



ΓΕΩΡΓΙΟΣ Ι.
ΦΡΑΓΚΟΥΛΗΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗΣ ΤΩΝ ΒΛΑΒΩΝ
DNA ΑΠΟ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ ΜΕ ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΣΤΙΩΝ
GH2AX ΣΕ ΕΙΚΟΝΕΣ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΚΗΣ

Επιβλέπων: Αναπλ. Καθηγητής Αλέξανδρος Γεωργακίλας



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΚΗΣ

Μελετη της επιδιορθωσης των βλαβων
DNA από ακτινοβολια με αναλυση εστιών
γH2AX σε εικονες ανοσοφθορισμου

Διπλωματική εργασία
του

Γεωργίου Ι. Φραγκούλη

Επιβλέπων: Αναπλ. καθηγητής Αλέξανδρος Γεωργακίλας

Εγκρίθηκε από την τριμελή εξεταστική επιτροπή την Δευτέρα 16 Οκτωβρίου 2017

.....
Αλέξανδρος Γεωργακίλας
Αναπλ. Καθηγητής Ε.Μ.Π.

.....
Γεωργία Τερζούδη
Ερευνήτρια Α', Ε.Κ.Ε.Φ.Ε.

.....
Απόστολος Κυρίτσης
Επ. Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Copyright © – All rights reserved Γεώργιος Ι. Φραγκούλης.

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν στη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς τη συγγραφέα.

.....
Γεώργιος Ι. Φραγκούλης

Διπλωματούχος Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών, Ε.Μ.Π.

© 2017 – All rights reserved

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ιοντίζουσα ακτινοβολία προκαλεί πλήθος διαφορετικών βλαβών στο DNA των κυττάρων. Οι ομαδοποιημένες βλάβες (πολλές βλάβες κοντά μεταξύ τους στην αλληλουχία του DNA) και οι δίκλωνες θραύσεις είναι πιο επικίνδυνες, γιατί οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης δυσκολεύονται να τις επεξεργαστούν περισσότερο από τις μεμονωμένες αλλοιώσεις. Όσο πιο πυκνές είναι οι ομαδοποιημένες βλάβες τόσο πιο δύσκολα επιδιορθώνονται και μπορούν να οδηγήσουν με τη σειρά τους σε δίκλωνες θραύσεις. Οι δίκλωνες θραύσεις μπορούν να εντοπιστούν με τη φωσφορυλίωση της ιστόνης H2AX (γH2AX), η οποία εμφανίζεται γρήγορα σε μία μεγάλη περιοχή της χρωματίνης μετά από δίκλωνη θραύση γύρω από τη βλάβη και είναι βασική για την αποτελεσματικότητα της επιδιόρθωσης. Όταν η δίκλωνη θραύση επιδιορθωθεί αποφωσφορυλιώνονται σταδιακά. Οι περιοχές αυτές μπορούν να οπτικοποιηθούν μέσω της μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού ώστε να εκτιμηθεί ο αριθμός των δίκλωνων θραύσεων. Ονομάζονται εστίες γH2AX και για μεγάλο εύρος δόσεων ο αριθμός τους ισούται με τον αριθμό των δίκλωνων θραύσεων στον πυρήνα. Η επαγωγή των εστιών γH2AX και η εξέλιξή τους αντικατοπτρίζουν την επαγωγή δίκλωνων θραύσεων και την επιδιόρθωσή τους. Στο πλαίσιο της εργασίας γίνεται μία εισαγωγή στην απόκριση του κυττάρου στην βλάβη DNA και τον ρόλο της γH2AX σε αυτήν και ως βιοδείκτη. Ακόμη μελετήθηκε η επιδιόρθωση των δίκλωνων θραύσεων σε λεμφοκύτταρα για δόσεις 1Gy και 2Gy ακτίνων-γ (^{60}Co) μέσα από ανάλυση εικόνων ανοσοφθορισμού με το λογισμικό JCount. Σκοπός ήταν να εκτιμηθεί αν ξεχωρίζουν τα ακτινοβλημένα κύτταρα από τα μη ακτινοβλημένα σε διαφορετικούς χρόνους μετά την ακτινοβόληση. Ακόμη δοκιμάστηκαν κάποιες μέθοδοι στατιστικής ανάλυσης σε ήδη υπάρχοντα δεδομένα για τον προσδιορισμό του αριθμού των εστιών γH2AX σε σχέση με τη φάση του κυτταρικού κύκλου σε κύτταρα MCF7 (ακτίνες-γ), A549 (ακτίνες-X). Οι μέθοδοι είτε χρησιμοποιούν διπλές κατανομές στο ιστόγραμμα συχνοτήτων των εστιών γH2AX ανά κύτταρο για να βρεθεί η μέση τιμή τους στις φάσεις G0/G1 και G2, είτε χρησιμοποιούν διπλές κατανομές στο ιστόγραμμα της συνολικής έντασης στο DAPI για τον εντοπισμό κυττάρων που βρίσκονται σε αυτές τις φάσεις.

ABSTRACT

Ionizing Radiation (IR) induces a great number of different types of damage to the cellular DNA. Clustered lesions (many lesions in close proximity in the DNA sequence) and Double Strand Breaks (DSB) are the most deleterious for the cell because the repair mechanisms have a greater difficulty processing them than single lesions. The higher the complexity of the lesions, the higher the repair difficulty. Clustered lesions can also lead to DSBs. DSBs can be detected thanks to the phosphorylation of the histone H2AX (γ H2AX), which occurs rapidly in a large region of the chromatin around the DSB and has an important role in the repair efficiency. After the repair of the DSB they are dephosphorated gradually. These regions can be visualized by immunofluorescence microscopy to evaluate the number of DSBs. They are called γ H2AX foci and for a wide range of doses their number are equal to the number of DSB in the nucleus. The induction of γ H2AX foci and their progress reflect the induction of DSBs and the progress of their repair. In this thesis there is an introduction in the cellular DNA damage response and in the role of γ H2AX during repair and as a biomarker. The repair of DSBs was also investigated in human lymphocytes after irradiation dosage of 1Gy and 2Gy of γ -rays (^{60}Co) with immunofluorescence images analysis using the JCount software. The goal was to evaluate the ability to distinguish the irradiated cells from non irradiated in different times after the irradiation. Also, statistical analysis methods were used in experimental data to evaluate the number of γ H2AX foci depending on the cell cycle phase in MCF7 (γ -rays) and A549(X-rays) cell lines. The methods either used bimodal distributions on the histograms of γ H2AX foci to calculate the mean number of foci in phases G0/G1 and G2, or they used bimodal distributions on the histograms of total intensity of the DAPI to find the cells that are in either of those phases.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΕΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στον επιβλέπων καθηγητή μου, δρ. Αλέξανδρο Γεωργακίλα, για την καθοδήγηση και τις χρήσιμες συμβουλές του κατά την εξέλιξη της παρούσας εργασίας. Μου επέτρεψε την έκθεση σε ένα ερευνητικό περιβάλλον που μου ήταν σημαντική για να ξεκαθαρίσω, όχι μόνο ζητήματα της διπλωματικής εργασίας μου, αλλά ευρύτερες επιστημονικές προοπτικές.

Επίσης ανυπολόγιστη ήταν η συνεισφορά της δρ. Ζαχαρένιας Νικητάκη. Εκτός από την διάθεση των πειραματικών δεδομένων της, ο συμβουλευτικός και ελεγκτικός ρόλος της μου δόθηκε οποτεδήποτε τον ζήτησα και ήταν πραγματικά ανεκτίμητος.

Θέλω να ευχαριστήσω, ακόμη, όσους συνέβαλαν με γνώσεις ή ιδέες στην ολοκλήρωση της διπλωματικής εργασίας.

Τέλος, η υποστήριξη της οικογένειάς μου και των καλών μου φίλων ήταν, είναι και θα είναι πάντα ουσιώδης σε οτιδήποτε κάνω, με αυτήν την εργασία να μην αποτελεί σε καμία περίπτωση εξαίρεση.

Γιώργος Φραγκούλης

Αθήνα, 2017

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	3
Abstract.....	4
Ευχαριστίες.....	5
Περιεχόμενα.....	6
ΜΕΡΟΣ Α – ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
Κεφάλαιο 1: Κύτταρο – DNA	
1.1 Ιεραρχία της Βιολογικής Ύλης.....	13
1.2 Οργάνωση του κυττάρου.....	14
1.3 Κυτταρικός κύκλος.....	16
1.3.1 Μεσόφαση.....	16
1.3.2 Μίτωση και Μείωση.....	16
1.3.3. Έξω από τον κυτταρικό κύκλο: Η φάση G0.....	17
1.4 Σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (Cell Cycle Checkpoints).....	17
1.5 Απόπτωση (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος.....	17
1.6 Το DNA.....	17
1.6.1 Τα βασικά συστατικά του DNA.....	18
1.6.2 Η πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα.....	18
1.6.3 Βαθμοί συμπύκνωσης του DNA.....	19
1.6.4 Χρωμοσώματα.....	20
1.6.5 Η μεταβλητότητα της δομής του DNA.....	20
1.7 Έκφραση γονιδίων.....	21
1.7.1 Μεταγραφή.....	22
1.7.2 Μετάφραση.....	22
Κεφάλαιο 2: Βλάβες στο DNA από ακτινοβολία	
2.1 Συνέπειες των βλαβών στο DNA.....	23
2.1.1 Μετάλλαξη.....	23
2.1.2 Καρκίνος.....	23
2.2 Πηγές βλαβών.....	23

