεως του μοριακού τους βάρους στο τζελ αгарόζης μετά την ηλεκτροφόρηση. Οι μετρήσεις γίνονται με βάση την ένταση της φωτεινότητας κάθε λωρίδας από το ζεύγος κατά μήκος του άξονα μετατόπισης. 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 της καμπύλης.

Πραγματοποιούμε την παραπάνω διαδικασία για όλα τα δείγματα του ιστού. Έπειτα προχωράμε στη δημιουργία αριθμημένης προσαρμοσμένης/fitted καμπύλης ώστε να αντιστοιχήσουμε τις τιμές των X_{med} με το μέσο μέγεθος του συγκεκριμένου πληθυσμού μορίων DNA, L_{med} . Για τη δημιουργία αυτής της καμπύλης παίρνουμε το διάγραμμα διασποράς του DNA ladder και βρίσκουμε τις τιμές των X_{med} των έξι διακριτών του διαγράμματος που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένο αριθμό ζευγών βάσεων. Επειδή γνωρίζουμε τον αριθμό των ζευγών βάσεων 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 στη γραφική παράσταση της συνάρτησης $exp(-x^2)$ του προγράμματος OriginPro 8 με τη σχέση:

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

Λαμβάνουμε τις τιμές των παραμέτρων και τις προσθέτουμε στο excel. Κατόπιν προσθέτουμε στο ειδικά διαμορφωμένο excel με σχέσεις από τη βιβλιογραφία και τις τιμές των X_{med} των δειγμάτων. Έτσι, προκύπτουν οι αντίστοιχες τιμές των L_{med} για κάθε πληθυσμό με βάση τη διασπορά που ορίζουν οι παραπάνω παράμετροι.

Τέλος, από τη σχέση: $\Phi = \frac{1}{L\varepsilon} - \frac{1}{La}$

υπολογίζονται οι τιμές της των συχνοτήτων αβασικών περιοχών σε clusters/Gbp , με $L\varepsilon$ και La να είναι οι τιμές των L_{med} για το (+) και το (-) δείγμα αντίστοιχα.

Κεφάλαιο 6

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Τα δείγματα DNA που μελετήσαμε προέρχονται από ιστούς ωοθηκών και σπλήνας οι οποίοι δεν έχουν ακτινοβοληθεί άμεσα. Κάθε ομάδα ποντικών συγκρίθηκε με τη μη ακτινοβολημένη ομάδα ποντικών του ιστού. Για κάθε ομάδα , εκτός από τη τιμή του μέσου όρου των συσσωματωμάτων βλαβών , υπολογίστηκε και το αντίστοιχο τυπικό σφάλμα (standard error):

$$\text{Τυπικό σφάλμα} = \frac{\text{τυπική απόκλιση}}{\sqrt{n}} = \frac{s}{n} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x-x')^2}{n(n-1)}} ,$$

όπου n είναι το πλήθος των δειγμάτων .

Στη συνέχεια διενεργήσαμε t-test, το οποίο αποτελεί ένα στατιστικό έλεγχο υποθέσεων για να αποφανθούμε αν οι τιμές των μέσων όρων των δειγμάτων που έχουν ακτινοβοληθεί σε απομακρυσμένο σημείο είναι σημαντικά διαφορετικές από τις τιμές των

μέσων όρων του control δείγματος. Ορίσαμε ένα διάστημα εμπιστοσύνης 95% , επομένως όταν το t-test δώσει p-value, $P < 0.05$ σημαίνει ότι έχουμε στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα στο διάστημα εμπιστοσύνης που έχουμε ορίσει.

Παρακάτω θα παρουσιαστεί η ανάλυση των πειραματικών αποτελεσμάτων.

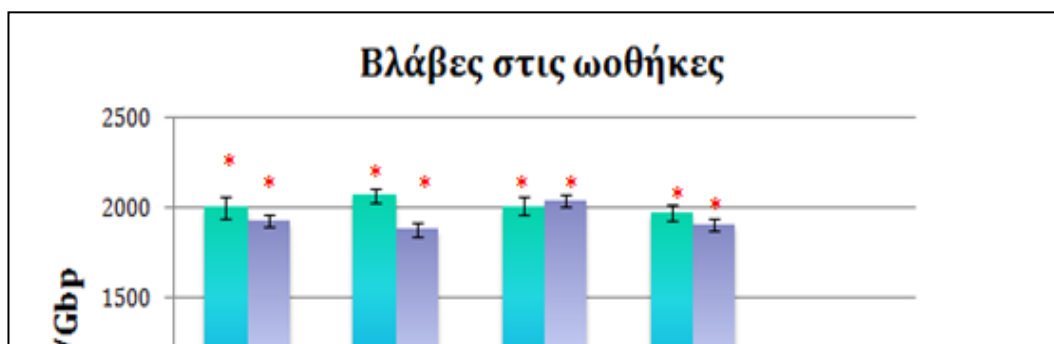
Απόκριση κάθε ιστού

Δίνονται αναλυτικά οι τιμές των αβασικών περιοχών σε Clusters/Gbp με τα αντίστοιχα τυπικά σφάλματα τους και τα αντίστοιχα ιστογράμματα συχνοτήτων.

Ωοθήκες με APE1	Δόση και τεχνική ακτινοβόλησης				
Χρονικό σημείο	10Gy MRT	40Gy MRT	10Gy BB	40Gy BB	Control
24 h					1015,96 ± 44
Τυπικό σφάλμα(±)	2000,8 ± 65	2065,83 ± 42	2010,44 ± 51	1971,31 ± 46	
96 h					1015,96 ± 44
Τυπικό σφάλμα(±)	1925,84 ± 78	1878,45 ± 49	2037,37 ± 45	1902,48 ± 68	

Πίνακας 6.1 Πειραματικά αποτελέσματα των βλαβών στις ωοθήκες σε Clusters/Gbp, για κάθε δόση, τεχνική ακτινοβόλησης και χρονικό σημείο παραλαβής του δείγματος μετά την έκθεση.

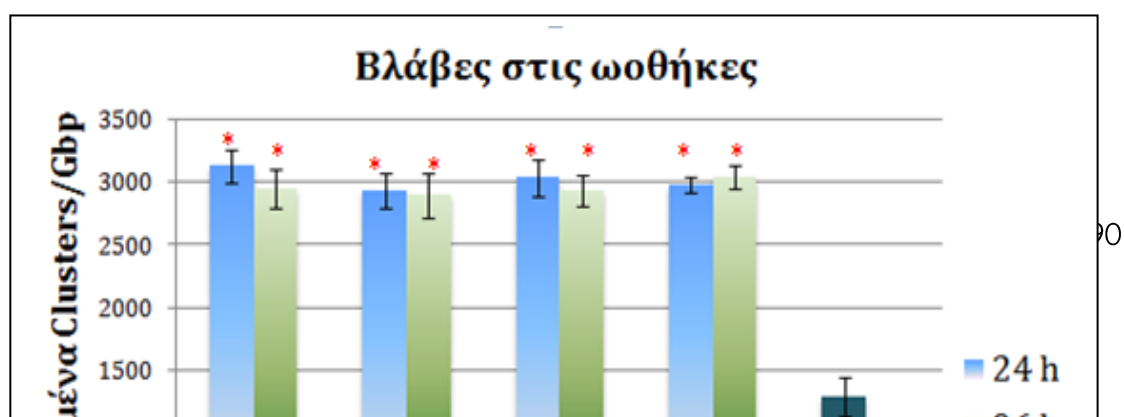
Παρακάτω ακολουθεί το ιστογράμμο συχνοτήτων των αβασικών περιοχών συναρτήσει της δόσης, της τεχνικής ακτινοβόλησης και του χρονικού σημείου μετά την έκθεση , στο οποίο λάβαμε το δείγμα.



Τα αποτελέσματα των εξεταζόμενων δειγμάτων από ωοθήκες μετά από επώαση με ένζυμο hOGG1. *Σημναιει.....

Ωοθήκες με hOGG1	Δόση και τεχνική ακτινοβολησης				
Χρονικό σημείο	10Gy MRT	40Gy MRT	10Gy BB	40Gy BB	control
24 h					1289,06 ± 153
Τυπικό σφάλμα(±)	3127,11 ± 131	2932,29 ± 138	3033,08 ± 150	2979,31 ± 65	
96 h					1289,06 ± 153
Τυπικό σφάλμα(±)	2947,63 ± 159	2894,12 ± 176	2927,65 ± 128	3036,18 ± 95	

Πίνακας 6.2 Πειραματικά αποτελέσματα για τις βλάβες που μετρήθηκαν στις ωοθήκες, σε οξειδωτικά Clusters/Cbp, σε σχέση με τη δόση, την τεχνική ακτινοβολησης και το χρονικό σημείο.

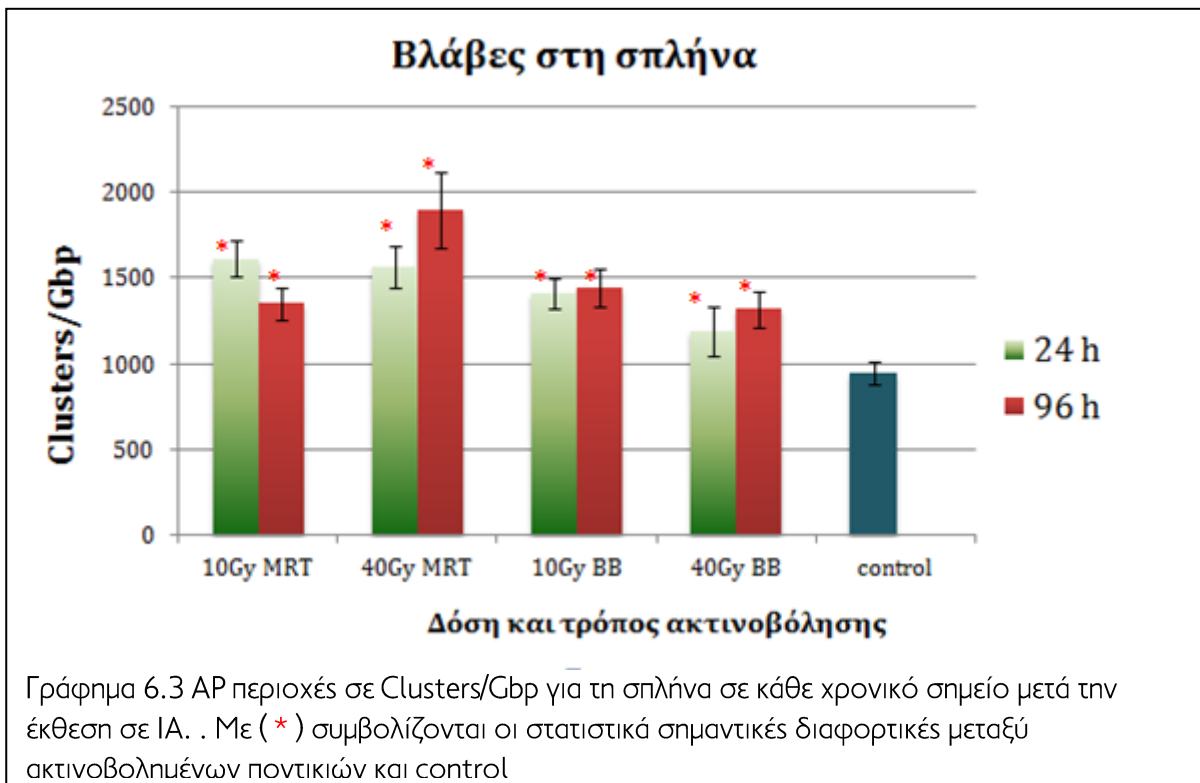


Παρακάτω ακολουθεί παράθεση των αποτελεσμάτων για τον ιστό της σπλήνας μετά από επώαση με ένζυμο hAPE1 και το αντίστοιχο ιστόγραμμα συχνοτήτων των βλαβών αβασικών περιοχών σε Clusters/Cbp. Τα αποτελέσματα έχουν ομαδοποιηθεί με βάση τη δόση, την τεχνική ακτινοβολήσης και το χρονικό σημείο μετά την έκθεση που περισυλλέξαμε το δείγμα.

