



Σχολή Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και  
Φυσικών Επιστημών  
ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

### ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Ταχεία εκτίμηση δόσεων με τη μέθοδο της  
πρόωρης χρωμοσωματικής συμπύκνωσης  
λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος μετά από  
έκθεση σε ιοντίζουσες ακτινοβολίες»**

ΔΡΕΜΟΥΡΑ Ε. ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή: Καθηγ. Ευάγγελος Γαζής (Επιβλέπων)

Αν. Καθηγ. Σταύρος Μαλτέζος

Δρ Γεωργία Τερζούδη, Ερευνήτρια Β΄

Αθήνα 2016

# Περιεχόμενα

Περίληψη.....	
Εισαγωγή.....	
Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1. Βασικές αρχές Κυτταρικής Βιολογίας .....	σελ 1
1.1 Το DNA.....	1
1.2 Ο κυτταρικός κύκλος.....	4
2. Ιοντίζουσα ακτινοβολία.....	6
2.1 Αλληλεπίδραση ιοντιζουσών ακτινοβολιών με την ύλη.....	6
2.1.1 Αλληλεπίδραση βαρέων φορτισμένων σωματιδίων με την ύλη.....	6
2.1.2 Αλληλεπίδραση ηλεκτρονίων/ποζιτρονίων με την ύλη.....	8
2.1.3 Αλληλεπίδραση γ,Χ-ακτινοβολίας με την ύλη.....	9
2.1.4 Αλληλεπίδραση νετρονίων με την ύλη.....	13
2.2 Βιολογική επίπτωση ιοντιζουσών ακτινοβολιών στο ανθρώπινο κύτταρο.....	14
2.2.1 Σχετική Βιολογική Επίπτωση (Relative Biological Effectiveness) RBE.....	15
2.2.2 Γραμμική Μεταφορά Ενέργειας (Linear Emission Transfer) LET.....	16
3. Βιολογικά αποτελέσματα σε κυτταρικό επίπεδο.....	18
3.1 Γονιδιακές μεταλλάξεις.....	19
3.2 Χρωμοσωματικές αλλοιώσεις.....	19
3.3 Σκέψεις για περαιτέρω μελέτη των βιολογικών βλαβών.....	21
3.4 Κυτταρικός θάνατος.....	22
3.5 Καμπύλες κυτταρικής επιβίωσης και μαθηματικά μοντέλα.....	23
3.6 Παράγοντες που μεταβάλλουν τις βιολογικές επιδράσεις της ιοντίζουσας ακτινοβολίας.....	26
4. Βιολογική Δοσιμετρία.....	29
4.1 Δοσιμετρία- Χαρακτηριστικά μεγέθη.....	29

4.2 Το ιδανικό βιολογικό δοσίμετρο.....	30
4.3 Τα λεμφοκύτταρο ως βιολογικό δοσίμετρο.....	30
4.4 Η κλασσική κυτταρογενετική μέθοδος βιοδοσιμετρίας (Dicentric method).....	31
4.5 Η μέθοδος της πρόωρης χρωμοσωματικής συμπύκνωσης (Premature Chromosome Condensation) PCC.....	36
4.6 Άλλες κυτταρογενετικές μέθοδοι Βιοδοσιμετρίας.....	39
4.6.1 GTG-ζώνωση.....	39
4.6.2 Η μέθοδος FISH (Fluorescent in situ Hybridization).....	40
<b>B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	
Εισαγωγή.....	45
1. Ραδιενεργές πηγές και συνθήκες ακτινοβολήσης.....	46
2. Dicentric method- Μέθοδοι και υλικά.....	48
2.1 Κυτταρική καλλιέργεια ακτινοβολημένων δειγμάτων.....	48
2.2 Απομόνωση λεμφοκυττάρων και μονιμοποίηση σε slides.....	48
2.3 Χρώση χρωμοσωμάτων.....	49
3. PCC method- Μέθοδοι και υλικά.....	50
3.1 Κυτταρική ανακαλλιέργεια CHO κυττάρων.....	50
3.2 Απομόνωση λεμφοκυττάρων.....	50
3.3 Σύντηξη CHO με τα λεμφοκύτταρα.....	51
3.4 Μονιμοποίηση σε slides- χρώση χρωμοσωμάτων.....	52
4. Ανάλυση κυτταρικών παρασκευασμάτων.....	53
5. Πειραματικά Αποτελέσματα.....	56
5.1 Πρώτη σειρά πειραμάτων : 22/10/14 (dicentric method- known dose)- Χάραξη καμπύλης απόκρισης-δόσης.....	56
5.1.1 Σκοπός.....	56
5.1.2 Αποτελέσματα.....	56

5.2 Δεύτερη σειρά : 14/10/14 (dicentric method- unknown dose).....	62
5.2.1 Σκοπός.....	62
5.2.2 Αποτελέσματα.....	62
5.3 Τρίτη σειρά : 14/10/14 (PCC method- known dose).....	67
5.3.1 Σκοπός.....	67
5.3.2 Αποτελέσματα.....	67
5.4 Τέταρτη σειρά : 14/10/14 (PCC method- unknown dose).....	75
5.4.1 Σκοπός.....	75
5.4.2 Αποτελέσματα.....	75
6. Συμπεράσματα.....	83
Βιβλιογραφία.....	85
Παράρτημα 1.....	87
Παράρτημα 2.....	99

# Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Υγαιοφυσικής, Ραδιοβιολογίας και Κυτταρογενετικής του Ινστιτούτου Πυρηνικών και Ραδιοβιολογικών Επιστημών στο Ε.Κ.Ε.Φ.Ε «Δημόκριτος» σε συνεργασία με τη σχολή Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου (συγκεκριμένα του τομέα Φυσικής της Σχολής). Την επίβλεψη της εργασίας είχε η Δρ. Γεωργία Τερζούδη κατά τα ακαδημαϊκά έτη 2014-15 και 2015-16 την οποία θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά για την πολύτιμη και καθοριστική βοήθειά της καθ' όλη τη διάρκεια τόσο στην κατανόηση των μεθόδων και όλων των βιολογικών παραμέτρων όσο και στη διεξαγωγή του πειραματικού μέρους στο εργαστήριο.

Με εκτίμηση ευχαριστώ τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Ε. Γαζή, χάρη στην προθυμία του οποίου μου δόθηκε η δυνατότητα να ασχοληθώ με το αντικείμενο αυτό, ιδιαίτερα στο εργαστήριο του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε «Δημόκριτος».

Ξεχωριστή σημασία για μένα όλο το προηγούμενο διάστημα είχε η κατανόηση που έδειξαν και οι δύο επιβλέποντες στα προσωπικά και οικογενειακά προβλήματα που προέκυψαν και στάθηκαν αιτία για την καθυστέρηση στην ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Ευχαριστώ, επίσης, τον κ. Γ. Παντελιά για τη δυνατότητα που μου έδωσε να παρακολουθήσω μέρος της δουλειάς του κατά το έτος 2014-15 που σχετιζόταν με πρόσθετες μεθόδους και τεχνικές βιοδοσιμετρίας οι οποίες αν και δεν είναι αντικείμενο μελέτης στον παρόν κείμενο, με βοήθησαν να αποκτήσω πιο ολοκληρωμένη εικόνα για τους επιστημονικούς δρόμους που ανοίγει η Βιολογική δοσιμετρία ιοντιζουσών ακτινοβολιών.

Ιδιαίτερη συνεισφορά και αμέριστη βοήθεια παρείχε όλο το επιστημονικό προσωπικό του εργαστηρίου που με προθυμία έλυσαν κάθε τεχνική δυσκολία ή δική μου απειρία όπως για παράδειγμα στη χρήση του οπτικού μικροσκοπίου.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου και τους πολύ καλούς μου φίλους που στέκονται πάντα στο πλευρό μου με δύναμη και αισιοδοξία στις δύσκολες και τις χαρμόσυνες καμπές της ζωής. Η παρούσα εργασία είναι αφιερωμένη σε εκείνους αλλά και σε όσους χάθηκαν πρόωρα και δεν πρόλαβαν να τη δουν να ολοκληρώνεται.

# Περίληψη

Λόγω της εκτεταμένης χρήσης των ακτινοβολιών στην Ιατρική, στη Βιομηχανία και σε άλλους επιστημονικούς τομείς, έχει αναπόφευκτα αυξηθεί ο αριθμός των εκτιθεμένων ατόμων καθώς και η πιθανότητα εμφάνισης των δυσμενών επιπτώσεων που εγκυμονούν τυχόν υπερεκθέσεις στις ιοντίζουσες ακτινοβολίες. Αναδεικνύεται ως αναγκαιότητα επομένως η ανάπτυξη αξιόπιστων βιολογικών μεθόδων δοσιμετρίας για την ταχεία εκτίμηση της απορροφούμενης δόσης που αποτελεί προτεραιότητα σε περιπτώσεις έκτακτης ανάγκης ιατρικής περίθαλψης των εκτιθεμένων ατόμων.

Η κλασική μέθοδος βιοδοσιμετρίας απαιτεί ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος και καλλιέργεια 48 ωρών πριν την προετοιμασία χρωμοσωματικών παρασκευασμάτων για την ανάλυση των επαγόμενων από την ακτινοβολία δικεντρικών χρωμοσωμάτων. Το γεγονός αυτό αποτελεί το βασικότερο μειονέκτημά της καθότι δεν ικανοποιεί την ανάγκη ταχείας εκτίμησης της απορροφούμενης δόσης σε περιπτώσεις υπερέκθεσης σε ιοντίζουσες ακτινοβολίες.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, που εκπονήθηκε στο εργαστήριο Υγειοφυσικής, Ραδιοβιολογίας και Κυτταρογενετικής του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», εξετάζεται η μέθοδος της πρόωρης χρωμοσωματικής συμπύκνωσης (Premature Chromosome Condensation- PCC) ως εναλλακτική μέθοδος βιοδοσιμετρίας. Η μέθοδος PCC επιτυγχάνεται με την κυτταρική σύντηξη των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος με μιτωτικά κύτταρα Χάμστερ και επιτρέπει την άμεση ανάλυση των χρωμοσωματικών αλλοιώσεων στα λεμφοκύτταρα για την εκτίμηση της δόσης εντός δύο ωρών από τη λήψη του αίματος.

Συγκεκριμένα, στη διπλωματική αυτή εργασία αξιολογούνται τα πλεονεκτήματα της μεθόδου PCC έναντι της κλασικής μεθόδου. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα δείγματα αίματος τα οποία ακτινοβολήθηκαν σε εργαστήριο της Γερμανίας στο πλαίσιο διεργασιολογικών συγκρίσεων του ευρωπαϊκού δικτύου RENE (Realizing European Network in Biodosimetry), ένα δίκτυο εργαστηρίων βιολογικής και αναδρομικής δοσιμετρίας όπου συμμετέχουν 23 εργαστήρια από 16 ευρωπαϊκές χώρες. Τα δείγματα αυτά παραλήφθηκαν κωδικοποιημένα ως Re5a, Re5b, Re6a και Re6b, δίχως να αναγράφεται η δόση κάθε δείγματος, ώστε να εκτιμηθούν οι απορροφούμενες δόσεις χρησιμοποιώντας τόσο την κλασική μέθοδο βιοδοσιμετρίας όσο και τη μέθοδο PCC. Οι πραγματικές απορροφούμενες δόσεις των δειγμάτων γνωστοποιήθηκαν μετά το πέρας των διεργασιολογικών συγκρίσεων.

Διεξήχθησαν τέσσερις σειρές πειραμάτων, δύο για κάθε μέθοδο:

Η πρώτη σειρά είχε στόχο την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς δόσης (D) -απόκρισης (Y) της κλασικής μεθόδου ανάλυσης δικεντρικών χρωμοσωμάτων. Η ανάλυση έγινε μετά από *in-vitro* ακτινοβολία λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος υγιούς δότη με δόσεις 0, 0.5, 1, 2, 4, 6 και 8 Gy και η καμπύλη αναφοράς που προέκυψε είναι γραμμική-δευτεροβάθμια της μορφής  $Y=aD+bD^2+c$ .

Η δεύτερη σειρά πειραμάτων είχε στόχο την εκτίμηση της δόσης των δειγμάτων Re5 και Re6 βάσει της καμπύλης αναφοράς που προέκυψε από την πρώτη σειρά πειραμάτων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η εκτίμηση της δόσης για τα δείγματα Re5a και Re5b συμπίπτει με την πραγματική δόση

στα όρια του σφάλματος, ενώ για τα δείγματα Re6 η δόση υπερεκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας την κλασική μέθοδο.

Στην Τρίτη σειρά πειραμάτων κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς δόσης (D) - απόκρισης (Y) για την μέθοδοPCC αναλύοντας εναπομείναντα χρωμοσωματικά θραύσματα, 24 ώρες μετά την ακτινοβολήση. Η ανάλυση έγινε μετά από in-vitro ακτινοβολήση λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος από υγιή δότη σε δόσεις 0, 1, 2, 4 και 6 Gyκαι η καμπύλη αναφοράς που προέκυψε είναι γραμμική της μορφής  $Y=aD+c$ .

Η τέταρτη σειρά πειραμάτων είχε στόχο την εκτίμηση της δόσης των δειγμάτων Re5 και Re6 με βάση την καμπύλη δόσης-απόκρισης της PCC μεθόδου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η εκτίμηση και για τα 4 δείγματα συμπίπτει, στα όρια του σφάλματος, με τις πραγματικές δόσεις.

Από την συγκριτική μελέτη των δύο μεθόδων, αναδεικνύονται τα πλεονεκτήματα της PCCμεθόδου έναντι της κλασικής ως προς την ταχύτητα, την ευαισθησία και την αξιοπιστία της. Η μέθοδος PCCαποτελεί επομένως ένα σημαντικό εργαλείο βιολογικής δοσιμετρίας για την ταχεία και αξιόπιστη εκτίμηση απορροφούμενων δόσεων σε περιπτώσεις υπερεκθέσεων ή ατυχημάτων με ιοντίζουσες ακτινοβολίες.

# Abstract

Due to the extensive use of radiation in medicine, industry and other scientific fields, the number of exposed persons has inevitably increased, as well as the likelihood of adverse effects posed by overexposure to ionizing radiation. The development of reliable biodosimetry methods for the rapid assessment of the absorbed doses, therefore, emerges as a necessity, since it is a priority in cases of medical emergency care of exposed persons.

The conventional biodosimetry methodology presupposes stimulation of peripheral blood lymphocytes and 48 hours culturing before the chromosomal preparation and analysis at metaphase of radiation-induced dicentric chromosomes, failing thus the criterion for rapid dose estimation, which is a high priority in radiation emergency medicine.

In the present experimental work, carried out in Health Physics, Radiobiology and Cytogenetics Laboratory, NCSR "Demokritos", the method of premature chromosome condensation (Premature Chromosome Condensation- PCC) is extensively used as an alternative biodosimetry method. The PCC method by means of cell fusion of peripheral blood lymphocytes with mitotic hamster cells, allows the direct analysis of chromosomal aberrations in non-stimulated G0 lymphocytes for dose assessment within two hours after obtaining the blood samples.

Specifically, this dissertation evaluates the advantages of PCC method over the conventional biodosimetry method. Four blood samples were used, irradiated in Germany in the framework of the European network RENE (Realizing European Network in Biodosimetry). In this inter-laboratory network 23 laboratories from 16 European countries are taking part. These samples were coded as Re5a, Re5b, Re6a and Re6b, in order to assess the absorbed doses using both conventional and the PCC methodology. The real absorbed doses of the samples were reported after the completion of the interlaboratory comparisons.

Four sets of experiments, two for each methodology were performed:

The first set aimed at the construction of the dose (D)-response (Y) calibration curve for dicentric-chromosome method. Analysis was performed after in-vitro peripheral blood irradiation with doses of 0, 0.5, 1, 2, 4, 6 and 8 Gy. The calibration curve obtained was a linear-quadratic:  $Y = aD + bD^2 + c$ .

The set of experiments aimed at assessing the dose of samples Re5 and Re6 based on the calibration curve obtained from the first set of experiments. The results showed that the estimation of dose for Re5 samples coincides with the effective dose within the error limits, as for the Re6 samples the dose was overestimated using the dicentric methodology.

In the third set of experiments the dose (D) - response (Y) calibration curve was constructed based on chromosomal fragment 24 hours after irradiation using PCC method. Analysis was performed after in-vitro irradiation of peripheral blood lymphocytes from a healthy donor at doses of 0, 1, 2, 4 and 6 Gy and the calibration curve was linear:  $Y = aD + c$ .



The fourth set of experiments was designed to assess the dose of Re6 and Re5 samples, based on the dose-response curve of the PCC methodology. The results showed that the dose estimates for all 4 samples coincided with the actual doses, within the error limits.

Overall, the comparative study of two methods highlights the advantages of PCC methodology against the conventional in terms of speed, sensitivity and reliability. The PCC method is therefore an important bio dosimetry tool for the rapid and reliable estimation of the absorbed doses in cases of accidentally overexposure to ionizing radiation.

# Εισαγωγή

Η συνεχώς αυξανόμενη χρήση των ιοντιζουσών ακτινοβολιών, εκτός από τις απεριόριστες δυνατότητες που προσφέρει στην Ιατρική, στη Βιομηχανία και σε πολλούς άλλους επιστημονικούς τομείς, εγκυμονεί και κινδύνους σε περιπτώσεις ατυχημάτων ή υπερέκθεσης εργαζομένων, ασθενών και γενικά του πληθυσμού σε μεγάλες δόσεις. Αναδεικνύεται επομένως η αναγκαιότητα εκτίμησης της απορροφούμενης δόσης σε άτομα του πληθυσμού, η οποία και δύναται να προσδιορισθεί σήμερα με ικανοποιητική αξιοπιστία τόσο με φυσικές όσο και με βιολογικές μεθόδους.

Η πιο διαδεδομένη είναι η μέθοδος που βασίζεται σε φυσικές μετρήσεις που λαμβάνονται μέσω οργάνων μέτρησης του ρυθμού έκθεσης στην ακτινοβολία όπως φορητά όργανα ανίχνευσης και μέτρησης ακτινοβολιών, προσωπικά δοσίμετρα κ.λ.π. Ωστόσο οι μετρήσεις αυτές δεν αναφέρονται απ' ευθείας στην απορροφημένη δόση ενός ατόμου του πληθυσμού αλλά κυρίως στο ρυθμό έκθεσης σε ένα συγκεκριμένο σημείο αναφοράς με αποτέλεσμα η προσέγγιση αυτή να μην είναι πάντοτε και η ακριβέστερη. Μια λανθασμένη ένδειξη του φυσικού δοσιμέτρου ή μερική έκθεση ενός ατόμου με το δοσίμετρό του εκτός της εκτιθέμενης περιοχής, καθώς και η πιθανή απουσία φυσικού δοσιμέτρου τη στιγμή της έκθεσης του ατόμου, τονίζουν την αναγκαιότητα εκτίμησης της απορροφούμενης δόσης με βιολογικές μεθόδους χρησιμοποιώντας ειδικούς βιοδείκτες και βιοδοσίμετρα όπως π.χ. τις επαγόμενες χρωμοσωματικές αλλοιώσεις στα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος. Στις περιπτώσεις παρουσίας φυσικών δοσιμέτρων, οι βιοδοσιμετρικές εκτιμήσεις απορροφούμενης δόσης θα μπορούσαν να επιβεβαιώσουν την υπερέκθεση καθώς και την αξιοπιστία της ένδειξης του φυσικού δοσιμέτρου. Αναδεικνύεται επομένως ως αναγκαιότητα η ανάπτυξη αξιόπιστων βιολογικών μεθόδων δοσιμετρίας για την ταχεία εκτίμηση της απορροφούμενης δόσης που αποτελεί προτεραιότητα σε περιπτώσεις έκτακτης ανάγκης ιατρικής περίθαλψης των εκτιθεμένων ατόμων.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία εξετάζεται η μέθοδος της πρόωρης χρωμοσωματικής συμπύκνωσης (Premature Chromosome Condensation - PCC) ως εναλλακτική της κλασικής μεθόδου βιοδοσιμετρίας η οποία απαιτεί καλλιέργεια 48 ωρών των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος πριν την προετοιμασία χρωμοσωματικών παρασκευασμάτων και την ανάλυση των επαγόμενων από την ακτινοβολία δικεντρικών χρωμοσωμάτων. Στη συγκριτική μελέτη των δύο μεθόδων, εξετάζονται τα πλεονεκτήματα της PCC μεθόδου έναντι της κλασικής ως προς την ταχύτητα, την ευαισθησία και την αξιοπιστία της. Η μέθοδος PCC, που επιτυγχάνεται με την κυτταρική σύντηξη λεμφοκυττάρων με μιτωτικά κύτταρα Χάμστερ, επιτρέπει την άμεση ανάλυση των χρωμοσωματικών αλλοιώσεων στα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος και την ταχεία εκτίμηση της δόσης εντός δύο ωρών από τη λήψη του αίματος. Θα μπορούσε επομένως να αποτελέσει μια σημαντική και αξιόπιστη μέθοδο βιοδοσιμετρίας για την ταχεία εκτίμηση απορροφούμενων δόσεων σε περιπτώσεις υπερέκθεσης ή ατυχήματος με ιοντίζουσες ακτινοβολίες.

Στο θεωρητικό μέρος της εργασίας κρίθηκε κατ' αρχάς σκόπιμη η ανάλυση των ιδιοτήτων των ιοντιζουσών ακτινοβολιών. Για το λόγο αυτό στο πρώτο κεφάλαιο γίνεται αναφορά στο DNA και τον

κυτταρικό κύκλο, στο δεύτερο και τρίτο κεφάλαιο αναφέρονται στον τρόπο με τον οποίο οι ιοντίζουσες ακτινοβολίες αλληλεπιδρούν με την βιολογική ύλη και πιο συγκεκριμένα, στο τρίτο κεφάλαιο, με το DNA που είναι ο κύριος ενδοκυτταρικός στόχος. Επίσης στο τρίτο κεφάλαιο περιγράφονται τα αποτελέσματα της ακτινοβόλησης σε επίπεδο DNA. Στο τέταρτο κεφάλαιο περιγράφονται οι μέθοδοι βιοδοσιμετρίας που εκτιμούν την απορροφούμενη δόση βάσει των χρωμοσωματικών αλλοιώσεων που παρατηρούνται μετά από ακτινοβόληση κυττάρων στη G0 φάση του κυτταρικού κύκλου όπως τα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος.

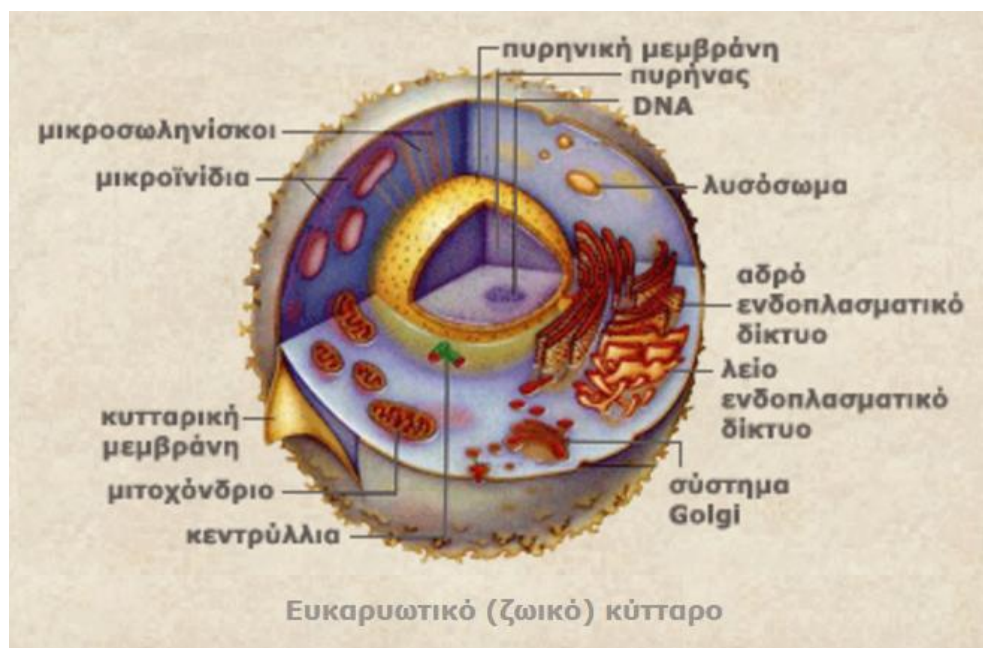
Το πειραματικό μέρος σχεδιάστηκε ώστε να συγκριθούν δύο μέθοδοι βιοδοσιμετρίας, συγκεκριμένα η κλασική μέθοδος και η μέθοδος PCC, και να εκτιμηθεί εάν η τελευταία είναι καταλληλότερη να δώσει ταχύτερο και πιο αξιόπιστο αποτέλεσμα για την απορροφούμενη δόση σε περιπτώσεις υπερέκθεσης που πιθανά χρήζουν άμεσης ιατρικής αντιμετώπισης. Στα κεφάλαια 1-5 του πειραματικού μέρους γίνεται εκτενής περιγραφή όλης της πειραματικής διαδικασίας και για τις δύο μεθόδους. Τέλος, στο έκτο κεφάλαιο γίνεται ανάλυση και συζήτηση των αποτελεσμάτων και σύγκριση των δύο μεθόδων.



# Α. Θεωρητικό μέρος

## 1. Βασικές αρχές Κυτταρικής Βιολογίας

Το ανθρώπινο κύτταρο είναι η θεμελιώδης δομική και λειτουργική μονάδα του ανθρώπινου σώματος. Κατατάσσεται στα ζωικά ευκαριωτικά κύτταρα και έχει τη μορφολογία που φαίνεται στην εικόνα 1.1 :



**Εικόνα 1.1 :** Διάγραμμα ενός τυπικού ζωικού ευκαριωτικού κυττάρου, όπου σημειώνονται οι βασικές υποκυτταρικές μονάδες [15].

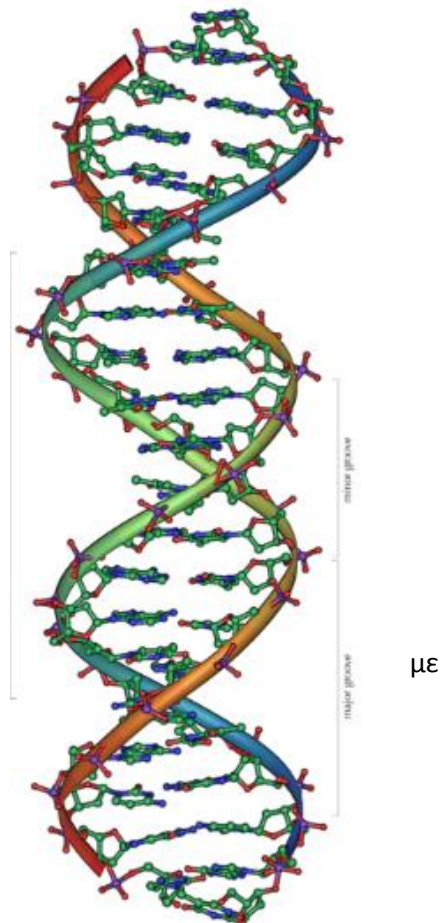
Το ανθρώπινο σώμα αποτελείται από μερικές εκατοντάδες κυτταρικούς τύπους ενώ κάθε κυτταρικός τύπος αντιπροσωπεύεται από εκατομμύρια κύτταρα. Τα κύτταρα έχουν την τάση να ομαδοποιούνται σε όργανα ή συστήματα που επιτελούν συγκεκριμένες και διαφορετικές λειτουργίες (έτσι έχουμε μυϊκά, νευρικά κύτταρα κλπ) [15].

### 1.1 Το DNA

Το δε(σ)οξυριβο(ζο)νουκλεϊ(νι)κό οξύ (Deoxyribonucleic acid - DNA) είναι νουκλεϊκό οξύ που περιέχει τις γενετικές πληροφορίες οι οποίες καθορίζουν τη βιολογική ανάπτυξη όλων των κυτταρικών μορφών ζωής και των περισσοτέρων ιών. Το DNA συνήθως έχει τη μορφή διπλής έλικας και στα ανθρώπινα ευκαριωτικά κύτταρα βρίσκεται συγκεντρωμένο κυρίως στον πυρήνα

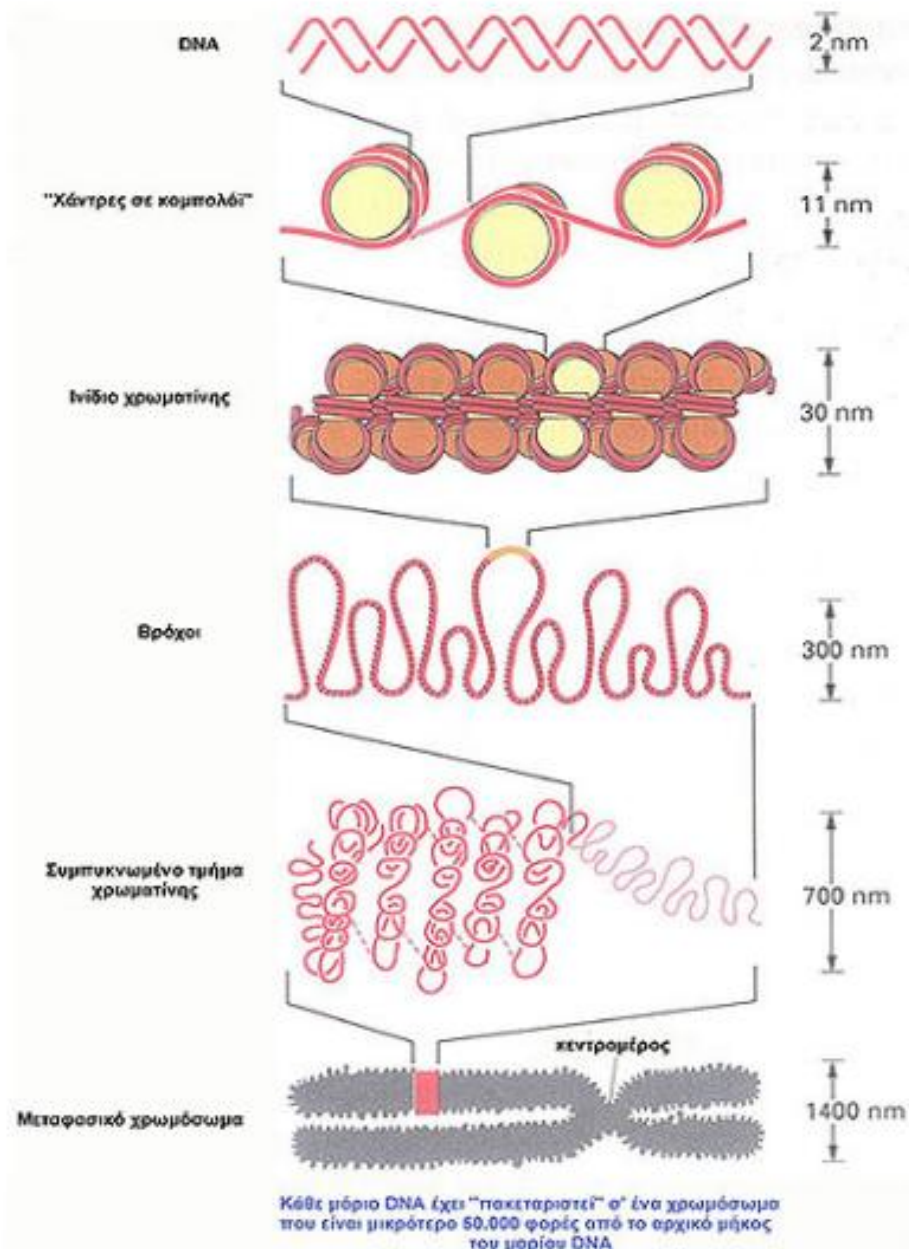
(βρίσκεται, όμως, και σε μερικά άλλα οργανίδια, όπως τα μιτοχόνδρια, επιτρέποντάς τους να αναπαράγονται αυτόνομα (ημιαυτόνομα οργανίδια)). Το DNA είναι ο φορέας των γενετικών πληροφοριών του κυττάρου, όχι μόνον με την έννοια της μεταβίβασης χαρακτηριστικών, αναλοίωτων από γενεά σε γενεά, αλλά και της ρύθμισης της φυσιογνωμίας εξειδίκευσης κάθε κυττάρου για την επιτέλεση των ιδιαίτερων λειτουργιών του. Τέλος, το DNA επιτρέπει τη δημιουργία γενετικής ποικιλότητας, υφιστάμενο μεταλλάξεις [15].

Πρόκειται, λοιπόν, για μια μεγαλομοριακή ένωση που συγκροτείται από αζωτούχες-πρωτεϊνικές βάσεις, φωσφορικές ρίζες και ένα σάκχαρο με πέντε άτομα άνθρακα (πεντόζη), την δε(σ)οξυριβόζη. Η διαμόρφωση των μεγάλων μορίων του DNA στο χώρο έχει τη μορφή δύο επιμήκων πολυνουκλεοτιδικών αντιτακτών συμπληρωματικών αλυσίδων, οι οποίες συστρέφονται δεξιόστροφα και ελικοειδώς μεταξύ τους. Οι αζωτούχες βάσεις (ή πρωτεϊνικές) κάθε κλώνου είναι κάθετες ως προς τον άξονα του μορίου και προεξέχουν προς το εσωτερικό της συστροφής και είναι υδρόφοβες, ενώ ο σκελετός που σχηματίζεται από επαναλαμβανόμενα μόρια φωσφορικής ομάδας-πεντόζης είναι υδρόφιλος. Οι δύο δημιουργούμενοι κλώνοι συγκρατούνται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου. Τα δε ζευγάρια των αζωτούχων βάσεων όπου αναπτύσσονται μεταξύ τους δεσμοί υδρογόνου είναι καθορισμένα: η αδενίνη τη θυμίνη και η γουανίνη με την κυτοσίνη. Μεταξύ της αδενίνης και της θυμίνης σχηματίζονται δύο δεσμοί υδρογόνου, ενώ μεταξύ της γουανίνης και της κυτοσίνης τρεις δεσμοί υδρογόνου. Οι δεσμοί υδρογόνου σταθεροποιούν τη δευτεροταγή δομή του DNA. Ο σχηματισμός αυτός φαίνεται στην εικόνα 1.2 [14],[15].



**Εικόνα 1.2 : Η Δομή του DNA (Πηγή : Wikipedia/DNA)**

Κάθε μόριο DNA συμπυκνώνεται δημιουργώντας ένα ξεχωριστό χρωμόσωμα όπως φαίνεται στην εικόνα 1.3. Αρχικά τα μόρια του DNA «πακετάρονται» με πρωτεΐνες σχηματίζοντας, έτσι τα **ινίδια χρωματίνης** τα οποία δομικά μοιάζουν με κομπολόι με χάντρες. Κάθε χάντρα αποτελεί τη βασική μονάδα οργάνωσης της χρωματίνης και ονομάζεται **νουκλεόσωμα**. Στη συνέχεια τα νουκλεόσωμα αναδιπλώνονται περαιτέρω κατά τη διάρκεια της μίτωσης και κάθε ινίδιο χρωματίνης διπλασιάζεται. Έχουμε έτσι ζεύγη αδελφών χρωματίδων, τα **χρωμοσώματα**, τα οποία συνδέουν τις αδελφές χρωματίδες με μια δομή που ονομάζεται κεντρομερίδιο και έχουν το μέγιστο βαθμό συμπύκνωσης του DNA και ως εκ τούτου είναι η καλύτερα παρατηρήσιμη μορφή του στο μικροσκόπιο [15].



Εικόνα 1.3 : Η συμπύκνωση του DNA [15].

Τα φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα έχουν στον πυρήνα 23 ζεύγη χρωμοσωμάτων και στην ανάλυση τους στο εργαστήριο ταξινομούνται κατά ελαττούμενο μέγεθος. Η απεικόνιση αυτή αποτελεί τον **καρυότυπο**. Από κάθε ζεύγος το ένα χρωμόσωμα είναι πατρικής και το άλλο μητρικής προέλευσης. Τα 22 πρώτα ζεύγη τα 2 χρωμοσώματα είναι μορφολογικά ίδια στα αρσενικά και θηλυκά άτομα ενώ για το 23<sup>ο</sup> ζεύγος, το οποίο ονομάζεται φυλετικό ζεύγος (καθορίζει το φύλο του ατόμου), αποτελείται από ένα Χ-χρωμόσωμα και ένα Υ-χρωμόσωμα (το οποίο είναι μικρότερο σε μέγεθος από το Χ) ή από 2 Χ-χρωμοσώματα αντίστοιχα [14].

## 1.2 Ο Κυτταρικός κύκλος

Τα περισσότερα κύτταρα ακολουθούν μια πορεία ανάπτυξης και κυτταρικής διαίρεσης που ονομάζεται κυτταρικός κύκλος. Η πορεία αυτή περιλαμβάνει την ανάπτυξη, την πυρηνική διαίρεση και τη διαίρεση του κυτταροπλάσματος. Η ικανότητα του κυτταρικού πολλαπλασιασμού εξαρτάται από διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα στο ίδιο το κύτταρο και οι οποίες σε γενικές γραμμές μπορούν να καταμεριστούν και να ορίσουν τέσσερις φάσεις στον κυτταρικό κύκλο :

**1. Φάση G1 (gar 1, πρώτο χάσμα) :** στη διάρκεια αυτής της φάσης το κύτταρο προετοιμάζεται για την είσοδο στην επόμενη φάση, εκείνη στην οποία συντίθεται το θυγατρικό DNA.

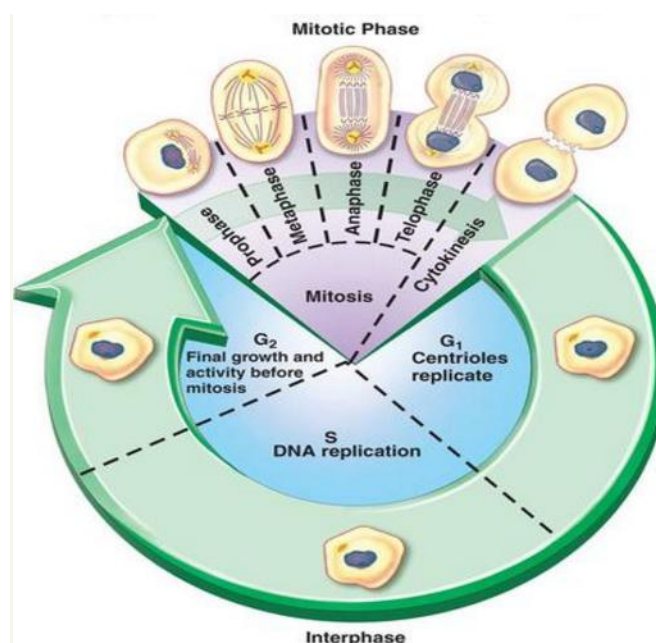
**2. Φάση S (DNA synthesis, σύνθεση DNA):** στη διάρκεια της φάσης αυτής το DNA αυτοαντιγράφεται με εξαιρετική ακρίβεια δημιουργώντας έτσι έναν θυγατρικό κλώνο ακριβώς πανομοιότυπο.

**3. Φάση G2 (gar 2, δεύτερο χάσμα) :** το κύτταρο προετοιμάζεται να εισέλθει στη φάση της μίτωσης.

**4. Φάση M (mitosis, Μίτωση) :** Το διπλασιασμένο DNA διαχωρίζεται σε 2 ίσα μέρη με εξαιρετική ακρίβεια, συμπυκνώνεται σχηματίζοντας χρωμοσώματα ώστε κάθε θυγατρικό κύτταρο να διαθέτει ένα πλήρες αντίγραφο του γενετικού υλικού του μητρικού κυττάρου.

Οι τρεις πρώτες φάσεις αποτελούν το στάδιο της μεσόφασης η οποία και καταλαμβάνει το 90-95% της χρονικής διάρκειας (~24 ώρες) της κυτταρικής διαίρεσης.

Ο κυτταρικός κύκλος παρουσιάζεται σχηματικά στην εικόνα 1.4 :



Εικόνα 1.4 : Οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου (Πηγή : [humanphysiology2011.wikispaces.com](http://humanphysiology2011.wikispaces.com))

Επιπλέον από τις προαναφερθείσες φάσεις, υπάρχει η **φάση G0 (φάση ηρεμίας)** κατά την οποία το διαιρεμένο κύτταρο που προέκυψε από τη μίτωση εισέρχεται αντί να εισέλθει ξανά στη φάση G1 για να διαιρεθεί ξανά. Η επιλογή εισόδου του κυττάρου στη φάση G0 αντί της φάσης G1 καθορίζεται από ποικίλα εξωτερικά ερεθίσματα (πχ απουσία μιτογόνων παραγόντων) χωρίς αυτό



να σημαίνει ότι αυτή η επιλογή είναι μόνιμη. Σε συγκεκριμένους ιστούς η φάση G0 έχει εξαιρετική σημασία γι' αυτό το μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων τους βρίσκεται στη φάση ηρεμίας (πχ στους λεμφικούς ιστούς) [13],[14].