2.3 Αλληλεπίδραση ιοντίζουσας ακτινοβολίας και βιολογικής ύλης.....	24
2.3.1 Γενικά για την ακτινοβολία.....	24
2.3.2 Φαινόμενα αλληλεπίδρασης φωτονίων και ύλης.....	25
2.4 Ραδιόλυση του νερού.....	26
2.5 Σημεία επίθεσης στο DNA.....	28
2.5.1 Άμεσες και έμμεσες βλάβες.....	28
2.5.2 Διαφορές ενδογενών και εξωγενών βλαβών.....	28
2.5.3 Μοντελοποίηση των βλαβών.....	29
2.5.4 Ομοιότητες $HO\cdot$ και των οξειδωτών ενός ηλεκτρονίου.....	30
2.5.5 Προστασία από προσδεδεμένα μόρια.....	31
2.6 Μεμονωμένες βλάβες DNA.....	31
2.7 Αξιολόγηση των μεμονωμένων αλλοιώσεων.....	32
2.8 Βλάβες DNA λόγω γειτνίασης.....	34
2.9 Πολύπλοκες βλάβες DNA και δίκλωνες θραύσεις (Double Strand Breaks – DSB)....	36
2.10 Σταυροδεσμοί.....	37
2.11 Μη στοχευόμενη επίδραση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας.....	38
2.12 Προγραμματισμένες δίκλωνες θραύσεις.....	39

Κεφάλαιο 3: Επιδιόρθωση βλαβών DNA

3.1 Απόκριση στη βλάβη του DNA (DNA Damage Response –DDR).....	40
3.2 Αναδιαμόρφωση της χρωματίνης στην περιοχή της βλάβης.....	40
3.3. Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις πρωτεϊνών (Post- Translational Modifications – PTM).....	40
3.4 Οικογένειες ενζύμων που παίρνουν μέρος στην επιδιόρθωση του DNA.....	43
3.5 Επιβράδυνση ή παύση του κυτταρικού κύκλου.....	43
3.6 Μηχανισμοί επιδιόρθωσης DNA.....	43
3.7 Επιδιόρθωση μεμονωμένων νουκλεοτιδίων.....	44
3.7.1 Επιδιόρθωση με Εκτομή Βάσης (Base Excision Repair – BER).....	44
3.7.2 Επιδιόρθωση με Εκτομή Νουκλεοτιδίου (Nucleotide Excision Repair – NER).....	46
3.7.3 Επιδιόρθωση Αναντιστοιχίας (Mismatch Repair – MMR).....	48
3.8 Επιδιόρθωση δίκλωνων θραύσεων.....	49

3.8.1 Σηματοδότηση της βλάβης.....	50
3.8.2 Αναδιαμόρφωση της χρωματίνης.....	51
3.8.3 Ομόλογος Ανασυνδυασμός (Homologous Recombination – HR).....	52
3.8.4 Ανόπτηση Μονού Κλώνου (Single Strand Annealing – SSA).....	53
3.8.5 Μη Ομόλογη Ένωση Άκρων (Non-Homologous End Joining – NHEJ).....	53
3.8.6 Εφεδρική Μη Ομόλογη Ένωση Άκρων (Backup-NHEJ – B-NHEJ).....	54

Κεφάλαιο 4: Ο ρόλος της γH2AX στην ανίχνευση των δίκλωνων θραύσεων

4.1 Περισσότερα για την γH2AX.....	56
4.1.1 Χημεία της H2AX.....	56
4.1.2 Συμμετοχή των εστιών γH2AX στην απόκριση στη βλάβη DNA.....	56
4.1.3 Άλλες περιπτώσεις εμφάνισης-απουσίας γH2AX.....	58
4.2 Μέθοδοι μέτρησης των δίκλωνων θραύσεων.....	58
4.2.1 Ηλεκτροφόρηση.....	59
4.2.2 Δοκιμές γH2AX.....	59
4.2.3 Κυτταρομετρία ροής.....	60
4.2.4 Μικροσκοπία ανοσοφθορισμού.....	61
4.2.5 Σύγκριση Κυτταρομετρίας Ροής και Μικροσκοπίας Ανοσοφθορισμού.....	62
4.2.6 Σύγκριση Ηλεκτροφόρησης και Μεθόδου γH2AX.....	62
4.3 Συνεστιακή μικροσκοπία ανοσοφθορισμού (Confocal Immunofluorescence Microscopy).....	63
4.4 Μέθοδος γH2AX και καρκίνος.....	64
4.5 Βιοδοσιμετρία.....	64
4.5.1 Χρήση της γH2AX στη βιοδοσιμετρία.....	64
4.5.2 Εκτίμηση αποτελεσματικότητας θεραπειών με τη μέθοδο γH2AX.....	65
4.5.3 Τα λεμφοκύτταρα πρώτη επιλογή για βιοδοσιμετρία με τη μέθοδο γH2AX.....	66
4.5.4 Αποτελέσματα μελετών πάνω στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα.....	66

ΜΕΡΟΣ Β – ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ

Κεφάλαιο 5: Βασικό εγχειρίδιο του προγράμματος επεξεργασίας εικόνων JCount.

5.1 Εισαγωγή.....	69
5.2 Επισκόπηση του προγράμματος.....	69
5.3 Περιήγηση Εικόνων.....	70

5.3.1 Έκθεση Εικόνων (Display Images).....	70
5.3.2 Καμπύλη Διάταξης.....	71
5.3.3 Zoom.....	72
5.3.4 Διαχωρισμός των καναλιών RGB.....	73
5.4 Ανάλυση Αντικειμένων (Object Analysis).....	73
5.4.1 Διαχωρισμός (Segmentation).....	73
5.4.2 Ένταση Υποβάθρου (Background Intensity).....	74
5.4.3 Επιλογές Αντικειμένων (Object Options).....	75
5.4.4 Χρώματα Αντικειμένων (Object Colours).....	78
5.4.5 Προφίλ (Profile).....	78
5.4.6 Φίλτρα (Filters).....	79
5.5 Εργαλεία Χειροκίνητης Επεξεργασίας Αντικειμένων (Manual Object Editing Tools)..	80
5.5.1 Εργαλεία Σχεδιασμού Αντικειμένων (Object Drawing Tools).....	80
5.5.2 Εργαλεία Χωρισμού Αντικειμένων (Object Splitting Tools).....	80
5.5.3 Επιλογή και Διαγραφή Αντικειμένων (Selecting and Deleting Objects).....	81
5.5.4 Αναίρεση/Επανάληψη (Undo/Redo).....	82
5.5.5 Χειροκίνητη Επεξεργασία με το Μεγεθυντικό Φακό (Manual Editing with Magnifying Glass).....	82
5.6 Ανάλυση Εστιών (Foci Analysis).....	82
5.6.1 Επιλογή Αρχείων (Select Files).....	82
5.6.2 Ανάθεση Ομάδων (Assign Groups).....	83
5.6.3 Μέτρηση Εστιών (Foci Counting).....	84
5.6.4 Μέτρηση εστιών σε Πολλαπλές Εικόνες (Foci Counting with Multiple Images)..	86
Κεφάλαιο 6: Μία τυπική ανάλυση με τη JCount.....	87
6.1. Το πείραμα.....	87
6.2 Επιλογή Εικόνων.....	87
6.3 Επιλογή πυρήνων.....	88
6.4 Εντοπισμός των εστιών γΗ2ΑΧ.....	91
6.5 Πιο εξειδικευμένοι στόχοι και άλλες εκδόσεις του JCount.....	95
Κεφάλαιο 7: Υπολογισμός αριθμού εστιών γΗ2ΑΧ ανά κύτταρο σε πειράματα επιδιόρθωσης λεμφοκυττάρων	
7.1 Σκοπός ανάλυσης.....	96

7.2 Πείραμα 1: Το πρώτο πείραμα επιδιόρθωσης λεμφοκυττάρων.....	96
7.2.1 Απλή στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων.....	96
7.2.2 Προσαρμογή της κατανομής Poisson.....	97
7.3 Πείραμα 2: Το δεύτερο πείραμα επιδιόρθωσης λεμφοκυττάρων.....	99
7.3.1 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων.....	99
7.4 Πείραμα 3: Το τρίτο πείραμα επιδιόρθωσης λεμφοκυττάρων.....	100
7.4.1 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων.....	100
7.5 Συμπεράσματα.....	101
Κεφάλαιο 8: Χρήση κατάλληλων κατανομών για τον υπολογισμό του αριθμού εστιών γΗ2ΑΧ ανά κύτταρο στις φάσεις G0/G1.	
8.1 Σκοπός ανάλυσης.....	103
8.2 Κατασκευή κατάλληλων κατανομών.....	103
8.3 Πείραμα 4: Κύτταρα MCF7.....	105
8.3.1 Σκοπός πειράματος.....	106
8.3.2 Επιλογή εικόνων	106
8.3.3 Απλή στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων – μέση τιμή και τυπική απόκλιση....	106
8.3.4 Προσαρμογή της Bimodal Poisson στα ιστογράμματα συχνοτήτων.....	107
8.3.5 Αναζήτηση κατάλληλων διπλών κατανομών για προσαρμογή στα ιστογράμματα.....	108
8.4 Πείραμα 5: Πείραμα επιδιόρθωσης σε κύτταρα A549 ακτινοβολημένα με ακτίνες-Χ.....	112
8.4.1 Σκοπός πειράματος.....	113
8.4.2 Αποτελέσματα απλής ανάλυσης και προσαρμογής της Bimodal Poisson.....	113
8.4.3 Σύγκριση προσαρμογής των ανεξάρτητων διπλών κατανομών.....	114
8.4.4 Συνολικά αποτελέσματα για το πείραμα.....	115
8.5 Συμπεράσματα.....	115
Κεφάλαιο 9: Μέθοδος εντοπισμού κυττάρων στις φάσεις G0/G1 και G2 σε εικόνες ανοσοφθορισμού με βάση το DAPI.	
9.1 Σκοπός ανάλυσης.....	117
9.2 Το πείραμα 5 με νέα μέθοδο: Κύτταρα A549 ακτινοβολημένα με ακτίνες-Χ.....	117
9.2.1 Εισαγωγή.....	117