Σπλήνα με APE1	Δόση και τεχνική ακτινοβολήσης				
	10Gy MRT	40Gy MRT	10Gy BB	40Gy BB	control
Χρονικό σημείο					
24 h					922,89 ± 63
Τυπικό σφάλμα(±)	1611,8 ± 106	1737,2 ± 118	1700,07±87	1649 ± 141	
96 h	1539,3 ± 91	1935,6 ± 223	1678,25 ±	1701,5± 106	

Τυπικό σφάλμα(±)			111		
------------------	--	--	-----	--	--

Πίνακας 6.3 Πειραματικά αποτελέσματα των βλαβών που μετρήθηκαν στη σπλήνα σε Clusters/Gbp συναρτήσει της δόσης, της τεχνικής ακτινοβολήσης και του χρονικού σημείου συλλογής δείγματος



Στα παραπάνω γραφήματα, αρχικά, παρατηρούμε πως για οποιοδήποτε συνδυασμό (τεχνική ακτινοβολήσης, δόση και χρονική στιγμή παραλαβής του δείγματος μετά την

έκθεση), τα επίπεδα των βλαβών είναι αρκετά αυξημένα σε κάθε ιστό και για κάθε ένζυμο σε σχέση με τα δείγματα από τα μη-ακτινοβολημένα ποντίκια.

Αξίζει να σημειώσουμε, ακόμη, ότι οι βλάβες στο DNA παρουσιάζουν διακυμάνσεις εντός των ορίων του σφάλματος, ανεξαρτήτως του συνδυασμού των χαρακτηριστικών που προσδιορίζουν τα δείγματα των ποντικών.

Μετά από τα t-tests που πραγματοποιήθηκαν στο SPSS για κάθε ομάδα παραμέτρων συγκριτικά με τα control, στη συντριπτική πλειοψηφία των ελέγχων, προέκυψε p-value << 0.05. Επομένως, υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους ιστούς των ακτινοβολημένων και των μη-ακτινοβολημένων ποντικών. Τα αποτελέσματα των t-tests θα παρουσιαστούν στο Παράρτημα.

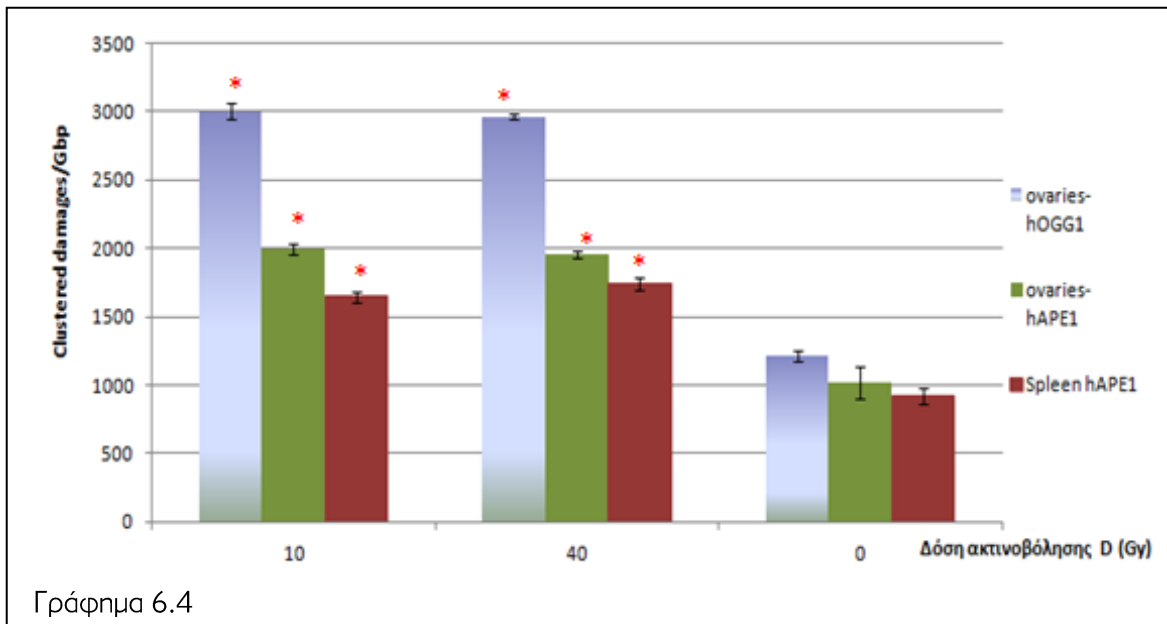
Απόκριση στη δόση

Για να εκτιμήσουμε πως αποκρίνονται οι ιστοί, επωασμένοι με το αντίστοιχο ένζυμο, ακτινοβολημένοι σε απομακρυσμένο σημείο από τους εξεταζόμενους ιστούς σε κάθε δόση Ι.Α. παρουσιάζουμε παρακάτω τα συνολικά αποτελέσματα.

Ιστός	Απορροφούμενη δόση		
	10 Gy	40 Gy	0 Gy
Ovaries με hOGG1	3003,17 ± 57,40	2965,94 ± 37,08	1218,55 ± 98,86
Τυπικό σφάλμα			
Ovaries με APE1	1999,67 ± 25,79	1952,74 ± 24,63	1015,96 ± 44,13
Τυπικό σφάλμα			
Spleen με APE1	1644,65 ± 39,84	1736,99 ± 119,27	922,89 ± 62,56

Τυπικό σφάλμα			
---------------	--	--	--

Πίνακας 6.4 Πειραματικά αποτελέσματα οξειδωτικών (1^η γραμμή) και αβασικών ομαδοποιημένων βλαβών για τους 2 ιστούς, σε Clusters/Gbp σε σχέση με τη δόση ακτινοβολίας.



Γράφημα 6.4

Από τα αποτελέσματα που εξάγαμε από τα πειράματα μας παρατηρούμε ότι η MRT και η BB ακτινοβολία επηρεάζει τα επίπεδα των ενδογενών βλαβών σε Μη-Στοχευμένους ιστούς σπλήνας και ωοθηκών συγκρινόμενα με μη-ακτινοβολημένες ομάδες ιστών. Γενικά, χαμηλές δόσεις MRT και BB αύξησαν τα επίπεδα των εστιών, ενώ υψηλότερες δόσεις κατέστειλαν τα επίπεδα των εστιών. Αυξήσεις OCDL εντοπίστηκαν σε μια ποικιλία μη-ακτινοβολημένων ιστών σε ακτινοβολημένους ποντικούς. Οι αλλαγές των βλαβών DNA παρέμειναν μέχρι τις 96 ώρες μετά την ακτινοβολία. Παρομοίως, οι αλλαγές στην έκφραση των κυτοκινών του πλάσματος και τοπικές ανοσοαποκρίσεις εξακολούθησαν να υπάρχουν.

Για τον ιστό των ωοθηκών τα t-test έδωσαν p-value $\leq 0,02$ και για τις δυο δόσεις Ιοντίζουσας Ακτινοβολίας, όταν συγκρίναμε τα ακτινοβολημένα ποντίκια με τα μη-ακτινοβολημένα. Οι μέσες τιμές των βλαβών του ιστού των ωοθηκών για τις δυο διαφορετικές δόσεις των 10 Gy είναι $3003,16 \pm 57,40$ και των 40 Gy: $2965,93 \pm$

37,08 μετά από επώαση σε hOCC1 . Για τα επωασμένα με hAPE1 είναι $1999,67 \pm 25,79$ και $1952,74 \pm 24,63$ Clusters/ Gbp , αντίστοιχα, για τις δυο διαφορετικές δόσεις . Οι παραπάνω τιμές παρουσιάζουν αποκλίσεις εντός των ορίων του τυπικού σφάλματος.

Για τον ιστό της σπλήνας, τα t-test της σύγκρισης των ακτινοβολημένων ποντικών με τα control έδωσαν αποτελέσματα που συμφωνούν στην πλειοψηφία τους με εκείνα των ιστών των ωοθηκών. Παρατηρήθηκε μια εξαίρεση , όμως, στην 14^η και 15^η ομάδα, όπου τα p-value ήταν 0,4 , το οποίο μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι μέσες τιμές των ομαδοποιημένων βλαβών δεν διαφέρουν σημαντικά.

Για το ένζυμο hAPE1 οι αντίστοιχες τιμές είναι $1644,65 \pm 39,84$ και $1736,99 \pm 119,27$ Clusters/ Gbp για τις δύο δόσεις των 10 και 40 Gy, αντίστοιχα .

Η μη διαφορετική απόκριση συμφωνεί και με άλλα πειραματικά αποτελέσματα ^[14].