## **Η Μίτωση**

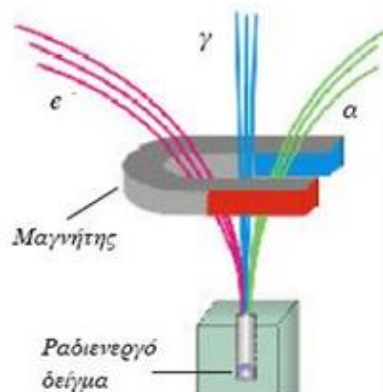
Κατά τη διάρκεια της μίτωσης (~1 ώρα) το κύτταρο είναι έτοιμο να δημιουργήσει δύο πανομοιότυπα θυγατρικά κύτταρα καθένα από τα οποία θα περιέχει το ένα από τα δύο πανομοιότυπα αντίγραφα του γενετικού υλικού. Αυτή η φάση του κυτταρικού κύκλου είναι ιδιαίτερα σημαντική δεδομένου ότι κατά τη διάρκειά της οποιαδήποτε ανωμαλία δε μπορεί να επιδιορθωθεί. Για το λόγο αυτό υπόκειται σε ποικίλους και αυστηρούς μηχανισμούς ελέγχου ώστε να εξασφαλίζεται κάθε φορά η ακρίβεια της διαδικασίας.

Η Μίτωση ολοκληρώνεται σε 4 φάσεις στην καθεμία από τις οποίες συντελούνται διαφορετικές διαδικασίες (όπως φαίνονται στην εικόνα 16):

- **Την πρόφαση** : η φάση κατά την οποία αρχίζει η συμπύκνωση και αναδίπλωση των μακρών χρωμοσωμικών ινιδίων που καταλήγει στη δομή χρωμοσωμάτων, δηλαδή την πιο ευδιάκριτη μορφή του γενετικού υλικού στο μικροσκόπιο. Παράλληλα με τη διαδικασία αυτή, ξεκινά ο σχηματισμός της λεγόμενης μιτωτικής ατράκτου, δηλαδή οι μικροσωληνίσκοι προσανατολίζονται από άκρη σε άκρη του κυττάρου δημιουργώντας έτσι δύο πόλους (εικόνα 17) όπου κατανέμονται τα διπλασιασμένα χρωμοσώματα.
- **Τη μετάφαση** : κύριο χαρακτηριστικό αυτής της φάσης είναι η θραύση του πυρηνικού φακέλου σε μικροκυστίδια τα οποία διασκορπίζονται στο κυτταρόπλασμα. Στη φάση αυτή παρατηρούνται τρία σημαντικά φαινόμενα :
  - i. η μιτωτική άτρακτος μετακινείται στην περιοχή όπου υπήρχε ο πυρήνας
  - ii. κάθε χρωμόσωμα συνδέεται με τους μικροσωληνίσκους της ατράκτου
  - iii. τα χρωμοσώματα μετακινούνται στο μέσο της ατράκτου
- **Την ανάφαση** : τα χρωμοσώματα έλκονται προς τους αντίθετους κυτταρικούς πόλους (ανάφαση α) ενώ ταυτόχρονα οι δύο πόλοι απομακρύνονται μεταξύ τους (ανάφαση β).
- **Την τελόφαση** : οι χρωματίδες αποσυμπυκνώνονται αποκτώντας ξανά τη μορφολογία που είχαν στη μεσόφαση. Επίσης σχηματίζονται οι πυρηνικοί φάκελοι των θυγατρικών κυττάρων. Στο τέλος της φάσης αυτής έχουμε δύο θυγατρικά κύτταρα τα οποία είτε εισέρχονται στη φάση G1 για τον επόμενο κυτταρικό κύκλο είτε στη φάση G0 [13],[14].

## 2. Ιοντίζουσα ακτινοβολία

Πηγή της ιοντίζουσας ακτινοβολίας είναι οι πυρηνικές αποδιεγέρσεις. Η ύπαρξή τους παρατηρήθηκε για πρώτη φορά στα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα από τον γάλλο φυσικό Antoine Henri Becquerel ο οποίος διαπίστωσε ότι ορισμένα, νεοανακαληφθέντα για την εποχή, ορυκτά αμαυρώνουν φωτογραφικές πλάκες. Η ακτινοβολία που ήταν υπεύθυνη για το φαινόμενο αυτό, κατά τη διέλευσή της από μαγνητικό πεδίο χωρίζεται σε τρεις συνιστώσες : η πρώτη αποκλίνει σαν ένα θετικά φορτισμένο σωματίδιο ( $\alpha$ -ray- πυρήνες He), η δεύτερη ως ένα ελαφρύ αρνητικό σωματίδιο ( $\beta$ -ray) ενώ η τρίτη ( $\gamma$ -ray) εξακολουθούσε την αρχική πορεία όπως φαίνεται στην εικόνα 2.1 [10].



Εικόνα 2.1 : Διέλευση ακτινοβολίας από μαγνητικό πεδίο (Πηγή : Σχολικό βιβλίο «Φυσική Γ' Λυκείου»)

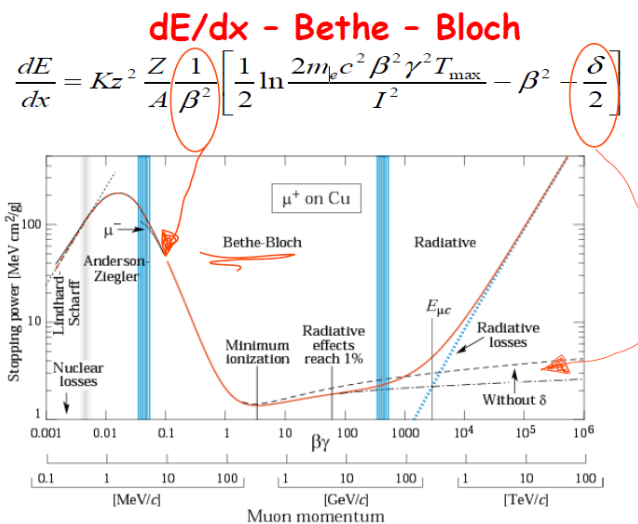
### 2.1 Αλληλεπίδραση ιοντιζουσών ακτινοβολιών με την ύλη

Η ιοντίζουσα ακτινοβολία, σε αντίθεση με το υπόλοιπο ηλεκτρομαγνητικό φάσμα, αλληλεπιδρά με την ύλη ιονίζοντας τα άτομα ή τα μόριά της. Δηλαδή λόγω της μεγάλης ενέργειάς της καταφέρνει να αποδεσμεύσει ένα ηλεκτρόνιο ενός ατόμου από αυτό όπως φαίνεται στην εικόνα. Όμως ιοντίζουσα με αυτήν την έννοια μπορεί να είναι και μια οποιαδήποτε δέσμη φορτισμένων ή και αφόρτιστων (πχ νετρόνια) σωματιδίων με αντίστοιχα μεγάλες ενέργειες, η οποία αλληλεπιδρώντας με την ύλη ιοντίζει τα άτομα ή τα μόριά της [10].

#### 2.1.1. Αλληλεπίδραση βαρέων φορτισμένων σωματιδίων με την ύλη

Αν θεωρήσουμε ένα πολύ γρήγορα κινούμενο φορτισμένο σωματίδιο το οποίο εισχωρεί στην ύλη και συγκρούεται με ένα τροχιακό ηλεκτρόνιο (το οποίο θεωρείται πρακτικά ακίνητο) τότε :

- το φορτισμένο σωματίδιο χάνει μέρος της ενέργειάς του, αλλάζει τροχιά και αλληλεπιδρά με άλλα ηλεκτρόνια μέχρι να χάσει όλη την ενέργειά του
- το ατομικό ηλεκτρόνιο αποσπάται από το άτομο (ιονισμός) και αποκτά κινητική ενέργεια



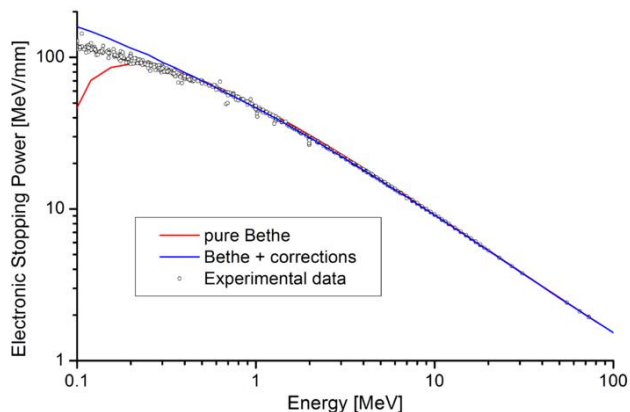
Γ. Τσπολίτης

**Εικόνα 2.2 : Γράφημα Bethe-Bloch [11]**

Το πόσο άμεσα θα συμβεί μια τέτοια κρούση κατά τη διέλευση του φορτισμένου σωματιδίου από την ύλη εξαρτάται από την πυκνότητα της ύλης σε ηλεκτρόνια δηλαδή από τον ατομικό αριθμό. Αυτή η εξάρτηση διαμορφώνει έναν παράγοντα κρούσης ο οποίος είναι ανάλογος του ατομικού αριθμού [10], [11].

### Ρυθμός απώλειας ενέργειας

Ο ρυθμός απώλειας ενέργειας dE/dx του φορτισμένου σωματιδίου συναρτήσει της απόστασης που διανύει κατά τη διέλευσή του μέσα από την ύλη από τη χρονική στιγμή που εισέρχεται στην ύλη μέχρι τη στιγμή που έχει εναποθέσει όλη την ενέργειά του μέσω των κρούσεων δίνεται από τη σχέση Bethe- Bloch. Αυτή η σχέση απεικονίζεται στο διπλανό ενεργειακό διάγραμμα.



**Εικόνα 2.3 : Bethe-Bloch σε λογαριθμική κλίμακα. Τα στρογγυλά σημεία είναι πειραματικά και η μπλέ γραμμή απεικονίζει τις θεωρητικές τιμές [10].**

Στην εικόνα παρουσιάζεται η σχέση Bethe-Bloch για διέλευση μιονίων σε χαλκό. Από το ενεργειακό διάγραμμα της εικόνας φαίνεται ότι για χαμηλές ενέργειες (MeV/c), δηλαδή για μικρές ταχύτητες, ο ρυθμός απώλειας ενέργειας μειώνεται. Αυτό οφείλεται στον παράγοντα  $1/\beta^2$  όπου  $\beta=v^2/c^2$  ( $v$  η ταχύτητα του σωματιδίου στο υλικό,  $c$  η ταχύτητα του σωματιδίου στο κενό) και πρακτικά σημαίνει ότι αν το σωματίδιο διέλθει στην ύλη με χαμηλή ταχύτητα, το χρονικό διάστημα στο οποίο θα αλληλεπιδράσει είναι μεγαλύτερο απ' ό,τι αν διέρχεται με μεγάλη ταχύτητα. Σε ιδιαίτερα υψηλές ενέργειες (από 10GeV-TeV/c), τώρα,

παρατηρείται αύξηση αντί για μείωση του ρυθμού απώλειας ενέργειας εξαιτίας της εγκάρσιας συνιστώσας του ηλεκτρικού πεδίου αλλά και του παράγοντα δ.

Γενικά η απώλεια ενέργειας ενός φορτισμένου σωματιδίου κατά τη διέλευσή του σε ένα υλικό δεν είναι συνεχής αλλά είναι στατιστικής φύσης [10], [11].

### Εμβέλεια R

Συνολικά το σωματίδιο αυτό μέχρι το τέλος της διαδρομής του θα έχει διανύσει μέσα στην ύλη μια απόσταση L. Αυτή η απόσταση λέγεται εμβέλεια του σωματιδίου.

- Η εμβέλεια είναι συνάρτηση του τύπου του σωματιδίου, της ενέργειάς του και του τύπου του υλικού διέλευσης. Για τη διέλευση του ίδιου σωματιδίου (ίδια ενέργεια) από διαφορετικά υλικά, ο λόγος των εμβελειών τους ανά δύο σχετίζεται με τον τύπο των υλικών από τη σχέση **Bragg-Kleeman** :

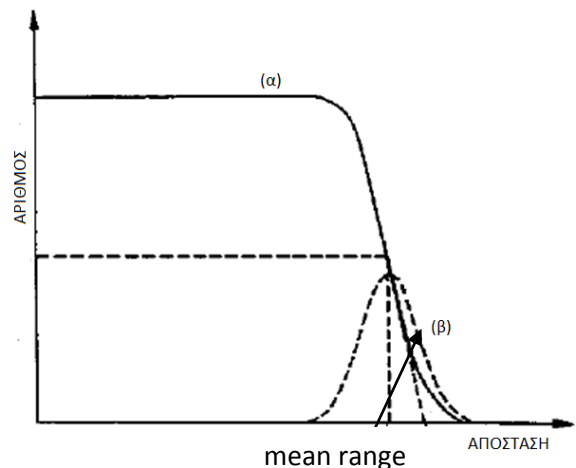
$$\frac{R_1}{R_2} \sim \frac{\sqrt{A_1}}{\sqrt{A_2}} \quad (1)$$

όπου A ο ατομικός αριθμός του υλικού.

- Η εμβέλεια είναι στατιστικής φύσης φαινόμενο, ακολουθεί κατανομή γύρω από μια μέση τιμή (mean range). Το φαινόμενο αυτό λέγεται στραγγαλισμός. Αν εισέλθει μια δέσμη σωματιδίων ποσότητας  $N_0$  και ολικής ενέργειας E σε ένα υλικό τότε σε απόσταση  $x$  από το σημείο εισόδου το ποσό των εναπομεινάντων σωματιδίων θα είναι :

$$N = N_0 e^{-\lambda x}$$

Στο διπλανό γράφημα φαίνεται η καμπύλη εναπόθεσης ενέργειας συναρτήσει του  $x$  (καμπύλη Bragg) όπου mean range το πάχος όπου τα  $N_0/2$  σταματούν [10].



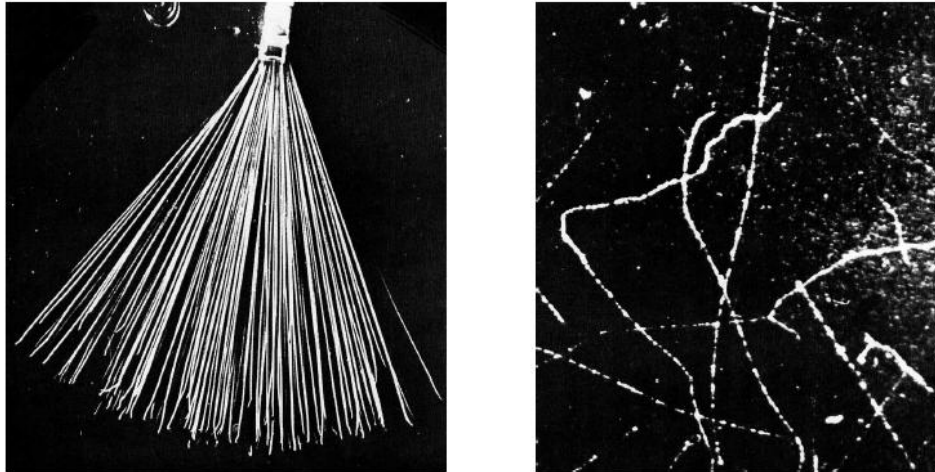
**Γράφημα 2.4: Η καμπύλη Bragg [10]**

### 2.1.2. Αλληλεπίδραση ηλεκτρονίων/ποζιτρονίων με την ύλη

Τα ηλεκτρόνια/ποζιτρόνια είναι φορτισμένα σωματίδια πολύ πιο ελαφριά από τα βαρέα ιόντα που είδαμε προηγούμενα. Αλληλεπιδρούν με την ύλη με δύο τρόπους είτε με ακτινοβολία είτε με ιονισμό είτε και με τους δύο τρόπους.

#### α) Αλληλεπίδραση με ιονισμό

Στην περίπτωση αυτή ως φορτισμένα σωματίδια αλληλεπιδρούν εξαιτίας των δυνάμεων Coulomb με ατομικά ηλεκτρόνια ή τους πυρήνες των ατόμων μέσω κρούσεων. Σε μια κρούση κινούμενου ηλεκτρονίου με ατομικό ηλεκτρόνιο/πυρήνα το κινούμενο μπορεί να απολέσει μεγάλο μέρος της ενέργειάς του (ακόμη και 100%) και να σκεδαστεί σε μεγάλες γωνίες. Επομένως, η τροχιά ενός ηλεκτρονίου μέσα στην ύλη αποκλίνει πολύ από την ευθύγραμμη τροχιά ή αλλάζει κατεύθυνση. Χαρακτηριστική εικόνα από την αλληλεπίδραση ηλεκτρονίων (δεξιά) και σωματιδίων α (αριστερά) που είναι βαριά ιόντα, με την ύλη, φαίνεται παρακάτω :



Εικόνα 2.5 : Εικόνες από ανίχνευση τροχιάς σωματιδίων-α (αριστερά) και ηλεκτρονίων (δεξιά) [10].

Όμως για σχετικά μικρές ενέργειες ( $\sim \text{MeV}$ ) η ταχύτητα  $v$  των ηλεκτρονίων είναι πολύ μεγαλύτερη από την ταχύτητα ενός βαριού ιόντος λόγω της μεγάλης διαφοράς μάζας τους. Έτσι επειδή η απώλεια ενέργειας, όπως εκφράζεται από τη σχέση Bethe-Bloch, είναι ανάλογη του  $1/v^2$ , η  $dE/dx$  των ηλεκτρονίων είναι πολύ μικρότερη σε σχέση με αυτή των βαρέων ιόντων.

Αντίστοιχα λόγω της μικρότερης απώλειας ενέργειας των ηλεκτρονίων, η εμβέλειά τους μέσα σε ένα υλικό είναι μεγαλύτερη από αυτή των βαρέων ιόντων [10].

### β) Αλληλεπίδραση με ακτινοβολία

Από την Κλασική Ηλεκτροδυναμική γνωρίζουμε ότι ένα επιταχυνόμενο φορτίο ακτινοβολεί ανάλογα με την επιτάχυνση που οφείλεται στο ηλεκτρικό πεδίο.

Το άθροισμα της απώλειας ενέργειας λόγω ακτινοβολήσης και της απώλειας ενέργειας λόγω ιονισμού αντιπροσωπεύει τη συνολική απώλεια ενέργειας ενός κινούμενου ηλεκτρονίου κατά τη διέλευσή του από ένα υλικό :

$$\left(\frac{dE}{dx}\right)_{\text{total}} = \left(\frac{dE}{dx}\right)_{\text{radiation}} + \left(\frac{dE}{dx}\right)_{\text{collision}} \quad (2) \quad [10].$$

### 2.1.3. Αλληλεπίδραση ακτινοβολίας-γ με την ύλη

Όταν μια δέσμη φωτονίων εισέρχεται σε ένα υλικό κάθε φωτόνιο αλληλεπιδρά με αυτό είτε μεταφέροντας ποσό ή ολόκληρη την ενέργειά του στην ύλη (απορρόφηση) είτε αλλάζοντας κατεύθυνση (σκέδαση). Εξαιτίας των φαινομένων αυτών η αρχική δέσμη φωτονίων διαχέεται σε φωτόνιο-φωτόνιο μέσα στο υλικό.

Στην περίπτωση που ένα φωτόνιο με συχνότητα  $f$  αποδώσει ποσό της ενέργειάς του τότε η εναπομείνουσα ενέργεια του αρχικού φωτονίου διαμορφώνει ένα νέο φωτόνιο με συχνότητα  $f'$  το οποίο διαδίδεται στην ύλη σε διαφορετική διεύθυνση με αυτή του αρχικού μέχρι να αλληλεπιδράσει κι αυτό. Η διαδικασία αυτή συνεχίζεται μέχρις ότου ολόκληρη η ενέργεια του

αρχικού φωτονίου απορροφηθεί από το υλικό. Το φαινόμενο αυτό λέγεται εξασθένηση δέσμης. Αν  $N_0$  είναι ο αρχικός αριθμός φωτονίων της δέσμης, η εξασθένησή της είναι εκθετική συνάρτηση η οποία δίνεται από τη σχέση :

$$N = N_0 e^{-\mu x} \quad (3)$$

όπου  $x$  το μήκος που διανύει η δέσμη μέσα στο υλικό μέχρι κάποιο φωτόνιο να αλληλεπιδράσει και  $\mu$  η ενεργός διατομή εξασθένησης της δέσμης η οποία εξαρτάται από την πυκνότητα του υλικού [10].

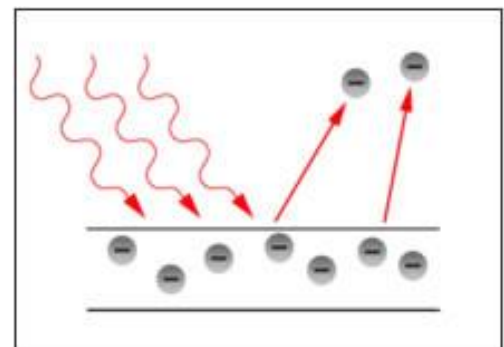
Η απορρόφηση ενός φωτονίου από ένα άτομο γίνεται με τρεις διαφορετικούς τρόπους :

### 1) Φωτοηλεκτρικό φαινόμενο

Η ενέργεια του φωτονίου απορροφάται από ατομικό ηλεκτρόνιο εσωτερικής στιβάδας του οποίου η ενέργεια σύνδεσης είναι μικρότερη από αυτήν του φωτονίου, και το ιονίζει. Το ηλεκτρόνιο που ελευθερώνεται από το άτομο αποκτά κινητική ενέργεια  $T$  ίση με τη διαφορά :

$$T = E_\gamma - E_{\sigma \text{ύνδεσης}}$$

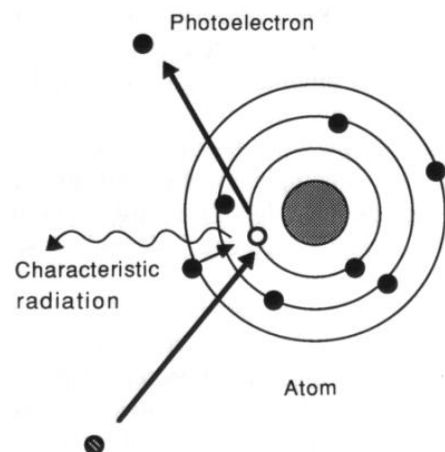
Σχηματικά το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο φαίνεται στην εικόνα 2.6.1 [10].



Εικόνα 2.6.1 : Φωτοηλεκτρικό φαινόμενο (πηγή : Wikipedia)

Με την αποσύνδεση του φωτοηλεκτρονίου από το άτομο δημιουργείται μια οπή η οποία καλύπτεται γρήγορα από ηλεκτρόνιο εξωτερικής ενεργειακής στιβάδας σύμφωνα με την αρχή ελάχιστης ενέργειας. Αυτή η διεργασία συνοδεύεται από την εκπομπή χαρακτηριστικού φωτονίου- $\gamma$ .

Η πιθανότητα να συμβεί φωτοηλεκτρικό φαινόμενο κατά την αλληλεπίδραση ενός φωτονίου με ένα άτομο εξαρτάται από τον ατομικό αριθμό του υλικού [10], [11].

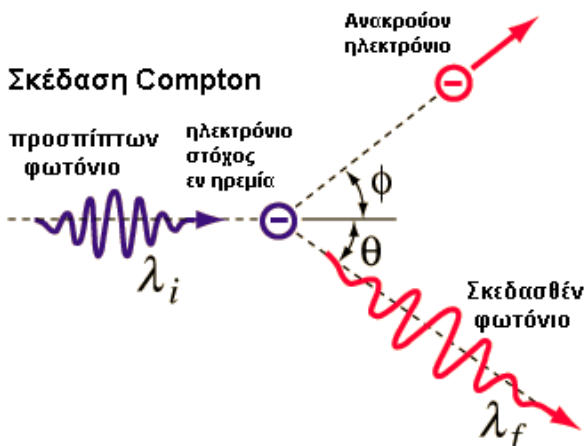


Εικόνα 2.6.2 : Μηχανισμός Φωτοηλεκτρικού φαινομένου (πηγή : Wikipedia)

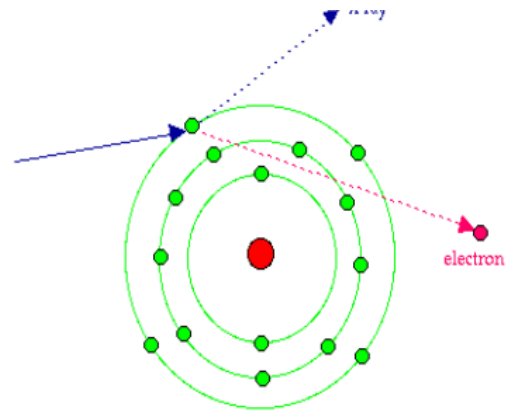
### 2) Φαινόμενο Compton

Το φαινόμενο Compton περιγράφει τη σκέδαση ενός φωτονίου- $\gamma$  από μονήρες ατομικό ηλεκτρόνιο (εξωτερικής στιβάδας).

Το ηλεκτρόνιο απορροφά μέρος της ενέργειας του φωτονίου και αποδεσμεύεται από το άτομο ενώ η απομένουσα ενέργεια διαδίδεται ως φωτόνιο- $\gamma'$  σε διαφορετική κατεύθυνση από την αρχική. Το φαινόμενο φαίνεται στις εικόνες 2.7.1 και 2.7.2 :



Εικόνα 2.7.1 : Φαινόμενο Compton (πηγή : Wikipedia)

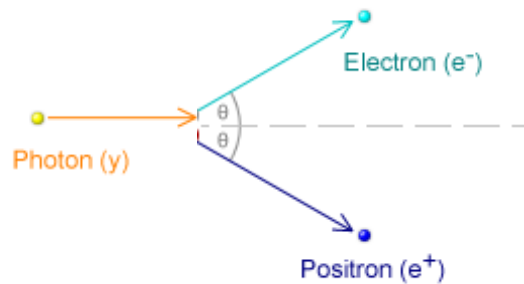


Εικόνα 2.7.2 : Μηχανισμός φαινομένου Compton (πηγή : Wikipedia)

Η πιθανότητα να συμβεί φαινόμενο Compton είναι ανεξάρτητη του ατομικού αριθμού του υλικού [10].

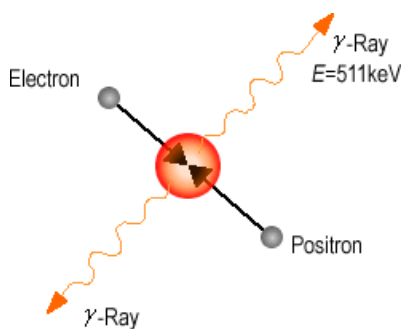
### 3) Δίδυμη γένεση

Στις περιπτώσεις όπου η ενέργεια ενός φωτονίου-γ υπερβαίνει την τιμή  $4m_0c^2$  ( $\sim 2.044\text{MeV}$ ) όπου  $m_0$  η μάζα ηρεμίας του ηλεκτρονίου, το φωτόνιο μπορεί να μετατραπεί σε ένα ζεύγος ηλεκτρονίου-ποζιτρονίου,  $e^-$ ,  $e^+$  όπως φαίνεται στην εικόνα 2.8.1. Τα  $e^-$ ,  $e^+$  έχουν ίδια κινητική ενέργεια μεταξύ τους ( $\sim 1024\text{MeV}$  το καθένα).



Εικόνα 2.8.1 : Δίδυμη Γένεση (πηγή : Wikipedia)

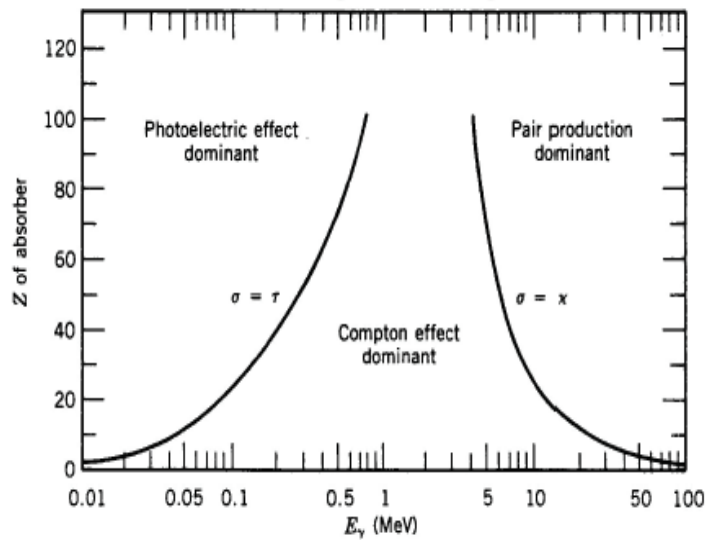
Το ηλεκτρόνιο αλληλεπιδρά με άλλα ατομικά ηλεκτρόνια όπως περιγράφηκε νωρίτερα.



Εικόνα 2.8.2 : Δίδυμη γένεση (πηγή : Wikipedia)

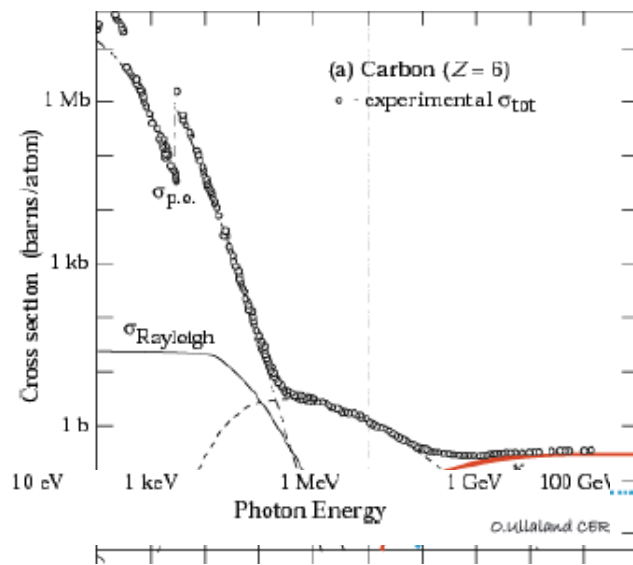
Το ποζιτρόνιο έλκει ένα ατομικό ηλεκτρόνιο και εξαϋλώνεται εκπέμποντας δύο φωτόνια-γ ενέργειας 511MeV το καθένα όπως φαίνεται στην διπλανή εικόνα [10].

Η πιθανότητα (ή ενεργός διατομή) αλληλεπίδρασης των φωτονίων με κάποιο από τα τρία παραπάνω φαινόμενα ως συνάρτηση της ενέργειάς τους μπορεί να παρασταθεί στο παρακάτω γράφημα όπου το υλικό αλληλεπίδρασης είναι άνθρακας (αριστερά). Επίσης η εξάρτηση της πιθανότητας αλληλεπίδρασης με έναν από τους τρεις τρόπους, από τον ατομικό αριθμό του υλικού και την ενέργεια των φωτονίων φαίνεται στην εικόνα 2.9 [10].



Εικόνα 2.9: Εξάρτηση αλληλεπίδρασης φωτονίου από τον ατομικό αριθμό της ύλης [10].

Τέλος, η ολική πιθανότητα αλληλεπίδρασης δέσμης φωτονίων- $\gamma$  είναι το άθροισμα των πιθανοτήτων αλληλεπίδρασης για κάθε ένα από τα τρία παραπάνω φαινόμενα ξεχωριστά. Αυτή η ολική πιθανότητα λέγεται γραμμικός συντελεστής απορρόφησης [10].



Εικόνα 2.10 : Συνεισφορά των τριών φαινομένων αλληλεπίδρασης των φωτονίων [10]



#### **2.1.4 Αλληλεπίδραση νετρονίων με την ύλη**

Όταν μια δέσμη νετρονίων εισέρχεται σε ένα υλικό αλληλεπιδρά με τα άτομά του μέσω κρούσεων ώσπου κάποια στιγμή τα νετρόνια «συλλαμβάνονται» από τους πυρήνες των ατόμων του υλικού. Ανάλογα με την ενέργεια των νετρονίων, τη θερμοκρασία του μέσου και τον ατομικό αριθμό του υλικού, οι αλληλεπιδράσεις μπορεί να είναι οι εξής :

##### **1) Σύλληψη νετρονίων**

Σύλληψη νετρονίου από τον πυρήνα ενός ατόμου του υλικού γίνεται όταν το νετρόνιο είναι αρκετά επιβραδυμένο και σε θερμική ισορροπία με το υλικό. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται ένας νέος «σύνθετος» πυρήνας. Τα νετρόνια αυτά λέγονται θερμικά νετρόνια.

Η σύλληψη του νετρονίου συνοδεύεται από την εκπομπή, από τον πυρήνα, ενός φωτονίου-γ με ενέργεια ισοδύναμη με την ενέργεια σύνδεσης των νετρονίων του πυρήνα. Το φωτόνιο αυτό συνεισφέρει στην απορρόφηση της ενέργειας του αρχικού νετρονίου αλληλεπιδρώντας με το υλικό όπως έχει ήδη αναφερθεί.

Σε ορισμένες περιπτώσεις οι σύνθετοι πυρήνες είναι πολύ ασταθείς και πέραν της ακτινοβολίας-γ εκπέμπουν κι ένα σωματίδιο  $\alpha$  [10].

##### **2) Ελαστική σκέδαση**

Στις ελαστικές σκεδάσεις των νετρονίων με τους πυρήνες μεταφέρεται σε κάθεμιά από αυτές μέρος της ενέργειας του νετρονίου στον πυρήνα ως κινητική ενέργεια :

- το νετρόνιο αλλάζει κατεύθυνση και εναποθέτει ενέργεια σε άλλους πυρήνες μέσω σκεδάσεων μέχρι να «συλληφθεί» από κάποιον πυρήνα.
- ο πυρήνας αποκτά κινητική ενέργεια την οποία χάνει. Η ενέργεια αυτή είναι ικανή να απομακρύνει ηλεκτρόνια από το άτομο έτσι ώστε να δημιουργούνται ιόντα [9],[10].

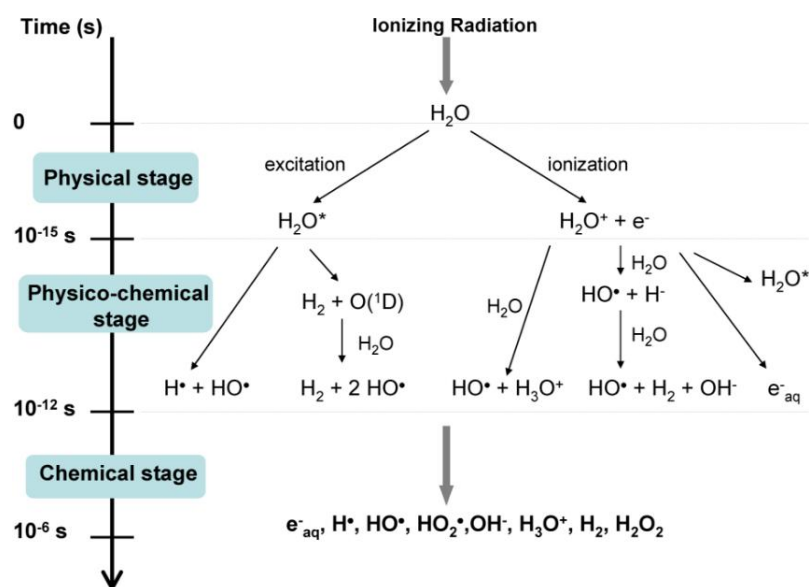
##### **3) Μη ελαστική σκέδαση**

Σε αυτήν την περίπτωση το ποσό της μεταφερόμενης από το νετρόνιο, ενέργειας διεγείρει τον πυρήνα ο οποίος αποδιεγειρόμενος εκπέμπει φωτόνιο-γ. Το νετρόνιο με σκεδάζεται ξανά και ξανά σε άλλους πυρήνες μέχρι να συλληφθεί [9],[10].

## 2.2 Βιολογική επίπτωση των ιοντιζουσών ακτινοβολιών στο ανθρώπινο κύτταρο

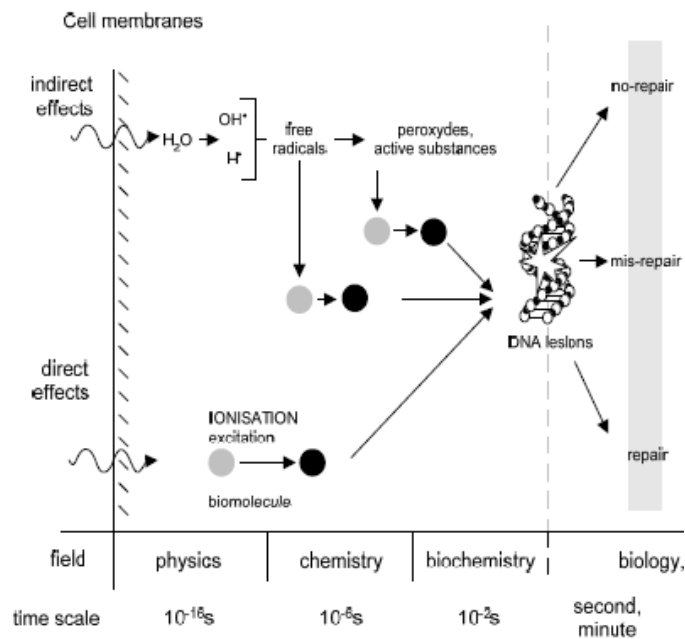
Η μελέτη της επίδρασης των ιοντιζουσών ακτινοβολιών στο ανθρώπινο κύτταρο βασίζεται στην παραδοχή ότι ο ανθρώπινος οργανισμός αποτελείται κατά κύριο λόγο από νερό. Για το λόγο αυτό η πειραματική μελέτη γίνεται με τη χρήση δεξαμενής νερού ως ανάλογο του ανθρώπινου ιστού στην οποία τοποθετούνται σε διάφορα βάθη κύτταρα και ακτινοβολούνται. Με αυτόν τον τρόπο μελετάται η επιβίωση των κυττάρων συναρτήσει του βάθους διείσδυσης, του τύπου της ακτινοβολίας και της ενέργειάς της.

Η αλληλεπίδραση της ιοντιζουσας ακτινοβολίας με τα κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ελευθέρων ριζών  $\text{OH}^-$  και υπεροξειδίου του νερού ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) τα οποία αλληλεπιδρούν με το μόριο του DNA και οδηγούν στις περισσότερες περιπτώσεις στον κυτταρικό θάνατο (έμμεση επίδραση). Η εικόνα 2.11 περιγράφει αυτή τη διαδικασία (Ραδιόλυση του νερού) [10], [18].



Εικόνα 2.11 : Ραδιόλυση του νερού [18]

Η επίδραση των ιοντιζουσών ακτινοβολιών στα κύτταρα μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την απευθείας αλληλεπίδραση με το μόριο του DNA (άμεση επίδραση) αλλά η πιθανότητα αυτή είναι στατιστικά πολύ μικρότερη σε σχέση με τη ραδιόλυση του νερού. Στην εικόνα 2.12 φαίνεται η σχετική άμεση και έμμεση επίδραση της ιοντιζουσας ακτινοβολίας και τα αποτελέσματά της τα οποία σχετίζονται με τη δόση της ακτινοβολίας :



Εικόνα 2.12 : Επίδραση της ionτίζουσας ακτινοβολίας στο μόριο του DNA [11]

### 2.2.1 Σχετική βιολογική επίπτωση (Relative Biological Effectiveness) RBE

Κατά την αλληλεπίδρασή των ionτίζουσών ακτινοβολιών με τον ανθρώπινο ιστό εναποθέτουν μέρος της ενέργειάς τους προκαλώντας ionισμό. Έτσι προξενούνται κάποιες βλάβες στο DNA είτε άμεσα είτε έμμεσα. Παράλληλα όμως τα ανθρώπινα κύτταρα έχουν ένα πολύ αποτελεσματικό και ακριβές σύστημα επιδιόρθωσης που προστατεύει την ακεραιότητα του DNA. Το σύστημα αυτό «αντέχει» μέχρι κάποιο όριο ακτινοβολήσης (ενέργειας).

Εάν στο μόριο του DNA επιτευχθεί ένα σύνολο γειτονικών βλαβών, δηλαδή εάν εναποτεθεί στην ίδια περιοχή μεγάλη δόση ενέργειας, τότε ο επιδιορθωτικός μηχανισμός δε μπορεί να επιτελέσει το ρόλο του.

Σημαντική παράμετρος για τη διασφάλιση του παραπάνω στόχου είναι ο υπολογισμός του σημείου στο οποίο εναποτίθεται το μεγαλύτερο μέρος της ενέργειας κάθε ionτίζουσας ακτινοβολίας (mean range). Αυτή η παράμετρος συνδέεται με τη σχετική βιολογική επίπτωση (RBE) των ionτίζουσών ακτινοβολιών.

Η RBE είναι μια περίπλοκη συνάρτηση του τύπου της ionτίζουσας ακτινοβολίας, της δόσης της ακτινοβολίας και του τύπου κυττάρου ή ιστού που ακτινοβολείται. Επίσης η τιμή της σχετίζεται με τον τρόπο και το ρυθμό (dE/dx) εναπόθεσης της ενέργειας της εκάστοτε ακτινοβολίας στη διαδρομή της μέσα σε έναν ιστό ή όγκο. Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται η τιμή της RBE για διάφορα είδη ionτίζουσών ακτινοβολιών :

Είδος ακτινοβολίας	RBE
Ακτίνες-Χ	1
Ακτίνες-γ	1
β-σωματίδια (1MeV)	1
Θερμικά νετρόνια	2-5
Πρωτόνια (1MeV)	8.5
Ταχέα νετρόνια	10
α-σωματίδια (5MeV)	15
α-σωματίδια (1MeV)	20

Η τιμή της RBE για τα φωτόνια και τα β-σωματίδια έχει σταθερή τιμή ίση με τη μονάδα. Αυτό αποδεικνύει ότι η απώλεια ενέργειάς τους στη μονάδα του μήκους είναι πρακτικά γραμμική. Αντίθετα για τα υπόλοιπα ιοντίζοντα σωματίδια οι τιμές της RBE είναι πιο μεγάλες και μπορεί να κυμαίνονται μεταξύ κάποιων τιμών συναρτήσεως της μονάδας μήκους διείσδυσης. Αυτό αποδεικνύει ότι για σωματίδια με μεγάλες ενέργειες τα οποία αλληλεπιδρούν με την ύλη φτάνοντας σε μεγάλα βάθη διείσδυσης μέχρι να εναποθέσουν όλη την ενέργειά τους, υπάρχει ένα σημείο στο οποίο εναποθέτουν το μεγαλύτερο μέρος από την ενέργειά τους (καμπύλη Bragg) [1],[10],[11].