9.2.2 Εφαρμογή της κατανομής Bimodal Gauss Independent για τον εντοπισμό των δύο κορυφών.....	118
9.2.3 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων.....	120
9.4 Συμπεράσματα.....	121
Βιβλιογραφία.....	123
Παράρτημα.....	127

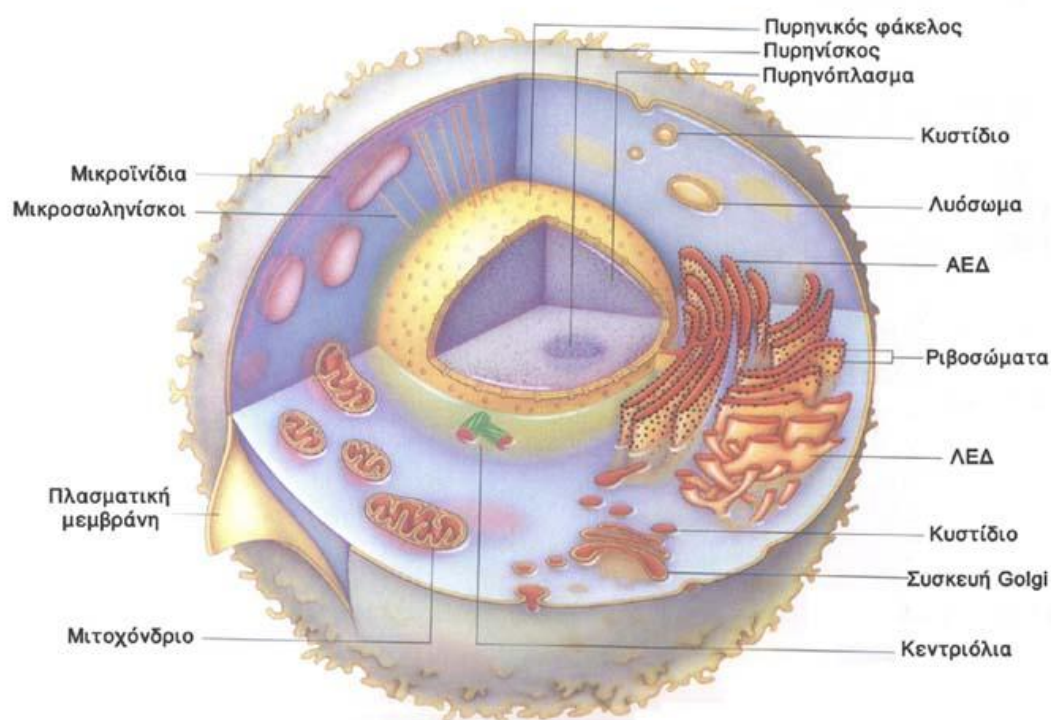
ΜΕΡΟΣ Α – ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1. Κύτταρο – DNA

1.1 Ιεραρχία της Βιολογικής Ύλης

Η βιολογική ύλη ιεραρχείται ανάλογα με το βαθμό οργάνωσης. Το πιο θεμελιώδες επίπεδο είναι το βιοχημικό, το οποίο περιγράφει τις χημικές αντιδράσεις που επιτελούν τα διάφορα βιομόρια. Έπειτα είναι το κύτταρο, το δομικό στοιχείο των οργανισμών. Πολλά κύτταρα συνδέονται για να σχηματίσουν έναν ιστό και στη συνέχεια διαφορετικοί ιστοί συνδυάζονται για να σχηματίσουν τα όργανα. Διαφορετικά όργανα συνεργάζονται οργανώνοντας τα συστήματα που επιτελούν συγκεκριμένες λειτουργίες και, τέλος, όλα τα συστήματα μαζί δημιουργούν έναν οργανισμό. [1]

Οι πολυκύτταροι οργανισμοί αποτελούνται από μεγάλο αριθμό κυττάρων, το καθένα με διαφορετική μορφή και λειτουργία. Στον άνθρωπο πρόκειται για μερικές δεκάδες τρισεκατομμύρια κύτταρα. Το μέγεθός τους κυμαίνεται γύρω στις μερικές δεκάδες μικρόμετρα. [1]



Εικόνα 1.1: Απεικόνιση ζωικού ευκαρυωτικού κυττάρου. (ΑΕΔ: Αδρό Ενδοπλασματικό Δίκτυο, ΛΕΔ: Λείο Ενδοπλασματικό Δίκτυο) [Κ.Π.Ε. Καστορίας]

Στην **Εικόνα 1.1** παρουσιάζεται ένα τυπικό ζωικό κύτταρο, ένα νοητικό κατασκεύασμα, το οποίο περιγράφει τις γενικές ιδιότητες των κυττάρων. Υπάρχουν πάνω από 200 τύποι κυττάρων, που διαφοροποιούνται ανάλογα με τη λειτουργία τους, και τέσσερις βασικοί ιστοί (Συνδετικός, Επιθηλιακός, Νευρικός και Μυϊκός)[2]

Παρά τις διαφορές των κυττάρων του οργανισμού, έχουν όλα το ίδιο γενετικό υλικό (DNA). Γενικά, τα κύτταρα χωρίζονται σε δύο ευρύτερες κατηγορίες, τα προκαρυωτικά και τα ευκαρυωτικά. Η διαφορά ανάμεσα στους δύο τύπους είναι ο τρόπος οργάνωσης του DNA. Στα προκαρυωτικά κύτταρα δεν υπάρχει πυρήνας, αλλά το γενετικό υλικό βρίσκεται μέσα στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου. Τα ευκαρυωτικά κύτταρα το έχουν μέσα στον ευκρινώς σχηματισμένο πυρήνα. Οι πολυκύτταροι οργανισμοί αποτελούνται από ευκαρυωτικά κύτταρα.

Όσον αφορά την οργάνωσή του, το DNA των προκαρυωτικών κυττάρων δείχνει μεγαλύτερη επινοητικότητα και ποικιλότητα.[2]

Άλλος ένας διαχωρισμός γίνεται όσον αφορά το οργανίδιο στο οποίο περιέχεται το DNA. Όταν γίνεται αναφορά στο DNA του κυττάρου, πρόκειται για εκείνο του πυρήνα. DNA, όμως, υπάρχει και στα μιτοχόνδρια, το επονομαζόμενο μιτοχονδριακό DNA.

1.2 Οργάνωση του κυττάρου [1, 2]

Κυτταρική μεμβράνη

Στην **Εικόνα 1.1** αναφέρεται ως πλασματική μεμβράνη. Έχει δομικό ρόλο, διαχωρίζοντας σαφώς το κύτταρο από το περιβάλλον, ρυθμίζει τη διακίνηση μορίων προς και από το κύτταρο, ρυθμίζει τη μεταφορά πληροφοριών με τους υποδοχείς της και περιέχει στις διάφορες επιφάνειές της αντιγόνα και ένζυμα.

Η σύνθεσή της αποτελείται από πρωτεΐνες (55%), λιπίδια (42%) και υδατάνθρακες (3%). Φωσφολιπίδια, αποτελούμενα από μία φωσφορική ομάδα (υδρόφιλη κεφαλή) και μία ουρά από λιπίδια (υδρόφοβη ουρά) οργανώνονται στην διπλή μεμβράνη με τις υδρόφιλες κεφαλές προς τα έξω και τις υδρόφοβες ουρές προς τα μέσα.

Πάνω στη μεμβράνη υπάρχουν πρωτεΐνες και σάκχαρα. Οι πρωτεΐνες μπορεί να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη (διαμεμβρανικές) ή να είναι προσδεσμένες εσωτερικά ή εξωτερικά σε αυτήν (περιφερειακές). Οι διαμεμβρανικές είναι συνήθως διάλυτοι και οι περιφερειακές καταλύτες ή σηματοδότες.

Η διακίνηση των συστατικών από και προς το κύτταρο εξαρτάται από το μέγεθός τους, τη χημική σύσταση ή τη δομή τους. Μικρομοριακές ενώσεις μπορούν να περάσουν την κυτταρική μεμβράνη με παθητική διάχυση, διευκολυνόμενη διάχυση ή ενεργό μεταφορά. Στην παθητική διάχυση σημασία έχει μόνο η διαφορά συγκέντρωσης εκατέρωθεν της μεμβράνης. Στη διευκολυνόμενη μία μη λιποδιαλυτή ουσία συνδέεται συνήθως με μία λιποδιαλυτή ουσία-φορέα και διαπερνά τη μεμβράνη. Τέλος στην ενεργό μεταφορά, το κύτταρο χρησιμοποιεί φορείς και καταναλώνει ενέργεια. Οι μακρομοριακές ενώσεις διαπερνούν δυσκολότερα τη μεμβράνη και με ενεργό μεταφορά.