Απόκριση στα διαφορετικά χρονικά σημεία

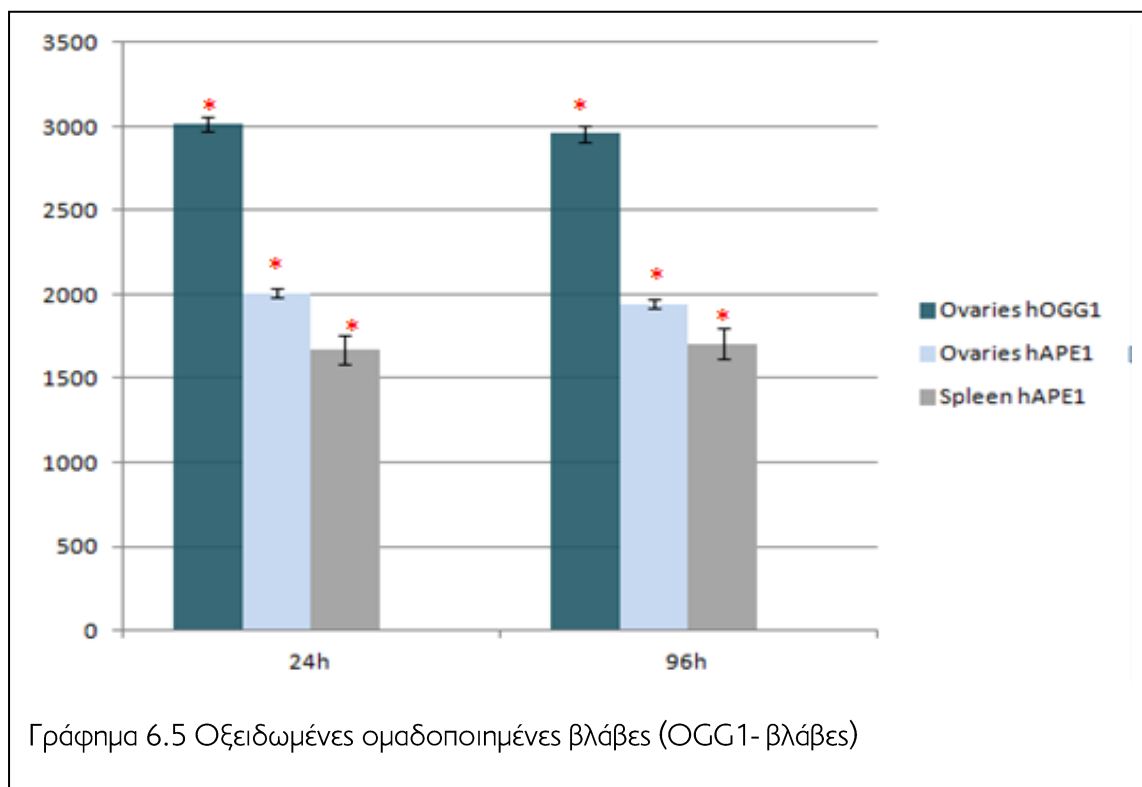
Προκειμένου να εξετάσουμε το βαθμό επιδιόρθωσης και τα επίπεδα των αβασικών περιοχών και των οξειδωμένων βάσεων μετά την έκθεση , μελετήσαμε δείγματα από δυο είδη ιστών που λήφθηκαν 24 και 96 ώρες μετά την ακτινοβολήση.

Γνωρίζουμε ότι η επιδιόρθωση των ομαδοποιημένων βλαβών από τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου διαρκεί 2 2/3 ημέρες. Επομένως, τα αποτελέσματα της για το DNA που πάρθηκε 24 ώρες μετά την ακτινοβολήση , δίνουν μια εκτίμηση της αρχικής απόκρισης του οργανισμού. Οι μετρήσεις για τα μετά από 96 ώρες εξεταζόμενα δείγματα θα δώσουν πιο αξιόπιστες μετρήσεις της απόκρισης του οργανισμού, όπου θα έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές κυτταρικές διαιρέσεις.

	Βλάβες σε κάθε ιστό
--	---------------------

Χρονικό σημείο	Ovaries με hOGG1	Τυπικό σφάλμα	Ovaries με APE1	Τυπικό σφάλμα	Σπλήνα με APE1	Τυπικό σφάλμα
24h	3013,56 ± 42,45		2007,74 ± 24,31		1672,64 ± 89,47	
96h	2955,55 ± 52,52		1944,67 ± 24,12		1709,01 ± 90,60	
Control	1218,55 ± 98,86		1015,96 ± 44,13		922,89 ± 62,56	

Πίνακας 6.5 Πειραματικά αποτελέσματα σε Clusters/Cbp οξειδωτικών (OGG1 βλαβών) και αβασικών ομαδοποιημένων βλαβών στους δυο ιστούς για κάθε χρονικό σημείο μετά την έκθεση.



Από τον Πίνακα 6.5 και το Γράφημα 6.5 βλέπουμε ότι οι τιμές των Clusters / Gbp για τον ιστό των ωοθηκών και σπλήνας που λήφθηκαν **24 ώρες** μετά την ακτινοβολήση είναι αρκετά κοντινές μεταξύ τους και δίνουν p -values < 0.01 στη σύγκριση τους με τα μη-ακτινοβολημένα ποντίκια . Άρα, η υπόθεση μας ότι οι τιμές των βλαβών των ακτινοβολημένων ποντικίων είναι σημαντικά διαφορετικές από εκείνες των μη-ακτινοβολημένων είναι σωστή σε ένα διάστημα εμπιστοσύνης πάνω από 99%.

Οι μέσες τιμές των βλαβών των δυο ιστών με επώαση ενζύμου hAPE1, φαίνονται να είναι διαφορετικές στο διάγραμμα και εκτός των ορίων του σφάλματος. Το t -test για τις ωοθήκες έδωσε τιμές κοντά στο 0 , άρα οι μέσες τιμές των βλαβών των ακτινοβολημένων τιμών απέχουν σημαντικά από τις βλάβες των μη-ακτινοβολημένων. Στα δείγματα από ιστό σπλήνας έχουμε την ίδια συμπεριφορά (διάστημα εμπιστοσύνης $> 95\%$) με εξαίρεση την 15^η ομάδα, όπου το $p=0.4$, που σημαίνει ότι δεν μπορούμε να αποφανθούμε ότι τα επίπεδα βλαβών στη σπλήνα των ακτινοβολημένων ποντικίων σε σχέση με τα control είναι σημαντικά διαφορετικά.

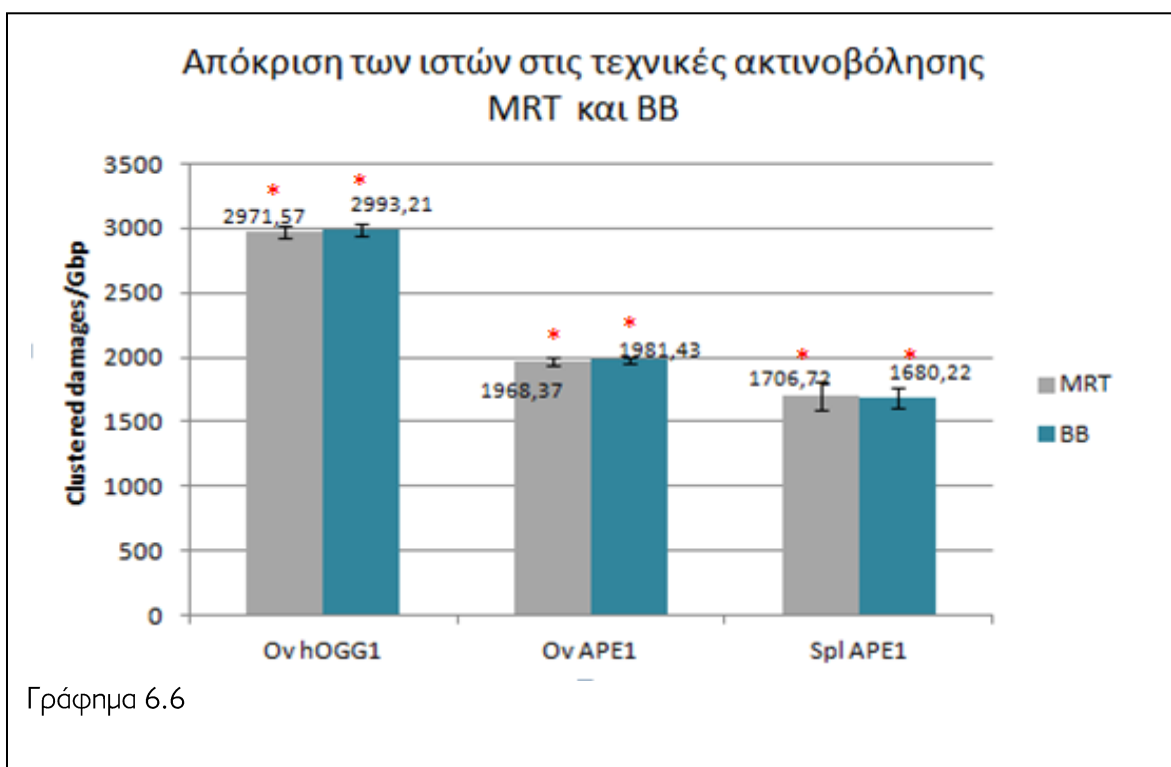
Για την απόκριση μετά από **96 ώρες** παρατηρούμε ότι τα επίπεδα βλαβών στις ωοθήκες που έχουν επωαστεί με hOGG1 είναι αρκετά κοντινά μεταξύ τους, εντός σχετικά των ορίων του σφάλματος. Τα t -test έδωσαν για τον ιστό των ωοθηκών p -values μικρότερα του 0.005 , δίνοντας μια ασφάλεια πάνω από 99% για την υπόθεση μας. Τα επίπεδα των βλαβών των αντίστοιχων ιστών μετά από επώαση με hAPE1 αποκλίνουν μεταξύ τους .Τα t -test για τον ιστό των ωοθηκών μας δίνουν p -values < 0.02 , άρα ένα διάστημα εμπιστοσύνης $> 98\%$ για την υπόθεση μας. Τέλος, τα t -test για τη σπλήνα μας έδωσαν παρόμοια αποτελέσματα με το p -value να είναι < 0.05 , άρα οι τιμές των βλαβών στη σπλήνα των ακτινοβολημένων ποντικίων σε σχέση με τα control τους είναι σημαντικά διαφορετικές με πιθανότητα πάνω από 95%.

Απόκριση στην τεχνική ακτινοβολήσης

Για να μελετήσουμε πως αποκρίνεται ο οργανισμός στη διαφορετική τεχνική ακτινοβολήσης, ομαδοποιούμε τα πειραματικά μας δεδομένα στις πρώτες 8 ομάδες και στις επόμενες 12. Παρακάτω παρουσιάζεται συγκεντρωτικά ο πίνακας με τις ομαδοποιήσεις με τα αντίστοιχα σφάλματα και το ιστόγραμμα συχνοτήτων των βλαβών.

Τεχνική ακτινοβολήσης	Βλάβες σε κάθε ιστό					
	Ovaries με hOGG1	Τυπικό σφάλμα	Ovaries με APE1	Τυπικό σφάλμα	Σπλήνα με APE1	Τυπικό σφάλμα
MRT	2971,57 ± 52,14		1968,37 ± 30,02		1706,72 ± 106,97	
BB	2993,21 ± 45,45		1981,43 ± 23,70		1680,22 ± 78,90	
Control	1218,55 ± 98,86		1015,96 ± 44,13		922,89 ± 62,56	

Πίνακας 6.6: Πειραματικά αποτελέσματα οξειδωτικών και αβασικών ομαδοποιημένων βλαβών για τους δυο ιστούς , σε Clusters/Cbp συναρτήσει της τεχνικής ακτινοβολήσης , MRT και BB.