### **2.2.2 Γραμμική Μεταφορά ενέργειας (Linear emission transfer)-LET**

Η κατανομή των πρωτογενών γεγονότων, ιοντισμών και διεγέρσεων κατά μήκος της τροχιάς της ιοντίζουσας ακτινοβολίας, ποικίλει ανάλογα με το είδος της ακτινοβολίας (μαζα σωματιδίων, ενέργεια κλπ).

Ένα χρήσιμο μέγεθος που περιγράφει την εναπόθεση της ενέργειας από διαφορετικούς τύπους ακτινοβολίας, είναι η γραμμική μεταφορά ενέργειας (LET). Για ακτινοβολίες με ένα ευρύ φάσμα LET, π.χ. νετρόνια, μπορούμε να πάρουμε ένα μέσο LET. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί σταθμίζοντας κάθε διάστημα LET σύμφωνα με την ενέργεια που εναποτίθεται (ή δόση) ή ανάλογα με το μήκος της τροχιάς που κάλυψε η ακτινοβολία μέχρι να εναποτεθεί όλη η ενέργειά της στην ύλη. Αυτά δίνουν, αντίστοιχα, τη μέση δόση παρακολουθώντας μέση τροχιά. Η LET φαίνεται να είναι η καλύτερη ποσότητα για να περιγράψει τη σχετική βιολογική αποτελεσματικότητα (RBE) για την ποικιλία των χρωμοσωμικών αλλοιώσεων.

Το σημαντικό σημείο που εξετάζει είναι ότι το ίδιο ή διαφορετικό είδος ακτινοβολίας μπορεί να διαφέρουν σημαντικά ως προς την ποσότητα ενέργειας που εναποτίθεται ανά μονάδα μήκους κάτι που μπορεί να μεταβάλλει σαφώς την βιολογική αποτελεσματικότητα των διαφορετικών τύπων ακτινοβολίας.

Μια συνέπεια της κατανομής του ιονισμού για την ακτινοβολία των διαφόρων LET είναι η **συχνότητα κατανομής χρωμοσωμικών αλλοιώσεων στα κύτταρα**. Ακτινοβολίες με χαμηλό LET, ή «αραιές ακτινοβολίες», εναποθέτουν την ενέργειά τους σε ιοντισμούς τυχαία μεταξύ των κυττάρων του στόχου. Αντίστοιχα οι αλλοιώσεις στο DNA από αυτή την ακτινοβολία, καταμερίζονται τυχαία στα κύτταρα του στόχου με βάση την υπόθεση ότι υπάρχει ίση πιθανότητα οποιαδήποτε βλάβη να μετεξελιχθεί σε αλλοίωση πάλι με τυχαία κατανομή.

Τέτοια παραδείγματα ακτινοβολιών είναι οι X και οι γ για τις οποίες οι αλλοιώσεις του DNA που προκαλούν κατανέμονται με την κατανομή Poisson στο στόχο.

Ακτινοβολίες με υψηλό LET , ή «πυκνές ακτινοβολίες», δεν εναποτεθούν την ενέργειά τους σε ιονισμούς τυχαία μεταξύ των κυττάρων του στόχου αλλά σε διακριτά ενεργειακά πακέτα. Εδώ ο αριθμός των συγκρούσεων είναι μικρότερος από τις ακτινοβολίες με χαμηλό LET σε ισοδύναμες δόσεις. Αντίστοιχα οι αλλοιώσεις στο DNA από αυτή την ακτινοβολία, δεν καταμερίζονται τυχαία στα κύτταρα του στόχου, ακολουθούν όμως κι εδώ κατανομή Poisson.

Αυτά τα χαρακτηριστικά είναι χρήσιμα για τη βιολογική δοσιμετρία ιδίως όσον αφορά την μη ομοιόμορφη έκθεση ή μερική έκθεση του σώματος σε ιονίζουσα ακτινοβολία.

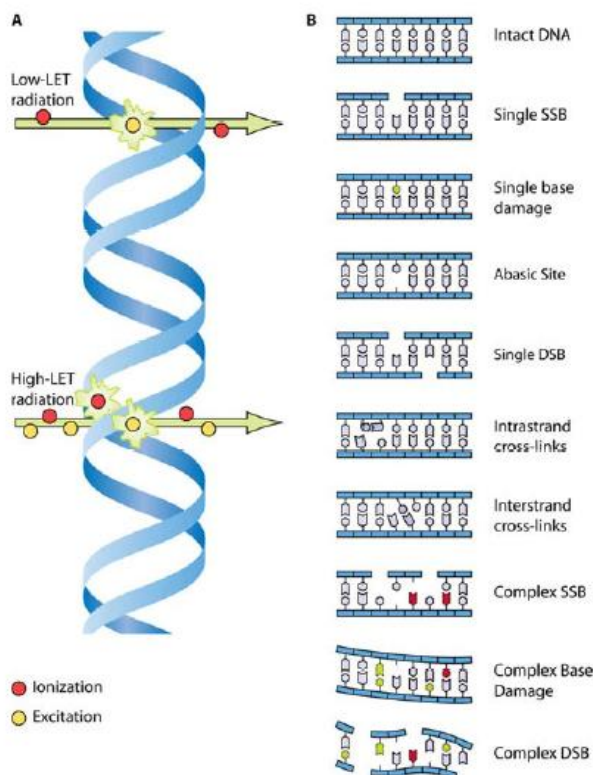
Η αποτελεσματικότητα των διαφόρων τύπων ακτινοβολιών για την επαγωγή ενός συγκεκριμένου βιολογικού τελικού σημείου περιγράφεται από τον όρο "σχετική βιολογική αποτελεσματικότητα» (RBE). Η RBE ορίζεται ως ο λόγος της δόσης της ακτινοβολίας αναφοράς προς την ισοδύναμη δόση της συγκεκριμένης ακτινοβολίας που μελετάται και παράγει το ίδιο βιολογικό αποτέλεσμα, ή μαθηματικά:

$$RBE = \frac{\text{dose of 200–250 kVp X rays producing effect Z}}{\text{dose of radiation producing effect Z}} \quad (4)$$

[1],[10],[11].

### 3. Βιολογικά αποτελέσματα σε κυτταρικό επίπεδο

Η ιονίζουσα ακτινοβολία χαρακτηρίζεται από την παραγωγή γεγονότων με εναπόθεση διακριτών ενεργειακών τμημάτων στο χώρο και το χρόνο όπου οι βλάβες στο DNA, άμεσες και έμμεσες, προκαλούνται από η παραγωγή δραστικών ουσιών που παράγονται κυρίως από τη ραδιόλυση του νερού. Βιοφυσικές μελέτες δείχνουν ότι η χαμηλού-LET ακτινοβολία μπορεί να παράγει εντοπισμένη αλληλουχία ιοντισμών. Από την άλλη, η ακτινοβολία υψηλού LET παράγει έναν κάπως μεγαλύτερο αριθμό ιοντισμών που βρίσκονται κοντά χωρικά.



Εικόνα 3.1 : Τύποι βλαβών στο μόριο του DNA [1].

Οι Ιονίζουσες ακτινοβολίες προκαλούν ένα ευρύ φάσμα βλαβών στο DNA (που είναι και ο σημαντικότερος ενδοκυτταρικός στόχος), συμπεριλαμβανομένων των ζημιών βάσης (BD), σημειακά σπασίματα της μίας έλικας του DNA (SSB), αβασικές θέσεις (AS), διπλά σπασίματα στο μόριο του DNA (DSB) κ.α. όπως φαίνεται στην εικόνα 3.1.

Η ενέργεια για το σχηματισμό ενός ζεύγους ιόντων ( $H_2O^+ + e^-$ ) από την ραδιόλυση του νερού είναι  $\sim 20$  eV, και από την ιονίζουσα ακτινοβολία κυμαίνεται σε ενέργειες έως εκατοντάδες eV, με μέση τιμή τα 60 eV. Επειδή αυτή η ενέργεια είναι επαρκής για να παράξει περίπου τρία ζεύγη ιόντων, οι ρίζες που σχηματίζονται θα αντιδράσουν στην περιοχή. Οι προκύπτουσες βλάβες στο DNA για όλους τους τύπους της ακτινοβολίας μπορεί να είναι βλάβες του DNA που περιλαμβάνουν SSB, AS, ή BD καθώς και πολλαπλές θέσεις Ζημιών (MDS) ή συγκεντρωμένες βλάβες στο DNA.

Οι MDS βλάβες που παράγονται στο DNA, μπορεί να περιλαμβάνουν μία ή περισσότερες DSB, αρκετές SSB καθώς και BD βλάβες. Οι συγκεντρωμένες βλάβες του DNA μπορεί να είναι πιο δύσκολο να επιδιορθωθούν ή ακόμη και ακατόρθωτο και ως εκ τούτου ενδεχομένως να οδηγήσουν στη δημιουργία θανατηφόρων, για το κύτταρο, χρωμοσωμικών αλλοιώσεων.

Ο HRR και ο DNA nonhomologous end-joining (NHEJ) είναι οι δύο κύριοι μηχανισμοί επιδιόρθωσης των DSB . Αυτοί οι δύο μηχανισμοί δρουν σε διαφορετικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Ο NHEJ συμβάλλει ουσιαστικά στην επιδιόρθωση DSB σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου, ενώ ο HRR συμβάλλει λιγότερο στη G1 και προοδευτικά περισσότερο στη G2 [1].

### **3.1 Γονιδιακές μεταλλάξεις**

Η περίπτωση μη επιτυχούς επιδιόρθωσης σε βλάβες των βάσεων, μπορεί να οδηγήσει στην οριστική διαφοροποίηση της αλληλουχίας τους και ως εκ τούτου σε μετάλλαξη. Το ίδιο μπορεί να συμβεί λόγω ελλείμματος βάσεων ή αδυναμίας των κλώνων της διπλής έλικας να επανασυνδεθούν (DSB βλάβη).

Τα αποτελέσματα των γονιδιακών μεταλλάξεων ποικίλουν ενώ η συχνότητα εμφάνισής τους αυξάνει με τη δόση ακτινοβολίας (στις πολύ μεγάλες δόσεις βέβαια, κυριαρχεί ο κυτταρικός θάνατος ως αποτέλεσμα) [1],[3],[12],[13], [16],[17].

### **3.2 Χρωμοσωμικές αλλοιώσεις**

Οι χρωμοσωμικές αλλοιώσεις είναι η κυρίαρχη πηγή παρατηρήσιμων γεγονότων που χρησιμοποιεί η βιολογική δοσιμετρία για την εκτίμηση της απορροφηθείσας δόσης. Πρόκειται, λοιπόν, για βλάβες που δεν έχουν επιδιορθωθεί επιτυχώς (συνήθως μία ή περισσότερες DSB βλάβες ) οι οποίες καθίστανται εμφανείς στην επόμενη διαίρεση του κυττάρου και συγκεκριμένα στη φάση της μετάφασης.

Οι αλλοιώσεις αυτές περιλαμβάνουν μια σειρά από ανταλλαγές θραυσμάτων του DNA μεταξύ διαφορετικών χρωμοσωμάτων, μεταξύ των δύο χρωματίδων του ίδιου χρωμοσώματος ή ακόμη και μεταξύ περιοχών της ίδιας χρωματίδας ανάλογα με το αν η βλάβη συνέβη στη G1 ή στη G2 φάση του κυτταρικού κύκλου.

Ειδικά στη βιολογική δοσιμετρία χρησιμοποιούνται για ανάλυση κύτταρα τα οποία βρίσκονται στη G0 φάση (λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος για λόγους που θα αναλυθούν σε παρακάτω παράγραφο). Επομένως έχει ιδιαίτερη σημασία να αναφερθούμε πιο αναλυτικά στις αλλοιώσεις που παρατηρούνται συχνότερα και χρησιμοποιούνται ως δείκτες για την εκτίμηση της απορροφηθείσας δόσης :

- **Δικεντρικά χρωμοσώματα** : χρωμοσώματα, δηλαδή τα οποία εμφανίζονται να έχουν δύο κεντρομερίδια αλλά πάντοτε η ύπαρξή τους συνοδεύεται από ζεύγη άκεντρων θραυσμάτων ίσων σε αριθμό με τον αριθμό των δικεντρικών χρωμοσωμάτων. Σπανιότερα μεν αλλά επίσης συχνά παρατηρούνται χρωμοσώματα με παραπάνω από 2 κεντρομερίδια (τρικεντρικά, τετρακεντρικά κ.λπ.) τα οποία συνοδεύονται από αντίστοιχο αριθμό ζευγών άκεντρων θραυσμάτων (2, 3 ζεύγη αντίστοιχα κ.λπ.)
- **Κεντρικοί δακτύλιοι** : χρωμοσώματα που προκύπτουν μετά από σπάσιμο και των δύο χρωματίδων . Οι άκρες τους τελικά συνδέονται μεταξύ τους σχηματίζοντας, μορφολογικά, δακτυλίους με κεντρομερίδιο. Οι δακτύλιοι αυτοί συνοδεύονται επίσης πάντα από ζεύγος άκεντρων θραυσμάτων συνήθως μικρότερων σε μέγεθος από αυτά που συνοδεύουν τα δικεντρικά χρωμοσώματα, τα οποία συχνά αναφέρονται ως *double minutes*.

- **Ζεύγη άκεντρων θραυσμάτων** : πρόκειται για τμηματικές χρωμοσωμικές αποκολλήσεις κυρίως από τις άκρες του ίδιου χρωμοσώματος, τα οποία δεν επανασυνδέονται με τα χρωμοσώματα.

Οι αλλοιώσεις αυτές είναι οι συχνότερες που συναντώνται για δόσεις μέχρι και περίπου 8-10Gy [1],[3],[12],[13], [16],[17]. Στην εικόνα 3.2 παρουσιάζεται ο τρόπος με τον οποίο σχηματίζονται οι αλλοιώσεις αυτές αλλά και μερικές ακόμη που συναντώνται σπανιότερα :

ΤΥΠΟΙ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΩΝ ΒΛΑΒΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ						
Σε ένα χρωμόσωμα	Φυσιολογικό	Τελικό τμήμα	Ενδιάμεσο τμήμα	Δακτύλιος με κεντόμερο	Χωρίς κεντόμερο	Ανάστροφη επικόλληση
Μεταξύ χρωμοσωμάτων	Φυσιολογικά		Δικεντρικό χρωμ. + τμήμα		Συμμετρική ανταλλαγή	

Εικόνα 3.2 : Χρωμοσωματικές αλλοιώσεις [3].





Εικόνα 3.3 : Μια τυπική μετάφαση με δικεντρικές χρωμοσωματικές αλλοιώσεις και συνοδά ζεύγη άκεντρων θραυσμάτων. Με μπλέ βέλη σημειώνονται τα δικεντρικά χρωμοσώματα, με πράσινο βέλος ο δακτύλιος με κεντρομερίδιο και με μωβ χρώμα τα ζεύγη θραυσμάτων χωρίς κεντρομερίδιο.

(Πηγή : Εργαστήριο Υγιοφυσικής, Ραδιοβιολογίας και Κυτταρογενετικής ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»)

### **3.3 Σκέψεις για περαιτέρω μελέτη των βιολογικών βλαβών.**

Με τη συνεχή εξέλιξη της γνώσης στο αντικείμενο της ραδιοβιολογίας μελετάται το ενδεχόμενο και η έκταση που μπορεί αυτό να έχει, τα βιολογικά αποτελέσματα της έκθεσης σε ιοντίζουσα ακτινοβολία να μην προκαλούνται μόνο από μη επιδιορθώσιμες ή ατελώς διορθωμένες βλάβες του DNA, και κυρίως DSB. Ερευνητικά περιλαμβάνει την προσαρμογή της απόκρισης στην ακτινοβολία (adaptive response) και τις επιγενετικές αποκρίσεις (epigenetic responses) όπως τη γονιδιακή αστάθεια (genomic instability) και την μεταβίβαση σημάτων μεταξύ κυττάρων μετά την ακτινοβόληση (bystander signaling).

Η υπόθεση της προσαρμογής της απόκρισης στην ακτινοβολία πηγάζει από πειραματικά αποτελέσματα που δείχνουν ότι η ακτινοβόληση συγκεκριμένων συστημάτων οδηγεί σε αυξημένη αντοχή σε επόμενη ακτινοβόληση. Παρότι υπάρχουν αυξανόμενες αποδείξεις για την ενεργοποίηση γονιδίων λόγω της έκθεσης σε χαμηλές δόσεις ακτινοβολίας τα οποία δυνητικά συμμετέχουν σε διάφορες βιολογικές αποκρίσεις (επαναπληθυσμοποίηση, επιδιόρθωση βλάβης, κυτταρικός θάνατος), οι ανασκοπήσεις της διεθνούς βιβλιογραφίας από αρμόδιους οργανισμούς καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η προσαρμογή της απόκρισης δεν είναι γενικό χαρακτηριστικό των κυττάρων in vivo και in vitro και ότι, παρά μερικά θετικά αποτελέσματα, μελέτες σε πειραματόζωα δεν

προσφέρουν συνεπείς ενδείξεις για τη μείωση των ανεπιθύμητων αποτελεσμάτων της ακτινοβολίας.

Ο όρος **επιγενετικές** αναφέρεται γενικά σε **αποκρίσεις** κυττάρων που παρατηρούνται μετά από ακτινοβόληση χωρίς να εμφανίζεται άμεση βλάβη του DNA. Για παράδειγμα σχετικά πρόσφατα προσδιορίστηκε ότι ενώ τα κύρια αποτελέσματα από την έκθεση σε ακτινοβολία εμφανίζονται άμεσα (ανακοπή του κυτταρικού κύκλου, θάνατος), μπορεί κάποια κύτταρα που επιβιώνουν εμφανίζουν διαρκώς υψηλό επίπεδο χρωμοσωματικών ανωμαλιών υποδεικνύοντας ότι η ακτινοβολία μπορεί να οδηγήσει σε μεγάλης διάρκειας αποτελέσματα που εκδηλώνονται ως γονιδιακή αστάθεια. Η εξέλιξη όμως που αμφισβητεί περισσότερο από όλες την παγιωμένη θεώρηση για το μηχανισμό πρόκλησης βλάβης από ακτινοβολία είναι η παρατήρηση ότι κάποια κύτταρα σε καλλιέργεια μπορεί να υποστούν θάνατο ή μεταλλάξεις λόγω βλάβης σε παρακείμενα κύτταρα χωρίς τα ίδια να πληγούν από την ακτινοβολία. Αν και οι σχετικές μελέτες είναι σε πρώιμο στάδιο έχει υποτεθεί ότι το φαινόμενο οφείλεται στην απόκριση σε σήματα που μεταβιβάζονται από κύτταρα που έχουν πληγεί από την ακτινοβολία μέσω μορίων που είτε εισέρχονται μέσω χασμοσυνδέσεων (gap junctions) στην κυτταρική μεμβράνη γειτονικών κυττάρων είτε διαχέονται στο υλικό καλλιέργειας των κυττάρων.

### **3.4 Ο κυτταρικός θάνατος**

Η έκταση της βλάβης των χρωμοσωμάτων που θα εκδηλωθεί κατά την πρώτη μίτωση μετά την ακτινοβόληση είναι ο παράγοντας που συσχετίζεται καλύτερα από κάθε άλλο με τον κυτταρικό θάνατο.

- Μετά από την **εφάπαξ απορρόφηση σημαντικής δόσης** ιοντίζουσας ακτινοβολίας που θα προκαλέσει εκτεταμένη βλάβη στο DNA (καθώς και σε πρωτεΐνες, ένζυμα και την κυτταρική μεμβράνη) προκαλείται **άμεση νέκρωση του κυττάρου** (μη ελεγχόμενος μηχανισμός κυτταρικού θανάτου που δεν συνοδεύεται από βιοχημικούς δείκτες και χαρακτηρίζεται από αύξηση του όγκου του κυττάρου και τελικώς ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης).
- Χαμηλότερες τιμές δόσης που θα οδηγήσουν σε σχετικά μικρότερη, αλλά **μη επιδιορθώσιμη βλάβη του DNA**, θα προκαλέσουν **άμεση απόπτωση**. Η απόπτωση είναι σημαντικός ελεγχόμενος μηχανισμός κυτταρικού θανάτου που θεωρείται μέσο των πολυκύτταρων οργανισμών για την απόρριψη ανεπιθύμητων ή κατεστραμμένων κυττάρων και ορίζεται βάσει αυστηρών μορφολογικών κριτηρίων που περιλαμβάνουν συμπύκνωση της χρωματίνης και συρρίκνωση του πυρήνα, πτύχωση της κυτταρικής μεμβράνης, συρρίκνωση του κυττάρου κ.α..
- Εάν η δόση της ακτινοβολίας είναι μικρή και οδηγήσει σε **περιορισμένη αρχική βλάβη του DNA**, δραστηριοποιούνται μηχανισμοί προαγωγής της κυτταρικής επιβίωσης που περιλαμβάνουν ανακοπή του κυτταρικού κύκλου για την αποτελεσματικότερη δράση των επιδιορθωτικών μηχανισμών. Σε περίπτωση επιτυχούς επιδιόρθωσης της βλάβης τα κύτταρα συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται. Σε περίπτωση ανεπιτυχούς επιδιόρθωσης τα κύτταρα μπορεί να συνεχίσουν να πολλαπλασιάζονται ωστόσο επέλθει μιτωτική καταστροφή (όρος που περιλαμβάνει κυτταρικούς θανάτους που εκδηλώνονται κατά τη φάση της μίτωσης είτε οφείλονται σε χρωμοσωματικές ανωμαλίες είτε όχι) που επιτελείται με καθυστερημένη νέκρωση ή καθυστερημένη απόπτωση [1].

### 3.5 Καμπύλες κυτταρικής επιβίωσης και μαθηματικά μοντέλα

Μια διαδεδομένη μέθοδος μελέτης του βιολογικού αποτελέσματος διαφόρων επιβλαβών παραγόντων in-vitro, είναι οι κυτταρικές καλλιέργειες: ένας αριθμός κυττάρων που επιβιώνουν με τη χορήγηση θρεπτικής ύλης και πολλαπλασιάζονται με ρυθμό χαρακτηριστικό της σειράς στην οποία ανήκουν. Καθώς η παρατήρηση μεταβολικών διαδικασιών είναι δύσκολη, δείκτης της επίδρασης ενός επιβλαβούς παράγοντα μπορεί να είναι ο κυτταρικός θάνατος ή, απλούστερα, η απώλεια της ικανότητας αναπαραγωγής. Έτσι, προκειμένου για έκθεση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία, καμπύλες επιβίωσης κυττάρων καλούνται τα διαγράμματα που παρουσιάζουν το κλάσμα των κυττάρων μιας καλλιέργειας τα οποία διατηρούν την αναπαραγωγική τους ικανότητα,  $N/N_0$ , συναρτήσει της δόσης από ιοντίζουσα ακτινοβολία,  $D$ . Εξυπακούεται ότι η επιβίωση ισούται με τη μονάδα για  $D=0$  Gy.

Οποιαδήποτε καμπύλη επιβίωσης θα περιέχει τουλάχιστον ένα εκθετικό τμήμα (βλ. και παράρτημα Α). Έτσι το πρώτο μοντέλο που αναπτύχθηκε βάσει των πειραματικών αποτελεσμάτων ήταν το **μοντέλο στόχου**. Σύμφωνα με αυτό, η επιβίωση ενός κυττάρου εξαρτάται από την πιθανότητα να πληγεί μια συγκεκριμένη περιοχή του κυττάρου (στόχος) που είναι σημαντική για τη διατήρηση της αναπαραγωγικής ικανότητας. Έτσι, βάσει της κατανομής Poisson, η πιθανότητα (ή το κλάσμα) επιβίωσης δίνεται ως:

$$P=N/N_0=P(\text{να πληγούν } 0 \text{ στόχοι})=\exp(-D/D_0) \quad (5)$$

Όπου  $D_0$  η μέση δόση θανάτωσης (η δόση που θα επιφέρει το θάνατο στο 63% του αρχικού κυτταρικού πληθυσμού  $N_0$ ). Οι καμπύλες επιβίωσης σύμφωνα με το μοντέλο στόχου είναι ευθείες γραμμές σε λογαριθμική κλίμακα όπως για παράδειγμα φαίνεται στην εικόνα 19. Καμπύλες αυτής της μορφής είναι συμβατές με αποτελέσματα κυρίως για ιούς και βακτήρια. Το μοντέλο στόχου περιγράφει επίσης ικανοποιητικά μερικές ειδικές περιπτώσεις αποτελεσμάτων κυτταρικής επιβίωσης όπως πολύ ακτινοευαίσθητα κύτταρα θηλαστικών, χαμηλούς ρυθμούς δόσης, και ακτινοβολία υψηλού LET.

Τα περισσότερα κύτταρα των θηλαστικών εμφανίζουν μια περιοχή περιορισμένης μείωσης της επιβίωσης για σχετικά μικρές δόσεις, μικρή αρχική κλίση με άλλα λόγια, πριν η καμπύλη επιβίωσης γίνει μια φθίνουσα ευθεία προδίδοντας εκθετική συμπεριφορά. Το αρχικό αυτό τμήμα της καμπύλης που συνδέεται με τους κυτταρικούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης της βλάβης, καλείται συχνά και «ώμος» της καμπύλης. Για να εξηγηθούν αυτού του είδους τα δεδομένα, κατ' επέκταση του μοντέλου στόχου έγινε η υπόθεση ότι στο κύτταρο υφίστανται  $n$  ανεξάρτητοι στόχοι (**μοντέλο πολλαπλών στόχων**) που πρέπει να πληγούν. Έτσι η πιθανότητα να μην πληγεί ένας από τους  $n$  στόχους είναι:

$$P(0 \text{ πλήξεις σε ένα στόχο})=\exp(-D/D_0) \quad (6)$$

οπότε η πιθανότητα να πληγεί ένας από τους  $n$  στόχους είναι:

$$P(\text{να πληγεί } 1 \text{ στόχος})=1-\exp(-D/D_0) \quad (7)$$

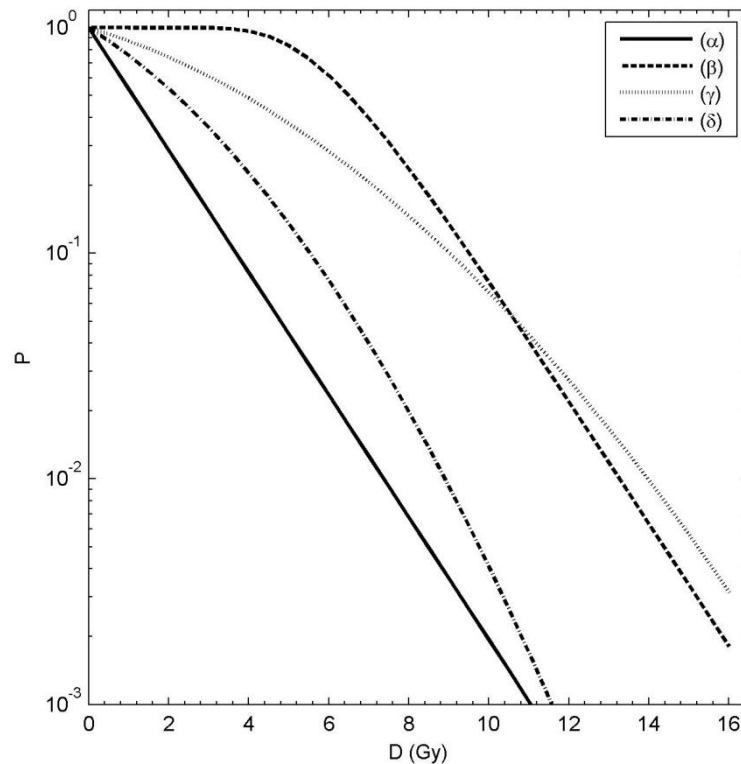
και η πιθανότητα να πληγούν όλοι οι  $n$  στόχοι:

$$P(\text{να πληγούν και οι } n \text{ στόχοι})=[1-\exp(-D/D_0)]^n \quad (8)$$

και τελικά η πιθανότητα (ή το κλάσμα) επιβίωσης δίνεται ως:

$$P=N/N_0=P(\text{να μην πληγούν και οι } n \text{ στόχοι})=1-[1-\exp(-D/D_0)]^n \quad (9)$$

Ένα παράδειγμα καμπύλης κυτταρικής επιβίωσης σύμφωνα με το μοντέλο πολλαπλών στόχων δίνεται στην εικόνα 3.4 :



**Εικόνα 3.4 :** Καμπύλες κυτταρικής επιβίωσης,  $P$ , συναρτήσει της δόσης,  $D$ , σύμφωνα με: (α) τη θεωρία στόχου για  $D_0=1.6\text{Gy}$  (β) τη θεωρία πολλαπλών στόχων για  $D_0=1.6\text{Gy}$ ,  $n=40$  (γ) το μοντέλο  $\alpha$ - $\beta$  για  $\alpha=0,125$ ,  $\beta=0,015$ ,  $\alpha/\beta=8$  (δ) το μοντέλο  $\alpha$ - $\beta$  για  $\alpha=0,25$ ,  $\beta=0,03$ ,  $\alpha/\beta=8$  , [1].

Παρατηρείται ότι οι καμπύλες επιβίωσης  $\alpha$  και  $\beta$  στην εικόνα 3.4 έχουν φυσικά την ίδια κλίση στο τμήμα της εκθετικής τους συμπεριφοράς. Λόγω της ύπαρξης του ώμου στην καμπύλη επιβίωσης του μοντέλου πολλαπλών στόχων όμως (καμπύλη  $\beta$ ) το ίδιο κλάσμα επιβίωσης αντιστοιχεί τώρα σε άλλη (μεγαλύτερη) δόση. Αυτή ήταν και η επιτυχία του μοντέλου. Προέβλεπε σωστά την επιβίωση σε μεγάλες δόσεις, αλλά όχι σε σχετικά μικρές στην περιοχή του ώμου όπου δίνει κλάσμα επιβίωσης 1 που υπονοεί την ύπαρξη κατωφλίου δόσης για την εμφάνιση βιολογικού αποτελέσματος [1],[17].

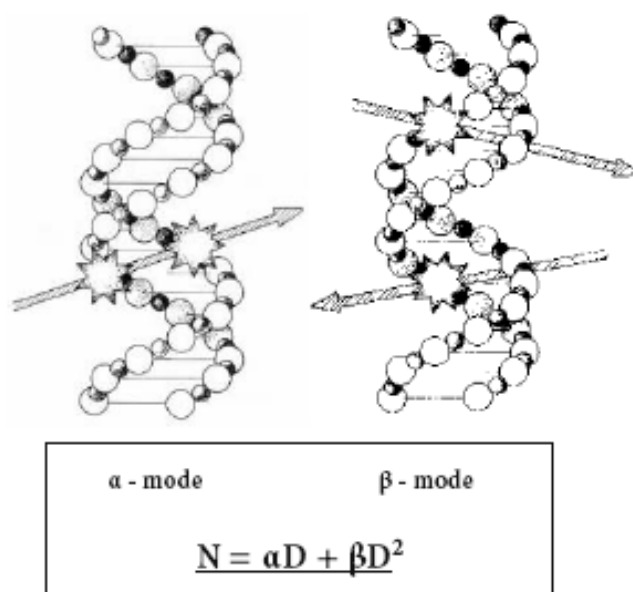
Καθώς επίσης στις περισσότερες περιπτώσεις δεν παρατηρείται αμιγώς εκθετική συμπεριφορά (ευθύγραμμο τμήμα σε ημιλογαριθμική κλίμακα) αλλά η κλίση του κλάσματος επιβίωσης αυξάνει με τη δόση, αναπτύχθηκε, και έχει επικρατήσει πειραματικά και κλινικά, το γραμμικό-τετραγωνικό μοντέλο (LQ από το Linear Quadratic) ή μοντέλο  $\alpha$ - $\beta$ . Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, το κλάσμα επιβίωσης δίνεται ως:

$$P=N/N_0=\exp[-(\alpha D+\beta D^2)] \quad (10)$$

και ένα παράδειγμα δίνεται στην εικόνα 3.4 . Οι καμπύλες που περιγράφονται από το μοντέλο α-β έχουν συνεχώς αυξανόμενη κλίση, η μορφή τους καθορίζεται από το λόγο α/β και περιγράφουν καλύτερα την κυτταρική επιβίωση στην περιοχή χαμηλών δόσεων (0-3 Gy) [1].

Μια ποιοτική εξήγηση της ισχύος του μοντέλου α-β συνδέεται με όσα αναφέρθηκαν στα προηγούμενα σχετικά με το γεγονός ότι οι DSB αποτελούν την σημαντικότερη βλάβη του DNA.

Όπως αποδίδεται γραφικά στην εικόνα 3.5 :



**Εικόνα 3.5 : Τύπου α και τύπου β DSB βλάβες στο DNA κατά την αλληλεπίδραση με ιοντίζουσα ακτινοβολία, σύμφωνα με το LQ μοντέλο [1].**

ο συντελεστής α (με μονάδες  $Gy^{-1}$ ) παριστάνει την πιθανότητα DSB ανά μονάδα δόσης λόγω των ιονισμών κατά μήκος της τροχιάς ενός σωματιδίου ακτινοβολίας που είναι ανεξάρτητη του ρυθμού δόσης, ενώ ο συντελεστής β (με μονάδες  $Gy^{-2}$ ) παριστάνει την πιθανότητα DSB ανά μονάδα δόσης λόγω των ιονισμών κατά μήκος της τροχιάς δύο διαφορετικών σωματιδίων ακτινοβολίας, που αυξάνει με το ρυθμό δόσης. Ο λόγος α/β έχει μονάδες δόσης και αντιστοιχεί στη δόση για την οποία η συνεισφορά του όρου αD ισούται με αυτή του όρου βD<sup>2</sup>.

Έτσι το μοντέλο προβλέπει επίσης σωστά την επίδραση της ποιότητας της ακτινοβολίας (π.χ. για ακτινοβολία υψηλού LET το α αυξάνει και το β παραμένει σταθερό οπότε α/β>> και η καμπύλη μεταπίπτει σε ευθεία σχεδόν σταθερής κλίσης όπως η καμπύλη α για το μοντέλο στόχου στο σχήμα 3.4) και του ρυθμού δόσης (π.χ. σε χαμηλό ρυθμό δόσης το α παραμένει σταθερό και το β μειώνεται και τείνει στο 0 για πολύ χαμηλό ρυθμό δόσης οπότε α/β<< και η καμπύλη εμφανίζει ώμο σε χαμηλές τιμές δόσης σε συμφωνία με τη μείωση του βιολογικού αποτελέσματος σε χαμηλούς ρυθμούς δόσης) [1],[19].

Γενικά, οι συντελεστές στα μοντέλα κυτταρικής επιβίωσης που συζητήθηκαν παραπάνω καθορίζονται πειραματικά και εξαρτώνται από μια σειρά παραγόντων που περιλαμβάνουν βιολογικές, φυσικές και χημικές παραμέτρους όπως συζητήθηκε στην προηγούμενη παράγραφο.

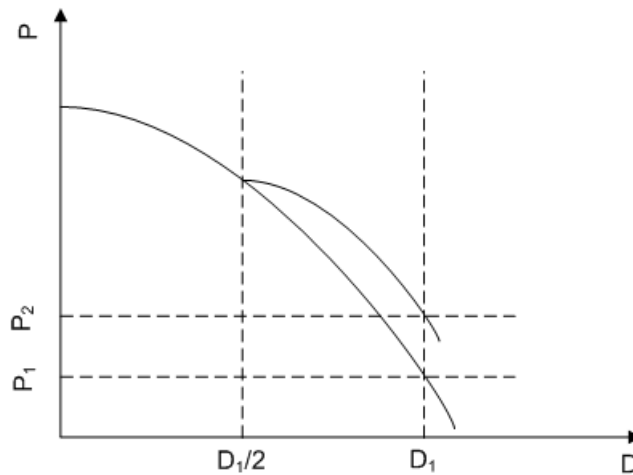
### **3.6 Παράγοντες που μεταβάλλουν τις βιολογικές επιδράσεις της ιοντίζουσας ακτινοβολίας**

Στην παράγραφο αυτή αναφέρονται, κατηγοριοποιημένοι, κάποιοι σημαντικοί παράγοντες που μπορεί να μεταβάλλουν-τροποποιήσουν τις βιολογικές επιδράσεις της ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Η συμβολή που μπορεί να έχουν εκφράζεται στην αύξηση ή μείωση των πιθανών αποτελεσμάτων από μια συγκεκριμένη δόση ακτινοβολίας. Οι κατηγορίες αυτών των παραγόντων είναι :

➤ **Φυσικοί παράγοντες** : Οι φυσικοί παράγοντες περιλαμβάνουν το είδος της ακτινοβολίας, την κατάτμηση της δόσης δεδομένης ακτινοβολίας, και τον ρυθμό δόσης.

Το είδος ή ποιότητα της ακτινοβολίας αφορά κυρίως στο LET της ακτινοβολίας (μέγεθος ενδεικτικό της απορρόφησης ενέργειας, ή ισοδύναμα της πυκνότητας ιονισμών, ανά μονάδα διαδρομής των σωματιδίων της ακτινοβολίας σε ένα υλικό) που συζητήθηκε προηγουμένα. Εύκολα γίνεται αντιληπτό ότι ακτινοβολία με μεγάλο LET έχει μεγαλύτερη πιθανότητα να πλήξει τον απειροστών διαστάσεων στόχο του DNA και να προκαλέσει DSB βλάβη. Για τη σύγκριση του αποτελέσματος διαφορετικών ειδών ακτινοβολίας έχει οριστεί η σχετική βιολογική αποτελεσματικότητα (Relative Biological Effectiveness-RBE) ως ο λόγος της δόσης μιας ακτινοβολίας αναφοράς (συνήθως αυτής δέσμης ακτίνων  $\times 250\text{keV}$ ) προς της δόση της ακτινοβολίας υπό δοκιμή που θα επάγει το ίδιο βιολογικό αποτέλεσμα. Λόγω της σημασίας της ποιότητας της ακτινοβολίας, εκτός από την απορροφούμενη δόση (D με μονάδες Gy) έχει οριστεί **το μέγεθος της ισοδύναμης δόσης** (H με μονάδες Sievert-Sv) [1].

Σημαντικό ρόλο διαδραματίζει επίσης από απόψεως βιολογικού αποτελέσματος ο τρόπος χορήγησης της δόσης δεδομένης ακτινοβολίας. Το γεγονός αυτό σχετίζεται με τους επανορθωτικούς μηχανισμούς των κυττάρων. Η κλασματική χορήγηση μιας δόσης έχει μικρότερο βιολογικό αποτέλεσμα από την εφάπαξ χορήγηση της ίδιας δόσης καθώς στην πρώτη περίπτωση δίνεται χρόνος να αναλάβουν δράση οι επανορθωτικοί μηχανισμοί. Το φαινόμενο αυτό παρουσιάζεται ποιοτικά στην εικόνα 3.6 με τη βοήθεια της καμπύλης του κλάσματος επιβίωσης κυττάρων συναρτήσει της δόσης :



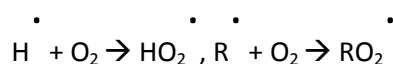
**Εικόνα 3.6 :** Ποιοτική αναπαράσταση της σημασίας της κατάτμησης της δόσης. Στην περίπτωση εφάπαξ χορήγησης δόσης  $D_1$  το κλάσμα επιβίωσης ( $P_1$ ) θα ήταν μικρότερο από ότι για χορήγηση σε δύο ίσα κλάσματα ( $P_2$ ) [1].

Η αύξηση του ρυθμού δόσης σχετίζεται επίσης με τον περιορισμό της αποτελεσματικότητας των κυτταρικών επιδιορθωτικών μηχανισμών και κυρίως με αύξηση της πιθανότητας δημιουργίας DSB λόγω ιονισμών κατά μήκος της τροχιάς δύο διαφορετικών σωματιδίων ακτινοβολίας, και οδηγεί σε αύξηση του βιολογικού αποτελέσματος (και άρα μείωση της κυτταρικής επιβίωσης) [1].

➤ **Χημικοί παράγοντες :** εμφανίζουν ενισχυτικό ή κατασταλτικό ρόλο στη βιολογική επίδραση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Οι κυριότεροι τροποποιητικοί χημικοί παράγοντες περιλαμβάνουν το μοριακό οξυγόνο, διάφορους δεσμευτές των δραστικών ελευθέρων ριζών όπως οι θειόλες και διάφορες αντιοξειδωτικές βιταμίνες, και τα ανάλογα της θυμιδίνης.

Η αυξημένη συγκέντρωση του μοριακού οξυγόνου στα κύτταρα (και όχι ο ρυθμός μεταβολισμού του ή άλλη σχετική παράμετρος) οδηγεί σε ενίσχυση του βιολογικού αποτελέσματος που εκφράζεται με το λόγο ενίσχυσης λόγω του οξυγόνου (Oxygen Enhancement Ratio-OER) που ορίζεται ως ο λόγος της δόσης ακτινοβολίας που απαιτείται σε ανοξικές συνθήκες αναφοράς για την πρόκληση δεδομένου βιολογικού αποτελέσματος προς την δόση της ίδιας ακτινοβολίας που θα επέγει το ίδιο βιολογικό αποτέλεσμα σε συνθήκες οξυγόνωσης.