Κυτταροσκελετός

Ο κυτταροσκελετός είναι ένα σύστημα ινιδίων (μικροϊνίδια και μικροσωληνίσκοι), συνδεδεμένο με την κυτταρική μεμβράνη και τα κεντριόλια, που δίνει στο κύτταρο σχήμα και βοηθά στη μεταφορά χημικών συστατικών από τη μία περιοχή του κυττάρου στην άλλη. Έτσι είναι πολύ σημαντικός για την εσωτερική οργάνωση του κυττάρου.

Πυρήνας

Ο πυρήνας οριοθετείται από δύο ομόκεντρες πορώδεις επιφάνειες που ονομάζονται πυρηνικός φάκελος, το εσωτερικό υγρό του οποίου λέγεται πυρηνόπλασμα. Μέσα στον πυρηνικό φάκελο βρίσκεται το DNA, το οποίο φέρει τη γενετική πληροφορία του κυττάρου. Ακόμη υπάρχει πλήθος ενζύμων που σχετίζονται με την αντιγραφή του DNA και την έκφραση των γονιδίων, καθώς και με την επιδιόρθωση του DNA και το πακετάρισμά του και δρουν όποτε χρειάζεται. Τέλος μέσα στον πυρήνα βρίσκονται οι πυρηνίσκοι, μικρά οργανίδια μέσα στα οποία γίνεται η παραγωγή των ριβοσωμάτων, τα οποία στη συνέχεια εκβάλλονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο.

Ριβοσώματα

Τα ριβοσώματα συμμετέχουν στην έκφραση των γονιδίων του DNA. Συγκεκριμένα, παίρνουν μέρος στη σύνθεση των πρωτεϊνών. Η λειτουργία τους θα εξηγηθεί στη συνέχεια.

Ενδοπλασματικό δίκτυο

Το ενδοπλασματικό δίκτυο επικοινωνεί με τον πυρήνα μέσω των πόρων. Είναι ένα συνεχές σύστημα αλληλοσυνδεδεμένων μεμβρανικών σάκων και σωλήνων. Συχνά εκτείνεται σε όλο το κύτταρο. Είναι η σημαντικότερη θέση σύνθεσης πρωτεϊνών και νέων μεμβρανών. Έχει δύο τμήματα, το Αδρό Ενδοπλασματικό Δίκτυο (ΑΕΔ) που έχει πάνω στη μεμβράνη τα ριβοσώματα και το Λείο Ενδοπλασματικό Δίκτυο (ΛΕΔ). Στο ΑΕΔ γίνεται η σύνθεση των πρωτεϊνών, ενώ στο ΛΕΔ γίνεται η επεξεργασία κάποιων μορίων που δεν έχουν πάρει την τελική μορφή τους. Στα περισσότερα κύτταρα το ΛΕΔ είναι μικρό σε σχέση με το ΑΕΔ. Εξαιρέση αποτελούν κύτταρα που επιτελούν συγκεκριμένες λειτουργίες, όπως τα επινεφρίδια με την παραγωγή ορμονών ή τα ηπατικά με την αποτοξίνωση της αλκοόλης.

Συσκευή Golgi

Η συσκευή Golgi είναι μία μεμβράνη που βρίσκεται κοντά στον πυρήνα και δέχεται πρωτεΐνες και λιπίδια από το ΕΔ, τα τροποποιεί και τα στέλνει όπου χρειάζονται.

Μιτοχόνδρια

Τα μιτοχόνδρια είναι ευδιάκριτα οργανίδια του κυτταροπλάσματος, τα «εργοστάσια» παραγωγής ενέργειας. Έχουν δύο κυτταρικές μεμβράνες, μία εξωτερική και μία εσωτερική. Η εσωτερική μεμβράνη είναι ρυτιδωμένη, έχοντας έτσι αυξημένο πηλίκο επιφάνειας ανά όγκο, ένα χαρακτηριστικό παραπέμπει σε δομή με καταλυτική δράση, όπως και στη συγκεκριμένη περίπτωση (όμοια και στο ενδοπλασματικό δίκτυο και τη συσκευή Golgi). Τα μιτοχόνδρια αξιοποιούν την ενέργεια που απελευθερώνεται από την οξείδωση της τροφής (πχ σάκχαρα) και παράγει την Τριφωσφορική Αδενίνη (Adenine Triphosphate – ATP). Ακόμη έχουν το δικό τους DNA και την ιδιότητα να διαιρούνται.

Λυσοσωμάτια

Τα λυσοσωμάτια είναι μικροί σάκοι με πεπτικά ένζυμα, αποικοδομούν φθαρμένα οργανίδια, μακρομόρια και άλλα σωματίδια.

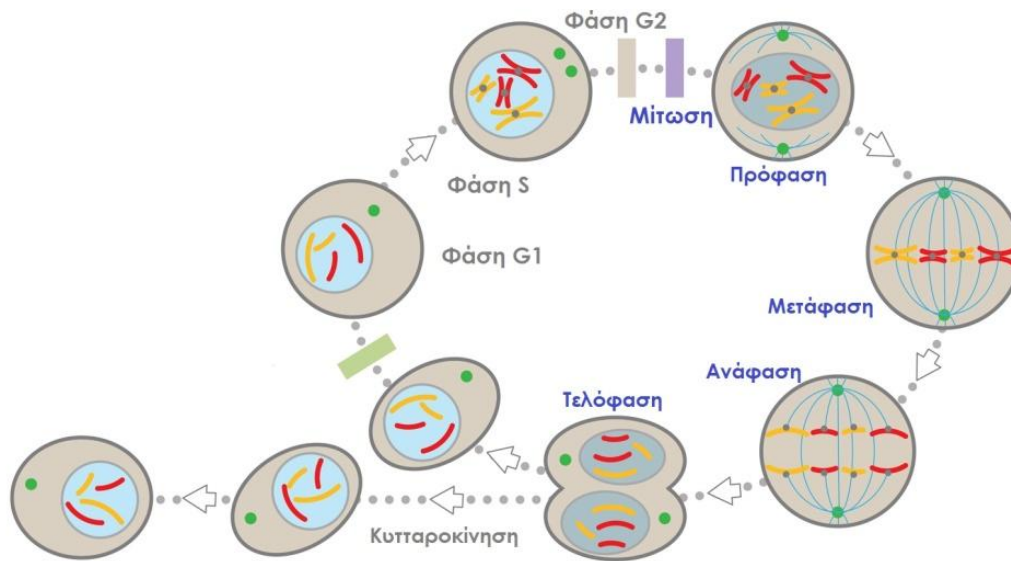
Υπεροξεισώματα

Τα υπεροξεισώματα περιβάλλονται από μία απλή μεμβράνη και περιέχουν ένζυμα που χρησιμοποιούνται σε πολλές αντιδράσεις οξείδωσης, αποδομούν λιπίδια ή καταστρέφουν τοξικά μόρια. Ακόμη εκεί παράγεται και αποδομείται το πολύ τοξικό υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂).

Κυστίδια

Τα κυστίδια είναι λιπιδικό «σάκοι» που χρησιμεύουν για τη μεταφορά διαλυτών πρωτεϊνών ανάμεσα στα διαμερίσματα του κυττάρου. Μπορούν να μεταφέρουν ουσίες και μέσω της κυτταρικής μεμβράνης.

1.3 Κυτταρικός Κύκλος



Εικόνα 1.2: Ο κυτταρικός κύκλος [i4]

Ένα τυπικό ευκαρυωτικό κύτταρο σε κυτταροκαλλιέργεια διαιρείται περίπου κάθε 24 ώρες. Ωστόσο η εξειδίκευση των κυττάρων στους πολυκύτταρους οργανισμούς συνεπάγεται την αρκετά διαφορετική διάρκεια κυτταρικού κύκλου ανάμεσα στους διαφορετικούς τύπους. Για παράδειγμα, τα επιθηλιακά κύτταρα έχουν διαιρούνται περίπου κάθε 12 ώρες, τα ηπατοκύτταρα περίπου ένα έτος και υπάρχουν και κύτταρα που δεν αλλάζουν φάση μέχρι να πεθάνουν.

Ο κυτταρικός κύκλος χωρίζεται σε δύο βασικά τμήματα, την Μεσόφαση (Interphase) και την Μίτωση (Mitosis). Περί του 95% του χρόνου του το μέσο κύτταρο το ξοδεύει στην Μεσόφαση. [1, 2]

1.3.1 Μεσόφαση

Η μεσόφαση χωρίζεται σε επιμέρους φάσεις, τις G1, S και G2.

Στην φάση G1 το κύτταρο μεταβολίζει ενεργά και μεγαλώνει, παράγοντας πρωτεΐνες και άλλες ουσίες που θα χρειαστεί στη συνέχεια, χωρίς να διπλασιάζει το DNA. Στην φάση S γίνεται ο διπλασιασμός του DNA. Τα διπλασιασμένα μόρια του DNA είναι συνδεδεμένα μεταξύ τους στο κεντρομερίδιο, μια ειδική ακολουθία DNA, και ονομάζονται αδελφές χρωματίδες. Έπειτα το κύτταρο περνάει στην φάση G2 συνθέτει πρωτεΐνες σχετικές με τη Μίτωση.[2, 3]

1.3.2 Μίτωση και Μείωση

Η Μίτωση χωρίζεται επίσης σε επιμέρους φάσεις. Την Πρόφαση (Prophase), τη Μετάφαση (Metaphase), την Ανάφαση (Anaphase) την Τελόφαση (Telophase) και την Κυτταροκίνηση (Cytokinesis).