Από τα παραπάνω συγκεντρωτικά αποτελέσματα παρατηρούμε ότι η τεχνική ακτινοβολήσης δεν παίζει στατιστικά σημαντικό ρόλο και οι αποκλίσεις στις τιμές βρίσκονται εντός των ορίων του σφάλματος. Τα t-test για τον ιστό των ωοθηκών των ποντικών που ακτινοβολήθηκαν με MRT, και με τα 2 ένζυμα, δίνουν p-values περίπου 0. Γεγονός που σημαίνει ότι τα επίπεδα των βλαβών είναι σημαντικά διαφορετικά από εκείνα των μη-ακτινοβολημένων. Ομοίως, και για την BB ακτινοβολήση με πιθανότητα μεγαλύτερη από 98%.

Για τον ιστό της σπλήνας, για τα ακτινοβολημένα ποντίκια με MRT, έχουμε το p να είναι μικρότερο του 0.02. Για την BB ακτινοβολήση τα t-test δίνουν τιμές για τα $p < 0.05$, με εξαίρεση την 15^η ομάδα.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το κυτταρικό στρες που αναπτύσσεται σε μία περιοχή έντονα εκτεθειμένη σε ιοντίζουσα ακτινοβολία φαίνεται, σύμφωνα και με τα πειραματικά αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, να επηρεάζει σημαντικά τους ιστούς απομακρυσμένων περιοχών του οργανισμού. Η Ι.Α. 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 ακτινοβολήσης σε κοντινές αλλά και απομακρυσμένες περιοχές σύμφωνα με αρκετές πειραματικές μελέτες. Η ανάπτυξη παρατεταμένου στρες υποθέσαμε πως παίζει βασικό ρόλο στην εμφάνιση αυτού του φαινομένου και για το λόγο αυτό εξετάσαμε τη συχνότητα σύνθετων οξειδωτικών βλαβών DNA σε ιστούς που δεν έχουν εκτεθεί άμεσα στην 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, η συχνότητα σχηματισμού αβασικών ομαδοποιημένων βλαβών αλλά και οξειδωμένων βάσεων (για τον ιστό των ωοθηκών μόνο) και με αυτό τον τρόπο πάρθηκαν εν τέλει σημαντικά βιολογικά δεδομένα.

Τα επίπεδα ενδογενών βλαβών στις ωοθήκες των μη ακτινοβολημένων ποντικών βρέθηκαν 1015 Clusters/Gbp (ή 1.015 clusters/Mbp), ενώ στη σπλήνα 923 Clusters/Gbp (ή 0.923 Clusters/Mbp). Οι παραπάνω τιμές είναι παραπλήσιες και περίπου εντός των ορίων των επιμέρους σφαλμάτων. Οι οξειδωτικές βλάβες στις ωοθήκες των μη ακτινοβολημένων ποντικών ποσοτικοποιήθηκαν στα 1218 Clusters/Gbp. Το ότι υποβλήθηκαν τα ποντίκια αυτά στην ίδια διαδικασία με τα ακτινοβολημένα δε φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά τα επίπεδα ενδογενών βλαβών, όπως έχει δείξει και προηγούμενη έρευνα ^[14]. Το γεγονός αυτό δείχνει πως η απόκριση του οργανισμού υπό αυτές τις συνθήκες δεν αλλάζει με τρόπο τέτοιο που να τροποποιεί τα αποτελέσματα των ΝΤΕs. Πειραματικά δεδομένα ακόμα από έρευνες σε ιστούς ποντικών και ανθρώπων δείχνουν συνολικό αριθμό αβασικών βλαβών συχνότητας 10-60 βλάβες/Mbp ^[96]. 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 ανθρώπινων κυττάρων έδειξε επίπεδα βλαβών 0.02-0.04 clusters/Gbp ^[97], 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 στις ωοθήκες για κάθε ομάδα δειγμάτων κυμάνθηκε μεταξύ 1800 και 2100 clusters/Gbp (γενική μέση τιμή ακτινοβολημένων 1976 clusters/Gbp) δηλαδή 1.7 με 2.1 φορές πάνω από τα μη ακτινοβολημένα ποντίκια με μέση τιμή 1015 clusters/Gbp. Στη σπλήνα έχουμε τα ίδια δεδομένα, τα επίπεδα των βλαβών κυμάνθηκαν μεταξύ των 1500-2000 clusters/Gbp (γενική μέση τιμή ακτινοβολημένων 1690 clusters/Gbp) και μέση τιμή control δειγμάτων 923 clusters/Gbp. Τα αποτελέσματα αυτά

παρουσιάζουν ομοιότητες με εκείνα προηγούμενης έρευνας σε μη εκτεθειμένο ιστό δέρματος ποντικίου για έκθεση σε 12.5 Gy ακτίνων Χ^[14]. Στην έρευνα αυτή βρέθηκαν επίπεδα AP ομαδοποιημένων βλαβών 1000 με 1400 clusters/Gbp μετά από 20 εβδομάδες.

Ο αριθμός των οξειδωμένων βλαβών στις ωοθήκες κυμαινόταν από 2700 έως 3200 (γενική μέση τιμή ακτινοβολημένων 2985), δηλαδή 2.2 έως 2.6 φορές παραπάνω σε σχέση με τα μη-ακτινοβολημένα με μέση τιμή 1218 Clusters/Gbp. Μετά από 96 ώρες από την ακτινοβολήση τα επίπεδα βλαβών εμφανίζονται υψηλά και στους δύο ιστούς χωρίς να παρατηρείται αξιόλογη πτώση. 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 cluster πραγματοποιείται σε διάστημα μικρότερο των 2.67 ημερών. Επομένως, η διαφαινόμενη επαγωγή και αναδημιουργία των οξειδωτικών βλαβών DNA σε απομακρυσμένους ιστούς υποδεικνύει παρατεταμένη και διευρυμένη ανάπτυξη στρες. Μετά την ακτινοβολήση με τόσο υψηλές δόσεις IA (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 απόκρισης του DDR) και του έντονου οξειδωτικού στρες επάγουν την έκλυση κυτοκίνων οι οποίες αυτοκρινικά ή παρακρινικά δύνανται 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 των ωοθηκών και της σπλήνας παράγοντας τέτοιο αριθμό clusters. Ωστόσο, μακρομόρια όπως ανοσοκύτταρα, κυτοκίνες και σήματα κινδύνου (μόρια DAMPs) μπορούν να μεταφερθούν μέσω του κυκλοφορικού σε μακρινούς ιστούς. 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^[98]. 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^[98]. 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 των ωοθηκών και της σπλήνας 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 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 ελλιμεματική επιδιόρθωση ή/και δημιουργία νέων βλαβών. Ακόμη, πρόσφατη έρευνα 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 ακτινοβόλησης. 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. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν υψηλά επίπεδα AP και οξειδωτικών clusters σε κάθε διαφορετικό τρόπο ακτινοβόλησης 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 ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων και η διάχυση των 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 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 συστημικό 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 ακριβής ποσοτική εκτίμηση τους 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 αβασικών και οξειδωτικών 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.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] A.G. Georgakilas, C. E. Redon, N. F. Ferguson, T. B. Kryston, P. Parekh, J. S. Dickey, A. J. Nakamura, J. B. Mitchell, W. M. Bonner, O. A. Martin., Systemic DNA damage accumulation under in vitro tumor growth can be inhibited by the antioxidant Tempol
- [2] C.N. Sprung, A. Ivashkevich, H. B. Forrester, C.E. Redon, A.G. Georgakilas, O. A. Martin., Oxidative DNA damage caused by inflammation may link to stress-induced NTEs, *Can. Let.* 356 (2015) 72-81.
- [3] , B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, Βασικές αρχές Κυτταρικής Βιολογίας
- [4] B. Sutherland, A.G. Georgakilas, P. Bennett, J. Laval, J. Sutherland, Quantification of Induction and Repair of Clustered DNA lesions by electrophoresis, electronic imaging and NALA
- [5] W. F. Morgan, M. B. , Non-Targeted Effects induced by ionizing radiation: Mechanisms and potential impact on radiation induced health effects
- [6] Μυρσίνη Μακροπούλου , Σημειώσεις Βιοφυσικής , ΕΜΠ
- [7] , M. Kadhim, S. Salomaa, E. Wright, G. Hildebrandt, O. V. Belyakov, K. M. Prise, M. P. Little , Non- Targeted Effects of Ionizing Radiation-implications for low dose risk, *Mutat. Res.* 752 (2013) 84-98
- [8] J. L. Schwartz, Variability: The common factor linking low dose-induced genomic instability, adaptation and bystander effects, *Mutat. Res.* 616 (2007) 196-200.
- [9] K. Aziz , S. Newsheer, G. Pantelias , G. Iliakis , V.G. Gorgoulis , A.G. Georgakilas , Targeting DNA damage and repair: Embracing the pharmacological era for successful cancer therapy , *Pharmacology & Therapeutics* (2012), 334-350
- [10] Ευάγγελος Ν. Γαζής , Ιοντίζουσες Ακτινοβολίες, Φυσική - Εφαρμογές στη Βιολογία & Ιατρική, ΕΜΠ
- [11] Z. Nikitaki, I. V. Mavragani, D. A. Laskaratou, V. Gika, V. P. Moskvin, K. Theofilatos, K. Vougas, R. D. Stewart, A. G. Georgakilas, Systemic mechanisms and effects of ionizing radiation: A new 'old' paradigm of how the bystanders and distant can become the players.

- [12] G. Chatzinikolaou, I. Karakasilioti, G. A. Garinis, DNA damage and innate immunity: links and trade-offs.
- [13] A. G. Georgakilas, P. O'Neill, R. D. Stewart, Induction and Repair of Clustered DNA Lesions: What Do We Know So Far?, *Rad. Res* 180 (2013) 100-109
- [14] E. Gollapalle, R. Wang, R. Adetolu, Doug Tsao, D. Francisco, G. Sigounas, A. G. Georgakilas, Detection of Oxidative Clustered DNA Lesions in X-Irradiated Mouse Skin Tissues and Human MCF-7 Breast Cancer Cells, *Rad. Res* 167 (2007) 207-216
- [15] M. Hada, A.G. Georgakilas, Formation of Clustered DNA damage after high-LET irradiation: A review, *J. Radiat. Res* 49 (2008) 203-210.
- [16], I. V. Mavragani, D. A. Laskaratou, B. Frey, S. M. Candéias, Udo S. Gaipl, K. Lumniczky, A. G. Georgakilas, Key mechanisms involved in ionizing radiation-induced systemic effects: A current review,
- [17], V. Sharma, L. B. Collins, T-H Chen, N. Herr, S. Takeda, W. Sun, J. A. Swenberg, J. Nakamura., Oxidative stress at low levels can induce clustered DNA lesions leading to NHEJ mediated mutations ,
- [18] J. Ventura, H. Forrester, C. N. Sprung, A. Ivashkevich, N. Haynes, A. Smith, A. W. Stevenson, C. J. Hall, J. Palazzolo, N. Best, J. Mason, A. Ntargaras, V. Kotsaris, A. G. Georgakilas, P. Lobachevsky, O. A. Martin, Synchrotron Broad Beam and MRT radiation induces DNA damage in normal mouse tissues distant from the irradiated volume.
- [19] A. G. Georgakilas, A. Pavlopoulos, M. Louka, Z. Nikitaki, C. E. Vorgias, P. G. Bagos, I. Michalopoulos, Emerging molecular networks common in Ionizing Radiation, immune and inflammatory responses by employing bioinformatics approaches.
- [20] S. J. Haikerwal, J. Hagekyriakou, Building immunity to cancer with Radiation Therapy.
- [21] M. Castedo, J.L. Perfettini, T. Roumier, A. Valent, H. Raslova, K. Yakushijin, et al., Mitotic catastrophe constitutes a special case of apoptosis whose suppression entails aneuploidy, *Oncogene* 23 (2004) 4362–4370.
- [22] M.H. Sanders, S.E. Bates, B.S. Wilbur, G.P. Holmquist, Repair Rates of R-band, G-band and C-band DNA in murine and human cultured cells.
- [23], F. Ianzini, A. Bertoldo, E.A. Kosmacek, S.L. Phillips, M.A. Mackey, Lack of p53 function promotes radiation-induced mitotic catastrophe in mouse embryonic fibroblast cells, *Cancer Cell Int.* 6 (2006) 11.