Η ενίσχυση της βιολογικής βλάβης της ιοντίζουσας ακτινοβολίας με την αύξηση της συγκέντρωσης μοριακού οξυγόνου εξηγείται από την προαγωγή της έμμεσης δράσης λόγω του σχηματισμού επιπρόσθετων δραστικών ελευθέρων ριζών όπως υπεροξύλιο και οργανικές ρίζες υπεροξειδίου



Αντίστροφα, οι θειόλες (RSH) προστατεύουν από την ακτινοβολία μέσω της δέσμευσης και αδρανοποίησης δραστικών ελευθέρων ριζών, της δέσμευσης μοριακού οξυγόνου, και άρα τον περιορισμό της ενισχυτικής του επίδρασης στο βιολογικό αποτέλεσμα, ή άλλων μηχανισμών που έχουν προταθεί.

Τα ανάλογα θυμιδίνης τέλος θεωρείται ότι εξασθενούν τον κλώνο του DNA στον οποίο συνδέονται με αποτέλεσμα την προαγωγή της ευαισθησίας του σε πιθανή βλάβη από την ακτινοβολία ή και προκαλούν περισπασμό των επανορθωτικών μηχανισμών του κυττάρου [1].

➤ **Βιολογικοί παράγοντες** : Οι παράγοντες αυτοί περιλαμβάνουν την φάση του κυτταρικού κύκλου αλλά και το είδος των κυττάρων.

Αν και το κύτταρο είναι ευπρόσβλητο από την ιονίζουσα ακτινοβολία σε όλες τις φάσεις του κύκλου του, η ευαισθησία δεδομένου τύπου κυττάρων ποικίλλει από φάση σε φάση. Γενικά, η φάση της μεγαλύτερης ευαισθησίας είναι η G2 και η μίτωση ενώ τα κύτταρα είναι, σχετικά, λιγότερο ευαίσθητα στη φάση S. Αντίστοιχα, οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί της κυτταρικής βλάβης λειτουργούν σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου αλλά είναι αποδοτικότεροι στη φάση S.

Το είδος των κυττάρων καθορίζει επίσης σε μεγάλο βαθμό και τη σχετική τους ευαισθησία στην ακτινοβολία. Βάσει των διαθέσιμων στην εποχή τους δεδομένων, οι γάλλοι ραδιοβιολόγοι Bergonie και Tribondeau διατύπωσαν το 1906 το φερώνυμο νόμο που παρά τις εξαιρέσεις και την εξέλιξη της γνώσης στο σχετικό γνωστικό αντικείμενο, παραμένει ένας χρήσιμος πρακτικός κανόνας. Σύμφωνα με αυτόν, η ακτινοευαισθησία του κυττάρου είναι ανάλογη της μιτωτικής του δραστηριότητας και αντιστρόφως ανάλογη του βαθμού διαφοροποίησης του. Χαρακτηριστικό παράδειγμα εξαίρεσης του παραπάνω νόμου αποτελούν τα λεμφοκύτταρα και τα ώριμα ωκύτταρα. Η σχετική ευαισθησία των κυττάρων των θηλαστικών.

Λόγω της σημασίας του είδους των κυττάρων/ιστού που ακτινοβολείται, εκτός από την απορροφούμενη δόση (D, με μονάδες Gy) και την ισοδύναμη δόση (H, με μονάδες Sievert-Sv) έχει οριστεί το μέγεθος της ενεργού δόσης ( $E_{eff}$ , με μονάδες επίσης Sievert-Sv) που ορίζεται στο κεφάλαιο το σχετικό με την ακτινοπροστασία [1].



## 4. Βιολογική Δοσιμετρία

### 4.1 Δοσιμετρία- Χαρακτηριστικά μεγέθη

Η δοσιμετρία επιδιώκει να ποσοτικοποιήσει την **απορροφούμενη δόση** ιοντίζουσας ακτινοβολίας στην έμβια ύλη. Ως απορροφούμενη δόση ορίζεται η ποσότητα ενέργειας που εναποτίθεται μέσω ιοντισμών στη μονάδα μάζας της ύλης και μετριέται σε μονάδες gray (**Gy**) που ισοδυναμούν με μονάδες ενέργειας ανά μονάδες μάζας (**J/Kg**) [10].

Όπως ήδη προαναφέρθηκε τα διάφορα είδη ιοντίζουσας ακτινοβολίας διαφέρουν ως προς τον τρόπο αλληλεπίδρασής τους με τη βιολογική ύλη και ως εκ τούτου ίσα ποσά εναποτιθέμενης ενέργειας δεν έχουν τα ίδια βιολογικά αποτελέσματα. Η έννοια της ισοδύναμης δόσης εισήχθη για να περιγράψει μια σχέση ισοδυναμίας ανάμεσα στην απορροφούμενη ενέργεια, το είδος της ακτινοβολίας και το βιολογικό αποτέλεσμα. Έτσι ως **ισοδύναμη δόση** ορίζεται η απορροφούμενη δόση πολλαπλασιασμένη με έναν παράγοντα ο οποίος εξαρτάται από το είδος της ακτινοβολίας (για ηλεκτρομαγνητικές ακτινοβολίες και β-σωματίδια ισούται με 1, για α-σωματίδια με 20, για νετρόνια μεταξύ των τιμών 5-20) και μετριέται σε μονάδες Sievert (**Sv**) [10].

Για τη μέτρηση της έκθεσης ενός υλικού στην ακτινοβολία αλλά και της απορροφηθείσας δόσης από ένα υλικό, στην απλή δοσιμετρία χρησιμοποιούνται κυρίως ειδικά όργανα μέτρησης γνωστά ως δοσίμετρα. Τα διάφορα είδη δοσιμέτρων θα μπορούσαμε να πούμε ότι κατηγοριοποιούνται με βάση τις αρχές λειτουργίας τους, οι οποίες στηρίζονται στα χαρακτηριστικά των ακτινοβολιών, και ότι κατατάσσονται ως εξής :

- Μετρητές και ανιχνευτές ιοντισμών με αέριο
- Δοσίμετρα φωταύγειας
- Χημικά δοσίμετρα
- Βιολογικά δοσίμετρα
- Φωτογραφικά δοσίμετρα
- Θερμιδομετρικά δοσίμετρα

Δοσίμετρα χρησιμοποιούνται επίσης για τον έλεγχο των επιπέδων έκθεσης του προσωπικού των εργαστηρίων (δοσίμετρα προσωπικού).

Τα όργανα αυτά ουσιαστικά μετρούν το ρυθμό έκθεσης σε ακτινοβολίες ή την έκθεση σε συγκεκριμένο σημείο του χώρου όπου βρίσκεται ο εργαζόμενος. Όταν χρησιμοποιούνται προσωπικά δοσίμετρα, η ένδειξή τους πολλές φορές παρουσιάζει ανεξήγητα μεγάλες τιμές οι οποίες μπορεί να οφείλονται όντως σε υπερέκθεση του εργαζόμενου λόγω ατυχήματος ή απροσεξίας, αλλά πολύ συχνά οφείλονται σε έκθεση μόνο του δοσίμετρου, σε απότομες μεταβολές του περιβάλλοντα χώρου (πχ θερμοκρασιακές) και άλλες αιτίες. Επιπρόσθετα τα όργανα αυτά δε μπορεί να παρέχουν πληροφορία για εκτεθειμένα άτομα που δεν τα χρησιμοποιούν [1], [10].

Έτσι προέκυψε η ανάγκη αναζήτησης και ανάπτυξης βιολογικών μεθοδολογιών για την αξιολόγηση ατυχημάτων με ιοντίζουσες ακτινοβολίες, τον ποσοτικό προσδιορισμό των απορροφούμενων δόσεων και γενικά την εκτίμηση της επικινδυνότητάς τους. Οι μέθοδοι αυτές είναι εξαιρετικά

ευαίσθητες οι οποίες είτε σε συνδυασμό με τα υπόλοιπα δοσίμετρα είτε όχι, μπορούν να παρέχουν πολύ σημαντικές και ακριβείς πληροφορίες.

## **4.2 Το ιδανικό βιολογικό δοσίμετρο**

Ως βιολογικά δοσίμετρα χρησιμοποιούνται συνήθως ουσίες ή κυτταρικά συστήματα τα οποία βρίσκονται στα βιολογικά υγρά του σώματος. Οι μεταβολές που συμβαίνουν σε αυτά και η απόκρισή τους μετά από έκθεση σε ακτινοβολία, σχετίζονται ποσοτικά με την απορροφούμενη δόση.

Ένα βιολογικό δοσίμετρο επομένως, είναι ιδανικό όταν πληρεί τις εξής προϋποθέσεις :

- Να εξαρτάται από ένα ευρύ φάσμα απορροφούμενης δόσης με κατώτατο όριο αυτό της έκθεσης σε επαγγελματικό χώρο (20-30mSv για οξεία έκθεση, 50mSv για χρόνια έκθεση) και ανώτατο αυτό της έκθεσης λόγω ατυχήματος το οποίο μπορεί να ανέρχεται σε πολλά Gy.
- Να ανταποκρίνεται σε πολλά είδη ακτινοβολίας δίνοντας πληροφορία και για το είδος της ακτινοβολίας (δηλαδή να εμφανίζονται διαφορετικά παρατηρήσιμα αποτελέσματα ανάλογα του είδους της ακτινοβολίας). Ιδιαίτερη σημασία έχει η εσωτερική ακτινοβολία (πχ μετά από πρόσληψη ραδιονουκλιδίου για θεραπεία) της οποίας τα αποτελέσματα πρέπει να είναι μετρήσιμα με ακρίβεια.
- Τα αποτελέσματα να είναι διαθέσιμα σύντομα μετά την έκθεση (μέχρι λίγες μέρες μετά) σε περιπτώσεις ατυχημάτων.
- Να καταγράφονται στη «μνήμη» του βιολογικού δοσίμετρου οι διάφορες βιολογικές μεταβολές που παρατηρούνται μετά από έκθεση για μελλοντική χρήση.
- Να χρησιμοποιείται απλή και εύκολη διαδικασία λήψης του βιολογικού δείγματος που χρησιμοποιούν τα δοσίμετρα.

Η έρευνα για το ιδανικό δοσίμετρο έχει προσανατολιστεί στη χρήση ακτινοευαίσθητων κυτταρικών συστημάτων ως δοσίμετρων, και κυρίως των βιολογικών δομών τους όπου οι αλλοιώσεις που προκαλούνται λόγω ακτινοβολίας είτε δε μπορούν να επιδιορθωθούν είτε επιδιορθώνονται εσφαλμένα. Τέτοιες δομές υπάρχουν στο γενετικό υλικό των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος [1].

## **4.3 Τα λεμφοκύτταρα ως βιολογικό δοσίμετρο.**

Τα ανθρώπινα περιφερικά λεμφοκύτταρα αντιπροσωπεύουν ένα πληθυσμό κυττάρων που είναι κατά κύριο λόγο στη φάση G0 κυτταρικού κύκλου. Μόνο 0,2% ή λιγότερο των περιφερειακών λεμφοκυττάρων είναι σε άλλη φάση του κυτταρικού κύκλου και αυτά πιθανότατα προέρχονται από την ομάδα των μεγάλων λεμφοειδών κυττάρων που αντιπροσωπεύουν διεγερμένα λεμφοκύτταρα ή ανώριμα κύτταρα του πλάσματος. Τα κύτταρα από αυτήν την ομάδα σπάνια βρίσκονται στη φάση της μίτωσης στο περιφερικό αίμα.

Ο Nowell ήταν ο πρώτος που έδειξε ότι τα περιφερειακά «ανθρώπινα λευκοκύτταρα» μπορούν, όταν υποβάλλονται σε *in vitro* διαδικασίες να βρεθούν στη φάση της μίτωσης. Ενώ ο Carstairs έδειξε ότι «μικρά λεμφοκύτταρα» είναι στόχοι για τέτοιου είδους μιτογόνο έναρξη.

Τα περιφερικά μικρά λεμφοκύτταρα σε μια κηλίδα αίματος έχει παρατηρηθεί έχουν μεγάλους και πυκνούς πυρήνες που περιβάλλονται από σχετικά λίγο κυτταρόπλασμα και η συγκέντρωσή τους στο περιφερικό αίμα ποικίλει ως συνάρτηση της ηλικίας, της εθνικότητας, της παρουσία παθολογικών και των περιβαλλοντικών παραγόντων (δηλ κάπνισμα, η παχυσαρκία, η χρήση αλκοόλ, κ.λπ.).

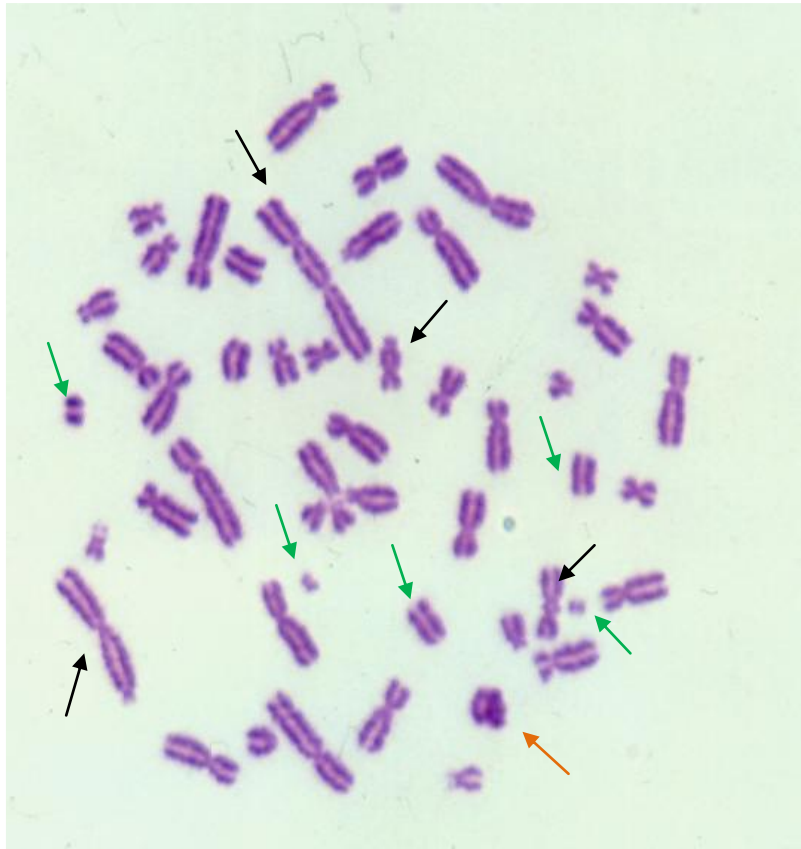
Για την *in vivo* ερμηνεία των επαγόμενων χρωμοσωματικών ανωμαλιών στον άνθρωπο, έχει μεγάλη σημασία το γεγονός ότι το μεγαλύτερο μέρος των περιφερικών λεμφοκυττάρων ανήκει στην «αναδιανεμητική δεξαμενή». Δηλαδή, τα λεμφοκύτταρα είναι ικανά να εγκαταλείψουν το περιφερικό αίμα, να περνούν μέσα από τον σπλήνα, τους λεμφαδένες και άλλους ιστούς, και να επανέλθουν στην κυκλοφορία. Ο μέσος χρόνος που μια δεδομένη αναδιανεμητική δεξαμενή λεμφοκυττάρων του είναι παρούσα στο περιφερικό αίμα είναι περίπου 30 λεπτά.

Έχει εκτιμηθεί ότι περίπου το 80% ανήκει στην αναδιανεμητική δεξαμενή και ότι ο συνολικός χρόνος ανακύκλωσης είναι περίπου 12 ώρες. Αυτό σημαίνει ότι τα λεμφοκύτταρα με χρωμοσωματικές αλλοιώσεις οι οποίες έχουν προκληθεί σε οποιοδήποτε σημείο του σώματος, μπορούν τελικά να είναι βρεθούν στο περιφερικό αίμα μετά από ένα χρονικό διάστημα να συλλεχθούν και να δώσουν πληροφορίες για την απορροφηθείσα δόση ακόμη και από μερική εσωτερική ακτινοβολία. Επίσης, επειδή στην πλειοψηφία τους τα κύτταρα αυτά πολλαπλασιάζονται κατά μέσο όρο κάθε 3,5 χρόνια, οι χρωμοσωματικές αλλοιώσεις λόγω ακτινοβολίας συσσωρεύονται με αποτέλεσμα η συλλογή τους να παρέχει μια εκτίμηση για την απορροφηθείσα δόση για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα μετά την έκθεση του ατόμου [1].

Για όλους αυτούς τους λόγους έχει εκτιμηθεί ότι **τα περιφερικά λεμφοκύτταρα αποτελούν το καταλληλότερο, μέχρι ώρας, βιολογικό δοσίμετρο.**

#### **4.4 Η κλασική κυτταρογενετική μέθοδος βιοδοσιμετρίας (Dicentric method)**

Η κλασική κυτταρογενετική μέθοδος βιοδοσιμετρίας προϋποθέτει συλλογή και καλλιέργεια για 48 ώρες, λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος παρουσία **μιτογόνων παραγόντων** (συνήθως **φυτοαιμαγλουτίνη-ΡΗΑ**) ώστε τα λεμφοκύτταρα να περάσουν από την φάση G<sub>0</sub>, στον κυτταρικό κύκλο ώστε να είναι δυνατή η ανάλυση των χρωμοσωματικών αλλοιώσεων στη μετάφαση της μίτωσης (η φάση κατά την οποία το πυρηνικό περίβλημα έχει διαλυθεί και τα χρωμοσώματα είναι παρατηρήσιμα στο μικροσκόπιο). Τέτοιες αλλοιώσεις είναι τα δικεντρικά χρωμοσώματα, οι κεντρικοί δακτύλιοι με τα συνοδά ζεύγη άκεντρων θραυσμάτων, όπως αυτά που φαίνονται στην εικόνα 4.1 :



**Εικόνα 4.1 :** Μεταφασική εικόνα περιφερικού λεμφοκύτταρου έπειτα από χρώση Giemsa. Διακρίνονται 4 δικεντρικά χρωμοσώματα (μαύρα βέλη) και ένας κεντρικός δακτύλιος (πορτοκαλί βέλος) μαζί με τα συνοδά άκεντρα ζεύγη θραυσμάτων (πράσινα βέλη)

(πηγή : Εργαστήριο Υγειοφυσικής, Ραδιοβιολογίας και Κυτταρογενετικής, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»)

Πιο συγκεκριμένα η μέθοδος περιλαμβάνει μια σειρά διαδικασιών που περιγράφονται στο πειραματικό μέρος της παρούσας εργασίας.

#### **Μερικά χαρακτηριστικά της μεθόδου-Καμπύλη δόσης απόκρισης**

Προκειμένου να προκύψει ένα δικεντρικό χρωμόσωμα, η βλάβη του DNA πρέπει να συμβεί σε δύο μη αντιγραμμένα χρωμοσώματα, έτσι ώστε τα κατεστραμμένα χρωμοσώματα να μπορούν να υποβληθούν σε ανταλλαγή. Αυτή η ανταλλαγή μπορεί να προκύψει είτε ως αποτέλεσμα της λανθασμένης επιδιόρθωσης των ρηγμάτων της έλικας DNA που προκαλείται άμεσα από την ακτινοβολία είτε ως αποτέλεσμα της λανθασμένης επιδιόρθωσης της βάσης στη βλάβη. Έτσι συμπεραίνουμε ότι οι βλάβες στα δύο χρωμοσώματα θα πρέπει να είναι κοντά μεταξύ τους, μέσα σε ένα διάστημα που ονομάζεται «απόσταση επανασύνδεσης», ώστε να είναι πιθανή η λανθασμένη επιδιόρθωση [1].

Αυτή η περιοχή ορίζεται ως στόχος. Δύο βλάβες, μία στην διπλή έλικα του DNA του κάθε μη αντιγραμμένου χρωμοσώματος, πρέπει να παραχθεί εντός αυτού του στόχου. Υπάρχει, όμως, πολύ μεγαλύτερη πιθανότητα οι δύο αλλοιώσεις να προκύψουν από 2 ιονισμούς σε 2 σημεία. Τα δικεντρικά χρωμοσώματα που έχουν προκύψει από έναν ιονισμό (δηλαδή το ίδιο φωτόνιο έχει προκαλέσει DSB βλάβη) θα έχουν συχνότητα που προσεγγίζεται από μια γραμμική συνάρτηση της

δόσης ενώ για αυτά που έχουν προκύψει από 2 ιονισμούς (δηλαδή η DSB βλάβη έχει προκύψει από 2 δύο φωτόνια) θα έχουν συχνότητα ανάλογη του τετραγώνου της δόσης [1].

Ο μέσος όρος εμφάνισης αυτών των αλλοιώσεων ανά κύτταρο για μια σειρά μετρήσεων είναι συνάρτηση της απορροφηθείσας δόσης η οποία προσδιορίζεται μέσω πρότυπων καμπυλών που κατασκευάζονται στα εργαστήρια και έχουν τη μορφή γραμμικής δευτεροβάθμιας εξίσωσης :

$$Y = C + \alpha D + \beta D^2 \quad (I)$$

Όπου :

**Y** είναι ο αριθμός των δικεντρικών χρωμοσωμάτων ανά κύτταρο

**D** είναι η δόση ακτινοβολήσης

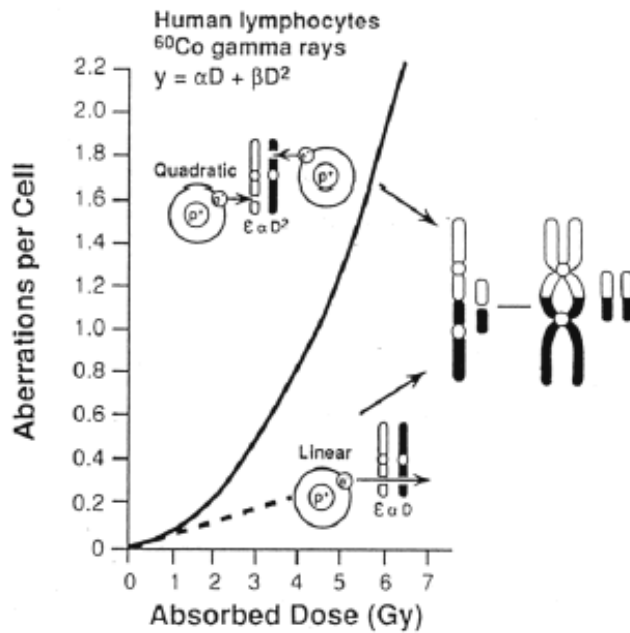
**C** είναι ο συντελεστής που εκφράζει την πιθανότητα να εμφανιστεί δικεντρικό χρωμόσωμα σε μη ακτινοβολημένο κύτταρο (control)

**α** είναι ο γραμμικός συντελεστής και

**β** είναι ο εκθετικός (τετραγωνικός συντελεστής)

Σε δόσεις κάτω των 0,5 Gy, η πιθανότητα 2 ιονισμών είναι τόσο χαμηλή ώστε τα δικεντρικά χρωμοσώματα να προέρχονται σχεδόν αποκλειστικά από 1 ιονισμό και σε χαμηλή συχνότητα. Με την αύξηση της δόσης, η καμπύλη δόσης-απόκρισης για τα χαμηλά LET προκύπτει από το συνδυασμό ενός και δύο-ιονισμών [1].

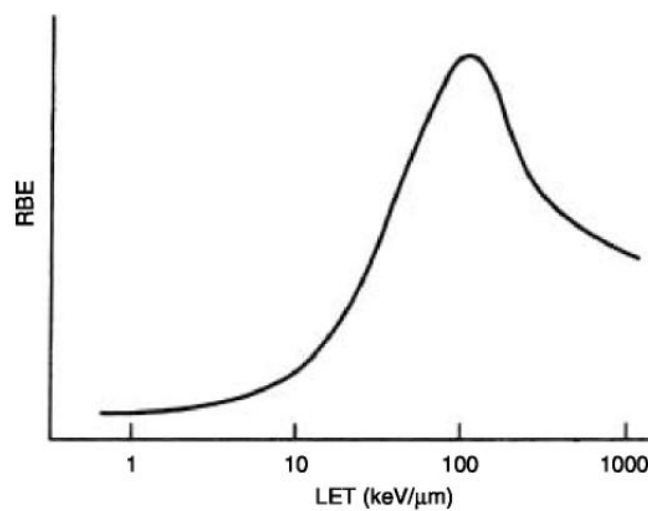
Η αναλογία  $\alpha / \beta$  αναφέρεται ως δόση cross-over. Είναι ίση με τη δόση στην οποία η γραμμική και η τετραγωνική εξάρτηση των dicentrics από τη δόση συνεισφέρουν εξίσου. Καθώς η LET της ακτινοβολίας αυξάνει μέχρι ένα μέγιστο, υπάρχει μεγαλύτερη πιθανότητα δύο βλάβες εντός του στόχου να επάγονται από δύο ιονισμούς κατά μήκος της ίδιας τροχιάς με αποτέλεσμα δύο συνέπειες. Η καμπύλη δόσης-απόκρισης σε γραμμική μεταφορά ενέργειας πάνω από περίπου 20 keV / μm θα είναι γραμμική. Επίσης, η απόδοση, ή RBE, από υψηλού LET ακτινοβολία για την επαγωγή dicentric, αυξάνεται με την αύξηση LET ως αποτέλεσμα της αυξημένης πιθανότητας οι δύο βλάβες να οφείλονται σε 1track (εικόνα 4.2) [1].



Εικόνα 4.2 : Καμπύλη δόσης απόκρισης δικεντρικής μεθόδου (Πηγή : Σημειώσεις κ. Τερζούδη)

Η μέγιστη RBE θα είναι σε τιμή LET όπου οι ιονισμοί γίνονται στη βέλτιστη απόσταση μεταξύ τους ώστε εξασφαλιστεί βλάβη σε καθεμία από τις δύο έλικες του DNA που εμπλέκονται στο σχηματισμό dicentric χωρίς «σπατάλη» ενέργειας.

Ωστόσο, αύξηση της LET πάνω από αυτή την βέλτιστη τιμή, θα οδηγήσει σε μεγαλύτερη εναπόθεση ενέργειας στο στόχο απ' όση είναι απαραίτητη και υπό αυτές τις συνθήκες η RBE θα μειώνεται καθώς αυξάνεται LET, όπως φαίνεται στο διάγραμμα της RBE με την LET στην εικόνα 4.3.



Εικόνα 4.3 : Εξάρτηση της RBE από την LET [1].

Συνοψίζοντας τη συζήτηση αυτή, η καμπύλη δόσης-απόκρισης (Εικ. 4.2)

- για χαμηλή ακτινοβολία LET, υψηλής ενέργειας πρωτόνια και τα ταχεία νετρόνια θα είναι μη γραμμικές και ταιριάζουν καλύτερα με ένα γραμμικά-τετραγωνικό μοντέλο
- η καμπύλη δόσης-απόκρισης για την ακτινοβολία υψηλής LET (νετρόνια σχάσης και σωματίδια άλφα) θα είναι γραμμική ή περίπου γραμμική και η RBE αυξάνει με την αύξηση LET σε μέγιστο περίπου 100 keV / μm και μειώνεται σε υψηλότερες τιμές LET (Εικ. 4.3).

### Κάποια μειονεκτήματα της μεθόδου

Παρ' ότι η κλασική μέθοδος για την εκτίμηση της απορροφηθείσας δόσης είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη, ωστόσο αξίζει να συζητηθούν ορισμένα ζητήματα που καθιστούν τη μέθοδο μη δόκιμη για όλες τις περιπτώσεις βιοδοσιμετρίας ως προς την απόδοσή της. Θα αναφερθούμε εδώ στα δύο σημαντικότερα :

- Χρησιμοποιεί ασταθείς αλλοιώσεις

Τα επαγόμενα-λόγω ακτινοβολίας- δίκεντρικά χρωμοσώματα και οι κεντρικοί δακτύλιοι στα οποία βασίζεται η μέθοδος, είναι από τη φύση τους ασταθείς χρωμοσωματικές αλλοιώσεις. Αυτό οφείλεται στον πεπερασμένο χρόνο ζωής των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος και την αντικατάστασή τους μετά από πολλαπλασιασμό αρχηγόνων κυττάρων κυρίως του μυελού των οστών. Η αντικατάσταση των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος πραγματοποιείται από νέα φυσιολογικά ή από λεμφοκύτταρα με αλλοιώσεις που δεν είναι, όμως, συμβατές με την κυτταρική διαίρεση αλλοιώσεις. Ο χρόνος ζωής των λεμφοκυττάρων είναι περίπου 3 χρόνια [1],[6].

- Η αξιοπιστία της ελαττώνεται με την πάροδο του χρόνου

Η σχέση δόσης-απόκρισης δε μπορεί να κατασκευαστεί αμέσως μετά την ακτινοβολήση, εξαιτίας του ότι πάντα υπάρχει χρόνος μεταξύ αυτής και της κυτταρικής διαίρεσης κατά τη διάρκεια του οποίου τα χρωμοσώματα δε μπορούν να εξεταστούν.

- Οι καμπύλες δόσης-απόκρισης βασίζονται εξολοκλήρου μόνο σε εκείνα τα λεμφοκύτταρα που έτυχε να ακινητοποιηθούν στις μεταφάσεις τους όταν συλλέγονται μετά από 48 ώρες καλλιέργειας
- Μερικά κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβη από την ακτινοβολία πεθαίνουν στη μεσόφαση κατά τη διάρκεια παραμονής τους στον επωαστικό κλίβανο αλλά λόγω της καθυστέρησης που προκαλεί η ακτινοβολία στον κυτταρικό κύκλο, δε μπορούν να προχωρήσουν στη μίτωση όταν τα κύτταρα συλλέγονται
- Το ποσοστό των λεμφοκυττάρων που φτάνει στη φάση της διαίρεσης με το τέλος της κλασικής καλλιέργειας των 48 ωρών, είναι περίπου 60% και εξαρτάται άμεσα από δόση του αίματος

Επομένως, όπως γίνεται αντιληπτό από τα παραπάνω , η αξιοπιστία της μεθόδου ελαττώνεται σημαντικά με την πάροδο του χρόνου από την μέρα της υπερέκθεσης, έτσι δεν προσφέρεται για εκτίμηση της δόσης σε περιπτώσεις που έχει παρέλθει μεγάλο χρονικό διάστημα από το ατύχημα. Συμπερασματικά η βιολογική δοσιμετρία έπρεπε να λύσει τα παραπάνω σημαντικά ζητήματα για να εξασφαλίσει μεγαλύτερη αξιοπιστία και ταχύτητα στην εκτίμηση της απορροφηθείσας δόσης. Στη συνέχεια, λοιπόν, περιγράφονται μερικές πιο σύγχρονες μεθοδολογίες [1], [6] .

### 4.5 Η μέθοδος της πρόωρης χρωμοσωματικής συμπύκνωσης-PCC (Premature Chromosome Condensation)

Η Βιολογική δοσιμετρία πραγματοποιείται γενικά με την ανάλυση dicentric ή / και μετατοπίσεων κατά την πρώτη μίτωση που προκύπτει από την in vitro 48ωρη καλλιέργεια με PHA. Αυτές οι μέθοδοι έχουν αρκετά μειονεκτήματα, δηλαδή από την ακτινοβολία προκαλείται μιτωτική

καθυστέρηση και κυτταρικός θάνατος κατά τη διάρκεια των δύο ημερών καλλιέργειας που απαιτούνται στην κλασική μέθοδο. Ειδικά μετά από υψηλές δόσεις ακτινοβολίας, μπορούν να προκληθούν σημαντικά προβλήματα που οδηγούν στην υποεκτίμηση της δόσης, όπως αναφέρθηκε. Η μέθοδος της πρόωρης συμπύκνωσης των χρωμοσωμάτων εφαρμόζεται στη φάση  $G_0$  των λεμφοκυττάρων, μειώνοντας, έτσι, σημαντικά ή ακόμα και εξαλείφοντας το χρόνο κυτταρικής καλλιέργειας και ως εκ τούτου την πιθανότητα για μιτωτική καθυστέρηση ή κυτταρικό θάνατο [4][6][8].

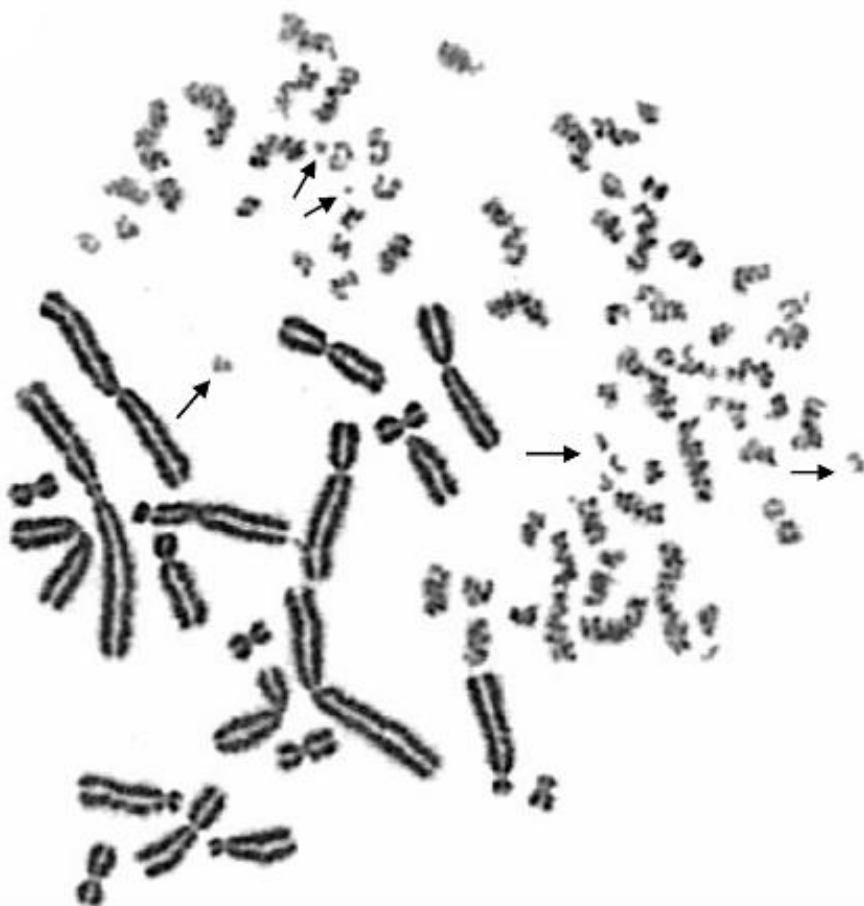
Η επαγωγή της PCC, η οποία χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά για τους σκοπούς της βιολογικής δοσιμετρίας, γίνεται με σύντηξη ανθρώπινων λεμφοκυττάρων με μιτωτικά κύτταρα ωοθήκης κινέζικου χάμστερ (**CHO- Chinese Hamster Ovary**) παρουσία ενός παράγοντα σύντηξης (πχ πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG)). Η μέθοδος αυτή παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα :

- επιτρέπει τη μέτρηση των χρωμοσωματικών ανωμαλιών αμέσως μετά την ακτινοβολία χωρίς να χρειάζεται καλλιέργεια για διέγερση του κυτταρικού κύκλου.
- αναλύει τις συχνότητες των χρωμοσωματικών ανωμαλιών, δηλαδή πέραν των θραυσμάτων, dicentric και μεταθέσεων.
- είναι χρήσιμη για τον προσδιορισμό της έκθεσης σε χαμηλές δόσεις αλλά και οξείες δόσεις χαμηλού και υψηλού- LET ακτινοβολίας.
- μπορεί να διακρίνει με ακρίβεια την ολική και μερική έκθεση του σώματος

[1],[2],[4],[6],[8].

Μια τυπική εικόνα PCC φαίνεται στην εικόνα 4.4 όπου μπορούμε να διακρίνουμε ένα μέρος του γονιδιώματος hamster σε μεταφασικό κύτταρο (διπλές χρωματίδες συνδεδεμένες με το κεντρομερίδιο) και τις μονές χρωματίδες ανθρώπινου λεμφοκυττάρου το οποίο βρίσκεται στη φάση  $G_0$  :





Εικόνα 4.4 : Τυπική εικόνα από το μικροσκόπιο, ακτινοβολημένου ανθρώπινου λεμφοκυττάρου με PCC. Τα χρωμοσώματα με διπλές χρωματίδες ανήκουν σε μέρος του γονιδιώματος hamster ενώ οι μονές χρωματίδες αποτελούν το γονιδίωμα του ανθρώπινου λεμφοκυττάρου. Τα βέλη καταδεικνύουν την περίσσεια χρωμοσωματικών θραυσμάτων (πέραν των 46 που έχει ένα μη ακτινοβολημένο κύτταρο) τα οποία είναι μικρότερα από τα υπόλοιπα.

(πηγή : Εργαστήριο Υγειοφυσικής, Ραδιοβιολογίας και Κυτταρογενετικής, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»)

Δεδομένου ότι με τη μέθοδο PCC ο αριθμός των φυσιολογικών κυττάρων αντικατοπτρίζει με μεγαλύτερη ακρίβεια το ποσοστό των μη ακτινοβολημένων λεμφοκυττάρων, η μέθοδος αυτή είναι αποτελεσματική για την ανίχνευση ακόμη και ενός μικρού κλάσματος. Η μέθοδος επίσης μπορεί να ποσοτικοποιήσει καλύτερα τις μικρές εντοπισμένες ακτινοβολήσεις από μερική σωματική έκθεση [1],[2],[4],[6],[8].

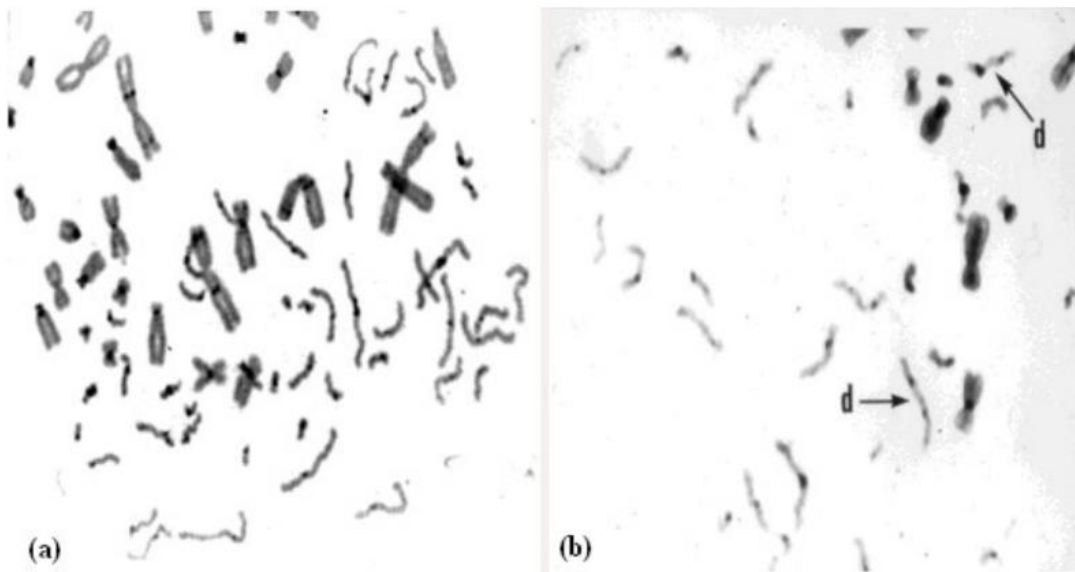
Η χρήση αυτής της μεθόδου PCC, σε συνδυασμό με τις συμβατικές τεχνικές όπως η C-banding ή η FISH (η μέθοδος FISH θα αναλυθεί παρακάτω) με τα χρωμοσώματα με ή χωρίς κεντρομερίδια, επιτρέπει την ανίχνευση των θραυσμάτων, των dicentric και των δαχτυλιδιών καθώς και των μετατοπίσεων.

### **C-banding (χρώση κεντρομεριδίων και PCC)**

Η μέθοδος PCC ποσοτικοποιεί την έκθεση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία με την ανάλυση των χρωμοσωμικών θραυσμάτων στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα. Όμως παρόλο που τα μονόκλωνα ανθρώπινα χρωμοσώματα διακρίνονται από τα CHO, η απλή χρώση Giemsa δεν αρκεί

- αφενός για να γίνουν εμφανή όλα τα θραύσματα δεδομένου ότι τα χρωμοσώματα έχουν την τάση να διογκώνονται και αυτό μπορεί να παρεμποδίσει την ακριβή μέτρηση των θραυσμάτων PCC αφού μικρά γειτονικά διογκωμένα θραύσματα φαίνονται σαν μια ενιαία δομή
- και αφετέρου γιατί δεν είναι παρατηρήσιμες αλλοιώσεις δικεντρικών και ακεντρικών χρωμοσωμάτων και δακτυλίων.