Στην Πρόφαση σχηματίζεται η μιτωτική άτρακτος, η οποία αποτελείται από μικροσωληνίσκους και πρωτεΐνες που φροντίζουν για τον ορθό διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων, και ο συστατικός δακτύλιος που αποτελείται κυρίως από νημάτια ακτίνης και μιοσίνης. Ο πυρηνικός φάκελος αποσυντίθεται και τα κεντρομερίδια ενώνονται με τα ινίδια της μιτωτικής

ατράκτου. Στη Μετάφαση οι αδελφές χρωματίδες αποκτούν τη μέγιστη συσπείρωσή τους και σχηματίζουν τα χρωμοσώματα. Στην Ανάφαση το κεντρομερίδιο και οι αδελφές χρωματίδες διαχωρίζονται και στην Τελόφαση σχηματίζονται οι θυγατρικοί πηρήνες και τα ινίδια της ατράκτου αποδιατάσσονται, ενώ στην κυτταροκίνηση το κύτταρο σπάει στα θυγατρικά του.

Τα κύτταρα των γαμετών δεν χωρίζονται με Μίτωση αλλά με Μείωση. Αυτή η διαδικασία έχει διαφορετικά βήματα και το γενετικό υλικό τους δεν διπλασιάζεται αλλά μοιράζεται στα θυγατρικά κύτταρά τους. [2, 3]

1.3.3 Έξω από τον κυτταρικό κύκλο: Η φάση G0

Μετά τη μίτωση το κύτταρο βρίσκεται στη φάση G0 μέχρι να μπει ξανά στην φάση G1 και τον κυτταρικό κύκλο. Υπάρχουν κύτταρα τα οποία βρίσκονται απ τη δημιουργία τους ως το θάνατό τους στην φάση G0, δεν διπλασιάζουν το DNA τους, απλά μεταβολίζουν. Παραδείγματα τέτοιων κυττάρων είναι τα λεμφοκύτταρα και τα νευρικά κύτταρα. [3]

1.4 Σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (Cell Cycle Checkpoints)

Για να πραγματοποιηθεί ο κυτταρικός κύκλος πρέπει να γίνει ακριβής συντονισμός της σύνθεσης και της κίνησης των βιολογικών μακρομορίων μέσα στο κύτταρο. Τα σημεία ελέγχου ορίζονται ως τα κυτταρικά μονοπάτια παρακολούθησης της ακεραιότητας του κυττάρου, τα οποία προκαλούν καθυστέρηση στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου ως απόκριση σε βλάβες ή άλλα παράτυπα γεγονότα. Εξασφαλίζουν έτσι τη σωστή μετάβαση από τη μία φάση του κυτταρικού κύκλου στην επόμενη, φροντίζοντας να έχουν ολοκληρωθεί ορισμένες απαραίτητες διαδικασίες. Σε αυτά τα σημεία ο κυτταρικός κύκλος είτε καθυστερεί, είτε διακόπτεται προσωρινά, ή ακόμη μπορεί το κύτταρο να προχωρήσει σε Απόπτωση και να οδηγηθεί μόνο του στο θάνατο.[2, 4]

1.5 Απόπτωση (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος)

Τα κύτταρα μπορούν να αποδομήσουν το σύστημα ελέγχου και να αποσυρθούν από τον κυτταρικό κύκλο. Αυτή η διαδικασία διεκπεραιώνεται με ενδοκυττάρια πρωτοελυτική διεργασία, δηλαδή το κύτταρο αποδομεί τις πρωτεΐνες του.

Στην περίπτωση της νέκρωσης, που προκαλείται από εξωτερικούς παράγοντες όπως χημικές ουσίες ή έλλειψη θρεπτικών συστατικών, δεν υπάρχει κυτταρική ρύθμιση. Το κύτταρο πεθαίνει παθητικά. Παρατηρείται διόγκωση του κυττάρου, έντονη μιτοχονδριακή δράση και γενική διαταραχή της εσωτερική ομοιόστασης του κυττάρου. Ακολουθεί λύση και φλεγμονώδης αντίδραση που επηρεάζει την περιοχή γύρω από το κύτταρο και προκαλεί επακόλουθες βλάβες. Αντίθετα, στην απόπτωση, το κύτταρο ρυθμίζει την καταστροφή του και πεθαίνει αθόρυβα, με τρόπο ενεργό. Η απόπτωση καταστρέφει τα συστατικά του κυττάρου κρατώντας προσωρινά ανέπαφα τα μιτοχόνδρια και την κυτταρική μεμβράνη. Έτσι δεν υπάρχει διάδοση του σήματος του θανάτου στα γύρω κύτταρα. [1, 5]

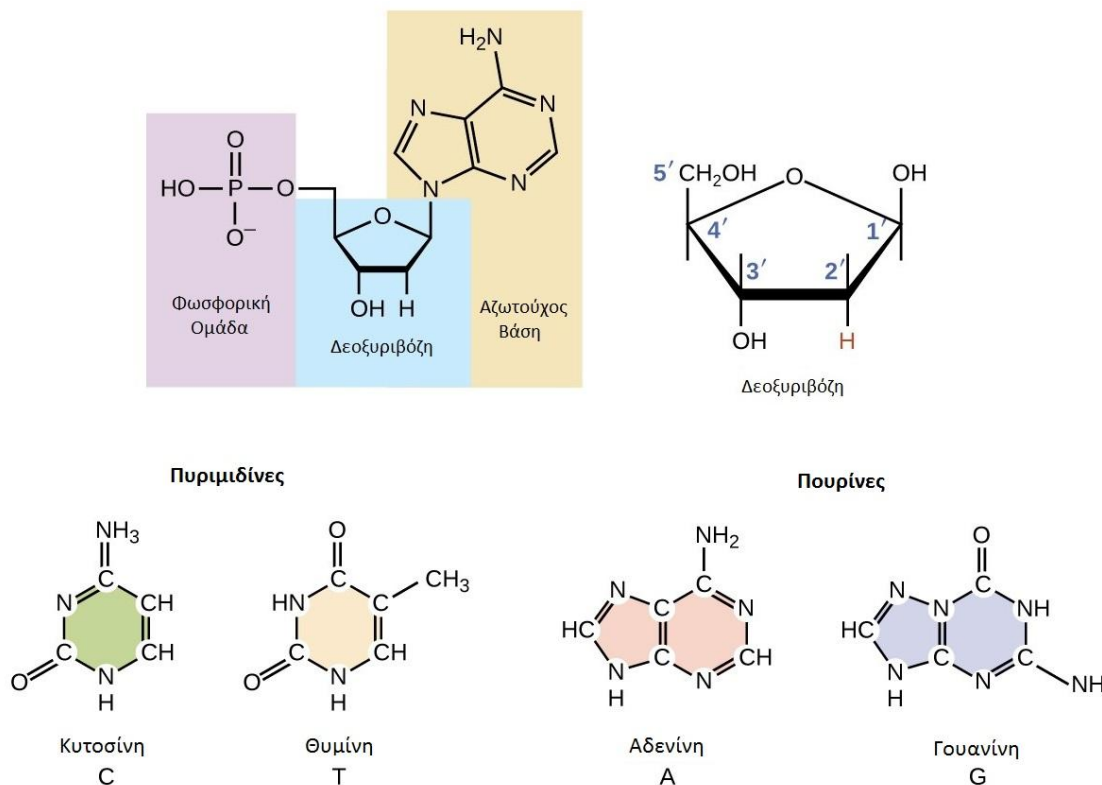
1.6 Το DNA

Όλη η πληροφορία για το σχηματισμό του οργανισμού περιέχεται στο DNA του. Εκεί βρίσκονται οι οδηγίες για την κατασκευή των συστατικών και των οργανιδίων που θα χρησιμοποιήσει στη συνέχεια το κύτταρο και, κατ' επέκταση, ο οργανισμός. Ωστόσο δεν είναι όλο το DNA κωδικοποιημένη πληροφορία. Υπάρχουν τμήματα του DNA που περιέχουν γονίδια και άλλα μεγάλα τμήματα που είναι αποτελούνται από αλληλουχίες βάσεων οι οποίες ως σήμερα δεν φαίνεται να έχουν κάποιο λειτουργικό ρόλο.

1.6.1 Τα βασικά συστατικά του DNA

Αρχικά γίνεται μία αναφορά των συστατικών του DNA, τα οποία φαίνονται και στην **Εικόνα 1.3**.