- [24] H. Vakifahmetoglu, M. Olsson, C. Tamm, N. Heidari, S. Orrenius, B. Zhivotovsky, DNA damage induces two distinct modes of cell death in ovarian carcinomas, *Cell Death Differ.* 15 (2008) 555–566.
- [25] D. Eriksson, H.M. Joniani, A. Sheikholvaezin, P.O. Lofroth, L. Johansson, K. Riklund Ahlstrom, et al., Combined low dose radio- and radioimmunotherapy of experimental HeLa Hep 2 tumours, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 30 (2003) 895–906.
- [26] P. Golstein, G. Kroemer, Cell death by necrosis: towards a molecular definition, *Trends Biochem. Sci.* 32 (2007) 37–43
- [27] M.E. Bianchi, DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger, *J. Leukoc. Biol.* 81 (2007) 1–5.
- [28] R. Hennel, N. Brix, K. Seidl, A. Ernst, H. Scheithauer, C. Belka, et al., Release of monocyte migration signals by breast cancer cell lines after ablative and fractionated gamma-irradiation, *Radiat. Oncol.* 9 (2014) 85.
- [29] J. Vakkila, M.T. Lotze, Inflammation and necrosis promote tumour growth, *Nat. Rev. Immunol.* 4 (2004) 641–648.
- [30] S. Palumbo, S. Comincini, Autophagy and ionizing radiation in tumors: the “survive or not survive” dilemma, *J. Cell. Physiol.* 228 (2013) 1–8.
- [31] Y. Deng, S.S. Chan, S. Chang, Telomere dysfunction and tumour suppression: the senescence connection, *Nat. Rev. Cancer* 8 (2008) 450–458.
- [32] R.J. Sabin, R.M. Anderson, Cellular Senescence – its role in cancer and the response to ionizing radiation, *Genome Integr.* 2 (2011) 7.
- [33] F. Rodier, J.P. Coppe, C.K. Patil, W.A. Hoeijmakers, D.P. Munoz, S.R. Raza, et al., Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion, *Nat. Cell Biol.* 11 (2009) 973–979.
- [34] J.P. Coppe, P.Y. Desprez, A. Krtolica, J. Campisi, The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression, *Annu. Rev. Pathol.* 5 (2010) 99–118.
- [35] Ward, J.F. ,Some biochemical consequences of the spatial distribution of ionizing radiation produced free radicals, *Radiat. Res.* 86 (1981) 185-195
- [36] Ward, J.F. , Biochemistry of DNA lesions *Radiat. Res.* 104 (1985) 103-111.
- [37] M. Hada, A.G. Georgakilas, Formation of Clustered DNA damage after high-LET irradiation: a review., *Radiat. Res.* 49 (2008), 203-210
- [38] E.I. Azzam et al., Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Can. Let.* 327 (2012) 48–60

- [39] International Atomic Energy Agency, Radiation Biology, ed. 2010, IAEA
- [40] J. F. Ward, The yield of DNA DSBs produced intercellularly by ionizing radiation: a review, *Int. J. Radiat. Biol.* 57 (1990) 1141-1150.
- [41] M.A. Siddiqi, E.Bothe, Single-and double strand break formation in DNA irradiated in aqueous solution: dependence on dose and OH radical scavenger concentration, *Radiat. Res.* 112 (1987) 449-463.
- [42] M.A. Xapsos, W.K. Pogozelski , Modeling the yield of DSBs due to formation of multiply damaged sites in irradiated plasmid DNA , *Radiat. Res.* 146 (1996) 668-672.
- [43] W.K. Pogozelski, M.A. Xapsos, W.F. Blakely , Quantitative assessment of the contribution of clustered damage to DNA DSBs induced by ⁶⁰Co gamma rays and fission neutrons, *Radiat. Res.* 151 (1999) 442-448.
- [44] D. Sy, C. Savoye, M. Begusova, V. Michalik, M.Charlier, M. Spothem-Maurizot, Sequence dependent variations of DNA structure modulate radiation-induced strand breakage, *Int. J. Radiat. Biol.* 72 (1997) 147-155.
- [45] A.G. Georgakilas, Processing of DNA damage clusters in human cells: current status of knowledge, *Mol. Biosyst.* 4 (2008) 30-35
- [46] J.F.Ward, DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation and repairability, *Prog. Nucleic Acid Res Mol Biol.* 35 (1998) 95-125
- [47] R. Roots, S.Okada, Estimation of life times and diffusion distances of radicals involved in X-ray induced strand breaks of killing of mammalian cells, *Rad. Res.* 64 (1975) 306-320
- [48] J. D. Brenner, J. F. Ward, Constraints on energy deposition and target size of multiple damaged sites associated with DNA DSBs, *Int. J. Rad. Biol* 61 (1992) 737-48
- [49] K. M. Prise, O. V. Belyakov, M. Folkard, A. Ozols, G. Schettino, B. Vojnovic, B. D. Michael, Investigating the cellular effects of isolated radiation tracks using microbeam techniques, *Adv. Space Res.* 30 (2002) 871-876
- [50] G. Randers-Pehrson, C. R. Geard, G. Johnson, C. D. Elliston, D. J. Brenner, The Columbia university single-ion microbeam, *Rad. Res.* 156 (2001) 210-214.
- [51] G. E. Watson, S. A. Lorrimore, D. A. MacDonald, E. G. Wright, Chromosomal instability in unirradiated cells induced in vivo by a bystander effect of I. R. , *Can. Res* 60 (2000) 5608-5611.

- [52] E. I. Azzam, G. P. Raaphorst, R. E. Mitchel, Radiation induced adaptive response for protection against micronucleus formation and neoplastic transformation in C3H 10T1/2 mouse embryo cells, *Rad. Res.* 138 (1994) 28-31
- [53] H. Matsumoto, M. Tomita, K. Otsuka, M. Hatashita, N. Hamada, Nitric oxide is a key molecule serving as a bridge between radiation induced bystander and adaptive responses, *Curr. Mol. Pharmacol.* 4 (2011) 126-134.
- [54] K. M. Prise, J.M. O' Sullivan, Radiation induced bystander signalling in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 9 (2009) 351-360.
- [55] S.C. Formenti, S. Demaria, Systemic effects of local radiotherapy, *Lancet, Oncol.* 10 (2009) 718-726.
- [56] P. J. Bostrom, M. S. Soloway, Secondary cancer after radiotherapy for prostate cancer: should we be more aware of the risk? *Euro Urol.* 52 (2007) 973-982
- [57] G. S. Pant, N, Kamada , Chromosome aberrations in normal leukocytes induced by the plasma of exposed individuals, *Hiroshima J. Med. Sci* 26 (1977) 149-154.
- [58] K Camphausen, M. A. Moses, C. Menard, M. Sproull, W. D. Beecken, J. Folkman, M.S. O' Reilly, Radiation abscopal antitumor effect is mediated through p53, *Can. Res.* 63 (2003) 1990-1993.
- [59] M. A. Khan, J. Van Dyk, I.W. Yeung, R. P. Hill, Partial volume rat lung irradiation; assessment of early damage in different lung regions and effect of radical scavengers, *Radiother. Oncol.* 66 (2003) 95-102.
- [60] V. L. Calveley, M. A. Khan, J. Van Dyk, I.W. Yeung, R. P. Hill, Partial volume rat lung irradiation: temporal fluctuations of in-field and out-of-field DNA damage and inflammatory cytokines following irradiation, *Int. J. Radiat. Biol.* 81 (2005) 887-899.
- [61] K. D. Held, Effects of low fluences of radiations found in space on cellular systems, *Int. J. Radiat. Biol.* 85 (2009) 379-390.
- [62] T. B. Kryston, A. B. Georgiev, P. Pissis, A. G. Georgakilas, Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis, *Mutat. Res.* 711 (2011) 193-201.
- [63] B.M. Hybertson, B. Gao, S.K. Bose, J.M. McCord, Oxidative stress in health & disease : the therapeutic potential of Nrf2 activation, *Mol. Aspects Med.* 32 (2011) 234-46
- [64] S. P. Hussain, L. J. Hofseth, C.C. Harris, Radical causes of cancer, *Nat. Rev. Cancer* 3 (2003) 276-285.
- [65] O. A. Martin, C.E. Redon, A. J. Nakamura, J.S. Dickey, A.G. Georgakilas, W. M. Bonner, Systemic DNA damage related to cancer, *Can. Res.* 71 (2011) 3437-3441.