Για την βελτιστοποίηση της μεθόδου, λοιπόν, έπειτα από μελέτη (Pantelias et al. 1993), υπάρχει πλέον πρωτόκολλο χρώσης κεντρομεριδίων για τη οπτικοποίηση της περιοχής των κεντρομεριδίων των PCC-χρωμοσωμάτων σε συνδυασμό με τη χρώση Giemsa όπως φαίνεται στην εικόνα 4.5 παρατηρούνται οι μονές χρωματίδες περιφερικού ανθρώπινου λεμφοκυττάρου (στην εικόνα (b) φαίνεται μόνο ένα μέρος του μονοχρωματικού γονιδιώματος ενός λεμφοκυττάρου) έπειτα από πρόωρη χρωμοσωματική συμπύκνωση, με εμφανώς έντονα χρωματισμένο κεντρομερίδιο. Στην εικόνα (α) το λεμφοκύτταρο δεν είναι ακτινοβολημένο ενώ στην εικόνα (b) είναι ακτινοβολημένο με ακτινοβολία-X 4Gy με αποτέλεσμα τις δικεντρικές χρωμοσωματικές αλλοιώσεις που φαίνονται με βέλος:



**Εικόνα 4.5 :** Στις εικόνες αυτές αποτυπώνεται το αποτέλεσμα ενός συνδυασμού βιοδοσιμετρικών μεθόδων, της PCC και C-banding. Στην αριστερή εικόνα φαίνεται το γονιδίωμα ενός μη ακτινοβολημένου λεμφοκυττάρου (control) ενώ στη δεξιά φαίνεται μέρος του γονιδιώματος ενός ακτινοβολημένου κυττάρου με επισημασμένα (βέλη) δύο δικεντρικά χρωμοσώματα.

(πηγή : Εργαστήριο Υγειοφυσικής, Ραδιοβιολογίας και Κυτταρογενετικής, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»)

Η C-banding εφαρμόζεται άμεσα σε έτοιμα για παρατήρηση χρωμοσώματα χωρίς να προκαλεί διόγκωση ή παραμόρφωση των χρωμοσωμάτων [1],[4],[5],[6],[7],[8].

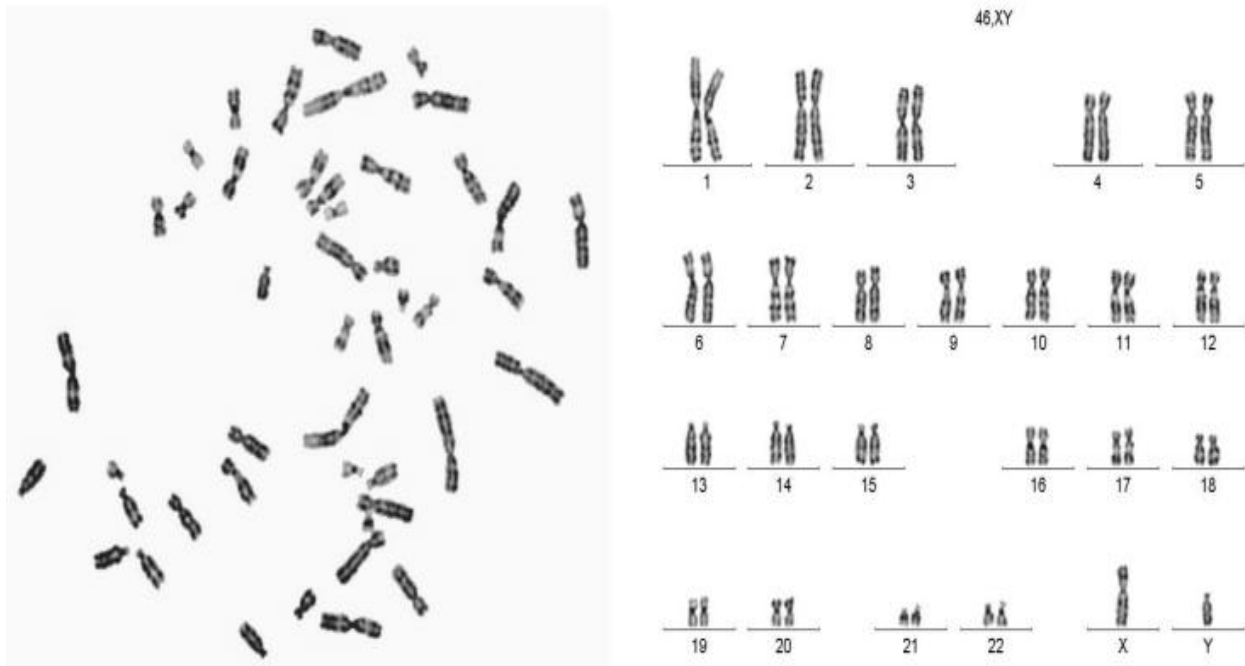
## **4.6 Άλλες κυτταρογενετικές μέθοδοι βιοδοσιμετρίας**

Παρά τις νέες δυνατότητες που εισάγει η μέθοδος PCC, παραμένει αρνητικό το γεγονός ότι και αυτή χρησιμοποιεί ασταθείς αλλοιώσεις για την εκτίμηση της απορροφηθείσας δόσης. Επομένως η αξιοπιστία και η ευαισθησία της ελαττώνεται με την πάροδο του χρόνου. Επομένως για τη βιολογική δοσιμετρία παραμένει το ζήτημα μεθοδολογίας που να δίνει μια εκτίμηση για εκθέσεις που έχουν συμβεί στο παρελθόν.

Οι μελέτες για την επίλυση του ζητήματος αυτού είναι προσανατολισμένες σε μεθόδους οι οποίες αξιοποιούν σταθερές αλλοιώσεις στα κύτταρα, δηλαδή αλλοιώσεις που είναι συμβατές με τον κυτταρικό κύκλο. Τέτοιες αλλοιώσεις θεωρούνται οι ανακατατάξεις και μετατοπίσεις χρωμοσωματικού υλικού με τρόπο ώστε το γονιδίωμα στο σύνολό του να παραμένει σταθερό. Πρόκειται, δηλαδή, για γονιδιακά σταθεροποιημένες αλλοιώσεις που μπορούν να ανιχνευτούν στα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος ακόμη και μετά από δεκάδες χρόνια από την έκθεση του ατόμου στην ακτινοβολία. Επίσης, έχουν ιδιαίτερη σημασία ως δείκτες που πιθανά συνδέονται με την καρκινογένεση, επομένως η μελέτη τους δίνει σημαντικές πληροφορίες για την καρκινογόνο δράση των ιοντιζουσών ακτινοβολιών [6].

### **4.6.1 GTG-Ζώνωση**

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε αρχικά για την ανίχνευση σταθερών χρωμοσωματικών αλλοιώσεων είναι η GTG-ζώνωση χρωμοσωμάτων με χρωστικές Trypsin και Giemsa η οποία επιτρέπει τον αδιαμφισβήτητο καθορισμό καθενός από τα χρωμοσώματα. Οι δομικές ατυπίες που αφορούν δύο ή περισσότερα χρωμοσώματα εμφανίζονται, συνήθως, σαν μετατοπίσεις ή ανταλλαγές χρωμοσωματικού υλικού στην ίδια χρωματίδα και έτσι μπορούν να εντοπιστούν με τον καρυότυπο μεταφασικών κυττάρων έπειτα από καλλιέργεια [1],[6]. Το αποτέλεσμα φαίνεται στις παρακάτω εικόνες 4.6 όπου φαίνεται, αριστερά, η απεικόνιση φυσιολογικού ανθρώπινου, περιφερικού, μεταφασικού λεμφοκυττάρου (έχει χρησιμοποιηθεί η κλασική μέθοδος και ως εκ τούτου φαίνονται διπλές χρωματίδες συνδεδεμένες με το κεντρομερίδιο) του οποίου τα χρωμοσώματα χρωματίστηκαν με τις χρωστικές Trypsin και Giemsa ώστε να γίνουν διακριτές οι ζώνες των χρωμοσωμάτων. Για να μπορεί η μέθοδος να δώσει παρατηρήσιμο αποτέλεσμα απαιτείται η διαδικασία καρυότυπισης και σύγκρισης των ζωνών των χρωμοσωματικών ζευγών όπως φαίνεται στο δεξί μέρος της εικόνας 4.6 :



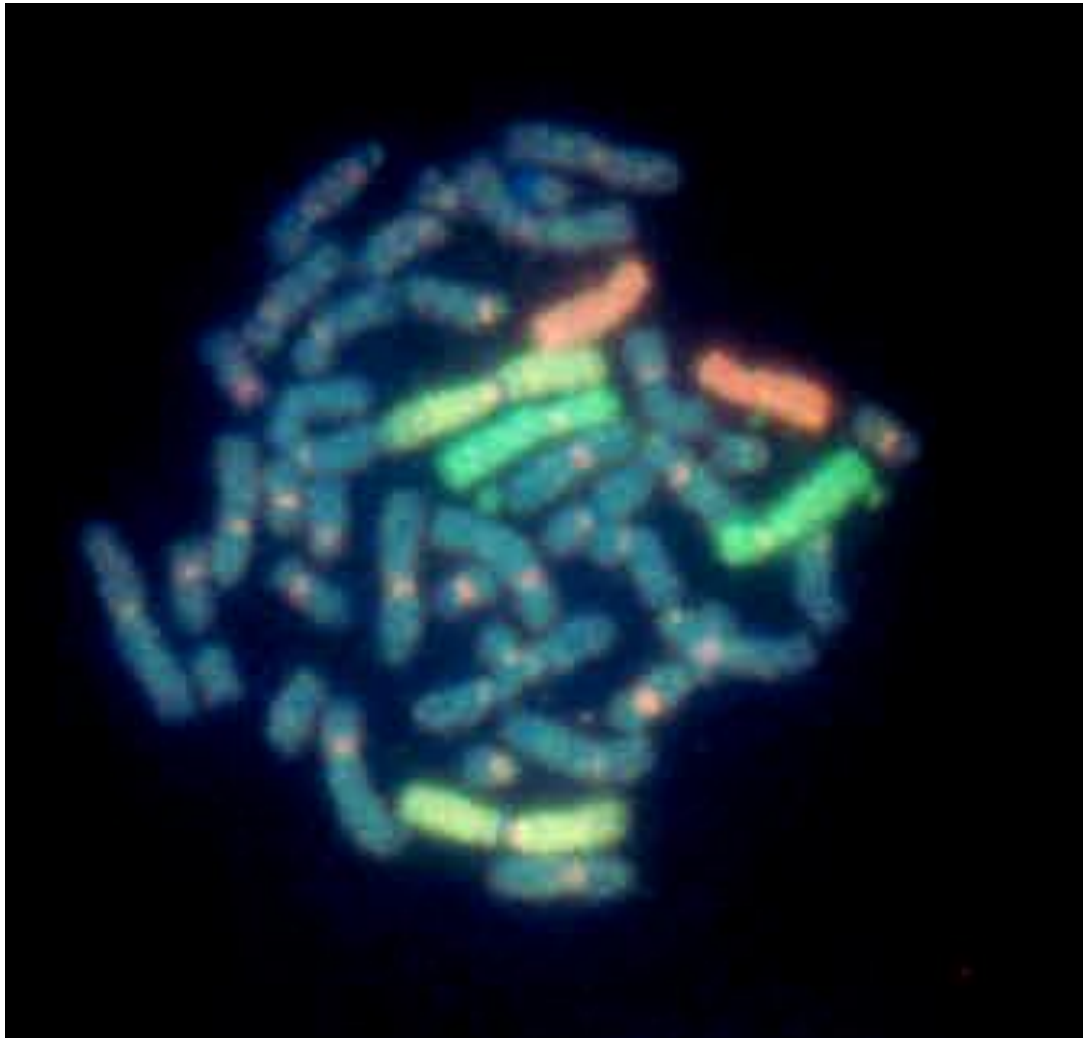
**Εικόνα 4.6 : Καρυοτύπιση με GTG-ζώνωση φυσιολογικού (μη ακτινοβολημένου) ανθρώπινου λεμφοκυττάρου άρρενος [6].**

Η ανάλυση, όμως, με τη μέθοδο αυτή, παρόλο που χρησιμοποιεί σταθερές χρωμοσωματικές αλλοιώσεις οι οποίες αφορούν το σύνολο του γονιδιώματος, είναι πολύ επίπονη και χρονοβόρα γιατί απαιτεί ανάλυση εκατοντάδων κυττάρων χωρίς τη χρήση αυτόματου αναλυτή καρυοτύπου για να δώσει εκτίμηση της απορροφηθείσας δόσης. Επομένως έγινε φανερή η ανάγκη εύρεσης μεθοδολογίας που θα διευκολύνει την «αναδρομική» βιολογική δοσιμετρία. Ως εναλλακτικές μέθοδοι της GTG-ζώνωσης χρησιμοποιούνται όλες οι προαναφερθείσες μέθοδοι σε συνδυασμό με τεχνικές μοριακής γενετικής νέας τεχνολογίας όπως η τεχνική FISH [1],[6].

#### **4.6.2 Η μέθοδος FISH (Fluorescent in situ Hybridization)**

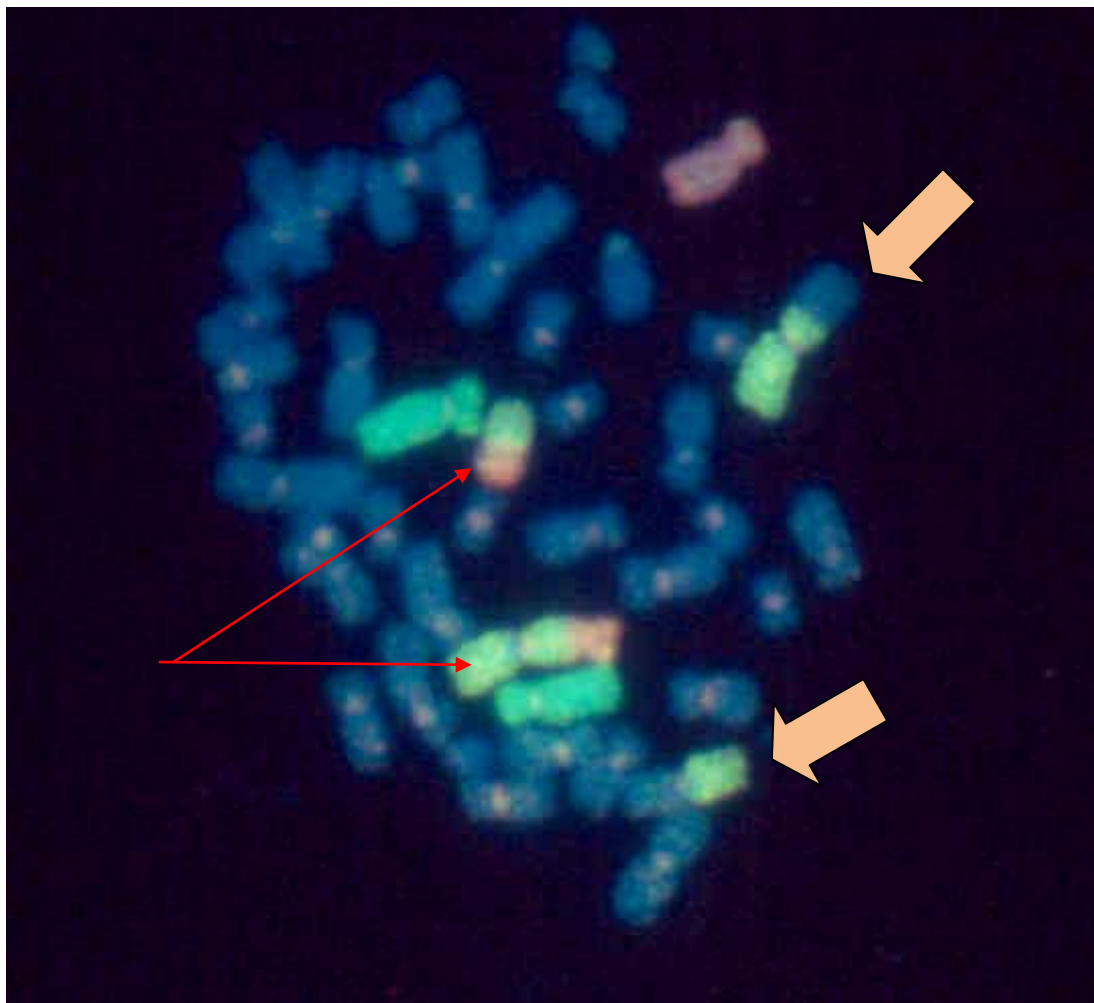
Η εισαγωγή της FISH έχει δώσει τη δυνατότητα να ανιχνεύονται τόσο σταθερές όσο και ασταθείς αλλοιώσεις με εναλλακτικές μεθόδους. Η τεχνική χρησιμοποιεί ειδικές αλληλουχίες του DNA οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ανιχνευτές για να συγκεκριμένο τμήμα του γονιδιώματος και, στη συνέχεια, με την προσάρτηση των διαφόρων φθοριοχρωμών να επισημαίνονται ή να βάφονται οι περιοχές αυτές με διαφορετικά χρώματα (συνήθως το τμήμα στο οποίο χρησιμοποιείται η τεχνική αποτελεί περίπου το 30% του συνολικού γονιδιώματος). Ως μεταθέσεις/μετατοπίσεις θεωρούνται οι χρωματισμένες ανακατατάξεις που φαίνονται σε ένα μικροσκόπιο φθορισμού [1].

Στις εικόνες 4.7, 4.8 απεικονίζεται ο συνδυασμός της κλασικής μεθόδου με την μέθοδο FISH για δύο μεταφασικά, ανθρώπινα λεμφοκύτταρα. Ως ανιχνευτές χρησιμοποιούνται τα χρωμοσώματα #1, #4 και #8 τα οποία βάφονται με κίτρινο, πράσινο και κόκκινο χρώμα αντίστοιχα. Τα υπόλοιπα χρωμοσώματα είναι βαμμένα μπλε και τα κεντρομεριδιά τους με πορτοκαλί. Στην εικόνα 4.7 το κύτταρο δεν είναι ακτινοβολημένο ενώ στην εικόνα 4.8 είναι ακτινοβολημένο και απεικονίζεται μια μετατόπιση στην οποία εμπλέκεται το χρωμόσωμα #4 (πορτοκαλί βέλη) και ένα δικεντρικό χρωμόσωμα με το συνοδό ακεντρικό θραύσμα στα οποία εμπλέκονται τα χρωμοσώματα #1 και #8.



Εικόνα 4.7 : Συνδυασμός κλασσικής μεθόδου και μεθόδου FISH σε ανθρώπινο λεμφοκύτταρο με τη χρήση των χρωμοσωμάτων #1, #4 και #8 (κίτρινο, πράσινο και κόκκινο) ως ανιχνευτές χρωμοσωματικών μετατοπίσεων, σε μη ακτινοβολημένο ανθρώπινο λεμφοκύτταρο.

(πηγή : Εργαστήριο Υγειοφυσικής, Ραδιοβιολογίας και Κυτταρογενετικής, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»)



Εικόνα 4.8 : Συνδυασμός δικεντρικής μεθόδου, τεχνικής FISH και C-banding σε ανθρώπινο λεμφοκύτταρο με τη χρήση των χρωμοσωμάτων #1, #4 και #11 (κόκκινο) ως ανιχνευτές χρωμοσωματικών μετατοπίσεων. Παρατηρείται μια μετατόπιση στην οποία εμπλέκεται το χρωμόσωμα #4 (πορτοκαλί βέλη) και ένα δικεντρικό χρωμόσωμα με το συνοδό ακεντρικό θραύσμα στα οποία εμπλέκονται τα χρωμοσώματα #1 και #8.

(πηγή : Εργαστήριο Υγειοφυσικής, Ραδιοβιολογίας και Κυτταρογενετικής, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»)

Με αυτόν τον συνδυασμό υπάρχει η δυνατότητα εντοπισμού τόσο σταθερών αλλοιώσεων όπως είναι οι μετατοπίσεις, όσο και ασταθών όπως είναι τα δικεντρικά χρωμοσώματα μαζί με τα συνωδά ζεύγη ακεντρικών θραυσμάτων.

Η FISH έχει πολλές εφαρμογές στην ιατρική και στην θεμελιώδη κυτταρογενετική και στη βιολογική δοσιμετρία. Μία μεγάλη ποικιλία ανιχνευτών είναι πλέον διαθέσιμη, έτσι ώστε κάποιος να μπορεί να χρωματίζει επιλεκτικά, ολόκληρα ή περιορισμένες περιοχές από τα ανθρώπινα χρωμοσώματα. Με την προσάρτηση φθοριόχρωμων σε διάφορες αναλογίες είναι δυνατόν να αναδειχθούν διάφορες περιοχές ταυτόχρονα με ένα ευρύ φάσμα χρωμάτων [1].

Αν και οι μετατοπίσεις είναι σταθερές μέσω της μίτωσης, εξακολουθεί να είναι καλή πρακτική να πραγματοποιείται η ανάλυση με M1 μεταφάσεις. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό διότι η μιτωτική απώλεια των κυττάρων που περιέχουν ασταθείς ανωμαλίες θα μπορούσαν να στρεβλώσουν τη μέση συχνότητα των μετατοπίσεων. Επιπλέον, μπορεί να υπάρχουν και περιπτώσεις όπου τόσο οι

συχνότητες στις σταθερές μετατοπίσεις όσο και στις ασταθής (dicentric) απαιτείται να αναλυθούν από το ίδιο δείγμα [1].

Οι ενδοχρωμοσωμικές ανταλλαγές, όπως μικρές περικεντρικές αναστροφές, μπορούν να ανιχνευθούν με επιλεκτικό χρωματισμό των p και q βραχιόνων ενός χρωμοσώματος σε διάφορα χρώματα και οι αναδιατάξεις εντός ενός και μόνο βραχίονα μπορεί να ανιχνευθούν με mBAND όπου γίνεται multi- banding κατά μήκος ενός χρωμοσώματος. Η αυξημένη συχνότητα των ενδοανταλλαγών σε σχέση με τους κόμβους έχει προταθεί ως «δακτυλικό αποτύπωμα» του αποτελέσματος της υψηλής LET ακτινοβολίας και ως εκ τούτου, αυτές οι μέθοδοι έχουν ειδικές εφαρμογές για την έρευνα της επίδρασης στην ποιότητα της ακτινοβολίας [1].

### **Ο συνήθης τρόπος χρήσης της FISH**

Γενικά, η χρώση τριών από τα μεγαλύτερα χρωμοσώματα (δηλ # 1 έως # 12), που αντιπροσωπεύουν περίπου το 20% του γονιδιώματος, οδηγεί σε απόδοση περίπου 33% στην ανίχνευση μετατοπίσεων όταν χρησιμοποιείται ένα ενιαίο χρώμα. Το ποσοστό του γονιδιώματος που χρωματίζεται στο συνολικό γονιδίωμά του, εκτιμάται από τα φυσικά μήκη χρωμοσωμάτων. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται συνήθως.

Έτσι η απορροφηθείσα δόση προσδιορίζεται μέσω των πρότυπων καμπυλών αναφοράς. Οι σταθερές μετατοπίσεις, όπως και οι ασταθείς αλλοιώσεις (δικεντρικά χρωμοσώματα) είναι συνάρτηση της δόσης και ακολουθούν κατανομή Poisson με βάση τη δευτεροβάθμια εξίσωση :

$$Y = c + aD + bD^2$$

Η καμπύλη που προκύπτει είναι αποτέλεσμα του γεγονότος ότι οι σταθερές χρωμοσωματικές αλλοιώσεις προκύπτουν είτε από αλληλεπίδραση δύο θραυσμάτων επαγόμενων από την ίδια διαδρομή της δέσμης ακτινοβολίας αποδίδοντας τον πρωτοβάθμιο όρο, είτε από την αλληλεπίδραση δύο θραυσμάτων επαγόμενων από διαφορετικές διαδρομές της ακτινοβολίας αποδίδοντας το δευτεροβάθμιο όρο.

Οι μετατοπίσεις που ανιχνεύονται με αυτόν τον τρόπο, αφορούν ένα μέρος του γονιδιώματος. Προκειμένου, λοιπόν, τα αποτελέσματα να είναι συγκρίσιμα με αυτά που προκύπτουν από τις συμβατικές μεθόδους, χρειάζεται στους υπολογισμούς να γίνει αναγωγή σε όλο το γονιδίωμα για να υπάρξει μια εκτίμηση των συνολικών του αλλοιώσεων. Επομένως, με την προϋπόθεση ότι τα επαγόμενα από την ακτινοβολία θραύσματα της διπλής έλικας του DNA κατανέμονται τυχαία, η συχνότητα των χρωμοσωματικών μετατοπίσεων στο συνολικό γονιδίωμα δύναται να εκτιμηθεί. Η αναγωγή γίνεται βάσει της εξίσωσης του Lucas et al.(1992) :

$$F_g = \frac{F_p}{2,05 \cdot f_p \cdot (1 - f_p)}$$

Όπου  $F_g$  η συχνότητα των χρωμοσωματικών μετατοπίσεων στο συνολικό γονιδίωμα

$F_p$  η συχνότητα των μετατοπίσεων στα επισημασμένα χρωμοσώματα

$f_p$  το μέρος του γονιδιώματος που έχει επισημανθεί [1].

# Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## Εισαγωγή

Το πειραματικό μέρος της παρούσας διπλωματικής εργασίας περιλαμβάνει την συγκριτική μελέτη δύο βασικών μεθόδων της Βιολογικής Δοσιμετρίας :

- I. Της κλασικής μεθόδου (Dicentric Method)
- II. Της μεθόδου πρόωρης χρωμοσωματικής συμπύκνωσης PCC (Premature Chromosome Condensation)

με απώτερο στόχο την εκτίμηση της απορροφημένης δόσης από δύο δείγματα τα οποία έφτασαν στο εργαστήριο Υγαιοφυσικής, Ραδιοβιολογίας και Κυτταρογενετικής του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» από το δίκτυο RENE (Realizing European Network in Biodosimetry) πρόκειται για ένα ευρωπαϊκό συνεργατικό δίκτυο εργαστηρίων βιολογικής και αναδρομικής δοσιμετρίας το οποίο ιδρύθηκε το έτος 2012 και στο οποίο συμμετέχουν 23 εργαστήρια από 16 ευρωπαϊκές χώρες, ένα εκ των οποίων είναι το εργαστήριο Υγαιοφυσικής, Ραδιοβιολογίας και Κυτταρογενετικής του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος».

Για τις δύο μεθόδους εκτελέστηκαν δύο ειδών σειρές πειραμάτων. Η πρώτη σειρά περιλάμβανε ακτινοβόληση με γνωστές δόσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας, περιφερικού αίματος υγιούς δότη (μη εκτεθειμένου σε ακτινοβολία) με σκοπό την κατασκευή καμπύλης αναφοράς για την απόκριση της δόσης. Η δεύτερη σειρά περιλάμβανε την ανάλυση δειγμάτων από ακτινοβολημένους δότες για τα οποία έγινε εκτίμηση της απορροφηθείσας δόσης με βάση τις πειραματικές καμπύλες αναφοράς. Ακολουθούν συμπεράσματα για την αποδοτικότητα των δύο μεθόδων.



## 1. Ραδιενεργές πηγές και συνθήκες ακτινοβόλησης

Η ακτινοβόληση των δειγμάτων περιφερικού αίματος από υγιή δότη (μη εκτεθειμένο σε ιοντίζουσα ακτινοβολία) έγινε με **πηγή κοβαλτίου ( $^{60}\text{Co}$ )** GammaCell 220 Irradiator (Atomic Energy Ltd, Ottawa, Canada) σε θερμοκρασία δωματίου η οποία θωρακίζεται από παχύ στρώμα μολύβδου (Pb). Η **αρχική ενεργότητα** της πηγής, όπως αναγράφεται στην ένδειξή της, είναι **5470Curies** (January 1974). Δεδομένου ότι δεν αναγράφεται κάποιο σφάλμα, μπορούμε να θεωρήσουμε ένα σφάλμα της τάξης  $\pm 1\text{Ci}$ . Έτσι :

$$R_0 = (5470 \pm 1)\text{Ci}$$

Για τον καθορισμό της ενεργότητας την ημερομηνία διεξαγωγής των πειραμάτων (22/10/2014) υπολογίζεται από τη διαφορά ως προς το χρόνο του νόμου ραδιενεργών διασπάσεων :

$$N(t) = N(0) \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \rightarrow R(t) = \frac{dN(t)}{dt} = \frac{dN}{dt}(0) \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \text{ όπου τα } \tau \text{ ο μέσος χρόνος ζωής με}$$

$$\tau = \frac{\tau_{1/2}}{\ln 2}. \text{ Ο χρόνος ημιζωής του } ^{60}\text{Co} \text{ είναι :}$$

$$\tau_{1/2} = (1925,1 \pm 0,1)\text{d} \rightarrow \tau = (2777,9 \pm 0,1)\text{d}$$

Για τον υπολογισμό της ενεργότητας είναι αναγκαίος ο προσδιορισμός του χρονικού διαστήματος από την ημέρα κατασκευής (Ιανουάριος 1974) της πηγής έως την ημέρα διεξαγωγής του πειράματος (22/10/2014). Αν θεωρηθεί ότι η πηγή κατασκευάστηκε στα μέσα του μήνα Ιανουαρίου του 1974, εισάγεται ένα χρονικό σφάλμα  $\pm 15\text{d}$ . Έκτοτε παρήλθαν 38 έτη εκ των οποίων τα 10 ήταν δίσεκτα, και 279 ημέρες για το 2014 (από 15/1/2014 έως 22/10/2014). Έτσι συνολικά

$$t = [(29 \cdot 365 + 10 \cdot 366 + 279) \pm 15]\text{d} \rightarrow t = (14524 \pm 15)\text{d}$$

Έτσι η ενεργότητα της πηγής στις 22/10/2014 είναι :

$$R(14524) = 5470 \cdot e^{-\frac{14524\text{d}}{2777,9\text{d}}} \rightarrow R(14524) = 30,4\text{Ci}$$

Για τον υπολογισμό του σφάλματος, από τη θεωρία διάδοσης των σφαλμάτων [20] :

$$\delta R = \sqrt{\left(\frac{\partial R}{\partial t} \cdot \delta t\right)^2 + \left(\frac{\partial R}{\partial R_0} \cdot \delta R_0\right)^2 + \left(\frac{\partial R}{\partial \tau} \cdot \delta \tau\right)^2}$$

όμως το σφάλμα  $\delta t=0,1\text{d}$  που βρίσκεται στο εκθετικό, μπορεί να θεωρηθεί αμελητέο δεδομένου ότι είναι μικρότερο κατά 3 τάξεις μεγέθους από το  $\delta t$ . Έτσι από τη θεωρία των σφαλμάτων για συναρτήσεις δύο μεταβλητών, το  $\delta R$  υπολογίζεται :

$$\delta R = \overline{R_0} \cdot \sqrt{\left(\frac{\delta R_0}{\overline{R_0}}\right)^2 + \left(\frac{t}{\tau} \cdot \frac{\delta t}{\tau}\right)^2} \text{ Ci} = 30,4 \cdot \sqrt{\left(\frac{1\text{Ci}}{5470\text{Ci}}\right)^2 + \left(\frac{14524\text{d}}{2777,9} \cdot \frac{15\text{d}}{2777,9\text{d}}\right)^2} \text{ Ci}$$

$$\delta R = 0,86\text{Ci}$$

Επομένως η ενεργότητα την ημέρα της ακτινοβόλησης προσδιορίζεται :

$$R = (30 \pm 1) \text{Ci}$$

Ο ρυθμός δόσης είναι  $1\text{Gy}/2\text{min}\&15\text{sec}$  με σφάλμα  $0.1\text{ Gy}/2\text{min}\&15\text{sec}$  το οποίο αυξάνει κατά  $0,1\text{Gy}$  για αύξηση δόσης κατά  $1\text{Gy}$ . Για τον υπολογισμό του ρυθμού δόσης λήφθηκε υπόψη ότι η πηγή κατασκευάστηκε Ιανουάριο του 1974 και η αρχική της ενεργότητα ήταν  $R_0=5470\text{ Ci}$  (Curie).

Τα δείγματα με την άγνωστη απορροφηθείσα δόση εστάλησαν από το Sartstedt της Γερμανίας. Τα δείγματα αυτά ακτινοβολήθηκαν με γ-ακτινοβολία από πηγή Καισίου  $^{137}\text{Cs}$  σε **άγνωστες δόσεις** και εστάλησαν για μελέτη και εκτίμηση των δόσεων στο εργαστήριο Υγειοφυσικής του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε «Δημόκριτος».

## **2. Μέθοδοι και υλικά (Dicentric Method)**

### **2.1 Κυτταρική καλλιέργεια ακτινοβολημένων δειγμάτων**

Το δείγμα αίματος που παραλήφθηκε, μοιράστηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες με σκοπό την ακτινοβόλησή του με διαφορετικές δόσεις. Στη συνέχεια για κάθε δόση ακτινοβόλησης, το αίμα μοιράστηκε σε 4 δοκιμαστικούς σωλήνες για να καλλιεργηθεί.

Ανάλογα με τον τύπο κυττάρων που είναι επιθυμητό να καλλιεργηθούν, επιλέγεται το μέσο καλλιέργειας. Υπάρχουν αρκετά μέσα καλλιέργειας που μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Όλα είναι εμπορικά διαθέσιμα και έχουν αποδειχθεί ότι είναι κατάλληλα για καλλιέργεια λεμφοκυττάρων. Θα πρέπει να περιλαμβάνουν ορό Εμβρύου μόσχου (FBS) ή ανθρώπινο ορό AB καθώς επίσης να συμπληρωθούν με L-γλουταμίνη, ηπαρίνη και αντιβιοτικά (πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη συνήθως). Ανάλογα με τον κατασκευαστή, πολλά Media περιέχουν ήδη αυτά τα αντιβιοτικά. Ωστόσο, μπορεί να χρειαστεί να προστεθούν αντιβιοτικά κατά την αραιώση του Medium.

Στο εργαστήριο σε όλα τα δείγματα προστέθηκε θρεπτικό υλικό McCOYS 5A εμπλουτισμένο με 10% ορό FBS, 1% γλουταμίνη και 1% PS (πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη). Επίσης προστέθηκε η μιτογόνο ουσία PHA για να εκκινήσει ο κυτταρικός κύκλος των λεμφοκυττάρων. Στη συνέχεια οι καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε κλίβανο και επώαστηκαν για 72 ώρες στους 37 °C (η επώαση μπορεί να έχει διάρκεια 48-72 ώρες, στο πείραμά μας κρατήσαμε τη μεγαλύτερη διάρκεια προκειμένου να έχουμε όσο το δυνατόν περισσότερα μιτωτικά λεμφοκύτταρα) παρουσία 5% CO<sub>2</sub>. Τέλος, περίπου 3 ώρες πριν το τέλος της επώασης προστίθενται σε κάθε καλλιέργεια 50ml κολσεμίδης (colsemid).

Η κολσεμίδα εμποδίζει τα κύτταρα να προχωρούν τον κυτταρικό κύκλο πέρα από την πρώτη μετάφαση κατά την οποία τα χρωμοσώματα έχουν το μεγαλύτερο βαθμό συσπείρωσης και είναι πιο ευδιάκριτα στο μικροσκόπιο, αποδιοργανώνοντας την άτρακτο του πυρήνα.

### **2.2 Μονιμοποίηση σε slides**

Οι καλλιέργειες, μετά το πέρας του χρόνου επώασης, φυγοκεντρώνονται και το υπερκείμενο απομακρύνεται και αντικαθίσταται από ένα υποτονικό διάλυμα (5 ml) χλωριούχου καλλίου 0.075 M. Οι σωλήνες θα πρέπει να παραμείνουν για περίπου 15 λεπτά στους 37 °C, αλλά όταν απομονώνονται τα λεμφοκύτταρα, 3-5 λεπτά είναι αρκετά. Επίσης προστίθεται περίπου 1 ml στερεωτικό στο υποτονικό διάλυμα για να ελαχιστοποιηθεί η ανάδευση των κυττάρων κατά τη φυγοκέντρηση. Οι σωλήνες τότε θα πρέπει να περιστραφούν και πάλι, το υποτονικό διάλυμα απομακρύνεται και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 5-10 ml προσφάτως παρασκευασμένου στερεωτικού (3: 1 μεθανόλη / οξικό οξύ). Το στερεωτικό προστίθεται αργά, αλλά με σταθερό ρυθμό, ενώ ο σωλήνας αναδεύεται (Αυτό είναι σημαντικό αφού εξασφαλίζει ότι τα κύτταρα διασπείρονται σε ένα ομοιόμορφο εναιώρημα). Τα κύτταρα θα πρέπει στη συνέχεια να φυγοκεντριστούν πάλι και εναιωρηθούν εκ νέου σε τρεις αλλαγές του στερεωτικού. Αν χρειαστεί, τα κύτταρα μπορεί να αποθηκευθούν μακροπρόθεσμα σε στερεωτικό, ιδανικά σε καταψύκτη -20 °C. Εναλλακτικά, εάν τα slides πρόκειται να παρασκευαστούν άμεσα (την ίδια ή το πολύ την επόμενη μέρα), το εναιώρημα μπορεί να αποθηκευτεί και να διατηρηθεί στους 4 °C. Η τελική πλύση του στερεωτικού θα πρέπει να αφαιρεθεί, αφήνοντας, ωστόσο, επαρκή ποσότητα (0.25 mL) που θα δώσει έναν κατάλληλο όγκο στο εναιώρημα για τη διανομή επάνω στα slides. Ωστόσο, ο τελικός

όγκος εξαρτάται από την πυκνότητα των κυττάρων και μπορεί να αραιωθεί με περισσότερο διάλυμα στερεωτικού αν κριθεί απαραίτητο.

Το στρώσιμο του εναιωρήματος σε αντικειμενοφόρους πλάκες απαιτεί καθαρά και μη λιπαρά slides. Γι' αυτό στο εργαστήριο γίνεται επιπλέον καθάρισμα με τη χρήση ενός υγρού απολίπανσης. Αυτό μπορεί να είναι ένα 1: 1 μίγμα ακετόνης και μεθανόλης ή ένα μίγμα 1: 1 από αιθέρα και αιθανόλη, ή 1% πυκνό υδροχλωρικό οξύ σε μεθανόλη. Όταν απαιτείται, τα πλακίδια μπορούν να ξηραίνονται και να γυαλίζονται με καθαρό απορροφητικό χαρτί. Ο διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων είναι καλύτερος αν οι διαφάνειες είναι κρύες και υγρές. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την αποθήκευση των πλακιδίων σε έναν καταψύκτη μέχρι ακριβώς πριν από την χρήση ενώ η τήξη του παγετού στη επιφάνειά τους γίνεται με την αναπνοή μερικές στιγμές πριν από τη διανομή των κυττάρων. Καλύτερη ύγρανση των πλακιδίων επιτυγχάνεται με τη διάχυση μεθανόλης στην κορυφή του παγωμένου υδάτινου επιστρώματος αλλά όχι ανακατεμένο. Η υγρή επιφάνεια θα πρέπει να ανακινείται από το κλείστρο μια στιγμή πριν τα κύτταρα διανεμηθούν.

Επίσης η εμπειρία έχει δείξει ότι η διασπορά των χρωμοσωμάτων μπορεί να είναι επηρεάζεται έντονα από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος και τη σχετική υγρασία του εργαστηρίου. Μεταβλητή ποιότητα λόγω αυτών των παραγόντων μπορεί να ξεπεραστεί με τη διανομή των κυττάρων σε ένα ελεγχόμενο περιβάλλον. Για το λόγο αυτό, στο εργαστήριο υπάρχουν ειδικοί πάγκοι εργασίας με απορροφητήρες.

Τα κύτταρα με το υπόλοιπο στερεωτικό διοχετεύονται με μία πιπέττα πάνω στο slide σε δύο ή τρεις σταγόνες (στο πείραμα αυτό εκτιμήσαμε ότι δύο σταγόνες είναι αρκετές). Για κάθε δόση απλώσαμε εναιώρημα σε δύο slides από καθεμία από τις 4 φλάσκες. Πριν από τη διανομή όλων των κυττάρων από μια καλλιέργεια σε slides, είναι καλό να τοποθετηθεί μία σταγόνα του αιωρήματος σε ένα δοκιμαστικό slide. Αυτό επιτρέπει να κρίνουμε αν η συγκέντρωση των μεταφάσεων είναι ευδιάκριτη και αν όχι να προβούμε σε συμπύκνωση ή αραιώση του υπόλοιπου εναιωρήματος. Εάν η εμφάνιση των μεταφάσεων στο δοκιμαστικό slide είναι κακή, δηλ συμπλέγματα των χρωμοσωμάτων έχουν απλωθεί άσχημα, συχνά βοηθά να προστεθεί μία ακόμη πλύση με στερεωτικό και χρησιμοποιώντας ξανά το πώμα να αποθηκευθούν οι σωλήνες στη διάρκεια της νύχτας στο ψυγείο και στη συνέχεια τα πλακάκια να στρωθούν την επόμενη ημέρα. Τα πλακίδια πρέπει να επιτραπεί να στεγνώσουν στον αέρα, και αυτό μπορεί να είναι επιταχυνθεί με ήπια θέρμανση ή στον ατμοσφαιρικό αέρα με έναν ανεμιστήρα.

### **2.3 Χρώση χρωμοσωμάτων**

Επόμενο βήμα για την ολοκλήρωση των πλακιδίων ώστε να είναι έτοιμα για παρατήρηση στο μικροσκόπιο, είναι η χρώση τους, εδώ με συμβατική χρώση Giemsa.