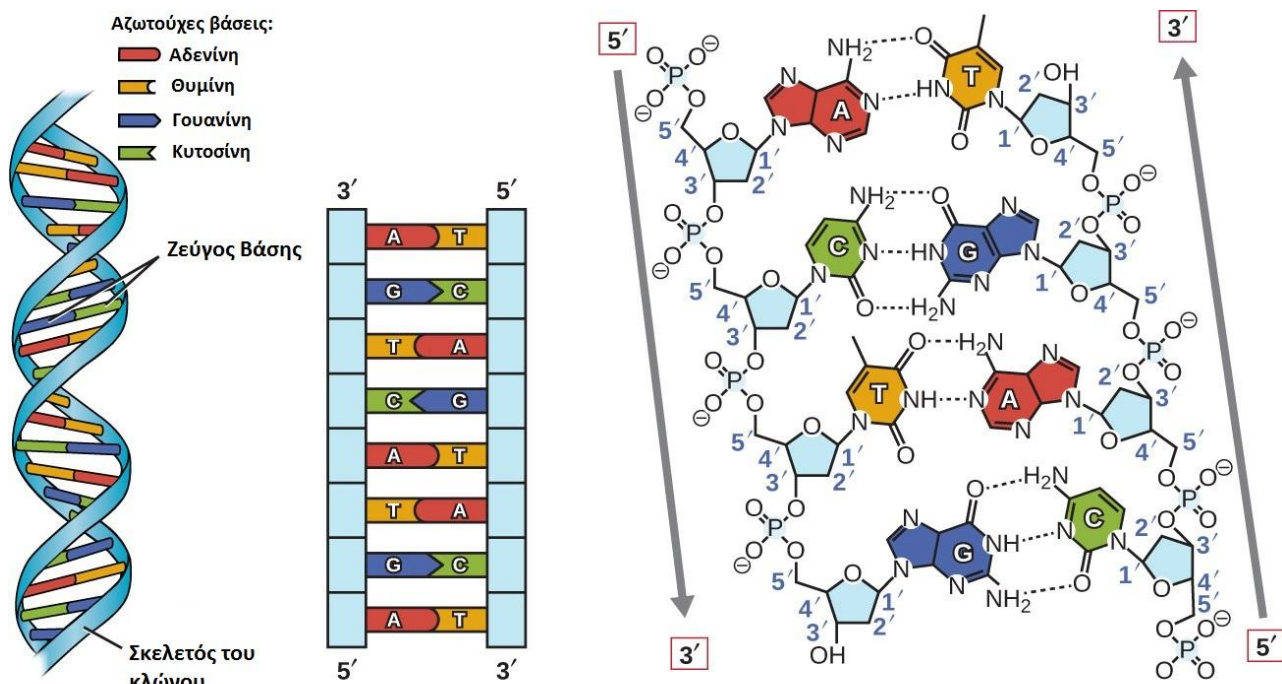
- Φωσφορική ομάδα (Phosphate).
- Δεοξυριβόζη (Deoxyribose). Είναι σάκχαρο με πέντε άνθρακες, δηλαδή μία πεντόζη.
- Αζωτούχες βάσεις (Bases). Είναι το αλφάβητο της κωδικοποιημένης πληροφορίας που περιέχει το DNA. Χωρίζονται χημικά σε δύο ευρύτερες κατηγορίες, τις πουρίνες και τις πυριμιδίνες. Οι πουρίνες είναι η Αδενίνη (Adenine-A) και η Γουανίνη (Guanine-G). Οι πυριμιδίνες είναι η Θυμίνη (Thymine-T) και η Κυτοσίνη (Cytosine-C) για το DNA, ενώ στην περίπτωση του RNA αντί της Θυμίνης απαντάται η Ουρακίλη (Uracil-U).



Εικόνα 1.3: Τα βασικά συστατικά του DNA. Η φωσφορική ομάδα, η δεοξυριβόζη και οι τέσσερις αζωτούχες βάσεις (C, T, A, G) [15]

1.6.2 Η πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα

Το DNA είναι ένα βιολογικό μακρομόριο. Η χημική του ονομασία είναι Δεοξυριβονουκλεϊκό Οξύ. Έχει τη δομή δεξιόστροφης διπλής έλικας. Κάθε κλώνος αυτής της έλικας διαθέτει σκελετό που αποτελείται από διαδοχικά μόρια Φωσφορικής ομάδας ομοιοπολικά συνδεδεμένης με την Δεοξυριβόζη, από την μία πλευρά με τον άνθρακα στη θέση 5' και από την άλλη με τον άνθρακα στη θέση 3' σχηματίζοντας έτσι ένα φωσφοδιεστερικό δεσμό. Έτσι ορίζεται και η κατεύθυνση της αλυσίδας 3'-5'. Στο εσωτερικό της διπλής έλικας οι Αζωτούχες βάσεις είναι συνδεδεμένες με γλυκοζυλικό δεσμό με την Δεοξυριβόζη



Εικόνα 1.4: Η δομή της διπλής έλικας. [i5]

Οι δύο κλώνοι συγκρατούνται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου. Ανάμεσα στην Αδενίνη και τη Θυμίνη σχηματίζονται δύο και ανάμεσα στην Κυτοσίνη και τη Γουανίνη τρεις δεσμοί. Με τους δεσμούς αυτούς σταθεροποιείται η διπλή έλικα. Καθώς σε κάθε αζωτούχο βάση αντιστοιχεί ένα μόνο ορισμένο ζευγάρι στην απέναντι έλικα, αρκεί ο ένας κλώνος για να κατασκευαστεί ο δεύτερος. Αυτή η ιδιότητα των κλώνων ονομάζεται συμπληρωματικότητα.

Χρησιμοποιείται ακόμη ο όρος νουκλεοσίδιο και νουκλεοτίδιο. Νουκλεοσίδιο είναι ένωση ανάμεσα στη Δεοξυριβόζη και την Αζωτούχο βάση. Το νουκλεοσίδιο μπορεί να είναι ένα μονά, διπλά ή τριπλά φωσφορυλιωμένο νουκλεοτίδιο, άρα να είναι συνδεδεμένο με μία, δύο ή τρεις φωσφορικές ομάδες. Όταν είναι μονά φωσφορυλιωμένο τότε λέγεται νουκλεοτίδιο. Από την προηγούμενη περιγραφή της δομής του DNA προκύπτει πως το νουκλεοτίδιο είναι το βασικό συστατικό του κάθε κλώνου.

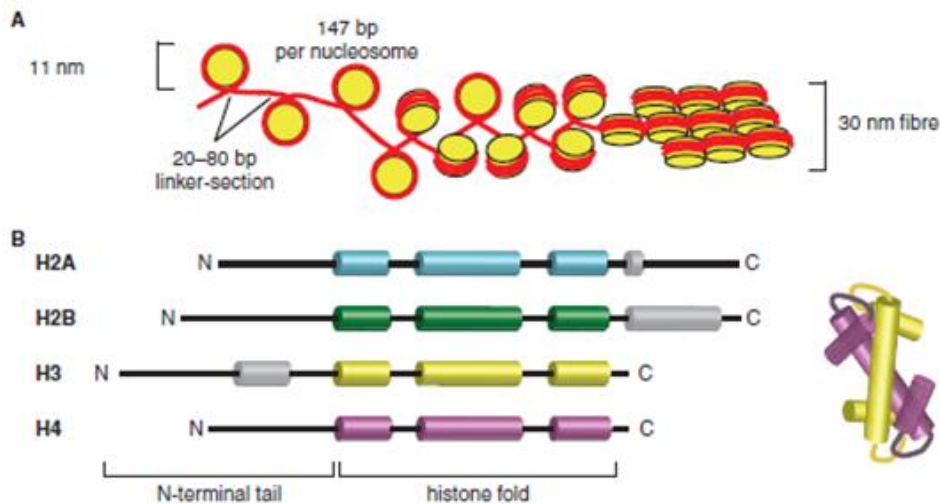
1.6.3 Βαθμοί συμπύκνωσης του DNA

Το DNA του ανθρώπου έχει μήκος περίπου δύο μέτρων. Για απλότητα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μονάδα μέτρησης του μήκους το ζεύγος αζωτούχων βάσεων (base pair - bp). Σε αυτή τη μονάδα μέτρησης το DNA έχει μήκος περίπου 6.4 δισεκατομμύρια ζεύγη βάσεων.[6]

Για να χωρέσει αυτό το τεράστιο σε μήκος μόριο στον πυρήνα διαστάσεων περίπου δέκα μικρομέτρων, αναγκάζεται να τυλιχτεί με πολλούς τρόπους. Το DNA είναι ένα μόριο αρνητικά φορτισμένο, οι πρωτεΐνες γύρω από τις οποίες τυλίγονται έχουν θετικό φορτίο, έτσι η αλληλεπίδραση μεταξύ τους είναι ελκτική, ενισχύοντας την διαδικασία της συμπύκνωσης. Σε πρώτο επίπεδο εμφανίζονται μικρές σαν χάντρες δομές που ονομάζονται νουκλεοσώματα (nucleosome). Το νουκλεόσωμα συνίσταται από ένα σύμπλοκο πυρήνα που αποτελείται από οκτώ ιστόνες (histone), γύρω απ τον οποίο τυλίγονται 147bp του DNA 1.7 φορές. Ανάμεσα σε δύο τέτοιες χάντρες μπορεί να υπάρχουν από 20 ως 80 bp DNA που να περισσεύει. Έτσι, όταν

ολοκληρώνεται το πρώτο επίπεδο πακεταρίσματος υπάρχουν περίπου τριάντα εκατομμύρια νουκλεοσώματα [6, 7].

Σε αυτό το σημείο θα γίνει η πρώτη αναφορά στις οικογένειες των ιστόνων, καθώς σε μία απ αυτές βασίζεται η κύρια μέθοδος που θα αναλυθεί αργότερα. Οι ιστόνες είναι οικογένεια πρωτεϊνών που βοηθούν στο πακετάρισμα του DNA και φαίνονται στην **Εικόνα 1.4**. Ονομάζονται H1, H2A, H2B, H3, H4 και έχουν πάνω από 100 αμινοξέα η κάθε μία. Το οκταμερές σύμπλοκο του νουκλεοσώματος αποτελείται από ζεύγη H3-H4 στον πυρήνα και H2A-H2B εξωτερικά. Η H2AX που μας ενδιαφέρει ανήκει στην οικογένεια της H2A [6].