- [66] M.S. Cooke, M. D. Evans, M. Dizdaroglu, J. Lunec, Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation and disease, *FASEB J.* 17 (2003) 1195-1214.
- [67] O.A. Sedelnikova, C.E. Redon, J.S. Dickey, A. J. Nakamura, A. G. Georgakilas, W.M. Bonner, Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis, *Mutat. Res.* 704 (2010) 152-159
- [68] D.M. Wilson, T.M. Sofinowski, D.R. McNeill, Repair mechanisms for oxidative DNA damage, *Front. Biosci.* 8 (2003) 963-981.
- [69] S. Havaki, A. Kotsinas, E. Chronopoulos, D. Kletsas, A.G. Georgakilas, V.G. Gorgoulis, The role of oxidative DNA damage in RIBE, *Can. Let.* 356 (2015) 43-51.
- [70] M.V. Sokolov, J.S. Dickey, W.M. Bonner, O.A.Sedelnikova, Gamma-H2AX in bystander cells: not just a radiation triggered event, a cellular response to stress mediated by intercellular communication, *Cell Cycle* 6 (2007) 2210-12.
- [71] T.K. Hei, H. Zhou, Y. Chai, B. Ponnaiya, V. N. Ivanov, Radiation induced non-targeted response: mechanism and potential clinical implications, *Curr. Mol. Pharmacol.* 4 (2011) 96-105
- [72] H. Matsumoto, A. Takahashi, T. Ohnishi, Radiation Induced adaptive responses and bystander effects, *Biol. Sci. Space* 18 (2004) 247-254.
- [73] A. Kotsinas, V. Aggarwal, E.J. Tan, B. Levy, V. Gorgoulis, PIG3: a novel link between oxidative stress & DNA damage response in cancer, *Can. Let.* 327 (2012) 97-102.
- [74] T.K. Hei, H. Zhou, V. N. Ivanov M. Hong, H. B. Lieberman, D.J. Brenner et al., Mechanism of RIBE: a unifying model, *J. Pharm. Pharmacol.* 60 (2008) 943-950.
- [75] H. Klammer, E. Mladenov, F. Li, G. Iliakis, Bystander effect as manifestation of intercellular communication of DNA damage and of the cellular oxidative status, *Can. Let.* 356 (2015) 58-71.
- [76] S. Prithivirajsingh, M.D. Story, S.A. Bergh, F.B. Geara, K.K. Ang, S.M. Ismail, et al., Accumulation of the common mitochondrial DNA deletion induced by ionizing radiation, *FEBS Lett.* 571 (2004) 227-232.
- [77] H. Zhou, V. N. Ivanov, Y.C. Lien, M. Davidson, T.K. Hei. Mitochondrial function and nuclear factor-kappaB-mediated signaling in radiation induced bystander effects, *Can. Res.* 68 (2008) 2233-2240
- [78] H. Lee, A. Herrmann, J. H. Deng, M. Kujawski, G. Niu, Z. Li, et al., Persistently activated Stat3 maintains constitutive NF-kappaB activity in tumors, *Cancer Cell* 15 (2009) 283 - 293

- [79] S. I. Grivennikov, M. Karin, Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and cross talk in cancer, *Cytokine Growth factor Rev.* 21 (2010) 11-19.
- [80] K. I. Andarawewa, J. Paupert, A. Pal, M. H. Barcellos-Hoff, New rationales for using TGF beta inhibitors in radiotherapy, *Int. J. Radiat. Biol.* 83 (2007) 803-811.
- [81] V. G. Gorgoulis, T. D. Halazonetis, Oncogene-induced senescence: the bright and dark side of the response, *Curr. Opin. Cell. Biol.* 22 (2010) 816-827
- [82] I. L. Aivaliotis, I. S. Pateras, M. Papaioannou, C. Glytsou, K. Kontzoglou, E. O. Johnson et al., How do cytokines trigger genomic instability? *J. Biomed. Biotechnol.* 2012 (2012) 536761.
- [83] K. Glebova, N. Veiko, S. Kostyuk, V. Izhevskaya, A. Baranova, Oxidized extracellular DNA as a stress signal that may modify response to anticancer therapy, *Can. Let.* 356 (2015) 22-33.
- [84] Heil, M. & Land, W. G. Danger signals – damaged-self recognition across the tree of life. *Front. Plant Sci.* 2014 5:578
- [85] Patel, S.P. , The Inflammatory response to double stranded DNA in endothelial cells is mediated by NFkB and TNFa. *Plosone* 6(5) (2011): e19910
- [86] S. A. Lorrimore, J. A. Chrystal, J. I. Robinson, P. J. Coates, E. G. Wright, Chromosomal instability in unirradiated hematopoietic cells induced by macrophages exposed in vivo to ionizing radiation, *Can. Res.* 68 (2008) 8122-8126.
- [87] S. A. Lorrimore, J. A. Chrystal, J. I. Robinson, D. Mukherjee, E. G. Wright, Long-lived inflammatory signaling in irradiated bone marrow is genome dependent, *Can. Res.* 71 (2011) 6485-91.
- [88] S. A. Lorrimore, P. J. Coates, G. E. Scobie, G. Milne, E. G. Wright, Inflammatory type responses after exposure to ionizing radiation in vivo: a mechanism for RIBEs? *Oncogene* 20 (2001) 7085 – 7095.
- [89] K. Fehsel, V. Kolb-Bachofen, H. Kolb, Analysis of NTE alpha- induced DNA strand breaks at the single cell level, *Am. J. Pathol.* 139 (1991) 251-254.
- [90] P. Vassalli, The pathophysiology of tumor necrosis factors, *Annu. Rev. Immunol.* 10 (1992) 11-452.
- [91] S. Rastogi, P. J. Coates, S. A. Lorrimore, E. G. Wright, Bystander type effects mediated by long-lived inflammatory signaling in irradiated bone marrow, *Radiat. Res.* 177 (2012) 244-250.

- [92] S. Rastogi, P. J. Coates, M. Boylan, E. G. Wright, Interactions of apoptotic cells with macrophages in radiation- induced bystander signaling, *Radiat. Res.* 179 (2013) 135-145.
- [93] T. J. Faber, D. Japnik, M. P. Leers, M. N. Sosef, M.F. von Meyenfeldt, M. Nap, Activated macrophages containing tumor marker in colon carcinoma: immunohistochemical proof of a concept, *Tumour Biol.* 33 (2012) 435-441
- [94] L. A. O' Neill, A critical role for citrate metabolism in LPS signaling, *Biochem J.* 438 (2011) e5-36.
- [95] Y. Zhang, S. Choksi, K. Chen, Y. Pobeziinskaya, I. Linnoila, Z. G. Liu, ROS play a critical role in the differentiation of alternatively activated macrophages and the occurrence of tumor-associated macrophages, *Cell. Res* (2013)
- [96] J. Cadet, T. Douki, D. Gasparutto & J. Ravanat, Oxidative damage to DNA: Formation, measurement and biochemical features. *Mutat. Res.* (2003) 531, 5–23
- [97] P. V. Bennett et al. Endogenous DNA damage clusters in human skin, 3D model and cultured skin cells
- [98] P. V. Bennett, A.G. Georgakilas, B.M. Sutherland, High efficiency detection of bistranded abasic clusters in irradiated DNA by putrescine, *Nucleic Acids Res.* 30 2800-2808.
- [99] Μαργαρίτης Λ.Χ. Γαλανόπουλος Β.Κ., Κεραμάρης Κ.Ε. , Μαρίνος Ε.Σ., Παπασιδέρη Ι.Σ., Στραβοπόδης Δ.Ι., Τρουγκάκος Ι.Π., Βιολογία Κυττάρου, Λίτσας Ο.Ε., 2008, 295-324
- [100] K.M. Schermerhorn, S. Delaney, A chemical and kinetic perspective on Base excision repair of DNA, *Acc. Chem. Res* 47 (2014) 1238-1246
- [101]

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

1) Ιστός Ωοθηκών

a) Ιστοί από ωοθήκες μετά από επώαση με hOGG1

ο Πειραματικά αποτελέσματα

Δείγμα	Δόση και Τεχνική ακτινοβολήσης	Χρονικό Σημείο	1ο πείραμα Clusters/Gbp	2ο πείραμα Clusters/Gbp	Μέση Τιμή Clusters/Gbp
1.10	10 Gy MRT 2x2	24h	3370,48	3977,08	3673,78
1.20			3018,51	3549,15	3283,83
1.3 ^ο			3978,32	2087,80	3033,06
1.4 ^ο			2194,06	3372,57	2783,32
1.5 ^ο			2584,48	2339,79	2462,14
2.1 ^ο		96h	3062,05	2911,95	2987,00
2.2 ^ο				4031,24	4031,24
2.3 ^ο			3272,85	2371,31	2822,08
2.4 ^ο			3085,03	2839,97	2962,50
2.5 ^ο			1951,88	3085,72	2518,80
3.1 ^ο	40Gy MRT 2x2	24h	2237,16	2946,95	2592,06
3.2 ^ο			3100,33		3100,33
3.3 ^ο				2477,45	2477,45
3.4 ^ο				2852,17	2852,17
3.5 ^ο				3349,13	3349,13
4.1 ^ο		96h	2541,14	2232,74	2386,94
4.20				2740,76	2740,76
4.30			2615,54	3483,44	3049,49
4.40				3774,31	3774,31
4.50				3114,18	3114,18
5.10	10 Gy MRT 8x8	24h		3393,92	3393,92
5.20			3616,25	2722,60	3169,42
5.30			3445,41	3977,40	3711,40
5.40			3015,32	2263,13	2639,23
5.50			3800,53	2441,43	3120,98
6.10		96h	1467,00	3592,05	2529,53
6.20			4076,07	2259,79	3167,93
6.30			3416,38	3455,12	3435,75
6.40		2142,19	2577,84	2360,02	

6.50			2303,55	3019,45	2661,50
7.10	40 Gy MRT 8x8	24h	1702,09	3274,89	2488,49
7.20				2994,73	2994,73
7.30			3957,14	2833,92	3395,53
7.40			1936,74	2905,73	2421,23
7.50				3651,78	3651,78
8.10		96h	1933,62	2324,18	2128,90
8.20				3485,68	3485,68
8.30			2436,67	2553,91	2495,29
8.40				2871,49	2871,50
8.50					
9.10	10 Gy BB 2x2	24h	5152,10	3205,11	4178,60
9.20			1962,80	2741,80	2352,30
9.30			2974,03	2301,64	2637,84
9.4 ⁰			3399,41	3120,90	3260,15
9.50			3433,69	2926,44	3180,07
10.10		96h	1939,19	2136,14	2037,66
10.20			3332,99	3529,77	3431,38
10.30			2213,40	3029,13	2621,26
10.40			4471,75	2587,34	3529,55
10.50			3721,73	3144,72	3433,23
11.10	40 Gy BB 2x2	24h	3776,99	3012,14	3394,56
11.20			2750,07	2559,95	2655,01
11.30				2768,41	2768,41
11.40				3318,85	3318,85
11.50			3182,54	2286,66	2734,60
12.10		96h		3192,84	3192,84
12.20			3058,63	2461,74	2760,19
12.30			3548,78	2539,82	2799,23
12.40			2565,29	3512,29	3038,79
12.50				3858,82	3858,82
13.10	10 Gy BB 8x8	24h	2397,16	2335,78	2366,47
13.20				3715,71	3715,71
13.30			2655,92	2623,76	2639,84
13.40				4037,32	4037,32
13.50			3609,51	2600,36	3104,93
14.10		96h		2285,23	2285,23