Για το σκοπό αυτό τα πλακίδια τοποθετούνται σε δοχείο χρώσης το οποίο περιέχει 1,5ml πυκνής χρωστικής Giemsa σε περίπου 50ml ρυθμιστικού διαλύματος Sorensen με pH 6,8. Έτσι προκύπτει 4% διάλυμα Giemsa στο οποίο τοποθετούνται τα πλακίδια για 10 λεπτά. Στη συνέχεια ξεπλένονται προσεκτικά με νερό βρύσης. Αφού στεγνώσουν, γίνονται μόνιμα παρασκευάσματα με την επικόλληση καλυπτρίδας, ενός είδους τζαμιού στις διαστάσεις του πλακιδίου πάνω στο οποίο ακουμπά ο φακός του μικροσκοπίου, με τη χρήση ειδικής κόλλας. Τότε τα πλακάκια είναι έτοιμα για παρατήρηση.

### **3. Μέθοδοι και υλικά (PCC)**

#### **3.1 Κυτταρική ανακαλλιέργεια CHO κυττάρων**

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η σύντηξη των ακτινοβολημένων δειγμάτων με κύτταρα CHO, ακολουθείται αρχικά μια διαδικασία ανακαλλιέργειας των CHO ώστε αυτά να φτάσουν στο στάδιο της μίτωσης, με τα παρακάτω βήματα :

1. Τα αποθέματα CHO που φυλάσσονται στο εργαστήριο (Εργαστήριο Βιοδοσιμετρίας του Ινστιτούτου Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε «Δημόκριτος») αφήνονται αρχικά να ξεπαγώσουν
2. Στη συνέχεια απομακρύνεται το υπερκείμενο από τα δοχεία το περιεχόμενο των οποίων χρειάζεται να ανακαλλιεργηθεί
3. Τα δοχεία καθαρίζονται από ίχνη παλιού ορού καλλιέργειας ή παλιού θρεπτικού υλικού με την προσθήκη ορού PBS (Phosphate Buffered Saline)
4. Προστίθεται τριψίνη, μια πρωτεΐνη για να ξεκολλήσουν τα κύτταρα της καλλιέργειας από τα τοιχώματα του δοχείου. Για το βέλτιστο αποτέλεσμα δράσης της τριψίνης τα δοχεία τοποθετούνται για 5-10 λεπτά στους 36,6°C στον επωαστικό κλίβανο
5. Στα δοχεία προστίθεται θρεπτικό υλικό McCOYS 5A εμπλουτισμένο με 10-15% ορό FBS, 1% γλουταμίνη και 1% PS (πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη)
6. Τέλος τα ανακαλλιεργημένα CHO εκχύνονται σε καθαρές και πλήρως αποστειρωμένες φλάσκες και αφήνονται για επώαση στον κλίβανο στους 37 °C παρουσία 5% CO<sub>2</sub> σε συνθήκες 100% υγρασίας.
7. Μετά το πέρας της ανακαλλιέργειας τα μιτωτικά κύτταρα CHO τοποθετούνται σε δοκιμαστικούς σωλήνες (τόσους όσους απαιτούνται για το εκάστοτε πείραμα) και φιογκεντρούνται στις 1300 στροφές για 7 λεπτά, αποχύνεται το υπερκείμενο και στη συνέχεια προστίθενται 4ml θρεπτικό υλικό χωρίς, ωστόσο να προστεθεί και FBS ορός δεδομένου ότι η παρουσία του δυσκολεύει τη σύντηξη για την οποία προορίζονται τα CHO. Επίσης προστίθενται 50ml κολσεμίδης και τότε τα CHO είναι έτοιμα για τη σύντηξη.

#### **3.2 Απομόνωση λεμφοκυττάρων από τα δείγματα αίματος**

Στην μέθοδο πρόωρης χρωμοσωματικής συμπύκνωσης η απομόνωση των λεμφοκυττάρων από τα δείγματα του περιφερικού αίματος, γίνεται πριν από τη σύντηξη με τα CHO κύτταρα και, προφανώς, πριν από την μετέπειτα κυτταρική καλλιέργεια. Στην εικόνα 3.1 φαίνεται η διαδικασία απομόνωσης των λεμφοκυττάρων από το αίμα με τη χρήση φικόλης (ενός υδρόφιλου πολυσακχαρίτη ο οποίος όταν διαλύεται στο αίμα το διαχωρίζει στα συστατικά του) :



**Εικόνα 3.1 : Απομόνωση λεμφοκυττάρων από περιφερικό αίμα**

Σε γυάλινους σωλήνες εκχύνουμε 5ml Bicolll Separating Solution το οποίο περιέχει φικόλη και στη συνέχεια, με τη χρήση πιπέτας Pasteur, 5ml αίματος (με αργό ρυθμό ώστε να μην αναμειχθούν). Ακολουθεί φιγοκέντρηση του δείγματος διάρκειας 25-30 λεπτά στις 1850 στροφές. Με αυτόν τον τρόπο τα λεμφοκύτταρα διαχωρίζονται ως ξεχωριστό στρώμα όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.1. Μετά την απομάκρυνση του πλάσματος (με τη χρήση πιπέτας Pasteur), συλλέγονται τα λεμφοκύτταρα (μαζί με μία ποσότητα φικόλης η οποία τα εξαναγκάζει να παραμείνουν στην επιφάνεια) και τοποθετούνται σε δοκιμαστικούς σωλήνες με αυξημένη ποσότητα θρεπτικού υλικού RPMI (η αυξημένη ποσότητα θρεπτικού υλικού διευκολύνει τα λεμφοκύτταρα να κάνουν ίζημα παρουσία της φικόλης που είναι ανασταλτικός παράγοντας) εμπλουτισμένου με ορό FBS και PS. Οι σωλήνες φιγοκεντρούνται για 15 λεπτά στις 1550 στροφές με αποτέλεσμα όλα τα λεμφοκύτταρα να έχουν τη μορφή ιζήματος. Το εναίωρημα αφαιρείται και στα λεμφοκύτταρα προστίθενται 10ml RPMI χωρίς ορό.

### **3.3 Σύντηξη CHO με τα λεμφοκύτταρα**

Η κυτταρική σύντηξη γίνεται με τη μέθοδο Pantelias and Maillie 1983. Για την επίτευξη της κυτταρικής σύντηξης είναι απαραίτητη η χρήση της συντηξιογόνου ουσίας πολυαιθυλενγλυκόλης (PEG) σε θερμοκρασία δωματίου. Η σύντηξη περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα :

1. Γίνεται η ανάμειξη των ανακαλλιεργημένων έτοιμων μιτωτικών κυττάρων CHO με τα απομονωμένα λεμφοκύτταρα.
2. Το μείγμα φιγοκεντρείται για 7 λεπτά στις 900 στροφές. Εάν παρατηρηθεί έλλειμμα θρεπτικού υλικού, προστίθεται και το μείγμα τοποθετείται στον κλίβανο για λίγο.
3. Ακολουθεί ακόμη μία φιγοκέντρηση, αφαιρούνται οι φυσαλίδες από το υπερκείμενο και οι σωλήνες αναποδογυρίζονται σε απορροφητικό χαρτί ώστε να απομακρυνθεί όλο το υπερκείμενο και να παραμείνει μόνο το κυτταρικό ίζημα.
4. Στο κυτταρικό ίζημα προστίθενται 150μl της συντηξιογόνου PEG με προσοχή. Το ίζημα εκτίθεται για περίπου 1 λεπτό στο συντηξιογόνο.
5. Ανακινούμε το κυτταρικό ίζημα προσθέτοντας συνολικά 6ml PBS (Phosphate Buffered Solution) σε 2 λεπτά. Το μείγμα φιγοκεντρείται στις 1300 στροφές για 7 λεπτά και το υπερκείμενο απομακρύνεται.

6. Στα κύτταρα προστίθεται θρεπτικό υλικό RPMI μαζί με FBS και Colsemide και η καλλιέργεια τοποθετείται στον κλίβανο για 1 ώρα και 15 λεπτά. Η σύντηξη επιτυγχάνεται στα πρώτα κιάλια στάδια της επώασης και η PCC ολοκληρώνεται.

### **3.4 Μονιμοποίηση σε slides- Χρώση χρωμοσωμάτων**

Για τη μονιμοποίηση των παρασκευασμάτων PCC, την προετοιμασία των slides, το στρώσιμο σε αυτά και τη χρώση τους ακολουθείται η ίδια διαδικασία που περιγράφηκε στις παραγράφους Β.1.3, Β.1.4.

## 4. Ανάλυση κυτταρικών παρασκευασμάτων

### Ανάλυση στο οπτικό μικροσκόπιο- Σύστημα IKAROS

Η παρατήρηση, ανάλυση και καταμέτρηση των χρωμοσωμικών αλλοιώσεων στη μετάφαση που έχουν πλέον μονιμοποιηθεί στα πλακάκια γίνεται με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου.

Το οπτικό μικροσκόπιο είναι σήμερα το πιο διαδεδομένο εργαλείο στα εργαστήρια κυτταρογενετικής. Αποτελείται από δυο συγκλίνοντες φακούς που είναι κατάλληλα στερεωμένοι στα άκρα ενός σωλήνα. Ο φακός που βρίσκεται κοντά στο αντικείμενο που εξετάζεται ονομάζεται αντικειμενικός και είναι μικρής εστιακής απόστασης.



Εικόνα 4.1 : Μικροσκόπιο Zeiss Axioscope.

(πηγή : Εργαστήριο Υγειοφυσικής, Ραδιοβιολογίας και Κυτταρογενετικής, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»)

Το προς παρατήρηση αντικείμενο τοποθετείται λίγο πιο πέρα από την κύρια εστία του αντικειμενικού φακού και σχηματίζει ένα είδωλο λίγο μεγαλύτερο από το πραγματικό. Αυτό λειτουργεί ως αντικείμενο για τον προσοφθάλμιο φακό. Ο προσοφθάλμιος φακός, που δρα ως μεγεθυντικός, δίνει ένα είδωλο φανταστικό και αντεστραμμένο ως προς το αντικείμενο.

Χαρακτηριστικό μέγεθος για το οπτικό μικροσκόπιο είναι η μεγέθυνση  $N$ , η οποία δίνεται από τη σχέση:

$$N = P \cdot \delta = \frac{I \cdot \delta}{\phi_{\pi} \cdot \varphi_{\alpha}}$$

όπου  $I$  είναι η απόσταση μεταξύ των δύο φακών,  $\phi_{\pi}$  η εστιακή απόσταση του προσοφθάλμιου φακού,  $\varphi_{\alpha}$  η εστιακή απόσταση του αντικειμενικού φακού και  $\delta$  η απόσταση ευκρινούς όρασης, όπου συνήθως  $\delta = 25\text{cm}$ . Μπορούμε όμως και να την υπολογίσουμε από το γινόμενο  $N = m \cdot M$ , όπου  $m$  είναι η μεγέθυνση του αντικειμενικού φακού και  $M$  η μεγέθυνση του προσοφθάλμιου φακού.

Τόσο στους αντικειμενικούς, όσο και στους προσοφθάλμιους φακούς των μικροσκοπίων, η μεγέθυνση αναγράφεται συμβολικά ως  $M_{\chi}$ , πχ.  $40\times$ . Συνεπώς μπορούμε να βρούμε τη μεγέθυνση με απλό πολλαπλασιασμό των τιμών που αναγράφονται στους φακούς.



Ένα άλλο χρήσιμο μέγεθος είναι το διακριτικό όριο. Η ικανότητα μεγέθυνσης μικροδομών στο οπτικό μικροσκόπιο περιορίζεται από το διακριτικό του όριο. Ως διακριτικό όριο του μικροσκοπίου ορίζεται η ελάχιστη απόσταση δυο σημείων του δείγματος, τα οποία δίνουν είδωλα διακριτά ως δυο διαφορετικά σημεία. Το διακριτικό όριο δίνεται από τη σχέση:

$$R = 0.61 \frac{\lambda}{A}$$

όπου  $\lambda$  είναι το μήκος κύματος του χρησιμοποιούμενου φωτός στο κενό και  $A$  το αριθμητικό άνοιγμα του φακού.

Για να έχουμε καλύτερη ευκρίνεια στην εικόνα χρησιμοποιούμε και μια ισχυρή πηγή φωτός. Το αριθμητικό άνοιγμα αναγράφεται πάνω στους αντικειμενικούς φακούς.

Στο πείραμα για να επιτύχουμε μικρό διακριτικό όριο χρησιμοποιήσαμε καταδυτικό φακό και παρεμβάλαμε κεδρέλαιο (με δείκτη διάθλασης 1,5) μεταξύ του δείγματος και του αντικειμενικού φακού. με αυτό τον τρόπο μεταβάλλεται το αριθμητικό άνοιγμα του αντικειμενικού φακού καθώς και το αριθμητικό άνοιγμα των ακτινών. Αυτό γίνεται ως εξής: Βυθίζοντας το αντικείμενο εντός διαφανούς υγρού, με δείκτη διάθλασης ίσο με αυτό του φακού καταδύσεως, οι ακτίνες οι εξερχόμενες από το αντικείμενο δεν διαθλώνται, αφού λείπει το στρώμα αέρα και έτσι διαδίδονται ευθύγραμμα και εντός του φακού.

Τα αντικείμενα που μπορούν να παρατηρηθούν με οπτικό μικροσκόπιο μπορούν να είναι διαμέτρου 1-60 $\mu$ m, έτσι ώστε να είναι δυνατός ο φωτισμός τους. Επειδή τα πιο πολλά κύτταρα είναι διαφανή στο φως, δε διακρίνονται, οπότε χρωματίζονται προκειμένου να μελετηθούν, όπως κάναμε και εμείς χρωματίζοντας τα χρωμοσωματικά παρασκευάσματα με Giemsa.

Στο εργαστήριο χρησιμοποιείται μικροσκόπιο ZEISS Axioscope με μεγεθύνσεις x100 ή x200 και x1000 ή x2000. Το προς παρατήρηση πλακάκι τοποθετείται και στερεώνεται στην αντικειμενοφόρο πλάκα του μικροσκοπίου και σαρώνεται οριζόντια ή κάθετα από φακό μεγέθυνσης x100 ή x200 ενώ οι παρατηρούμενες μεταφάσεις κεντράρονται χειροκίνητα στο οπτικό πεδίο του παρατηρητή και αναλύονται με φακό μεγέθυνσης x1000 ή x2000.

### **Dicentric method**

Κάθε αποδεκτή, προς καταμέτρηση, μετάφαση θεωρείται εκείνη η οποία περιλαμβάνει πλήθος χρωμοσωμάτων με συνολικά 46 κεντρομερίδια ενώ για κάθε δικεντρικό χρωμόσωμα ή κεντρικό δακτύλιο, υπάρχει και το αντίστοιχο ζεύγος άκεντρων θραυσμάτων.

### **PCC method**

Με τη μέθοδο αυτή καταμετρώνται τα χρωμοσωματικά θραύσματα (μονόκλωνα) τα οποία πρέπει να είναι 46 στα φυσιολογικά κύτταρα. Τα πλεονάζοντα των 46 προσμετρούνται ως χρωμοσωματικές αλλοιώσεις και είναι πολύ μικρά σε μήκος συγκριτικά με τα υπόλοιπα.

Η καταμέτρηση των στοιχείων κάθε μετάφασης γίνεται με το σύστημα επεξεργασίας εικόνας IKAROS (Metasystems). Το σύστημα αυτό ενσωματώνει στο οπτικό μικροσκόπιο κάμερα

συνδεδεμένη με τον ηλεκτρονικό υπολογιστή. Έτσι οι παρατηρούμενες μεταφάσεις φωτογραφίζονται κατευθείαν και αποθηκεύονται για επεξεργασία με το σύστημα IKAROS το οποίο επιτρέπει περεταίρω μεγέθυνση της εικόνας, αρίθμηση των χρωμοσωμάτων, βελτίωση του background της εικόνας, αποκοπή περιττών στοιχείων (πχ κυττάρων σε προγενέστερη της μετάφασης, φάση του κυτταρικού κύκλου κ.α.), συνένωση στη μετάφαση στοιχείων της που αρχικά εμφανίζονται αρκετά απομακρυσμένα κ.λπ. Τέτοιες επεξεργασμένες εικόνες παρουσιάζονται στις επόμενες παραγράφους.

## **5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### **5.1 Πρώτη σειρά πειραμάτων : 22/10/14 (dicentric method-known dose)- Χάραξη καμπύλης απόκρισης δόσης**

#### **5.1.1 Σκοπός**

Σκοπός της πρώτης σειράς πειραμάτων, το οποίο εκπονήθηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, είναι η χάραξη της καμπύλης που συνδέει τη δόση με το βιολογικό αποτέλεσμα από την άποψη των χρωμοσωματικών αλλοιώσεων που παρατηρούνται. Σε προηγούμενη παράγραφο αναφέρθηκε ότι οι παρατηρούμενες αλλοιώσεις στις οποίες βασίζεται η μέθοδος, σχετίζονται με τη δόση ακτινοβολήσης μέσω της δευτεροβάθμιας εξίσωσης :

$$Y = c + b \cdot D + a \cdot D^2$$

Στο πείραμα αυτό, γνωρίζοντας τη δόση ακτινοβολήσης και τον αριθμό των αλλοιώσεων ανά κύτταρο για κάθε δόση, υπολογίζονται οι συντελεστές a,b,c. Για όλα τα εργαστήρια βιολογικής δοσομετρίας είναι ιδιαίτερα σημαντική η ύπαρξη μιας τέτοιας καμπύλης γιατί με βάση αυτή μπορούν να αξιολογηθούν ατυχήματα άγνωστων δόσεων.

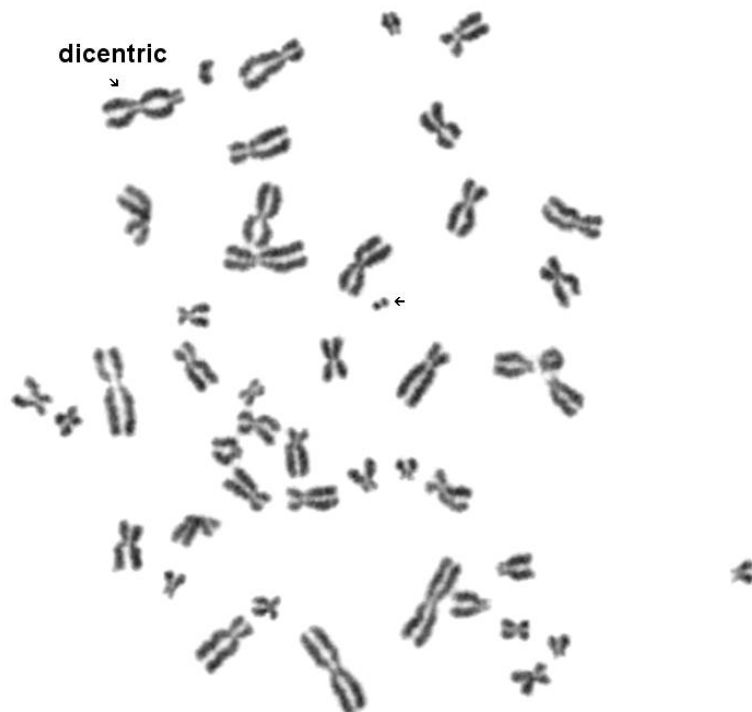
#### **5.1.2 Αποτελέσματα**

Κατά την ανάλυση στο μικροσκόπιο, για κάθε μετάφαση καταμετρήθηκαν συνολικά 46 κεντρομερίδια (συμπεριλαμβανομένων των δικεντρικών χρωμοσωμάτων, δακτυλίων με κεντρομερίδιο και των συνοδών θραυσμάτων χωρίς κεντρομερίδιο.

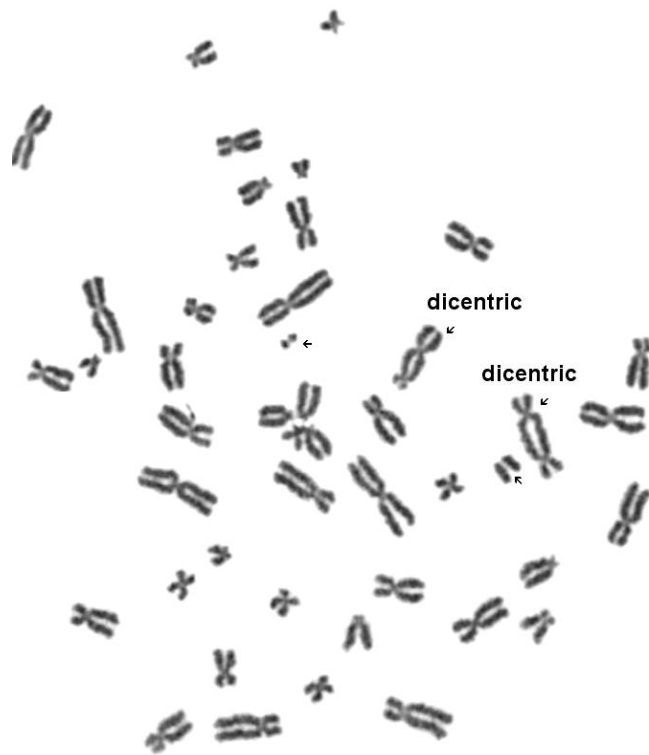
Ακολουθούν οι εικόνες 5.1.1-5 μεταφάσεων που παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο από την ανάλυση λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος τα οποία ακτινοβολήθηκαν με 0,2,4,6,8Gy αντίστοιχα. Από τις εικόνες αυτές γίνεται φανερό ότι με την αύξηση της δόσης ακτινοβολήσης οι δικεντρικές αλλοιώσεις εμφανίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα ενώ για μεγάλες δόσεις εμφανίζονται επίσης, και τρικεντρικά χρωμοσώματα (εικόνες 5.1.4 και 5.1.5 στα 6 και 8Gy αντίστοιχα).



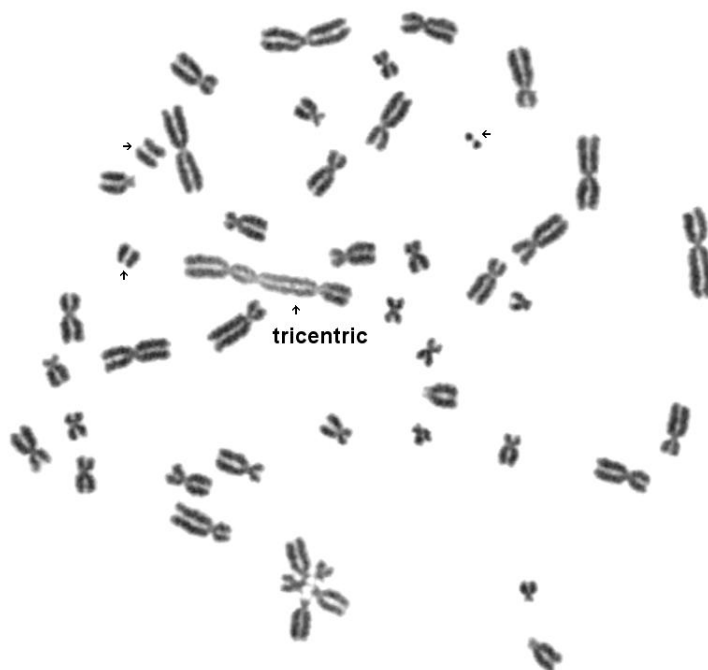
Εικόνα 5.1.1 : Τυπική μετάφαση με την κλασική μέθοδο βιοδοσιμετρίας, μη ακτινοβολημένου ανθρώπινου λεμφοκυττάρου. Καταμετρώνται 46 φυσιολογικά χρωμοσώματα. (Πηγή : Πρώτη σειρά πειραμάτων 22/10/14 (control))



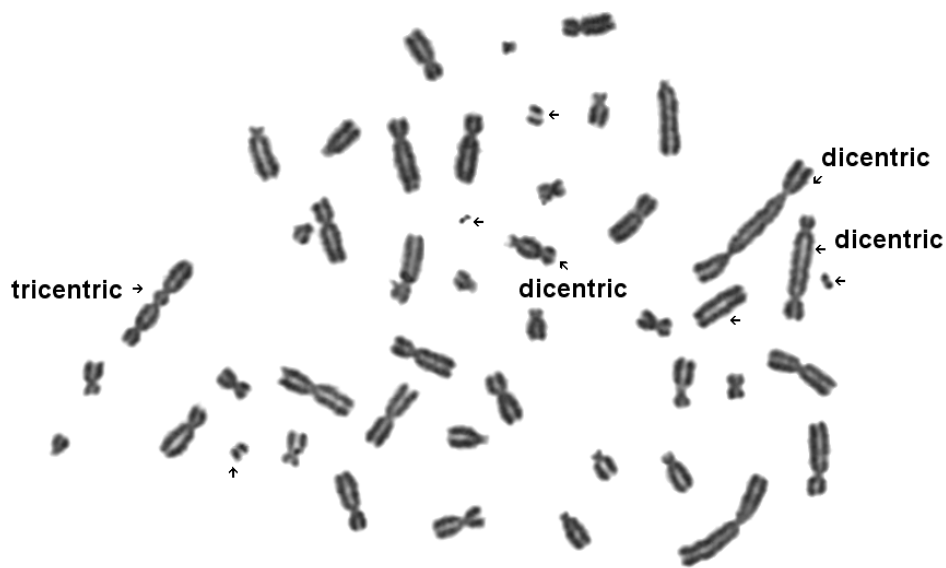
Εικόνα 5.1.2 : Τυπική μετάφαση με την κλασική μέθοδο βιοδοσιμετρίας, ανθρώπινου λεμφοκυττάρου που έχει ακτινοβοληθεί με δόση 2Gy. Καταμετρώνται 44 χρωμοσώματα με ένα κεντρομερίδιο και ένα δικεντρικό χρωμόσωμα με το αντίστοιχο συνοδό ακεντρικό ζεύγος θραυσμάτων. (Πηγή : Πρώτη σειρά πειραμάτων 22/10/14 (2Gy))



Εικόνα 5.1.3 : Τυπική μετάφαση με την κλασική μέθοδο βιοδοσιμετρίας, ανθρώπινου λεμφοκυττάρου που έχει ακτινοβοληθεί με δόση 4Gy. Καταμετρώνται 40 χρωμοσώματα με ένα κεντρομερίδιο και δύο δικεντρικά χρωμοσώματα με τα αντίστοιχα συνοδά ακεντρικά ζεύγη θραυσμάτων. (Πηγή : Πρώτη σειρά πειραμάτων: 22/10/14 (4Gy))



Εικόνα 5.1.4 : Τυπική μετάφαση με την κλασική μέθοδο βιοδοσιμετρίας, ανθρώπινου λεμφοκυττάρου που έχει ακτινοβοληθεί με δόση 6Gy. Καταμετρώνται 40 χρωμοσώματα με ένα κεντρομερίδιο και ένα τρικεντρικό χρωμόσωμα μαζί τρία ακεντρικά ζεύγη θραυσμάτων. (Πηγή : Πρώτη σειρά πειραμάτων: 22/10/14 (6Gy))



Εικόνα 5.1.5 : Τυπική μετάφαση με την κλασική μέθοδο βιοδοσιμετρίας, ανθρώπινου λεμφοκυττάρου που έχει ακτινοβοληθεί με δόση 8Gy. Καταμετρώνται 37 χρωμοσώματα με ένα κεντρομερίδιο, 1 τρικεντρικό χρωμόσωμα, 3 δικεντρικά χρωμοσώματα και 5 ακεντρικά ζεύγη θραυσμάτων. (Πηγή : Πρώτη σειρά πειραμάτων: 22/10/14 (6Gy))

Με βάση την ανάλυση των ακτινοβολημένων λεμφοκυττάρων με τον τρόπο που παρουσιάστηκε στο «πειραματικό μέρος», προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα στους πίνακες 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 (Παράρτημα 1).

Από τους παραπάνω πίνακες μετρήσεων προκύπτει ο συγκεντρωτικός πίνακας (πίνακας 8) όπου :

$$\text{άθροισμα αλλοιώσεων} = \# \text{δικεντρικών} + 2 \cdot \# \text{τρικεντρικών} + \# \text{δακτυλίων}$$

Πίνακας 8			
Dose (Gy)	αριθμός κυττάρων που αναλύθηκαν	άθροισμα αλλοιώσεων	αλλοιώσεις ανά κύτταρο
0,00 ± 0,00	150	0	0,00 ± 0,00
0,50 ± 0,05	150	1	0,01 ± 0,00
1,00 ± 0,10	100	2	0,02 ± 0,01
2,00 ± 0,20	100	23	0,23 ± 0,06
4,00 ± 0,40	100	81	0,81 ± 0,08
6,00 ± 0,60	100	177	1,77 ± 0,11
8,00 ± 0,8	100	240	2,40 ± 0,13

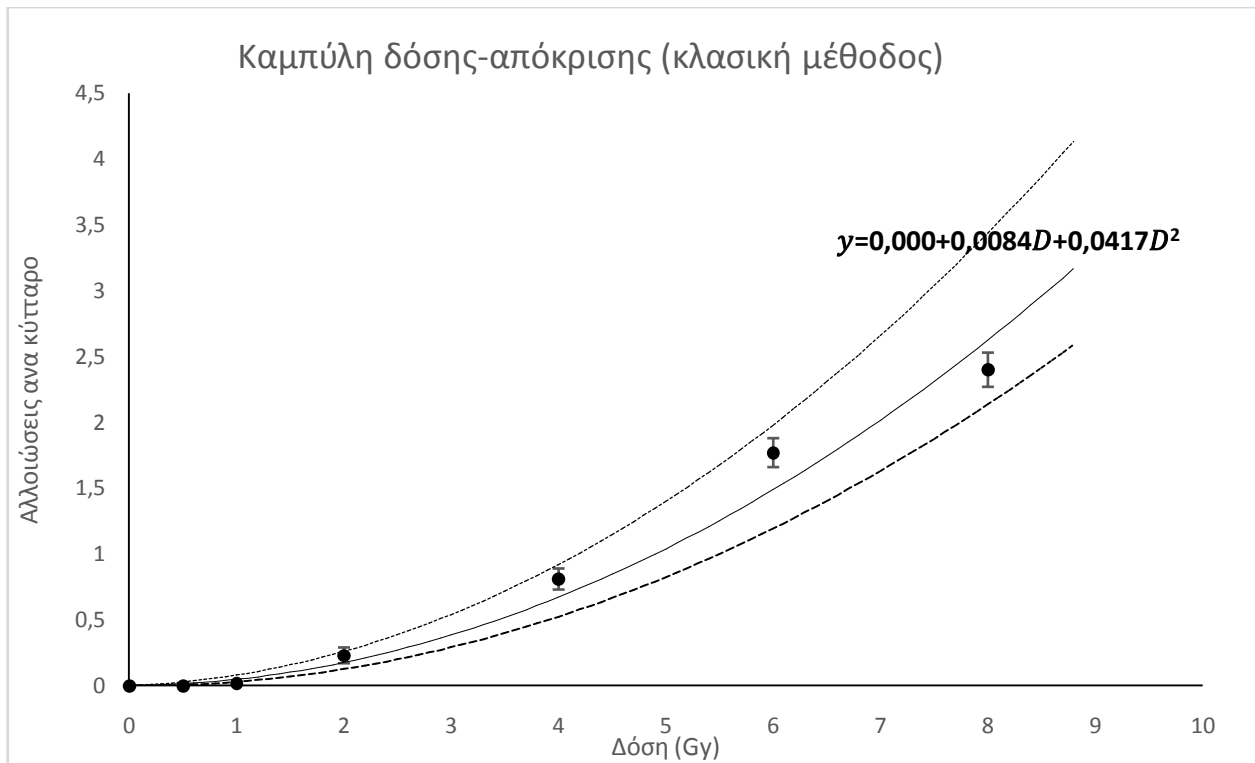
Τα σφάλματα των μετρήσεων εκτιμήθηκαν με βάση την τυπική απόκλιση των μετρήσεων από τη μέση τιμή τους για κάθε δόση (αναλυτικά οι μετρήσεις που έγιναν παρουσιάζονται στο παράρτημα στο τέλος της παρούσας εργασίας):

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (\bar{x} - x)^2}{(N - 1)}}$$
$$\delta x = SE = \frac{SD}{\sqrt{N}}$$

Όπου N ο αριθμός των καταμετρημένων κυττάρων για κάθε δόση.

Τα αποτελέσματα του πίνακα 8 αποδεικνύουν ότι με την αύξηση της δόσης ακτινοβολίας, αυξάνεται και η συχνότητα εμφάνισης δικεντρικών αλλοιώσεων, όχι όμως κατ'αναλογία. Επομένως από τα πειραματικά αποτελέσματα επιβεβαιώνεται ότι η απόκριση των κυττάρων στη δόση ακτινοβολίας περιλαμβάνει κι έναν εκθετικό (τετραγωνικό) όρο εξάρτησης από τη δόση.

Ο υπολογισμός των συντελεστών a,b,c της δευτεροβάθμιας εξίσωσης απόκρισης-δόσης και των αντίστοιχων σφαλμάτων τους, τα οποία εξαρτώνται από τα σφάλματα στη δόση αλλά και από τα σφάλματα των μετρήσεων στο μικροσκόπιο λόγω του αναλυτή, υπολογίστηκαν με το εργαλείο CABAS (Παράρτημα 2). Από τους υπολογισμούς αυτούς προκύπτει το γράφημα στην εικόνα 5.1.6 :



Σχήμα 5.1.6 : Πειραματική καμπύλη απόκρισης-δόσης με την Κλασική Μέθοδο / Πρώτη σειρά πειραμάτων: 22/10/14» (πρόγραμμα excel). Η καμπύλη με τη συνεχή γραμμή απεικονίζει την εξίσωση για τις μέσες τιμές των συντελεστών a,b,c, η πάνω καμπύλη απεικονίζει την καμπύλη για τις μέγιστες τιμές των a,b,c και η κάτω καμπύλη για τις ελάχιστες.



## **5.2 Δεύτερη σειρά : 14/10/14 (dicentric method-unknown dose)**

### **5.2.1 Σκοπός**

Η σειρά αυτή διεξήχθη στο εργαστήριο Υγειοφυσικής, Ραδιοβιολογία και Κυτταρογενετικής του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» με σκοπό την εκτίμηση της απορροφηθείσας δόσης από ιοντίζουσα ακτινοβολία σε δείγματα τα οποία εστάλησαν στο εργαστήριο από τη Γερμανία (δίκτυο RENEΒ). Πειραματικά τα δείγματα μελετήθηκαν με τη μέθοδο dicentric, τη μέθοδο PCC αλλά και συνδυαστικά με άλλες μεθόδους (πχ FISH) για την ανάλυση επιπλέον στοιχείων για μελέτη τα οποία, όμως, ξεφεύγουν από τα πλαίσια της παρούσας εργασίας.

Σκοπός της δεύτερης σειράς στο πλαίσιο μελέτης της dicentric μεθόδου, είναι η ανάλυση των δύο δειγμάτων και η αποτίμηση της δόσης

- με την καμπύλη απόκρισης-δόσης που προέκυψε από το πρώτης σειράς πειραμάτων και
- αφετέρου με την καμπύλη δόσης- απόκρισης που έχει κατασκευαστεί και χρησιμοποιείται για την εκτίμηση των δόσεων με αυτές τις μεθόδους στο Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος»

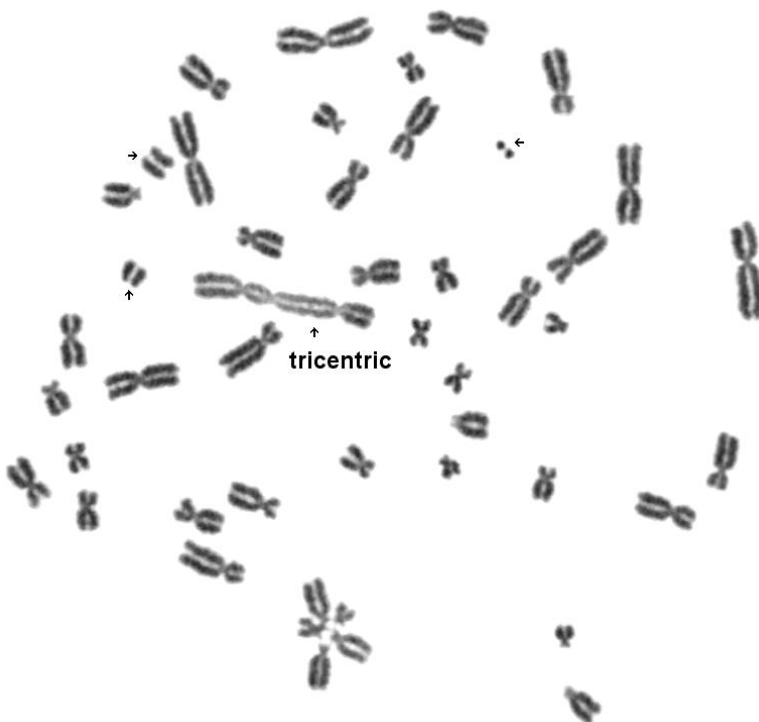
### **4.2.2 Αποτελέσματα**

Κατά την ανάλυση στο μικροσκόπιο, για κάθε μετάφαση καταμετρήθηκαν συνολικά 46 κεντρομερίδια (συμπεριλαμβανομένων των δικεντρικών χρωμοσωμάτων, δακτυλίων με κεντρομερίδιο και των συνοδών θραυσμάτων χωρίς κεντρομερίδιο.

Ακολουθούν οι εικόνες 5.2.1-2 μεταφάσεων που παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο από την ανάλυση λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος από τα δείγματα Re5, Re6 . Στην εικόνα 5.2.1 φαίνεται ένα λεμφοκύτταρο στη φάση της μετάφασης, το οποίο δεν έχει δικεντρικές αλλοιώσεις, προέρχεται, όμως, από δείγμα που έχει ακτινοβοληθεί. Το γεγονός ότι δεν εμφανίζει δικεντρικές αλλοιώσεις σημαίνει είτε ότι έχουν λειτουργήσει αποδοτικά για το κύτταρο αυτό , οι επιδιορθωτικοί του μηχανισμοί είτε ότι έχει αλλοιώσεις που δεν είναι παρατηρήσιμες με τη δικεντρική μέθοδο (πχ μετατοπίσεις). Στην εικόνα 5.2.2 φαίνεται ένα λεμφοκύτταρο από το δείγμα RENEΒ 6 το οποίο, παρά το γεγονός ότι εκτιμάται να έχει ακτινοβοληθεί με δόση μικρότερη των 4Gy, εμφανίζει ένα τρικεντρικό χρωμόσωμα.



Εικόνα 5.2.1 : Τυπική μετάφαση με την κλασική μέθοδο βιοδοσιμετρίας, ανθρώπινου λεμφοκυττάρου από το δείγμα Re5. Καταμετρώνται 46 χρωμοσώματα με ένα κεντρομερίδιο. (Πηγή : Δεύτερη σειρά: 14/10/14 Re5)



Εικόνα 5.2.1 : Τυπική μετάφαση με την κλασική μέθοδο βιοδοσιμετρίας, ανθρώπινου λεμφοκυττάρου από το δείγμα Re5. Καταμετρώνται 43 χρωμοσώματα με ένα κεντρομερίδιο και 3 ζεύγη ακεντρικών θραυσμάτων. (Πηγή : Δεύτερη σειρά: 14/10/14 Re6).

Με βάση την ανάλυση των ακτινοβολημένων λεμφοκυττάρων με τον τρόπο που παρουσιάστηκε στο «πειραματικό μέρος», για τα δύο δείγματα άγνωστης δόσης προέκυψαν τα αποτελέσματα στους πίνακες 9, 10 του παραρτήματος .

Από τους παραπάνω πίνακες μετρήσεων προκύπτει ο συγκεντρωτικός πίνακας (πίνακας 11):

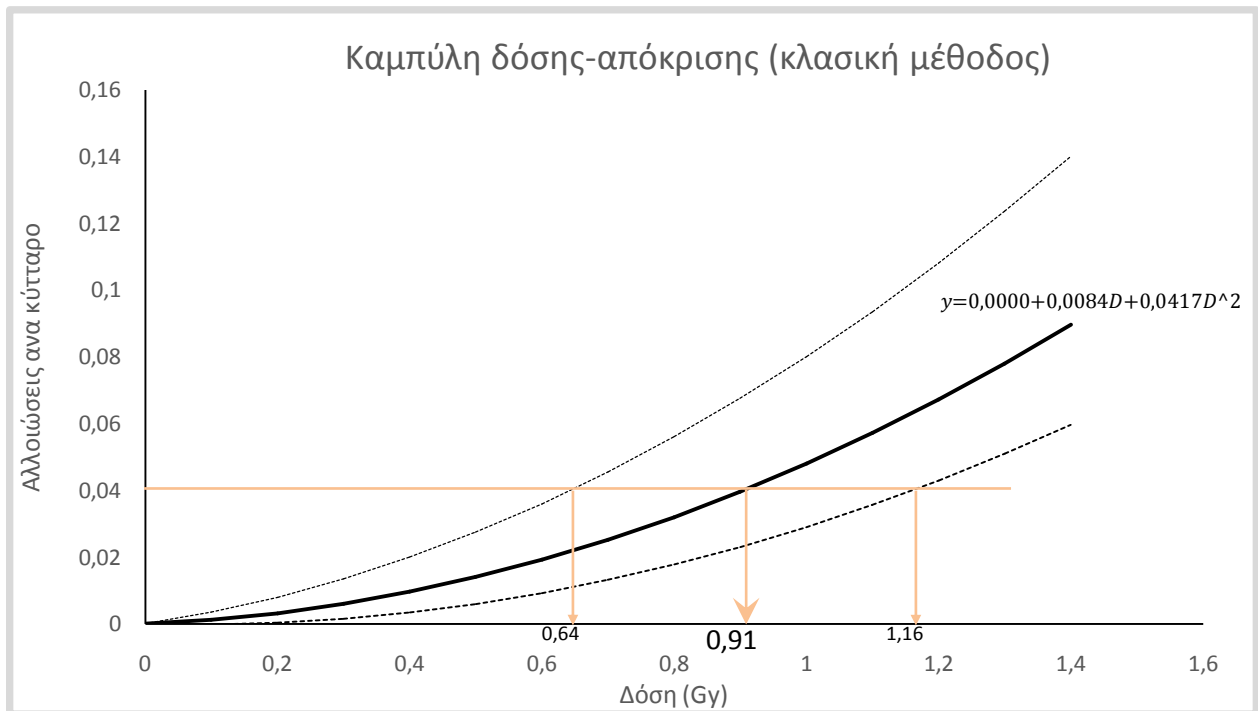
<b>Πίνακας 11</b>			
<b>δείγμα</b>	<b>αριθμός κυττάρων που αναλύθηκαν</b>	<b>άθροισμα αλλοιώσεων ανά δόση</b>	<b>αλλοιώσεις ανά κύτταρο</b>
<b>Re5</b>	<b>100</b>	<b>4</b>	<b>0,04 ± 0,02</b>
<b>Re6</b>	<b>100</b>	<b>61</b>	<b>0,61 ± 0,08</b>

Τα σφάλματα υπολογίστηκαν όπως περιγράφεται στην «Πρώτη σειρά πειραμάτων : 22/10/14».