Εικόνα 1.5: (A) Το ινίδιο χρωματίνης και (B) Οι ιστόνες του οκταμερούς του νουκλεοσώματος. [6]

Τα νουκλεοσώματα διατάσσονται με τη βοήθεια πρωτεϊνών που δεν είναι ιστόνες, και σχηματίζουν ένα νήμα πλάτους περίπου 30nm όπως φαίνεται επίσης στην **Εικόνα 1.5** που λέγεται ινίδιο χρωματίνης. Οι μηχανισμοί περεταιίρω συμπύκνωσης δεν είναι επακριβώς γνωστοί. Πραγματοποιούνται με τη βοήθεια πρωτεϊνών που ονομάζονται κοντενσίνες (condesins). [6]

1.6.4 Χρωμοσώματα

Στο τέλος της φάσης G2, πριν τη μίτωση, το DNA συμπυκνώνεται ακόμη περισσότερο καθώς προετοιμάζεται να χωριστεί στους θυγατρικούς πυρήνες. Σχηματίζει τα χρωμοσώματα, την πιο πυκνή δομή της χρωματίνης. Τα χρωμοσώματα έχουν αυτοσωμικά ζεύγη χρωμοσωμάτων και ένα φυλετικό ζεύγος. Όταν το DNA είναι αντιγραμμένο, τα δύο αντίγραφα συνδέονται σε μία κοινή δομή, το κεντρομερίδιο. Ακόμη στα υπάρχουν τα τελομερή, που είναι εξελικτικά διατηρήσιμες εξαμερείς νουκλεοτιδικές ακολουθίες (TTAGGG) που επαναλαμβάνονται στα άκρα κάθε χρωμοσώματος. [1, 2, 8]

1.6.5 Η μεταβλητότητα της δομής του DNA

Η δομή της διπλής έλικας εξαρτάται από πολλούς παράγοντες πέρα από τη χημική της σύσταση. Εξαρτάται από τη φάση του κυτταρικού κύκλου, την πιθανή έκφραση κάποιων γονιδίων και την αντιγραφή του DNA, από παράγοντες του περιβάλλοντος όπως pH και θερμοκρασία και όχι μόνο.

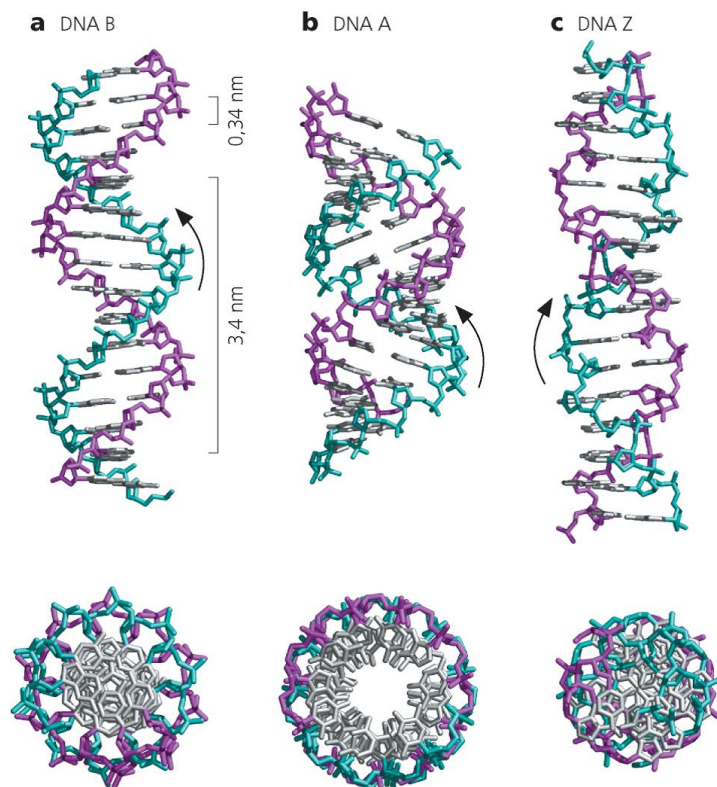
Οι κυτταρικοί μηχανισμοί που σχετίζονται με την επεξεργασία του DNA είναι εξαιρετικά ευαίσθητοι στις αλλαγές που μπορεί να συμβούν σε αυτό το μακρομόριο. Ακόμη και οι πιο

μικρές αλλαγές μπορεί να αποτελέσουν έναυσμα για να ξεκινήσουν πολύπλοκες ενζυματικές διαδικασίες, όπως πρόκειται στην περίπτωση της επιδιόρθωσης που θα σχολιαστεί στο Κεφάλαιο 3.

Στις φάσεις G0 και G1 στον πυρήνα βρίσκεται το DNA του κυττάρου λιγότερο συμπυκνωμένο. Στην φάση το κύτταρο αρχίζει να διπλασιάζει το DNA του, οπότε η διπλή έλικα είναι σε πολλαπλά σημεία ξεπλεγμένη και, ως εκ τούτου, πολλαπλώς εκτεθειμένη σε βλάβες. Η βασική διαφορά της G2 από τις G0 και G1 είναι πως υπάρχει διπλάσιο DNA στον πυρήνα. Τέλος, στη φάση της Μίτωσης, και συγκεκριμένα στη Μετάφραση, το διπλασιασμένο DNA αποκτά την πιο συμπυκνωμένη δομή που μπορεί να έχει σχηματίζοντας τα χρωμοσώματα [1].

Ανάλογα με την έκφραση των γονιδίων μπορεί κατά τόπους η διπλή έλικα να είναι ξεπλεγμένη και έτσι περισσότερο προσβάσιμη. Μάλιστα, η χρωματίνη χωρίζεται σε δύο κατηγορίες με βάση αυτό το κριτήριο. Στην ευχρωματίνη (euchromatin) και την ετεροχρωματίνη (heterochromatin). Η ευχρωματίνη είναι ελαφρότερα πακεταρισμένη από την ετεροχρωματίνη και περιέχει τμήματα DNA που εκφράζονται σε αυτό το κύτταρο. Ο κυτταρολογικός ορισμός της ετεροχρωματίνης είναι 'η ύλη στον πυρήνα της Μεσόφασης που παραμένει συνεπτυγμένος και χρωματίζεται πυκνά μετά την Τελόφαση του κυτταρικού κύκλου [9].

Οι περιβαλλοντικές συνθήκες μπορούν επίσης να προκαλέσουν αλλαγές στην δομή της διπλής έλικας. Στην **Εικόνα 1.6** φαίνονται οι τρεις βασικότερες δομές του DNA. Η πιο συνηθισμένη απεικόνιση είναι η β-έλικα που ονομάζεται Watson-Crick.



Εικόνα 1.6: Η β-, α- και ζ- έλικα του DNA [16]

1.7 Έκφραση γονιδίων

Ένα μεγάλο μέρος του DNA μπορεί να ιδωθεί σαν ένα βιβλίο, ένα εγχειρίδιο κατασκευής πρωτεϊνών που πρόκειται να παραχθούν από το κύτταρο. Οι πρωτεΐνες παίρνουν μέρος με καθοριστικό τρόπο σε όλες τις λειτουργίες του κυττάρου και του οργανισμού. Οι περισσότερες είναι, τρόπον τινά, εργάτες του κυττάρου, μακρομόρια περίπλοκα και άκρως εξειδικευμένα, τέτοια ώστε ελάχιστες αλλαγές μπορούν να καταστρέψουν τη λειτουργικότητά τους ή να τους δώσουν νέες [1]. Η έκφραση των γονιδίων αποτελείται από δύο στάδια, τη Μεταγραφή και τη Μετάφραση.

1.7.1 Μεταγραφή

Δεν μεταφράζονται όλα τα γονίδια σε όλα τα κύτταρα, ούτε με τον ίδιο ρυθμό. Σε κάθε κύτταρο, όμως, εκφράζονται κάποια γονίδια που παράγουν πρωτεΐνες. Η διαδικασία παραγωγής πρωτεϊνών στο κύτταρο, μία διαδικασία που εκτελείται από άλλες πρωτεΐνες, ξεκινά με την 'ανάγνωση' της πληροφορίας στον πυρήνα από τα κατάλληλα ένζυμα. Εκεί κατασκευάζεται ένα μακρομόριο RNA (Ριβονουκλεϊκό Οξύ) του αντίστοιχου γονιδίου που μεταφέρει την πληροφορία έξω από τον πυρήνα, στο κυτταρόπλασμα, πιο συγκεκριμένα στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Για το λόγο αυτό ονομάζεται 'αγγελιαφόρος', mRNA. Η διαδικασία της μεταγραφής περιλαμβάνει το ξετύλιγμα της διπλής έλικας και την παραγωγή της συμπληρωματικής αλυσίδας του γονιδίου, αλλά με ριβόζη αντί για δεοξυριβόζη στον σκελετό και αντί της Θυμίνης την Ουρακίλη απέναντι από κάθε Αδενίνη του γονιδίου [1,2].