14.20				3642,11	3642,11
14.30				3307,97	3307,97
14.40			3188,67	3459,65	3324,16
14.50			3924,35	2163,02	3043,68
15.10	40 Gy BB 8x8	24h	3937,19	2487,95	3212,57
15.20			2739,30	3498,86	3119,08
15.30			2542,86	3359,44	2951,15
15.40			2761,17	3229,24	2995,20
15.50				3052,10	3052,10
16.10		96h		2955,82	2955,83
16.20				2569,10	2569,10
16.30				3395,63	3395,63
16.40			2300,66	3471,79	2886,23
16.50			2437,71	2962,17	2699,94
17.10	10 Gy BB 8x1	24h	2437,71	3457,75	2947,73
17.20			2432,95	3171,86	2802,41
17.30				2821,64	2821,64
17.40			3094,61	3201,48	3148,05
17.50			1645,96	2960,35	2303,15
18.10		96h	2403,64	3156,47	2780,06
18.20			1927,59	3473,29	2700,44
18.30			2820,29	2619,88445	2720,08
18.40			2227,01	2713,80	2470,40
18.50			1671,06	3503,85	2587,45
19.10	40 Gy BB 8x1	24h	2516,68	3733,76	3125,22
19.20					
19.30			2169,26	2993,54	2581,40
19.40			2601,15	3205,58	2903,37
19.50			2895,39	2902,22	2898,80
20.10		96h	3812,30	2923,54	3367,92
20.20					
20.30			2303,25	2987,12	2645,19
20.40				3303,16	3303,16
20.50			3604,30	2462,80	3033,65
21.10	Μη ακτινοβολημέν η ομάδα		697,83	1261,59	979,71
21.20			1628,53	1262,95	1445,74
21.30			2066,19	858,20	1462,20

21.40				1086,22	1086,22
21.50				1118,86	1118,87

- Μέση τιμή ομάδας και αποτελέσματα t-test

Δείγμα	Δόση και τεχνική ακτινοβολήσης	Χρονικό σημείο	hogg1 enzyme		p-value
			Μέση τιμή ομάδας Clusters/Gbp	Std Error	
1.10	10 Gy MRT 2x2	24 hr	3673,778065	207,45	0,000
1.20			3283,831111		
1.30			3033,06005		
1.40			2783,316109		
1.50			2462,139521		
2.10		96 hr	2986,995604	255,690805	
2.20			4031,24453		
2.30			2822,083136		
2.40			2962,498204		
2.50			2518,804403		
3.10	40 Gy MRT 2x2	24 hr	2592,058391	160,34217	0,000
3.20			3100,334278		
3.30			2477,450973		
3.40			2852,173747		
3.50			3349,128087		
4.10		96 hr	2386,940928	229,915254	
4.20			2740,764466		
4.30			3049,494079		
4.40			3774,307836		
4.50			3114,17801		
5.10	10 Gy MRT 8x8	24 hr	3393,923431	176,144873	0,000
5.20			3169,424622		

5.30			3711,406003	202,568979	0,000
5.40			2639,22944		
5.50			3120,98127		
6.10		96 hr	2529,528201		
6.20			3167,9323		
6.30			3435,74661		
6.40			2360,016042		
6.50			2661,498162		
7.10	40 Gy MRT 8x8	24 hr	2488,489655	242,635505	0,000
7.20			2994,732422		
7.30			3395,529742		
7.40			2421,230791		
7.50		3651,779855			
8.10	96 hr	2128,900046	289,616685	0,001	
8.20		3485,676078			
8.30		2495,292074			
8.40		2871,491503			
8.50					
9.10	10 Gy BB 2x2	24 hr	4178,603735	313,50648	0,000
9.20			2352,299072		
9.30			2637,834694		
9.40			3260,157311		
9.50			3180,069048		
10.10		96 hr	2037,664377	293,527284	0,002
10.20			3431,381725		
10.30			2621,262251		
10.40			3529,548038		
10.50			3433,226779		
11.10	40 Gy BB 2x2	24 hr	3394,56455	157,659148	0,000
11.20			2655,011858		
11.30			2768,409083		
11.40			3318,850555		
11.50		2734,602743			
12.10	96 hr	3192,842064	198,698759	0,000	
12.20		2760,186779			
12.30		2799,226637			
12.40		3038,786931			
12.50		3858,822442			
13.10	10 Gy BB	24 hr	2366,471989	314,719007	0,002

13.20	8x8		3715,711619		
13.30			2639,836102		
13.40			4037,315362		
13.50			3104,933462		
14.10			2285,232563		
14.20	96 hr	3642,110723	229,376867	0,000	
14.30		3307,97437			
14.40		3324,161188			
14.50		3043,681586			
15.10		3212,570369			
15.20	24 hr	3119,081734	46,2040918	0,000	
15.30		2951,150111			
15.40		2995,202665			
15.50		3052,10536			
16.10		2955,826577			
16.20	96 hr	2569,095558	141,150189	0,000	
16.30		3395,629945			
16.40		2886,230341			
16.50		2699,941113			
17.10		2947,730897			
17.20	24 hr	2802,411121	139,6756	0,000	
17.30		2821,643741			
17.40		3148,046075			
17.50		2303,153569			
18.10		2780,059023			
18.20	96 hr	2700,440049	55,0109059	0,000	
18.30		2720,085259			
18.40		2470,404088			
18.50		2587,453493			
19.10		3125,219438			
19.20	24 hr		111,864011	0,000	
19.30		2581,400081			
19.40		2903,367817			
19.50		2898,803109			
20.10		3367,921929			
20.20	96 hr		164,236996	0,000	
20.30		2645,186011			
20.40		3303,156019			
20.50		3033,649745			

21.10	Μη- ακτινοβολημένη ομάδα		979,7127414	98,8611611	
21.20			1445,740254		
21.30			1462,196225		
21.40			1086,216149		
21.50			1118,869486		

b) Ιστοί από ωοθήκες μετά από επώαση σε APE1

ο Πειραματικά αποτελέσματα

Δείγμα	Δόση και τεχνική ακτινοβολήσης	Χρονικό σημείο	Μέση τιμή ομάδας Clusters/Gbp	Standard Error	p-value
1.10	10 Gy MRT 2x2	24 hr	1967,419	70,962	0,000
1.20			2164,878		
1.30			1927,572		
1.40			1959,971		
1.50			2291,568		
2.10		96 hr	2148,256	149,425	0,000
2.20			1348,604		
2.30			2012,892		
2.40			2148,575		
2.50			1819,701		
3.10	40 Gy MRT 2x2	24 hr	2226,961	49,281	0,000
3.20			2041,506		
3.30			2087,111		
3.40			1925,095		
3.50			2022,299		
4.10		96 hr	1622,337	67,463	0,000
4.20			1870,524		
4.30			1885,483		
4.40			1869,004		
4.50			2043,620		
5.10	10 Gy MRT 8x8	24 hr	1537,901	109,217	0,000
5.20			2118,224		

5.30			2144,804		
5.40			1986,914		
5.50			1908,786		
6.10			1997,149		
6.20			2197,281		
6.30		96 hr	1873,412	66,938	0,000
6.40			1817,573		
6.50			1895,006		
7.10			2178,433		
7.20			1950,776		
7.30		24 hr	1856,130	73,733	0,000
7.40			2112,323		
7.50	40 Gy MRT 8x8		2257,706		
8.10			1684,207		
8.20			1996,780		
8.30		96 hr	2045,922	80,264	0,000
8.40			1888,167		
8.50					
9.10			1711,415		
9.20			2318,687		
9.30		24 hr	2262,282	108,281	0,000
9.40			2099,433		
9.50	10 Gy BB 2x2		2206,077		
10.10			2159,725		
10.20			1938,834		
10.30		96 hr	1814,629	72,547	0,000
10.40			2103,157		
10.50			2201,160		
11.10			2125,159		
11.20			1955,835		
11.30		24 hr	2152,527	86,306	0,000
11.40			2089,677		
11.50	40 Gy BB 2x2		1683,674		
12.10			1704,909		
12.20			1903,748		
12.30		96 hr	2010,176	55,289	0,000
12.40			1948,057		
12.50			1997,130		
13.10	10 Gy BB	24 hr	2223,436	78,742	0,000

13.20	8x8		2003,491	54,184	0,000
13.30			2229,354		
13.40			1907,401		
13.50			1851,238		
14.10		96 hr	2242,036		
14.20			1904,695		
14.30			2078,165		
14.40			2026,742		
14.50			2071,498		
15.10		40 Gy BB 8x8	24 hr		
15.20	1739,506				
15.30	1827,777				
15.40	1975,111				
15.50	2265,667				
16.10	96 hr		1964,071		
16.20			2061,212		
16.30			1855,828		
16.40			1934,332		
16.50			1375,114		
17.10	10 Gy BB 8x1	24 hr	1813,751	38,861	0,000
17.20			1857,279		
17.30			1818,718		
17.40			1832,770		
17.50			2021,226		
18.10		96 hr	1698,740		
18.20			2083,000		
18.30			2100,434		
18.40			2328,062		
18.50			1809,603		
19.10	40 Gy BB 8x1	24 hr	1839,528	76,750	0,000
19.20					
19.30			2077,980		
19.40			1827,465		
19.50			2117,527		
20.10		96 hr	2313,597		
20.20					
20.30			2284,638		
20.40			1546,132		
20.50			1735,845		
			193,982	0,014	

21.10	Μη ακτινοβολημένη ομάδα		943,770	44,133	
21.20			970,331		
21.30			1160,277		
21.40			930,306		
21.50			1075,094		

ο Μέση τιμή ομάδας και αποτελέσματα t-test

Δείγμα	Δόση και τεχνική ακτινοβολήσης	Χρονικό σημείο	Μέση τιμή ομάδας Clusters/Gbp	Standard Error	p-value
1.10	10 Gy MRT 2x2	24 hr	1967,419	70,962	0,000
1.20			2164,878		
1.30			1927,572		
1.40			1959,971		
1.50			2291,568		
2.10		96 hr	2148,256	149,425	0,000
2.20			1348,604		
2.30			2012,892		
2.40			2148,575		
2.50			1819,701		
3.10	40 Gy MRT 2x2	24 hr	2226,961	49,281	0,000
3.20			2041,506		
3.30			2087,111		
3.40			1925,095		
3.50			2022,299		
4.10		96 hr	1622,337	67,463	0,000
4.20			1870,524		
4.30			1885,483		
4.40			1869,004		
4.50			2043,620		
5.10	10 Gy MRT 8x8	24 hr	1537,901	109,217	0,000
5.20			2118,224		
5.30			2144,804		

5.40			1986,914		
5.50			1908,786		
6.10		96 hr	1997,149	66,938	0,000
6.20			2197,281		
6.30			1873,412		
6.40			1817,573		
6.50			1895,006		
7.10	40 Gy MRT 8x8		24 hr	2178,433	73,733
7.20		1950,776			
7.30		1856,130			
7.40		2112,323			
7.50		2257,706			
8.10		96 hr	1684,207	80,264	0,000
8.20			1996,780		
8.30			2045,922		
8.40			1888,167		
8.50					
9.10	10 Gy BB 2x2	24 hr	1711,415	108,281	0,000
9.20			2318,687		
9.30			2262,282		
9.40			2099,433		
9.50			2206,077		
10.10		96 hr	2159,725	72,547	0,000
10.20			1938,834		
10.30			1814,629		
10.40			2103,157		
10.50			2201,160		
11.10	40 Gy BB 2x2	24 hr	2125,159	86,306	0,000
11.20			1955,835		
11.30			2152,527		
11.40			2089,677		
11.50			1683,674		
12.10		96 hr	1704,909	55,289	0,000
12.20			1903,748		
12.30			2010,176		
12.40			1948,057		
12.50			1997,130		
13.10	10 Gy BB 8x8	24 hr	2223,436	78,742	0,000
13.20			2003,491		