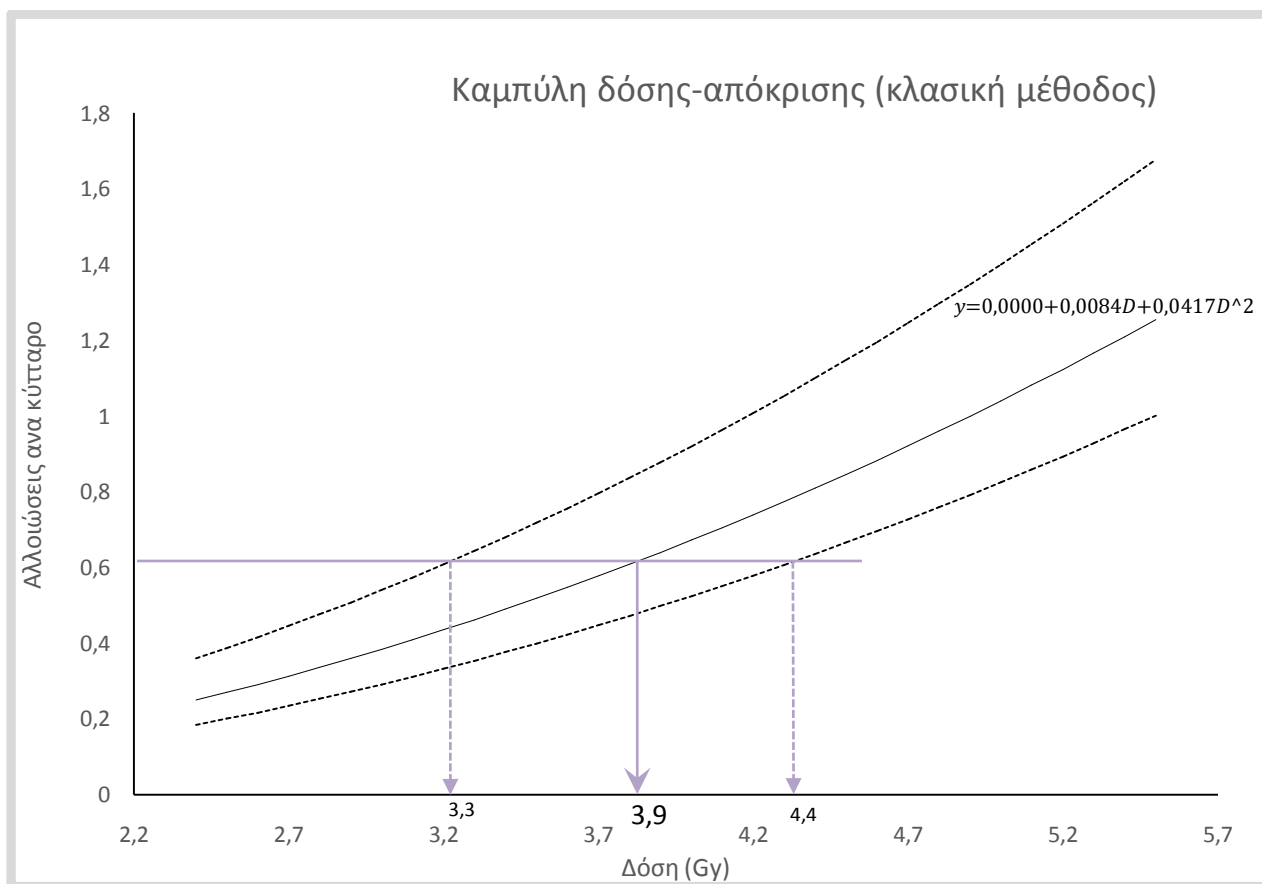
Από τις αλλοιώσεις ανά κύτταρο που προκύπτουν για τα δύο άγνωστα δείγματα και φαίνονται στον πίνακα 11 (αναλυτικά οι μετρήσεις φαίνονται στο παράρτημα στο τέλος της εργασίας), μπορούμε να έχουμε μια εκτίμηση για τη δόση ακτινοβολήσεως των δειγμάτων με την χρήση της πειραματικής καμπύλης απόκρισης δόσης της πρώτης σειράς. Μελετώντας τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα των πινάκων 8 και 11 διαπιστώνεται ότι :

- το δείγμα RENE5 5 έχει ακτινοβληθεί με μικρότερη δόση από το δείγμα RENE6 6 αφού οι αλλοιώσεις ανά κύτταρο του πρώτου έχουν μικρότερη τιμή από το δεύτερο
- οι αλλοιώσεις ανά κύτταρο του δείγματος RENE5 5 έχουν τιμή η οποία βρίσκεται μεταξύ της αντίστοιχης τιμής αλλοιώσεων ανά κύτταρο για 1Gy και 2Gy
- αντίστοιχα η τιμή των αλλοιώσεων ανά κύτταρο για το δείγμα RENE6 6 βρίσκονται μεταξύ των αντίστοιχων τιμών για 2Gy και 4Gy.

Από την καμπύλη του σχήματος 5.1.6 (excel) προκύπτουν στα σχήματα 5.2.3, 5.2.4 οι εκτιμήσεις των άγνωστων δόσεων από την πειραματική καμπύλη με μέση τιμή δόσης το σημείο πάνω στην συνεχή καμπύλη και οριακές τιμές που προκύπτουν από τις διακεκομμένες καμπύλες. Επίσης για να υπάρχει η μέγιστη δυνατή ευκρίνεια, στην εικόνα 5.2.3 φαίνεται το κομμάτι της καμπύλης για δόσεις από 0Gy έως 1,4Gy, ενώ στην εικόνα 5.2.4 το κομμάτι από 2,2 έως 5,5Gy :



**Σχήμα 5.2.3 :** Εκτίμηση δείγματος Re 5 από την «Πειραματική καμπύλη δόσης- απόκρισης / Πρώτη σειρά : 22/10/14» (πρόγραμμα excel). Με πορτοκαλί οριζόντια γραμμή, η τιμή αλλοιώσεων ανά κύτταρο, που υπολογίστηκε, συναντά τις τρεις καμπύλες. Με παχύ βέλος φαίνεται η μέση τιμή της εκτιμώμενης δόσης ενώ με τα άλλα δύο βέλη φαίνεται η ελάχιστη και μέγιστη τιμή της.



Σχήμα 5.2.3 :Εκτίμηση δείγματος Re 6 από την «Πειραματική καμπύλη δόσης- απόκρισης / Πρώτη σειρά : 22/10/14 (πρόγραμμα excel). Με μωβ οριζόντια γραμμή η τιμή αλλοιώσεων ανά κύτταρο, που υπολογίστηκε, συναντά τις τρεις καμπύλες. Με παχύ βέλος φαίνεται η μέση τιμή της εκτιμώμενης δόσης ενώ με τα άλλα δύο βέλη φαίνεται η ελάχιστη και μέγιστη τιμή της.

Στον πίνακα 12 φαίνονται τα αποτελέσματα για την εκτίμηση της δόσης στα 2 δείγματα από τις δύο καμπύλες που προέκυψαν από την καμπύλη αναφοράς :

<b>Πίνακας 12</b>	
δείγμα	εκτίμηση (exp1curve)
	dose (Gy)
<b>Re5</b>	<b>0,64 &lt; <math>\bar{D}</math> = 0,91 &lt; 1,16</b>
<b>Re6</b>	<b>3,3 &lt; <math>\bar{D}</math> = 3,9 &lt; 4,4</b>

### **5.3 Τρίτη σειρά : 14/10/14 (PCC method-known dose)**

#### **5.3.1 Σκοπός**

Σκοπός της τρίτης σειράς, το οποίο εκπονήθηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας στο πλαίσιο μελέτης της PCC μεθόδου, είναι η ανάλυση ακτινοβολημένων με γνωστές δόσεις, δειγμάτων και η χάραξη της καμπύλης που συνδέει τη δόση με το βιολογικό αποτέλεσμα από την άποψη των χρωμοσωματικών αλλοιώσεων που παρατηρούνται. Σε προηγούμενη παράγραφο αναφέρθηκε ότι οι παρατηρούμενες αλλοιώσεις στις οποίες βασίζεται η μέθοδος, σχετίζονται με τη δόση ακτινοβολήσεως μέσω της εξίσωσης :

$$Y = Y_0 + b \cdot D$$

Στη σειρά αυτή, γνωρίζοντας τη δόση ακτινοβολήσεως και τον αριθμό των αλλοιώσεων ανά κύτταρο για κάθε δόση, υπολογίζονται οι συντελεστές  $Y_0$ ,  $b$ . Επίσης επειδή η καμπύλη αυτή κατασκευάζεται ως καμπύλη αναφοράς για την εκτίμηση των άγνωστων δόσεων από τα δείγματα Re 5 και Re 6, συνυπολογίσαμε χρόνο κυτταρικής επιδιόρθωση  $24^{ωv}$  ωρών.

#### **5.3.2 Αποτελέσματα**

Η ανάλυση των ακτινοβολημένων λεμφοκυττάρων έγινε με τον τρόπο που παρουσιάστηκε στο «πειραματικό μέρος» για την PCC μέθοδο. Τα δείγματα ακτινοβολήθηκαν με δόσεις 0, 1, 2, 4, 6 Gy .

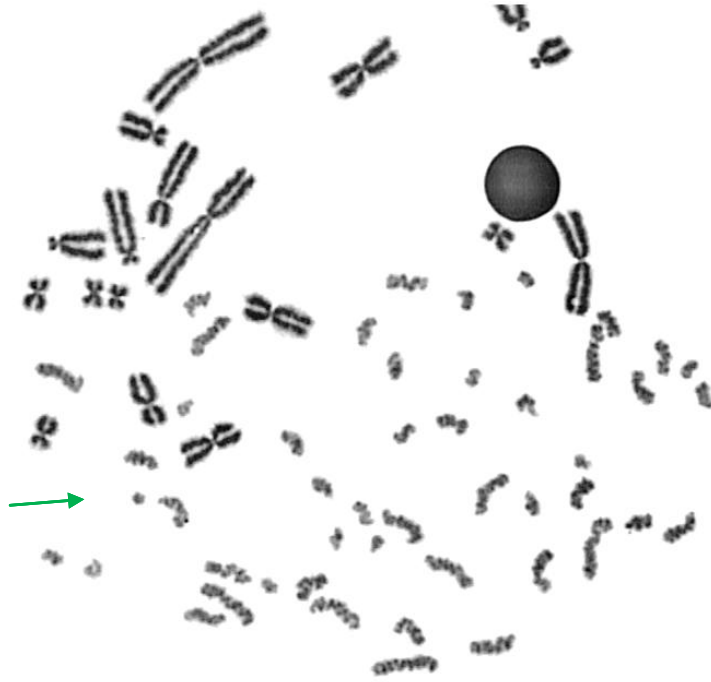
Στην εικόνα 5.3.1 αποτυπώνεται μια τυπική εικόνα από την ανάλυση ανθρώπινων περιφερικών λεμφοκυττάρων τα οποία έχουν συντηχθεί με CHO. Τα χρωμοσώματα τα οποία αποτελούνται από δύο χρωματίδες ενωμένες με το κεντρομερίδιο και εμφανίζονται πιο σκούρα στην αριστερή πλευρά της εικόνας, προέρχονται από CHO ενώ οι μονές χρωματίδες στην δεξιά πλευρά ανήκουν στο ανθρώπινο λεμφοκύτταρο και εμφανίζονται πιο ανοιχτόχρωμες. Αυτή η χρωματική διαφορά οφείλεται στο γεγονός ότι οι ανθρώπινες χρωματίδες εμφανίζουν μικρότερο βαθμό συμπύκνωσης στη φάση  $G_0$  του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκονται από αυτή που εμφανίζουν τα CHO τα οποία βρίσκονται στη φάση της μετάφασης (επομένως εμφανίζουν τη μέγιστη δυνατή χρωμοσωματική συμπύκνωση).

Να σημειωθεί εδώ ότι με την PCC μπορούμε να ποσοτικοποιήσουμε την απορροφηθείσα δόση καταμετρώντας τα πλεονάζοντα χρωμοσωμικά θραύσματα και τους δακτυλίους. Δε μπορούμε όμως, να αποφανθούμε για δικεντρικές αλλοιώσεις και εσωτερικές μετατοπίσεις. Για να επιτευχθεί αυτό θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί παράλληλα ακόμη μία τεχνική C-banding είτε με Trypsin και Giemsa (για να μετρηθούν δικεντρικά) είτε FISH (για να μετρηθούν δικεντρικά και εσωτερικές μετατοπίσεις).

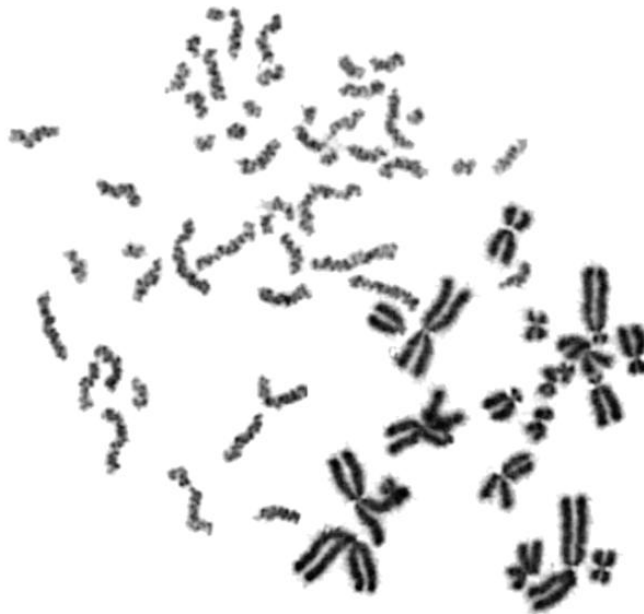


Εικόνα 5.3.1 : Τυπική μεταφασική εικόνα μη ακτινοβολημένου PCC λεμφοκυττάρου. Τα χρωμοσώματα τα οποία αποτελούνται από δύο χρωματίδες ενωμένες με το κεντρομερίδιο προέρχονται από CHO ενώ οι μονές χρωματίδες στην δεξιά πλευρά ανήκουν στο ανθρώπινο λεμφοκύτταρο. (Πηγή : Τρίτη σειρά : 22/10/14 PCC 0 Gy (Control))

Στις εικόνες 5.3.2-5 Απεικονίζονται μεταφάσεις ακτινοβολημένων λεμφοκυττάρων :



Εικόνα 5.3.2 : Τυπική μεταφασική εικόνα PCC λεμφοκυττάρου ακτινοβολημένου με 1Gy. Τα χρωμοσωματικά θραύσματα είναι κατά 2 παραπάνω από 46. Τα πλεονάζοντα θραύσματα είναι χρωματιδικές αποκολλήσεις και συνήθως φαίνονται πολύ μικρότερα σε μήκος από τα φυσιολογικά (πράσινο βέλος). (Πηγή : Τρίτη σειρά : 22/10/14 PCC (1 Gy))



Εικόνα 5.3.3 : Τυπική μεταφασική εικόνα PCC λεμφοκυττάρου ακτινοβολημένου με 2Gy. Τα χρωμοσωματικά θραύσματα είναι κατά 3 παραπάνω από 46. (Πηγή : Τρίτη σειρά : 22/10/14 PCC (2Gy))





Εικόνα 5.3.4 : Τυπική μεταφασική εικόνα PCC λεμφοκυττάρου ακτινοβολημένου με 4Gy. Τα χρωμοσωματικά θραύσματα είναι κατά 5 παραπάνω από 46. (Πηγή : Τρίτη σειρά : 22/10/14 PCC (4Gy))



Εικόνα 5.3.5 : Τυπική μεταφασική εικόνα PCC λεμφοκυττάρου ακτινοβολημένου με 6Gy. Τα χρωμοσωματικά θραύσματα είναι κατά 7 παραπάνω από 46. (Πηγή : Τρίτη σειρά : 22/10/14 PCC (6Gy))

Στον πίνακα 13 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ανάλυση, καταγράφεται δηλαδή, ο αριθμός των μονών χρωματιδικών στοιχείων που καταμετρήθηκαν σε κάθε κύτταρο που

αναλύθηκε για κάθε μία από τις δόσεις ακτινοβολήσης . Στις δύο τελευταίες σειρές του πίνακα συνοψίζονται για κάθε δόση, ο μέσος όρος των χρωματιδικών θραυσμάτων ανά κύτταρο και ο αριθμός θραυσμάτων ανά κύτταρο που διαφέρει από το φυσιολογικό (δηλαδή από τις 46 χρωματίδες) αντίστοιχα.

Για τα μη ακτινοβολημένα κύτταρα υπολογίστηκε ότι τα χρωματιδικά θραύσματα για τα κύτταρα που αναλύθηκαν, είναι κατά μέσο όρο 45,97 , αριθμός ο οποίος είναι μικρότερος από τις 46 φυσιολογικές χρωματίδες. Το γεγονός αυτό οφείλεται πιθανά στο ότι κάποια θραύσματα δεν ήταν εμφανή στο οπτικό πεδίο του μικροσκοπίου είτε γιατί μπορεί ένα θραύσμα να βρισκόταν κάτω από κάποιο άλλο είτε γιατί κατά την επίστρωση των αντικειμενοφόρων πλακών το θραύσμα απομακρύνθηκε από τα υπόλοιπα είτε γιατί ένα θραύσμα κόλλησε με κάποιο άλλο και ως εκ τούτου φαίνονται ως ένα ενιαίο θραύσμα. Αυτός ο παράγοντας εισάγει την σταθερά  $\gamma_0$  η οποία συνήθως είναι αρνητική.

### Πίνακας 13

known dose PCC-method

#cell	# breaks				
	0 Gy	1 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy
1	46	47	48	50	51
2	46	48	49	52	55
3	46	46	47	50	53
4	46	48	50	50	53
5	46	46	48	53	53
6	46	47	48	51	53
7	46	47	49	51	54
8	46	47	50	51	53
9	46	47	49	49	53
10	46	48	49	51	52
11	46	46	48	51	51
12	46	47	47	52	54
13	46	47	48	51	51
14	46	46	48	51	51
15	46	47	48	53	54
16	46	46	48	52	51
17	46	47	48	51	53
18	46	47	48	53	52
19	46	47	48	50	51
20	45	48	48	50	52
21	46	47	48	50	53
22	46	46	49	50	53
23	46	46	47	53	53
24	46	47	48	49	55
25	46	48	48	47	53
26	46	47	49	49	55
27	46	48	49	52	55
28	46	47	50	49	55
29	46	47	48	49	56
30	46	47	48	50	53
<b>breaks/cell</b>	<b>45,97</b>	<b>46,97</b>	<b>48,33</b>	<b>50,67</b>	<b>53,03</b>
<b>more than 46 breaks/cell</b>	<b>-0,03</b>	<b>0,97</b>	<b>2,33</b>	<b>4,67</b>	<b>7,03</b>

Με βάση τις μετρήσεις του πίνακα 13, χαράσσεται η καμπύλη δόσης-απόκρισης. Απόκριση της δόσης θεωρείται ο αριθμός των επιπλέον από τα 46, χρωμοσωματικών θραυσμάτων που καταμετρώνται και ορίζεται ως :

$$Y = \frac{X_{>46}}{N}$$

Όπου  $X_{>46}$  η μέση τιμή του αριθμού των επιπλέον από τα 46, θραυσμάτων και N ο αριθμός των κυττάρων που μετρήθηκαν για κάθε δόση.

Η τυπική απόκλιση (standard deviation) του αριθμού των θραυσμάτων ανά κύτταρο (X) από τη μέση τιμή ( $X_{>46}$ ) ανά δόση, είναι :

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (X - X_{>46})^2}{(N - 1)}}$$

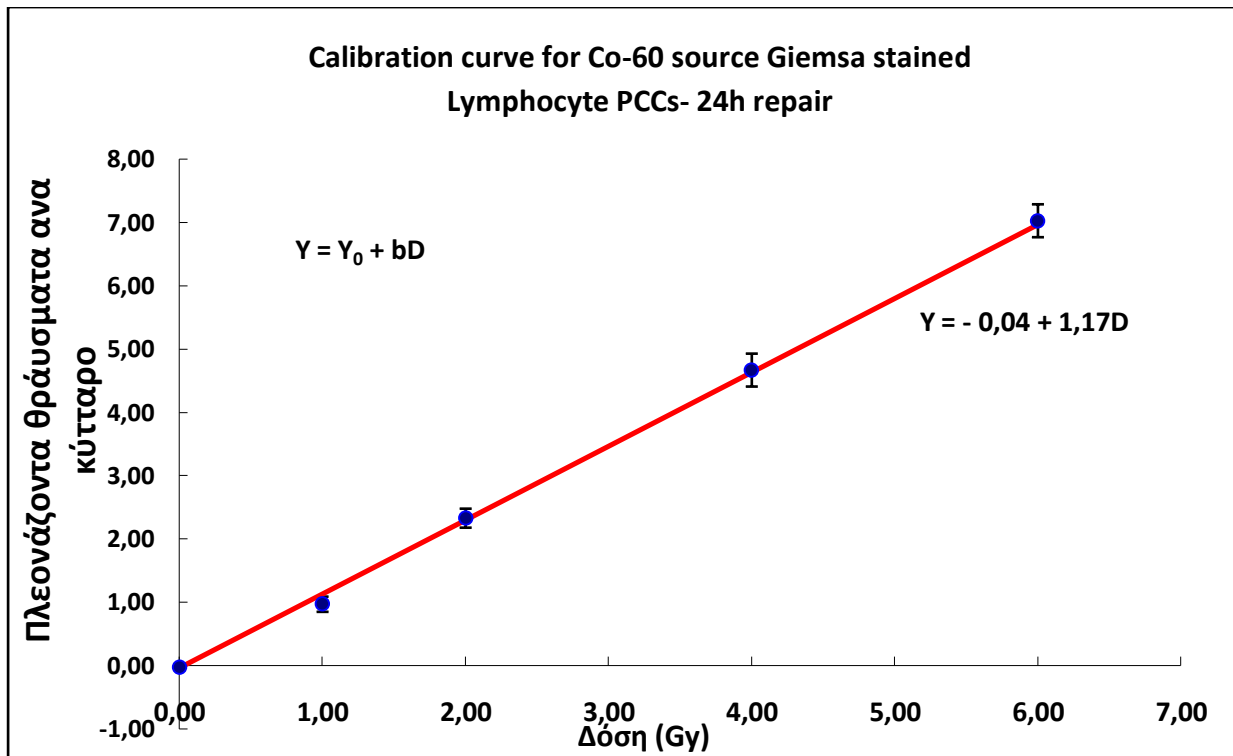
ενώ το τυπικό σφάλμα (standard error), είναι :

$$\delta Y = SE = \frac{SD}{\sqrt{N}}$$

Στον συγκεντρωτικό πίνακα 14 παρουσιάζονται η τυπική απόκλιση και το τυπικό σφάλμα των μετρήσεων :

Πίνακας 14			
Dose (Gy)	more than 46 Breaks/cell ( $X_{>46}$ )	SD	$\delta Y1$
0	-0,03	0,18	$\pm 0,03$
1	0,97	0,67	$\pm 0,12$
2	2,33	0,8	$\pm 0,15$
4	4,67	1,45	$\pm 0,26$
6	7,03	1,43	$\pm 0,26$

Η καμπύλη απόκρισης δόσης δίνεται από τις τιμές του παραπάνω πίνακα :



Εικόνα 5.3.6 : Η καμπύλη δόσης απόκρισης με τη μέθοδο PCC για 24h repair από τις μετρήσεις της Τρίτης σειράς : 14/10/14

Ο υπολογισμός των  $Y_0$  και  $b$  και των σφαλμάτων τους γίνεται με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων (μέσω του υπολογιστικού φύλλου excel `linear_fit_errors_greek/~s.maltezos`) :

Έτσι προκύπτουν :

$$Y_0 = -0,04 \pm 0,03 \text{ more than 46 breaks/cell} \quad \text{και} \quad b = 1,17 \pm 0,03 \text{ (more than 46 breaks/cell)/Gy}$$

## **5.4 Τέταρτη σειρά : 14/10/14 (PCC method-unknown dose)**

### **5.4.1 Σκοπός**

Η σειρά αυτή διεξήχθη στο εργαστήριο Υγειοφυσικής, Ραδιοβιολογία και Κυτταρογενετικής του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» με σκοπό την εκτίμηση της απορροφηθείσας δόσης από ιοντίζουσα ακτινοβολία σε δείγματα τα οποία εστάλησαν στο εργαστήριο από τη Γερμανία (δίκτυο RENEΒ). Πειραματικά τα δείγματα μελετήθηκαν με τη μέθοδο dicentric, τη μέθοδο PCC αλλά και συνδυαστικά με άλλες μεθόδους (πχ FISH) για την ανάλυση επιπλέον στοιχείων για μελέτη τα οποία, όμως, ξεφεύγουν από τα πλαίσια της παρούσας εργασίας.

Σκοπός της τέταρτης σειράς, στο πλαίσιο μελέτης της PCC μεθόδου, είναι η ανάλυση των δύο δειγμάτων και η αποτίμηση της δόσης χρησιμοποιώντας την αφενός την καμπύλη του πειράματος 3 και αφετέρου την καμπύλη αναφοράς του εργαστηρίου.

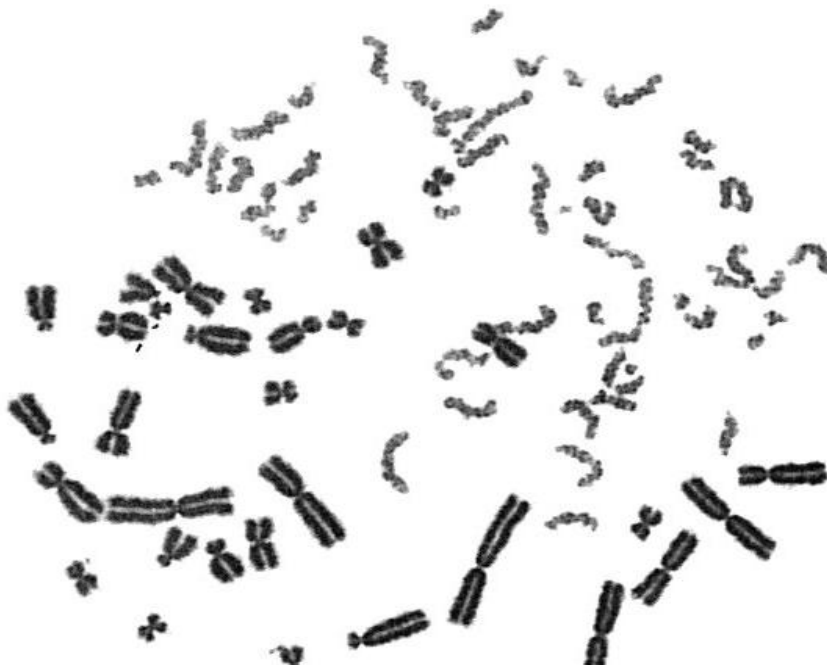
### **5.4.2 Αποτελέσματα**

Με βάση την ανάλυση των ακτινοβολημένων λεμφοκυττάρων με τον τρόπο που παρουσιάστηκε στο «πειραματικό μέρος» για την PCC μέθοδο, για τα δύο δείγματα άγνωστης δόσης προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα στον πίνακα 15.

Οι εικόνες 5.4.1, 5.4.2 αποτυπώνουν καταμετρημένα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα με τη μέθοδο PCC από τα δείγματα Re 5 και Re 6 αντίστοιχα. Δεδομένου ότι δεν έχει χρησιμοποιηθεί καμία πρόσθετη τεχνική C-banding, δεν είναι ορατές δικεντρικές αλλοιώσεις ή μετατοπίσεις. Από την καταμέτρηση των θραυσμάτων η εικόνα 5.4.1 περιλαμβάνει 47 θραύσματα ενώ η εικόνα 5.4.2 περιλαμβάνει 49.



Εικόνα 5.4.1 : Τυπική μεταφασική εικόνα PCC ακτινοβολημένου λεμφοκυττάρου από το δείγμα Re5. Τα χρωμοσωματικά θραύσματα είναι κατά 1 παραπάνω από 46. (Πηγή : Τέταρτη σειρά : 14/10/14 PCC (Re5))



Εικόνα 5.4.2 : Τυπική μεταφασική εικόνα PCC ακτινοβολημένου λεμφοκυττάρου από το δείγμα Re6. Τα χρωμοσωματικά θραύσματα είναι κατά 3 παραπάνω από 46. (Πηγή : Τέταρτη σειρά: 14/10/14 PCC (Re6))

Από τα πλεονάζοντα χρωμοσωμικά θραύσματα ανά κύτταρο που προκύπτουν για τα δύο άγνωστα δείγματα και φαίνονται στον πίνακα 15, μπορούμε να έχουμε μια εκτίμηση για τη δόση ακτινοβολήσης των δειγμάτων με την χρήση της πειραματικής καμπύλης απόκρισης δόσης της τρίτης σειράς. Μελετώντας τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα των δύο τελευταίων γραμμών του πίνακα, διαπιστώνεται ότι :

- το δείγμα RENE6 5 έχει ακτινοβοληθεί με μικρότερη δόση από το δείγμα RENE6 6 αφού τα πλεονάζοντα χρωμοσωμικά θραύσματα ανά κύτταρο του πρώτου έχουν μικρότερη τιμή από το δεύτερο
- τα πλεονάζοντα χρωμοσωμικά θραύσματα ανά κύτταρο του δείγματος RENE6 5 έχουν τιμή η οποία βρίσκεται κοντά στην αντίστοιχη τιμή των πλεοναζόντων χρωμοσωμικών θραυσμάτων ανά κύτταρο για 1Gy
- αντίστοιχα η τιμή των πλεοναζόντων θραυσμάτων ανά κύτταρο για το δείγμα RENE6 6 βρίσκεται μεταξύ των αντίστοιχων τιμών για 2Gy και 4Gy.

Τα αποτελέσματα του πίνακα 15 αποδεικνύουν ότι με την αύξηση της δόσης ακτινοβολήσης, αυξάνεται και η τιμή των πλεοναζόντων θραυσμάτων ανά κύτταρο κατ'αναλογία. Επομένως από τα πειραματικά αποτελέσματα επιβεβαιώνεται ότι η απόκριση των κυττάρων στη δόση ακτινοβολήσης εξαρτάται γραμμικά από τη δόση ακτινοβολήσης.



<b>Πίνακας 15</b>							
<b>unknown dose PCC-method</b>							
<b>RENEB 5</b>				<b>RENEB 6</b>			
<b># cell</b>	<b>breaks</b>	<b># cell</b>	<b>breaks</b>	<b># cell</b>	<b>breaks</b>	<b># cell</b>	<b>breaks</b>
1	47	36	46	1	51	36	47
2	48	37	46	2	46	37	48
3	46	38	46	3	52	38	47
4	46	39	46	4	52	39	47
5	50	40	49	5	49	40	51
6	46	41	47	6	47	41	50
7	47	42	48	7	48	42	52
8	47	43	46	8	47	43	46
9	48	44	48	9	47	44	47
10	46	45	46	10	51	45	50
11	46	46	47	11	46	46	48
12	49	47	47	12	47	47	50
13	47	48	50	13	49	48	50
14	47	49	46	14	47	49	46
15	48	50	48	15	49	50	47
16	46	51	46	16	46	51	49
17	47	52	47	17	51	52	50
18	46	53	48	18	47	53	48
19	48	54	46	19	48	54	47
20	48	55	48	20	48	55	51
21	46	56	46	21	53	56	48
22	46	57	48	22	51	57	48
23	48	58	46	23	50	58	46
24	47	59	47	24	53	59	53
25	47	60	46	25	51	60	48
26	46	61	47	26	51	61	47
27	46	62	46	27	48	62	50
28	47	63	47	28	51	63	51
29	48	64	48	29	51	64	48
30	48	65	46	30	48	65	49
31	46	66	49	31	52	66	48
32	46	67	46	32	52	67	48
33	47	68	46	33	48	68	51
34	46	69	47	34	46	69	47
35	48	70	47	35	51	70	49
<b>breaks/cell</b>		<b>46,97</b>		<b>breaks/cell</b>		<b>48,94</b>	
<b>more than 46 breaks/cell</b>		<b>0,97</b>		<b>more than 46 breaks/cell</b>		<b>2,94</b>	

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα προκύπτει ο συγκεντρωτικός πίνακας 16 :

Πίνακας 16			
δείγμα	more than 46 Breaks/cell (Y)	SD	δY
Re 5	0,97	0,99	0,12
Re 6	2,94	1,73	0,21

Επίσης από την καμπύλη της τρίτης σειράς, οι άγνωστες δόσεις εκτιμώνται :

Πίνακας 17	
δείγμα	dose (Gy)
Re 5	0,86 ± 0,11
Re 6	2,55 ± 0,14

Τα σφάλματα για τη εκτιμώμενη δόση υπολογίστηκαν με τη μέθοδο διάδοσης των σφαλμάτων [20], ως εξής :

$$\begin{aligned} \delta D &= \sqrt{\left(\frac{\partial D}{\partial Y} \cdot \delta Y\right)^2 + \left(\frac{\partial D}{\partial Y_0} \cdot \delta Y_0\right)^2 + \left(\frac{\partial D}{\partial b} \cdot \delta b\right)^2} = \\ &= \sqrt{\left(\frac{1}{b} \cdot \delta Y\right)^2 + \left(-\frac{1}{b} \cdot \delta Y_0\right)^2 + \left(\frac{Y_0 - Y}{b^2} \cdot \delta b\right)^2} \end{aligned}$$

Έτσι :

$$\begin{aligned} \delta D_{Re5} &= 0,11Gy , \\ \delta D_{Re6} &= 0,14Gy \end{aligned}$$

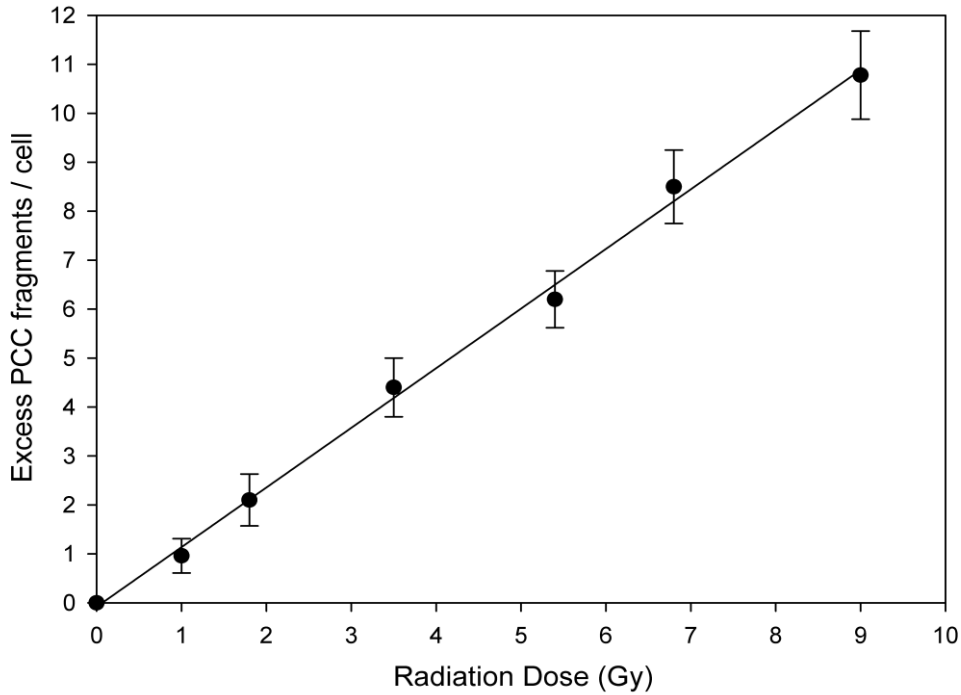
Από την καμπύλη αναφοράς του εργαστηρίου εκτιμάται ότι :

<b>Πίνακας 18</b>	
<b>δείγμα</b>	<b>dose (Gy)</b>
<b>Re 5</b>	<b>0,87 ± 0,14</b>
<b>Re 6</b>	<b>2,52 ± 0,19</b>

Η καμπύλη αναφοράς του εργαστηρίου φαίνεται στην εικόνα 5.4.3:

## Calibration Curve for Co-60 source

Giemsa Stained Lymphocyte PCCs -24h repair



### Nonlinear Regression

Data Source: Data in Ly PCCs\_24h repair

Equation: Polynomial, Linear

$$f=y_0+a*x$$

R	Rsqr	Adj Rsqr	Standard Error of Estimate
0.9986	0.9972	0.9966	0.2335

	Coefficient	Std. Error	t	P	VIF
y0	-0.0817	0.1441	-0.5672	0.5951	2.6658
a	1.2186	0.0290	42.0304	<0.0001	2.6658

### Analysis of Variance:

Uncorrected for the mean of the observations:

	DF	SS	MS
Regression	2	251.3174	125.6587
Residual	5	0.2726	0.0545
Total	7	251.5900	35.9414

Corrected for the mean of the observations:

	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	96.3112	96.3112	1766.5571	<0.0001
Residual	5	0.2726	0.0545		

Total	6	96.5838	16.0973
-------	---	---------	---------

**Statistical Tests:**

<b>PRESS</b>	0.4578
--------------	--------

<b>Durbin-Watson Statistic</b>	1.7263	Passed
--------------------------------	--------	--------

<b>Normality Test</b>	Passed (P = 0.9914)
-----------------------	---------------------

Εικόνα 5.4.3 : Πηγή : Εργαστήριο Υγειοφυσικής, Ραδιοβιολογίας και Κυτταρογενετικής Ε.Κ.Ε.Φ.Ε.  
«Δημόκριτος»

## 6. Συμπεράσματα- Συζήτηση

Στον πίνακα 19 φαίνονται τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα για τα άγνωστα δείγματα.

Πίνακας 19				
Δείγμα	Κλασική μέθοδος	μέθοδος PCC		Πραγματική τιμή της δόσης (Gy)
	dose (Gy) exp1 curve	Καμπύλη PCC-24h repair (Πείραμα 3) Δόση (Gy)	Καμπύλη εργαστηρίου PCC-24h repair Δόση (Gy)	
Re 5	$0,64 \leq D=0,91 \leq 1,16$	$0,86 \pm 0,12$	$0,87 \pm 0,14$	<b>0,85</b>
Re 6	$3,30 \leq D=3,90 \leq 4,40$	$2,55 \pm 0,19$	$2,52 \pm 0,14$	<b>2,70</b>

Από τα συγκριτικά αποτελέσματα του πίνακα 19 φαίνεται ότι για το δείγμα Re 5 η πειραματική καμπύλη που προέκυψε στην πρώτη σειρά πειραμάτων με την κλασική μέθοδο, δίνει μια εκτίμηση δόσης, εντός των ορίων του σφάλματος, με την καμπύλη της μεθόδου PCC και την πραγματική δόση ακτινοβολήσης. Για το δείγμα Re 6 τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την πειραματική καμπύλη της κλασικής μεθόδου δεν συμπίπτουν ούτε με τα αποτελέσματα της PCC μεθόδου ούτε και με την πραγματική δόση με την οποία είχε ακτινοβοληθεί το δείγμα. Αντίθετα το αποτέλεσμα της καμπύλης της PCC μεθόδου (Τρίτη σειρά) για το δείγμα αυτό συμπίπτουν στα όρια του σφάλματος. Επομένως από την πειραματική μελέτη των δύο μεθόδων, η PCC μέθοδος αποδεικνύεται πιο αξιόπιστη συγκριτικά με την κλασική μέθοδο βιοδοσιμετρίας.

Οι δύο μέθοδοι αποτελούν σημαντικότερα εργαλεία της Βιολογικής δοσιμετρίας για την εκτίμηση απορροφηθεισών δόσεων ιοντίζουσας ακτινοβολίας από ολόσωμη ή μερική ακτινοβολήση αφού χρησιμοποιούν ως βιολογικό δοσίμετρο τα λεμφοκύτταρα τα οποία θεωρούνται ιδανικά για το σκοπό αυτό όπως περιγράφηκε στο θεωρητικό μέρος του παρόντος κειμένου, τόσο από την άποψη ότι είναι κύτταρα που συλλέγονται εύκολα από το περιφερικό αίμα ενώ παράλληλα κυκλοφορούν σε όλους τους ιστούς και έχουν σχετικά ομοιόμορφη ακτινοευαισθησία, όσο και από την άποψη ότι βρίσκονται για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα (~ χρόνια) στη φάση  $G_0$  του κυτταρικού κύκλου. Κάτι τέτοιο προσδίδει τη δυνατότητα στις κυτταρογενετικές μεθόδους να δώσουν μια εκτίμηση απορροφηθείσας δόσης για ατυχήματα που συνέβησαν χρόνια πριν.