13.30			2229,354		
13.40			1907,401		
13.50			1851,238		
14.10		96 hr	2242,036	54,184	0,000
14.20			1904,695		
14.30			2078,165		
14.40			2026,742		
14.50			2071,498		
15.10	40 Gy BB 8x8	24 hr	1920,842	89,522	0,000
15.20			1739,506		
15.30			1827,777		
15.40			1975,111		
15.50			2265,667		
16.10		96 hr	1964,071	120,328	0,000
16.20			2061,212		
16.30			1855,828		
16.40			1934,332		
16.50			1375,114		
17.10	10 Gy BB 8x1	24 hr	1813,751	38,861	0,000
17.20			1857,279		
17.30			1818,718		
17.40			1832,770		
17.50			2021,226		
18.10		96 hr	1698,740	112,145	0,000
18.20			2083,000		
18.30			2100,434		
18.40			2328,062		
18.50			1809,603		
19.10	40 Gy BB 8x1	24 hr	1839,528	76,750	0,000
19.20					
19.30			2077,980		
19.40			1827,465		
19.50			2117,527		
20.10		96 hr	2313,597	193,982	0,014
20.20					
20.30			2284,638		
20.40			1546,132		
20.50			1735,845		
21.10	Mn		943,770	44,133	

21.20	ακτινοβολημένη ομάδα		970,331		
21.30			1160,277		
21.40			930,306		
21.50			1075,094		

2. Ιστός σπλήνας

- ο Πειραματικά αποτελέσματα μετά από επώαση σε ένζυμο hAPE1

Δείγμα	Δόση και τεχνική ακτινοβολήσης	Χρονικό σημείο	1ο πείραμα Clusters/Gbp	2ο πείραμα Clusters/Gbp	Μέση τιμή Clusters/Gbp
1.1S	10 Gy MRT 2x2	24 hr	1671,67	1690,65	1681,16
1.2S			2501,8	1865,71	2183,76
1.3S			1155,9	2097,36	1626,63
1.4S			1004,05		1004,05
1.5S			1867,66		1867,66
2.1S		96 hr	1608,82	2022,62	1815,72
2.2S			1236,92	1649,69	1443,31
2.3S			1498,78	1580,36	1539,57
2.4S			1666,64		1666,64
2.5S					
3.1S	40 Gy MRT 2x2	24 hr	1690,51		1690,51
3.2S			1486,48	1328,66	1407,57
3.3S			1694,46	2537,52	2115,99
3.4S			1335,25	1644,5	1489,87

3.5S		96 hr	2769,69	1328,18	2048,94
4.1S			3037,66	1203,88	2120,77
4.2S			2614,67	2070,16	2342,41
4.3S			2376,89	1211,07	1793,98
4.4S			2677,62	1808,72	2243,17
4.5S			3554,27		3554,27
5.1S	10 Gy MRT 8x8	24 hr	1196,66	1353,66	1275,16
5.2S			1544,44	1930,55	1737,5
5.3S			1310,5	1460,32	1385,41
5.4S			1542,68	1500,79	1521,73
5.5S			1382,74	2286,73	1834,74
6.1S			96 hr	1123,23	1616,13
6.2S					
6.3S	1859,08			1859,08	
6.4S	1618,9	1982,77		1800,83	
6.5S	1086,73	1546,15		1316,44	
7.1S	40 Gy MRT 8x8	24 hr		1441,28	1592,34
7.2S			1341,6	2076,65	1709,12
7.3S					
7.4S			1987,76	2684,89	2336,33
7.5S			1115,37	1523,91	1319,64
8.1S			96 hr	1355,28	1605,48
8.2S	1509,58	2126,96		1818,27	
8.3S	1179,98			1179,98	
8.4S	1712,91			1712,91	
8.5S	1110,02			1110,02	
9.1S	10 Gy BB 2x2	24 hr		1874,85	1436,7
9.2S			1717,89		1717,89
9.3S			1518,47		1518,47
9.4S			2326,03	2125,54	2225,79
9.5S			2369,37	2510,7	2440,04
10.1S			96 hr	2272,81	
10.2S	1487,08			1487,08	
10.3S	1838,87	819,86		1329,36	
10.4S	2313,2	1500,99		1907,1	
10.5S	1239,36	1880,53		1559,95	
11.1S	40 Gy BB	24 hr			

11.2S	2x2		2088,77		2088,77
11.3S			1852,38		1852,38
11.4S			2304,97	2549,7	2427,34
11.5S			2091,34	2443,62	2267,48
12.1S			1882,95	937,065	1410,01
12.2S		2333,07		2333,07	
12.3S		2097,51	3156,2	2626,86	
12.4S		1387,23	2608,44	1997,83	
12.5S		1569,11	1200,46	1384,78	
13.1S		10 Gy BB 8x8	24 hr	1523,58	
13.2S	1078,36				1078,36
13.3S	1889,89				1889,89
13.4S	1182,31			1858,92	1520,62
13.5S	1501,13				1501,13
14.1S	96 hr		1943,99	1835,15	1889,57
14.2S			2035,83		2035,83
14.3S				839,595	839,595
14.4S			2490,21		2490,21
14.5S			1428,34		1428,34
15.1S	40 Gy BB 8x8	24 hr		937,93	937,93
15.2S			898,644	596,299	747,471
15.3S			1554,46		1554,46
15.4S			1007,56		1007,56
15.5S					
16.1S		96 hr			
16.2S			1728,77		1728,77
16.3S			1021,71	2155,39	1588,55
16.4S			1148,92	1639,6	1394,26
16.5S			1523,94	2329,07	1926,5
17.1S	10 Gy BB 8x1	24 hr	1457,65	2531,81	1994,73
17.2S			1095,63	1664,27	1379,95
17.3S			1872,26	1534,04	1703,15
17.4S			1123,69	2211,15	1667,42
17.5S			1410,75	1957,66	1684,2
18.1S		96 hr	1945,86	1474,7	1710,28
18.2S			2070,01		2070,01
18.3S			1278,83		1278,83

18.4S			1183,15	1655,73	1419,44
18.5S			1455,41		1455,41
19.1S	40 Gy BB 8x1	24 hr	1618,41		1618,41
19.2S			1947,22		1947,22
19.3S			1268,3	1829,48	1548,89
19.4S			1807,83		1807,83
19.5S			1475,57	1786,84	1631,2
20.1S		96 hr	1701,68		1701,68
20.2S			1317,72		1317,72
20.3S			1015,23	2226,03	1620,63
20.4S			1406,99		1406,99
20.5S			1525,97	1240,62	1383,29
21.1S	Μη ακτινοβολημένη ομάδα		710,065	972,567	841,316
21.2S			1011,27	795,064	903,167
21.3S			970,964	517,688	744,326
21.4S			1053,2		1053,2
21.5S			1072,43		1072,43

- ο Μέση τιμή ομάδας και αποτελέσματα t-test

Δείγμα	Δόση & τεχνική ακτινοβολήσης	Χρονικό σημείο	Μέση τιμή ομάδας Clusters/Gbp	Standard Error	p-value
1.1S	10 Gy	24 hr	1681,16	193,45	0,006
1.2S			2183,76		
1.3S			1626,63		

1.4S			1004,05	130,77	0,004
1.5S			1867,66		
2.1S		96 hr	1815,72		
2.2S			1443,30		
2.3S			1539,57		
2.4S			1666,64		
2.5S	1041,98				
3.1S	40 Gy	24 hr	1690,51	143,49	0,001
3.2S			1407,56		
3.3S			2115,99		
3.4S			1489,87		
3.5S			2048,94		
4.1S		96 hr	2120,77	300,41	0,001
4.2S			2342,41		
4.3S			1793,98		
4.4S			2243,17		
4.5S			3554,27		
5.1S	10 Gy	24 hr	1275,16	104,80	0,001
5.2S			1737,49		
5.3S			1385,41		
5.4S			1521,73		
5.5S			1834,74		
6.1S		96 hr	1369,68	141,48	0,012
6.2S					
6.3S			1859,08		
6.4S			1800,83		
6.5S			1316,44		
7.1S	40 Gy	24 hr	1516,81	220,14	0,006
7.2S			1709,12		
7.3S					
7.4S			2336,32		
7.5S			1319,64		
8.1S		96 hr	1480,38	140,29	0,008
8.2S			1818,27		
8.3S			1179,97		
8.4S			1712,91		
8.5S			1110,02		

9.1S	10 Gy	24 hr	1655,77	178,25	0,003
9.2S			1717,89		
9.3S			1518,47		
9.4S			2225,79		
9.5S			2440,03		
10.1S		96 hr	2272,81	169,22	0,002
10.2S			1487,08		
10.3S			1329,36		
10.4S			1907,09		
10.5S			1559,95		
11.1S	40 Gy	24 hr		123,40	0,000
11.2S			2088,77		
11.3S			1852,38		
11.4S			2427,34		
11.5S			2267,48		
12.1S		96 hr	1410,00	246,80	0,012
12.2S			2333,07		
12.3S			2626,86		
12.4S			1997,83		
12.5S			1384,78		
13.1S	10 Gy	24 hr	1523,58	128,60	0,004
13.2S			1078,36		
13.3S			1889,89		
13.4S			1520,62		
13.5S			1501,12		
14.1S		96 hr	1889,57	281,11	0,043
14.2S			2035,83		
14.3S			839,59		
14.4S			2490,21		
14.5S			1428,34		
15.1S	40 Gy	24 hr	937,93	173,16	0,435
15.2S			747,47		
15.3S			1554,46		
15.4S			1007,56		
15.5S					
16.1S		96 hr		112,35	0,001
16.2S			1728,77		

16.3S			1588,55		
16.4S			1394,26		
16.5S			1926,50		
17.1S	10 Gy	24 hr	1994,73	97,37	0,000
17.2S			1379,95		
17.3S			1703,15		
17.4S			1667,42		
17.5S			1684,20		
18.1S		96 hr	1710,28	139,44	0,002
18.2S			2070,01		
18.3S			1278,83		
18.4S			1419,43		
18.5S			1455,41		
19.1S	40 Gy	24 hr	1618,41	72,94	0,000
19.2S			1947,22		
19.3S			1548,89		
19.4S			1807,83		
19.5S			1631,20		
20.1S		96 hr	1701,68	74,08	0,000
20.2S			1317,72		
20.3S			1620,63		
20.4S			1406,99		
20.5S			1383,29		
21.1S	Μη ακτινοβολημένη ομάδα		841,32	62,56	
21.2S			903,16		
21.3S			744,33		
21.4S			1053,20		
21.5S			1072,43		