### Συμπεράσματα για την Κλασική μέθοδο

Τα πειράματα 1 και 2 της παρούσας εργασίας, σκοπό είχαν την μελέτη της Κλασικής μεθόδου ως προς την αποτελεσματικότητά της. Για την χάραξη της καμπύλης δόσης απόκρισης χρειάστηκαν 48ώρες καλλιέργειας και αναλύθηκαν από 150 κύτταρα για τις χαμηλές δόσεις ακτινοβολήσης και από 100 για τις υπόλοιπες. Στην πραγματικότητα, όμως, για την χάραξη της καμπύλης αναφοράς ενός εργαστηρίου απαιτείται η ανάλυση τουλάχιστον  $1000^{uv}$  κυττάρων για τις χαμηλές δόσεις και τουλάχιστον  $500^{uv}$  κυττάρων για τις υψηλότερες για να υπάρχει μια σωστή εκτίμηση άγνωστων δόσεων από αυτήν. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι η μέθοδος στηρίζεται στην παρουσία δικεντρικών χρωμοσωμάτων τα οποία έχουν εξαιρετικά μικρή πιθανότητα εμφάνισης στις χαμηλές δόσεις (για παράδειγμα στα 150 κύτταρα που αναλύθηκαν στα 0,5 και 1Gy στο πείραμα 1 δεν

παρατηρήθηκε κανένα δικεντρικό χρωμόσωμα), επομένως για να δοθεί μια εκτίμηση χρειάζεται η ανάλυση πολύ περισσότερων κυττάρων, διαδικασία η οποία είναι ιδιαίτερα χρονοβόρα.

Επίσης για τις υψηλές δόσεις αντιμετωπίζεται και το πρόβλημα των λιγοστών μεταφάσεων ανά πλακάκι (αυτόματα μειώνεται και ο αριθμός των κυττάρων που μπορούν να αναλυθούν). Το πρόβλημα αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι κύτταρα που έχουν απορροφήσει μεγάλες δόσεις είτε δεν εισέρχονται στον κυτταρικό κύκλο και παραμένουν στη φάση  $G_0$  όπου και πεθαίνουν είτε καθυστερούν σημαντικά να φτάσουν στη μίτωση όπου τα χρωμοσώματα είναι παρατηρήσιμα.

### **Συμπεράσματα για τη μέθοδο PCC**

Η μελέτη της PCC, έδειξε την υπεροχή της μεθόδου συγκριτικά με την Κλασσική μέθοδο. Πέρα από τα πλεονεκτήματά της τα οποία περιγράφηκαν στο θεωρητικό μέρος, έχει ιδιαίτερη σημασία να τονιστεί εδώ η αμεσότητα της μεθόδου στην εκτίμηση της δόσης. Από τη στιγμή που είναι διαθέσιμο το δείγμα αίματος, τα κύτταρα μπορούν να αναλυθούν σε χρονικό διάστημα περίπου 2 ωρών από τη λήψη του δείγματος, ενώ παράλληλα για οποιαδήποτε δόση από τις πρώτες μεταφάσεις που θα αναλυθούν μπορεί να δοθεί μια αρκετά ασφαλής εκτίμηση για τη δόση. Το γεγονός αυτό οφείλεται στους εξής βασικούς παράγοντες :

1. Με τη σύντηξη των λεμφοκυττάρων με τα CHO τα οποία βρίσκονται ήδη στη φάση της μετάφασης, η πυρηνική μεμβράνη των λεμφοκυττάρων διαλύεται άμεσα και οι χρωματίδες των λεμφοκυττάρων συμπυκνώνονται λόγω των ειδικών ενζύμων που παράγονται στη φάση της μετάφασης των CHO. Ανεξάρτητα, λλοιπόν, από το γεγονός ότι τα λεμφοκύτταρα βρίσκονται στη  $G_0$  φάση, τα χρωμοσώματά τους γίνονται ορατά και παρατηρήσιμα.
2. Η μέθοδος βασίζεται στην καταμέτρηση των χρωμοσωματικών θραυσμάτων πολύ άμεσα. Τα χρωμοσωματικά θραύσματα είναι χρωμοσωματικές αλλοιώσεις οι οποίες εμφανίζονται από τις πολύ χαμηλές ακόμα δόσεις με συχνότητα ανάλογη της δόσης. Κάτι τέτοιο καθιστά τη μέθοδο πιο ευαίσθητη. Δηλαδή, όπως φάνηκε και από τα πειράματα 3, 4 τόσο για τη χάραξη της καμπύλης δόσης απόκρισης όσο και για την εκτίμηση των άγνωστων δόσεων χρειάστηκαν πολύ λιγότερες μετρήσεις για ένα αρκετά ασφαλές συμπέρασμα.

Οι παραπάνω παράγοντες καθιστούν την PCC μέθοδο ένα σημαντικά ανώτερο εργαλείο της Βιολογικής Δοσιμετρίας συγκριτικά με τις πιο κλασσικές μεθόδους που χρησιμοποιούν ασταθείς χρωμοσωματικές αλλοιώσεις και χρησιμοποιούνται για την άμεση εκτίμηση υπερέκθεσης.

# Βιβλιογραφία

- 1.«Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies», IAEA Semtember 2011
- 2.«The Use of Premature Chromosome Condensation to Study the Influence of Environmental Factors on Human Genetic Material in Interphase Cells» , Vasiliki I. Hatzi, Georgia I. Terzoudi, Christina Paraskevopoulou, Vasilios Makropoulos, Demetrios P. Matthopoulos, and Gabriel E. Pantelias
3. «Βιολογικά αποτελέσματα της έκθεσης σε Ιοντίζουσα ακτινοβολία», Π. Δημητρίου (Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Φυσιικής), Π. Παπαγιάννης (Λέκτορας Ιατρικής Φυσιικής), ΕΚΠΑ
4. «The use of peripheral blood mononuclear cell prematurely condensed chromosomes for biological dosimetry.» , Pantelias GE, Maillie HD, Radiat Res. 1984 Jul;99(1):140-50.
5. «Triage biodosimetry using Centromeric/ Telomeric DNA probes and Giemsa staining to score dicentrics or excess fragments in non-stimulated lymphocyte prematurely condensed chromosomes», Karachristou Ioanna, Karakosta Maria, Pantelias Antonio, Hatzi Vasiliki, Karaiskos Pantelis, Dimitriou Panagiotis, Pantelias Gabriel, Terzoudi Georgia, journal ELSEVIER, 2015
6. «Cytogenetic methods for Biodosimetry and risk individualization after exposure to ionizing radiation», G. I. Terzoudi and G. E. Pantelias , published in Radiation Protection Dosimetry , 2006
7. «Biological dosimetry of absorbed radiation by C-banding of interphase chromosomes in peripheral blood lymphocytes», G. E. Pantelias, G. E. Iliakis, C. D. Sambani and G. Politis, published in Int. J. Radiat. Biology, Vol. 63, 1993
8. «A simple method for premature chromosome condensation induction in primary human and rodent cells using polyethylene glycol.» , Pantelias GE, Maillie HD, Somatic Cell Genet. 1983 Sep;9(5):533-47.
9. «Κβαντομηχανική Ι» , Στέφανος Τραχανάς (Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, 2007)
10. «Ιοντίζουσες Ακτινοβολίες : Εφαρμογές στην Ιατρική και Βιολογία» , Ε. Γαζής, Καθηγητής ΕΜΠ, εκδόσεις Παπασωτηρίου, Αθήνα 1999
11. Σημειώσεις Αναπλ. Καθηγητή κ. Γεώργιου Τσιπολίτη για το μάθημα : «Εφαρμογές Ιοντιζουσών Ακτινοβολιών», Σχολή Ε.Μ.Φ.Ε. , Ε.Μ.Π.
12. «Η Φυσική της Πυρηνικής Ιατρικής», Α.Κασφίκη, Π.Δημητρίου, Μ.Λύρα
13. «Ραδιοβιολογία, Ακτινοβολίες και Ζωή», ΛΟΥΚΑ Χ. ΜΑΡΓΑΡΙΤΗ (1996)
14. «Βιολογία Κυττάρου» , Θωμόπουλος Γ. Ν., University Studio Press, Θεσσαλονίκη 1990



15. «Εισαγωγή στην Κυτταρική Βιολογία και Γενετική», Σαρρής Φ. Π., Ηράκλειο 2004
16. «Βιοδοσιμετρία Ιοντιζουσών Ακτινοβολιών και μελέτη μηχανισμών ακτινοευαισθησίας με κυτταρογενετικές μεθόδους και μοριακούς ανιχνευτές», διδακτορική διατριβή Γ. Τερζούδη , Αθήνα 1998
17. «Η χρήση της πρόωρης Χρωμοσωματικής Συμπύκνωσης στη Βιολογική Δοσιμετρία και προοπτικές συνδυασμού της με τις σύγχρονες τεχνικές Μοριακής Κυτταρογενετικής», διπλωματική εργασία Χ. Γάββαρη , Αθήνα 2013
18. «Water Radiolysis: Influence of Oxide Surfaces on H<sub>2</sub> Production under Ionizing Radiation», Sophie Le Caër, Institut Rayonnement Matière de Saclay, Service Interdisciplinaire sur les Systèmes Moléculaires et les Matériaux, UMR 3299 CNRS/CEA SIS2M, Laboratoire de Radiolyse, Bâtiment 546, F-91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France, Published: 28 February 2011
19. «What nutrition does to our genes: A modern paradigm for optimizing health and preventing non-communicable disease», Michael Fenech , CSIRO, Australia, 2015
20. «Εργαστηριακές Ασκήσεις Φυσικής», Τόμος Ι, Α.Α. Κώνστα, Κ. Χριστοδουλίδης, εκδόσεις Συμμετρία, Αθήνα 1999.

# Παράρτημα 1

<b>Πίνακας 1</b>			
<b>dicentric method - known dose 0 Gy (control)</b>			
<b># cell</b>	<b>Chromosome type exchange</b>		<b>breaks</b>
	<b>dicentric</b>	<b>centric rings</b>	<b>acentric fragments</b>
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0	0	0
7	0	0	0
8	0	0	0
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	1
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0
21	0	0	0
22	0	0	0
23	0	0	0
24	0	0	0
25	0	0	0
26	0	0	0
27	0	0	0
28	0	0	0
29	0	0	0
30	0	0	0
31	0	0	0
32	0	0	0
33	0	0	0
34	0	0	0
35	0	0	0
36	0	0	0
37	0	0	0
38	0	0	0
39	0	0	0
40	0	0	0
41	0	0	0
42	0	0	0
43	0	0	0
44	0	0	0
45	0	0	0
46	0	0	0
47	0	0	0
48	0	0	0
49	0	0	0
50	0	0	0
51	0	0	0
52	0	0	0
53	0	0	0
54	0	0	0
55	0	0	0
56	0	0	0
57	0	0	0

58	0	0	0
59	0	0	0
60	0	0	0
61	0	0	0
62	0	0	0
63	0	0	0
64	0	0	0
65	0	0	0
66	0	0	0
67	0	0	0
68	0	0	0
69	0	0	0
70	0	0	0
71	0	0	0
72	0	0	0
73	0	0	0
74	0	0	0
75	0	0	0
76	0	0	0
77	0	0	0
78	0	0	0
79	0	0	0
80	0	0	0
81	0	0	0
82	0	0	1
83	0	0	0
84	0	0	0
85	0	0	0
86	0	0	0
87	0	0	0
88	0	0	0
89	0	0	0
90	0	0	0
91	0	0	0
92	0	0	0
93	0	0	0
94	0	0	0
95	0	0	0
96	0	0	0
97	0	0	0
98	0	0	0
99	0	0	0
100	0	0	0
101	0	0	0
102	0	0	0
103	0	0	0
104	0	0	0
105	0	0	0
106	0	0	0
107	0	0	0
108	0	0	0
109	0	0	0
110	0	0	0
111	0	0	0
112	0	0	0
113	0	0	0
114	0	0	0
115	0	0	0
116	0	0	0
117	0	0	0
118	0	0	0
119	0	0	0
120	0	0	0
121	0	0	0

122	0	0	0
123	0	0	0
124	0	0	0
125	0	0	0
126	0	0	0
127	0	0	0
128	0	0	0
129	0	0	0
130	0	0	0
131	0	0	0
132	0	0	0
133	0	0	1
134	0	0	0
135	0	0	0
136	0	0	0
137	0	0	0
138	0	0	0
139	0	0	0
140	0	0	0
141	0	0	0
142	0	0	0
143	0	0	0
144	0	0	0
145	0	0	0
146	0	0	0
147	0	0	1
148	0	0	0
149	0	0	0
150	0	0	0
<b>total/cell</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0.026666667</b>

<b>Πίνακας 2</b>			
<b>dicentric method - known dose 0,5 Gy</b>			
<b># cell</b>	<b>Chromosome type exchange</b>		<b>breaks</b>
	<b>dicentric</b>	<b>centric rings</b>	<b>acentric fragments</b>
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	1
6	0	0	0
7	0	0	0
8	0	0	0
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0
21	0	0	0
22	0	0	0
23	0	0	0
24	0	0	0
25	0	0	0
26	0	0	0
27	0	0	0
28	0	0	0
29	0	0	1
30	0	0	0
31	0	0	0
32	0	0	0
33	0	0	0
34	0	0	0
35	0	0	0
36	0	0	0
37	0	0	0
38	0	0	0
39	0	0	0
40	0	0	0
41	0	0	1
42	0	0	0
43	0	0	0
44	0	0	0
45	0	0	0
46	0	0	0
47	0	0	0
48	0	0	0
49	0	0	0
50	0	0	0
51	0	0	0
52	0	0	0
53	0	0	0
54	0	0	0
55	0	0	0
56	0	0	0
57	0	0	0

58	0	0	0
59	0	0	0
60	0	0	0
61	0	0	1
62	0	0	0
63	0	0	0
64	0	0	0
65	0	0	0
66	0	0	0
67	0	0	0
68	0	0	0
69	0	0	0
70	0	0	0
71	0	0	0
72	0	0	0
73	0	0	0
74	0	0	0
75	0	0	0
76	0	0	0
77	0	0	0
78	0	0	0
79	0	0	0
80	0	0	0
81	0	0	0
82	0	0	0
83	0	0	0
84	0	0	0
85	0	0	0
86	0	0	0
87	0	0	0
88	0	0	1
89	0	0	0
90	0	0	0
91	0	0	0
92	0	0	0
93	0	0	0
94	0	0	0
95	0	0	1
96	0	0	0
97	0	0	0
98	0	0	0
99	0	0	0
100	0	0	0
101	0	0	0
102	0	0	0
103	0	0	0
104	0	0	0
105	0	0	0
106	0	0	0
107	0	0	0
108	0	0	0
109	0	0	0
110	0	0	0
111	0	0	1
112	0	0	0
113	0	0	0
114	0	0	0
115	0	0	0
116	0	0	0
117	0	0	0
118	0	0	0
119	0	0	0
120	0	0	0
121	0	0	0

122	0	0	1
123	0	0	0
124	0	0	0
125	0	0	0
126	0	0	0
127	0	0	0
128	0	0	0
129	0	0	0
130	0	0	0
131	0	0	0
132	0	0	0
133	0	0	0
134	0	0	0
135	0	0	0
136	0	0	0
137	0	0	0
138	0	0	0
139	0	0	0
140	0	0	1
141	0	0	0
142	0	0	0
143	0	0	0
144	0	0	0
145	0	0	0
146	0	0	0
147	0	0	0
148	0	0	1
149	0	0	0
150	0	0	0
<b>total/cell</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0.067</b>

<b>Πίνακας 3</b>			
<b>dicentric method - known dose 1 Gy</b>			
<b># cell</b>	<b>Chromosome type exchange</b>		<b>breaks</b>
	<b>dicentrics</b>	<b>centric rings</b>	<b>acentric fragments</b>
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	1
5	0	0	0
6	0	0	0
7	0	0	0
8	0	0	0
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0
21	0	0	0
22	0	0	1
23	0	0	1
24	0	0	0
25	0	0	0
26	0	0	0
27	0	0	0
28	0	0	0
29	0	0	0
30	0	0	0
31	0	0	0
32	0	0	0
33	0	0	0
34	0	0	0
35	0	0	0
36	0	0	0
37	0	0	0
38	0	0	0
39	0	0	0
40	0	0	0
41	0	0	0
42	0	0	0
43	0	0	0
44	0	0	1
45	0	0	0
46	0	0	0
47	0	0	0
48	0	0	0
49	0	0	0
50	0	0	0
51	0	0	1
52	0	0	0
53	0	0	0
54	0	0	0
55	0	0	0
56	0	0	0
57	0	0	0

58	0	0	0
59	0	0	2
60	0	0	0
61	0	0	0
62	0	0	0
63	0	0	0
64	0	0	0
65	0	0	0
66	0	0	0
67	0	0	0
68	0	0	0
69	0	0	0
70	0	0	0
71	0	0	0
72	0	0	0
73	0	0	0
74	0	0	0
75	0	0	0
76	0	0	0
77	0	0	0
78	0	0	0
79	0	0	0
80	0	0	0
81	0	0	1
82	0	0	0
83	0	0	0
84	0	0	0
85	0	0	0
86	0	0	0
87	0	0	0
88	0	0	0
89	0	0	1
90	0	0	0
91	0	0	0
92	0	0	0
93	0	0	0
94	0	0	0
95	0	0	0
96	0	0	0
97	0	0	0
98	0	0	1
99	0	0	0
100	0	0	0
<b>total/cell</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0.1</b>

<b>Πίνακας 4</b>			
<b>dicentric method - known dose 2 Gy</b>			
# cell	Chromosome type exchange		breaks
	dicentrics	centric rings	acentric fragments
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0	0	0
7	2	0	3
8	0	0	0
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	1	0	1
21	0	0	0
22	0	0	0
23	0	0	0
24	0	0	1
25	1	0	1
26	0	0	0
27	0	0	0
28	0	0	0
29	0	0	0
30	0	0	0
31	0	0	0
32	0	0	0
33	0	0	0
34	0	0	1
35	0	0	0
36	0	0	0
37	0	0	0
38	0	0	0
39	1	0	1
40	0	0	0
41	0	0	0
42	0	0	1
43	0	0	0
44	0	0	0
45	0	0	0
46	0	0	1
47	0	0	0
48	0	0	3
49	0	0	0
50	0	0	0
51	0	0	0
52	0	0	0
53	1	0	1
54	2	0	2
55	0	0	0
56	1	0	1
57	1	0	2

58	1	0	4
59	0	0	0
60	0	0	0
61	0	0	0
62	0	0	0
63	3	0	3
64	0	0	0
65	0	0	0
66	0	0	0
67	0	0	0
68	0	0	0
69	0	0	0
70	0	0	0
71	1	0	1
72	1	0	1
73	2	0	2
74	0	0	0
75	0	0	0
76	2	0	4
77	1	0	2
78	0	0	0
79	0	0	0
80	0	0	0
81	0	0	0
82	0	0	0
83	0	0	0
84	0	0	0
85	0	0	0
86	0	0	0
87	0	0	0
88	0	0	0
89	0	0	1
90	0	0	0
91	1	0	1
92	0	0	0
93	0	0	0
94	0	0	0
95	0	0	1
96	0	0	0
97	0	0	0
98	1	0	1
99	0	0	0
100	0	0	0
<b>total/cell</b>	<b>0.23</b>	<b>0</b>	<b>0.4</b>



<b>Πίνακας 5</b>			
<b>dicentric method - known dose 4 Gy</b>			
# cell	Chromosome type exchange		breaks
	dicentric	centric rings	acentric fragments
1	1	0	1
2	1	0	2
3	1	0	1
4	0	0	1
5	1	0	1
6	1	0	1
7	1	0	1
8	0	0	0
9	1	0	1
10	1	0	1
11	1	0	1
12	1	0	1
13	0	0	0
14	1	0	1
15	2	0	3
16	0	0	0
17	0	0	0
18	1	0	1
19	1	0	2
20	2	0	2
21	2	0	3
22	1	0	1
23	2	0	2
24	1	0	1
25	1	0	1
26	1	0	3
27	0	0	0
28	0	0	0
29	1	0	1
30	1	0	2
31	0	0	0
32	2	0	3
33	0	0	1
34	0	0	0
35	1	0	1
36	3	0	3
37	1	0	1
38	2	0	2
39	0	0	1
40	0	0	0
41	0	0	0
42	1	0	1
43	0	0	0
44	1	0	2
45	0	0	0
46	0	0	0
47	3	0	3
48	0	0	0
49	0	0	0
50	2	0	4
51	0	0	0
52	1	0	2
53	1	0	1
54	1	0	1
55	0	0	1
56	0	0	2
57	1	1	2

58	0	0	2
59	2	1	3
60	1	0	2
61	0	1	1
62	0	0	1
63	0	0	0
64	0	0	0
65	1	0	1
66	1	0	2
67	0	0	0
68	0	0	1
69	0	0	0
70	0	0	0
71	0	0	0
72	0	0	2
73	2	0	2
74	0	0	2
75	1	0	1
76	0	0	1
77	1	0	1
78	0	0	2
79	0	0	1
80	1	0	1
81	3	1	4
82	1	0	1
83	0	0	0
84	0	0	0
85	0	0	0
86	0	0	1
87	1	0	1
88	0	0	0
89	0	0	0
90	1	0	2
91	1	0	1
92	3	0	3
93	1	0	1
94	1	0	1
95	1	0	1
96	0	0	0
97	0	0	0
98	0	0	0
99	1	0	1
100	2	0	2
<b>total/cell</b>	<b>0.73</b>	<b>0.04</b>	<b>1.11</b>

<b>Πίνακας 6</b>			
<b>dicentric method - known dose 6 Gy</b>			
<b># cell</b>	<b>Chromosome type exchange</b>		<b>breaks</b>
	<b>dicentric</b>	<b>centric rings</b>	<b>acentric fragments</b>
1	1	0	1
2	1	0	1
3	2	0	2
4	1	0	2
5	3	0	3
6	4	0	6
7	2	0	4
8	2	0	4
9	0	0	2
10	1	0	2
11	2	0	2
12	3	0	3
13	5	0	6
14	2	0	3
15	2	0	2
16	0	0	2
17	1	0	2
18	0	0	2
19	2	0	3
20	2	0	2
21	1	0	1
22	1	0	2
23	2	0	4
24	1	0	2
25	0	0	1
26	1	0	1
27	1	0	2
28	2	0	2
29	3	0	3
30	4	0	4
31	2	0	4
32	2	1	4
33	0	0	2
34	1	0	2
35	2	0	2
36	3	0	3
37	1	0	1
38	1	0	2
39	2	0	4
40	1	0	2
41	0	0	1
42	1	0	1
43	1	0	2
44	2	1	4
45	0	0	2
46	1	0	2
47	2	0	2
48	3	0	3
49	1	0	1
50	1	0	2
51	2	0	4
52	1	0	1
53	1	0	1
54	2	0	2
55	1	0	2
56	3	0	3
57	4	1	6

58	1	0	2
59	2	0	2
60	3	0	3
61	1	0	1
62	1	0	2
63	2	0	4
64	1	0	1
65	1	0	1
66	1	0	1
67	2	0	2
68	1	0	2
69	3	0	3
70	4	1	6
71	1	0	2
72	1	0	2
73	2	0	2
74	3	0	3
75	4	0	4
76	2	0	4
77	2	1	4
78	0	0	2
79	1	0	2
80	2	0	2
81	3	0	3
82	1	0	1
83	1	0	2
84	2	0	4
85	1	0	2
86	0	0	1
87	4	0	4
88	1	0	2
89	2	0	3
90	2	0	4
91	3	0	3
92	2	0	4
93	2	0	2
94	2	0	2
95	2	0	4
96	1	0	2
97	2	1	3
98	2	0	2
99	2	0	2
100	2	0	2
<b>total/cell</b>	<b>1.71</b>	<b>0.06</b>	<b>2.5</b>

<b>Πίνακας 7</b>			
<b>dicentric method - known dose 8 Gy</b>			
<b># cell</b>	<b>Chromosome type exchange</b>		<b>breaks</b>
	<b>dicentrics</b>	<b>centric rings</b>	<b>acentric fragments</b>
1	3	0	3
2	4	0	7
3	3	0	3
4	2	0	4
5	1	0	3
6	4	0	7
7	2	0	4
8	2	0	2
9	1	0	3
10	3	0	3
11	0	0	1
12	2	0	4
13	3	0	4
14	1	0	1
15	2	0	3
16	3	0	5
17	2	0	3
18	3	0	3
19	1	1	4
20	2	0	4
21	3	0	5
22	4	0	4
23	2	0	4
24	2	0	5
25	1	0	3
26	2	0	2
27	1	0	3
28	6	0	7
29	2	0	2
30	2	0	7
31	4	0	7
32	2	0	4
33	2	0	2
34	1	0	3
35	3	0	3
36	0	0	1
37	2	0	4
38	3	0	4
39	1	0	1
40	2	0	3
41	3	0	5
42	2	0	3
43	3	0	3
44	1	2	4
45	2	0	4
46	3	0	5
47	4	0	4
48	2	0	5
49	1	0	3
50	2	0	2
51	1	1	3
52	6	0	7
53	2	0	2
54	2	1	7
55	4	0	7
56	2	1	4
57	2	0	2

58	1	0	3
59	3	0	3
60	0	0	1
61	2	0	4
62	3	0	4
63	1	0	1
64	1	1	3
65	6	0	7
66	2	0	2
67	2	1	7
68	4	0	7
69	2	1	4
70	2	0	2
71	1	1	3
72	3	0	3
73	0	0	1
74	3	0	3
75	4	0	7
76	3	0	3
77	2	0	4
78	1	0	3
79	4	0	7
80	2	0	4
81	2	0	2
82	1	0	3
83	3	0	3
84	0	0	1
85	4	0	7
86	2	1	4
87	2	0	2
88	1	1	3
89	3	0	3
90	0	0	1
91	3	0	3
92	4	1	7
93	3	0	3
94	2	0	4
95	1	0	3
96	4	0	7
97	2	0	4
98	3	0	3
99	2	0	2
100	2	0	3
<b>total/cell</b>	<b>2.27</b>	<b>0.13</b>	<b>3.533333333</b>

<b>Πίνακας 9</b>			
dicentric method - unknown dose RENEB 5			
# cell	Chromosome type exchange		breaks
	dicentric	centric rings	acentric fragments
1	0	0	1
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	1
5	0	0	0
6	0	0	0
7	0	0	0
8	0	0	0
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0
13	0	0	0
14	0	0	1
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0
21	0	0	0
22	0	0	0
23	0	0	0
24	0	0	0
25	0	0	0
26	0	0	1
27	0	0	0
28	0	0	0
29	0	0	0
30	0	0	0
31	0	0	0
32	0	0	0
33	0	0	0
34	0	0	0
35	0	0	0
36	0	0	1
37	0	0	1
38	0	0	0
39	0	0	0
40	0	0	0
41	0	0	0
42	0	0	0
43	0	0	0
44	0	0	0
45	0	0	0
46	0	0	0
47	0	0	0
48	0	0	0
49	0	0	0
50	0	0	0
51	0	0	0
52	0	0	0
53	0	0	0
54	0	0	0
55	0	0	0
56	0	0	0
57	0	0	0

58	0	0	0
59	0	0	2
60	0	0	0
61	0	0	1
62	0	0	0
63	0	0	0
64	0	0	0
65	0	0	0
66	0	0	0
67	0	0	0
68	0	0	1
69	0	0	0
70	0	0	0
71	0	0	0
72	0	0	0
73	0	0	0
74	0	0	0
75	0	0	0
76	0	0	0
77	0	0	0
78	0	0	1
79	0	0	0
80	1	0	1
81	1	0	1
82	0	0	0
83	0	0	0
84	0	0	0
85	0	0	0
86	0	0	0
87	0	0	0
88	0	0	0
89	0	0	1
90	0	0	0
91	0	0	0
92	1	0	1
93	0	0	0
94	0	0	0
95	0	0	0
96	1	0	1
97	0	0	0
98	0	0	0
99	0	0	1
100	0	0	0
total/cell	0,04	0	0,17

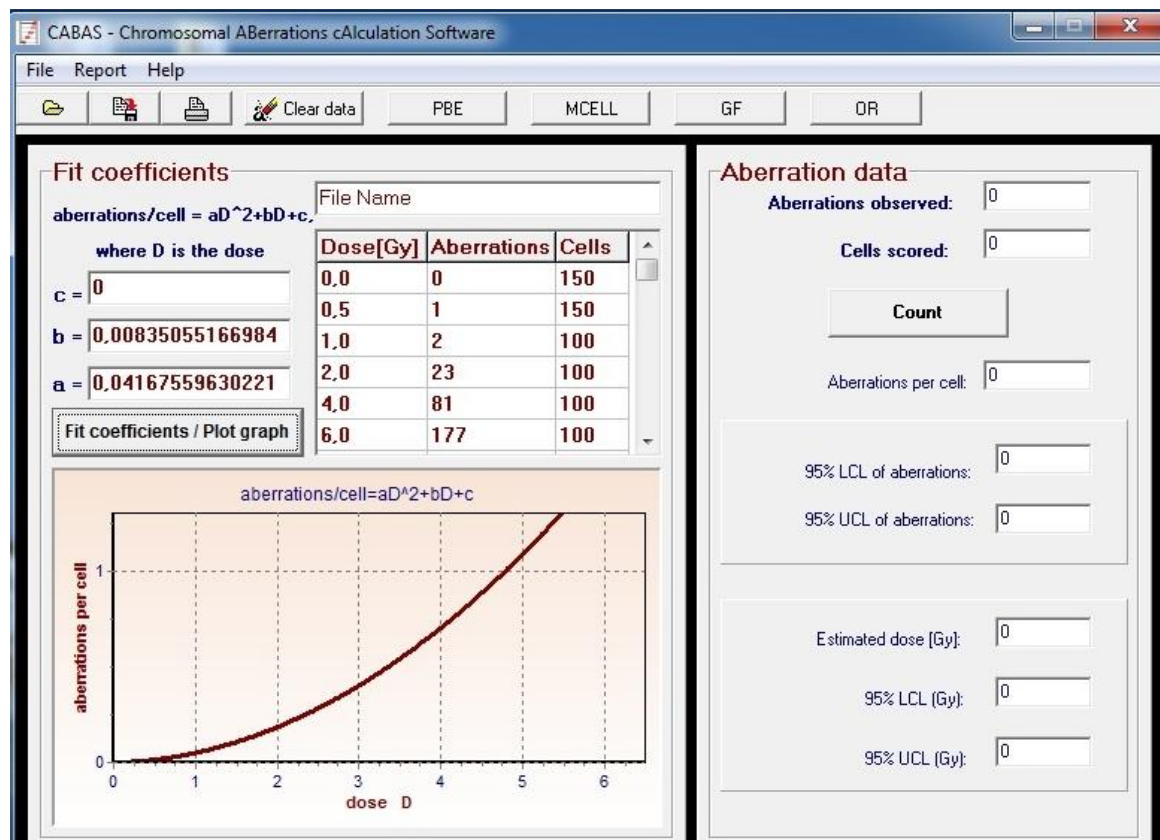
<b>Πίνακας 10</b>			
dicentric method - unknown dose RENEB 6			
# cell	Chromosome type exchange		breaks
	dicentrics	centric rings	acentric fragments
1	2	0	3
2	0	0	0
3	0	0	1
4	2	0	2
5	1	0	1
6	0	0	0
7	0	0	0
8	0	0	0
9	0	0	0
10	0	0	0
11	1	0	3
12	1	0	2
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0
16	1	0	1
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	1	0	1
21	0	0	0
22	0	0	1
23	1	0	1
24	2	0	2
25	0	0	0
26	1	0	1
27	3	0	5
28	0	0	0
29	1	0	1
30	1	0	2
31	1	0	1
32	0	0	0
33	0	0	0
34	2	0	3
35	0	0	1
36	0	0	0
37	0	0	0
38	0	0	0
39	1	0	3
40	0	0	0
41	2	0	2
42	1	0	1
43	0	0	0
44	0	0	0
45	1	0	1
46	0	0	0
47	1	0	1
48	0	0	2
49	0	0	0
50	2	0	2
51	2	0	3
52	0	0	0
53	0	0	0
54	0	0	0
55	2	0	2
56	0	0	0
57	1	1	5

58	0	0	1
59	0	0	1
60	0	0	0
61	0	0	0
62	0	0	0
63	0	0	2
64	1	0	1
65	1	0	1
66	0	0	0
67	0	0	0
68	1	0	1
69	1	0	2
70	1	0	2
71	0	0	0
72	4	0	4
73	0	0	0
74	0	1	1
75	0	0	0
76	1	0	1
77	0	0	0
78	1	0	1
79	0	0	1
80	0	0	0
81	1	0	1
82	1	0	1
83	0	0	0
84	1	0	1
85	1	0	1
86	0	0	0
87	1	0	1
88	1	0	1
89	2	0	4
90	1	0	1
91	1	0	2
92	0	0	0
93	0	0	0
94	2	0	4
95	0	0	1
96	0	0	1
97	0	0	0
98	0	0	0
99	0	2	2
100	0	0	0
total/cell	0,57	0,04	0,94

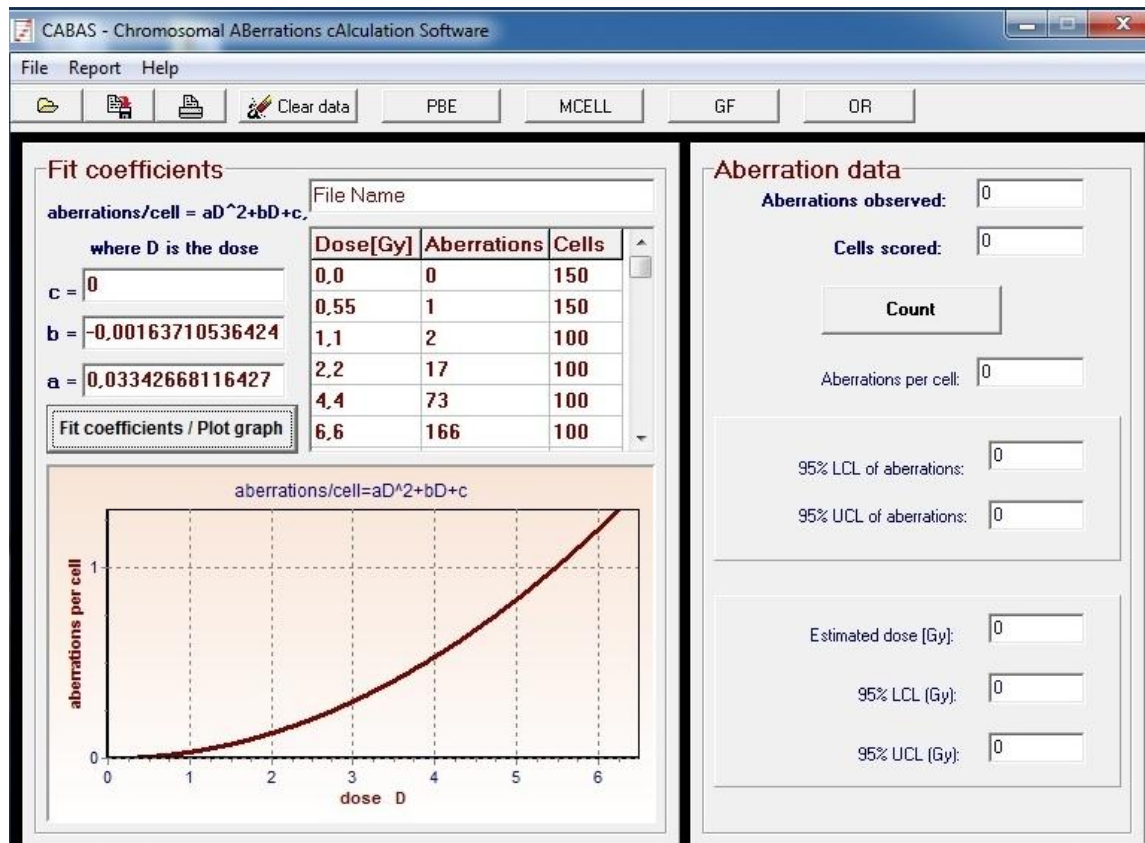
## Παράρτημα 2

Το υπολογιστικό πρόγραμμα **CABAS** (**Chromosomal ABerration cAlculate Software**). Πρόκειται για ένα υπολογιστικό εργαλείο εξειδικευμένο για χρήση στη βιολογική δοσιμετρία για την κλασική μέθοδο. Η ανάγκη ανάπτυξης ενός τέτοιου προγράμματος άπτεται στη δυσκολία εφαρμογής της μεθόδου μέγιστης πιθανοφάνειας με άλλους τρόπους όπως επίσης και του υπολογισμού του 95% του διαστήματος εμπιστοσύνης των στατιστικών. Επομένως το συγκεκριμένο πρόγραμμα αποτελεί ένα πολύ σημαντικό εργαλείο για τη βαθμονόμηση των καμπυλών δόσης- απόκρισης αλλά και για την εκτίμηση της δόσης, στο 95% του διαστήματος εμπιστοσύνης, από δείγματα ακτινοβολημένα από άγνωστη δόση.

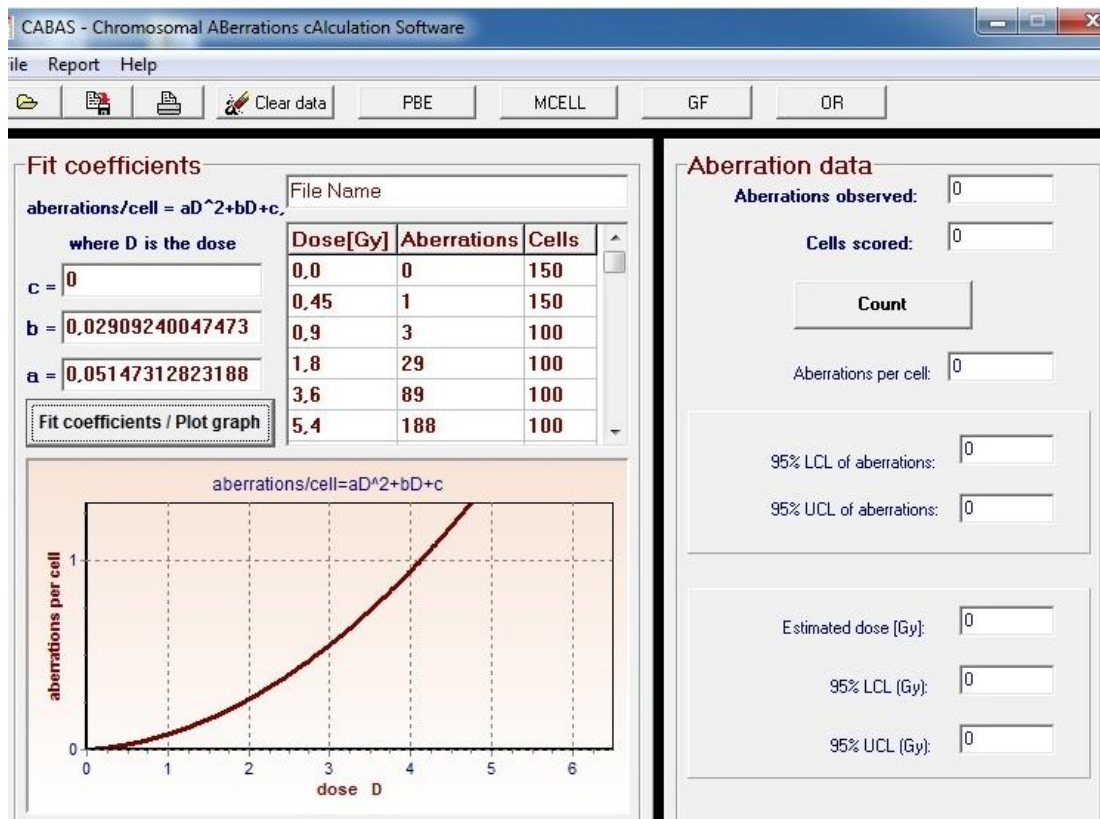
Τοποθετώντας τα αποτελέσματα των τριών πρώτων στηλών του συγκεντρωτικού πίνακα 8 στο πρόγραμμα CABAS, προέκυψαν οι τιμές a, b, c και η καμπύλη δόσης- απόκρισης όπως φαίνεται στο αρχείο CABAS\knowndosecurve.dat (Σχήμα 5.1.2):



Σχήμα Π.2.1 : Οι συντελεστές a,b,c υπολογίζονται με το πρόγραμμα CABAS τοποθετώντας τις πειραματικές μετρήσεις στις στήλες δόση-αλλοιώσεις-#καταμετρημένων κυττάρων.



Σχήμα Π.2.2 : Υπολογίζονται οι ελάχιστες τιμές των συντελεστών  $a, b, c$  με το πρόγραμμα CABAS τοποθετώντας τις πειραματικές μετρήσεις στις στήλες (δόση+σφάλμα)-(αλλοιώσεις-σφάλμα)-#καταμετρημένων κυττάρων.



Σχήμα Π.2.2 : Υπολογίζονται οι μέγιστες τιμές των συντελεστών  $a, b, c$  με το πρόγραμμα CABAS τοποθετώντας τις πειραματικές μετρήσεις στις στήλες (δόση-σφάλμα)-(αλλοιώσεις+σφάλμα)-#καταμετρημένων κυττάρων.