1.7.2 Μετάφραση

Όταν το mRNA βρει στο ενδοπλασματικό δίκτυο κάποιο ριβόσωμα, τότε αρχίζει η μετάφρασή του με τη βοήθεια άλλων δύο μορίων RNA, του tRNA (transporter) και του rRNA (ribosomal). Υπάρχει αντιστοιχία ανάμεσα στη γλώσσα του DNA και τη γλώσσα των πρωτεϊνών. Η αλφάβητος της πρώτης είναι οι τέσσερις αζωτούχες βάσεις ενώ της δεύτερης είναι τα είκοσι αμινοξέα. Κάθε τριάδα αζωτούχων βάσεων ονομάζεται, σε αυτό το πλαίσιο, κωδικόνιο και αντιστοιχεί σε ένα αμινοξύ (αν και ένα αμινοξύ μπορεί να έχει πάνω από ένα κωδικόνιο). Ένα ένα τα tRNA φέρνουν τα αμινοξέα τα οποία συνδέονται με πεπτιδικούς δεσμούς φτιάχνοντας μία μεγάλη αλυσίδα. Για αυτό, η πρωτεΐνη ονομάζεται πολυπεπτιδική αλυσίδα. Η πρωτεΐνη που παράγεται μπορεί να μην έχει πάρει την τελική της μορφή, οπότε χρειάζεται να υποστεί περαιτέρω επεξεργασία στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο.[1, 2]

Κεφάλαιο 2. Βλάβες στο DNA από ακτινοβολία

2.1 Συνέπειες των βλαβών στο DNA

Οι βλάβες του DNA έχουν είτε ενδογενή προέλευση, όπως το οξειδωτικό στρες λόγω του μεταβολισμού, είτε εξωγενή, όπως το οξειδωτικό στρες που προκαλεί η έκθεση σε ιοντίζουσες ακτινοβολίες. Η ανεπιτυχής επιδιόρθωσή τους ενδέχεται να οδηγήσει σε μεταλλάξεις, οι οποίες με τη σειρά τους να προκαλέσουν τη δημιουργία νεοπλασίας. Οι μεταλλάξεις επίσης μπορούν να έχουν και ευεργετικές επιπτώσεις στην περίπτωση που το νέο, μεταλλαγμένο γονίδιο αποδειχθεί «βελτιωμένο» σε σχέση με το αρχικό. Για το λόγο αυτόν, άλλωστε, αποτελούν και ακρογωνιαίο λίθο της θεωρίας της εξέλιξης. Ο βαθμός που οι βλάβες DNA θα επηρεάσουν τον οργανισμό (ή το κύτταρο) ποικίλει ανάλογα με το είδος της βλάβης και την απόκριση του οργανισμού (ή του κυττάρου) σε αυτήν.

2.1.1 Μετάλλαξη

Μεταλλάξεις είναι οι αλλαγές που συμβαίνουν στην αλληλουχία αζωτούχων βάσεων του DNA, όταν το κύτταρο αποτυγχάνει να επιδιορθώσει την υφιστάμενη βλάβη. Παραμένουν, έτσι, ως μόνιμες τροποποιήσεις. Όταν εμφανίζονται σε σημαντικές θέσεις των γονιδίων μπορούν να προκαλέσουν δυσλειτουργίες, τον θάνατο του κυττάρου, ως και του οργανισμού. Σε αδιάφορες θέσεις οι μεταλλάξεις δεν έχουν επιπτώσεις. Αν η μετάλλαξη γίνει στα κύτταρα των γαμετών μπορεί να κληροδοτηθεί και στους απογόνους του οργανισμού. [2]

2.1.2 Καρκίνος

Μία από τις σοβαρότερες επιπτώσεις των μεταλλάξεων είναι ο καρκίνος. Καρκίνος προκύπτει όταν επηρεάζεται η πολλαπλασιαστική συμπεριφορά των κυττάρων, συνήθως από συσσώρευση μεταλλάξεων και γενετική αστάθεια. Τα καρκινικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται, διαιρούνται και μεθίστανται[1].

Γενικές ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων:

- Βασίζονται λιγότερο σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα από άλλα κύτταρα όσον αφορά τα σήματα για ανάπτυξη, επιβίωση και διαίρεση.
 - Σκοτώνονται πιο δύσκολα και είναι λιγότερο ευπαθή στην απόπτωση.
 - Συχνά πολλαπλασιάζονται απεριόριστα.
 - Είναι γενετικά ασταθή.
 - Έχουν παθολογική διεσιδυτικότητα.
 - Συχνά εισβάλλουν επιβιώνουν και πολλαπλασιάζονται σε ξένους ιστούς (μετάσταση).
- [1]

2.2 Πηγές βλαβών

Τρεις είναι οι κύριες κατηγορίες προέλευσης βλαβών DNA [10].

- Στρες Αντιγραφής (Replication Stress): Το στρες αντιγραφής εμφανίζεται κατά την Αντιγραφή του DNA, όταν τα ίδια τα ένζυμα που διπλασιάζουν το DNA μπορεί να κάνουν λάθος τοποθέτηση κάποιας αζωτούχου βάσης. Ορίζεται ως η επιβράδυνση ή παρακώλυση της προόδου των διχάλων πολλαπλασιασμού (replication forks). Προκύπτει από πολλές διαφορετικές πηγές που θεωρούνται φραγμοί της αντιγραφής, όπως τελομερή, επαναλήψεις ακολουθιών, αλλοιώσεις του DNA, λανθασμένους

συντονισμός ριβονουκλεοτιδίων, δευτερεύουσες δομές του DNA, υβρίδια DNA-RNA, αδρανή σημεία εκκίνησης της αντιγραφής, συγκρούσεις μεταξύ των συμπλόκων αντιγραφής και μεταγραφής, υπο-ακετυλίωση και συμπύκνωση της χρωματίνης, εύθραυστες περιοχές αρχικής αντιγραφής (early-replicating fragile sites – ERFS), συνήθεις εύθραυστες περιοχές (Common fragile sites – CFS) και τέλος, υπερέκφραση ή ενεργοποίηση ογκογονιδίων.[11]

- **Οξειδωτικό Στρες (Oxidative Stress):** Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί από ελεύθερες ρίζες ή χημικές ουσίες που παράγουν χημικές ρίζες. Σημαντικό ρόλο παίζουν οικογένειες ουσιών όπως οι Δραστικές Μορφές Οξυγόνου/Αζώτου (Reactive Oxygen/Nitrogen Species – ROS/RNS) στις οποίες περιλαμβάνονται πολλές ελεύθερες ρίζες, οι οποίες είναι οι κύριες πηγές των βλαβών λόγω οξείδωσης. Οι πιο γνωστές ουσίες που ανήκουν στις ROS/RNS είναι οι H_2O_2 , $\cdot OH$, O_2^- , 1O_2 ¹. Τα παραπάνω είναι ελεύθερες ρίζες εκτός από το πρώτο, το υπεροξειδίο του υδρογόνου, το οποίο όμως είναι πολύ δραστικό και δημιουργεί πολύ γρήγορα ελεύθερες ρίζες. [10, 12, 13, 14] Το οξειδωτικό στρες έχει δείξει συσχετίσεις με καταστάσεις όπως την σωματική εξάσκηση, μεταλλική τοξικότητα, γήρανση και αρκετές παθολογικές καταστάσεις όπως καρδιαγγειακές ασθένειες, νευρολογικές διαταραχές και καρκίνο [15]. Ακόμη, η χρόνια έκθεση σε ιογενείς λοιμώξεις δείχνει θετική συσχέτιση με την παραγωγή ελεύθερων ριζών[12].
- **Ιονίζουσα Ακτινοβολία (Ionizing Radiation - IR):** Προκαλεί διάφορα είδη βλαβών, πολλές εκ των οποίων είναι αντίστοιχες του οξειδωτικού στρες. Μερικά φάρμακα προκαλούν οξειδωτικό στρες αντίστοιχα με την ακτινοβολία και γι αυτό ονομάζονται ραδιομιμητικά (radiomimetic), όπως η Μπλεομυκίνη ή η Νεοκαρζινοστατίνη. Η επίδραση της ιονίζουσας ακτινοβολίας στο DNA αναλύεται ακολούθως. [13]

Οι δύο τελευταίες αυτές κατηγορίες έχουν μεγάλο βαθμό αλληλοεπικάλυψης, διότι τα μόρια που παίρνουν μέρος στο οξειδωτικό στρες μπορούν να προκύψουν και από την ιονίζουσα ακτινοβολία.

2.3 Αλληλεπίδραση ιονίζουσας ακτινοβολίας και βιολογικής ύλης

Η κατανόηση της επίδρασης των ακτινοβολιών στον οργανισμό πρέπει να ξεκινήσει μελετώντας τον τρόπο που αλληλεπιδρά με την ύλη.

2.3.1 Γενικά για την ακτινοβολία

Οι βασικές υποκατηγορίες της ακτινοβολίας είναι τρεις, η ακτινοβολία-α (πυρήνες ηλίου), η ακτινοβολία-β (ηλεκτρόνια) και τέλος η ακτινοβολία-γ (φωτόνια).

Ένα πολύ χρήσιμο μέγεθος όταν αναφερόμαστε σε ακτινοβολία είναι η δόση (dose – D). Η δόση της ακτινοβολίας χωρίζεται σε 3 υποκατηγορίες:

- **Απορροφημένη δόση:** Η συγκέντρωση της ενέργειας που αποτίθεται στον ιστό ως αποτέλεσμα της έκθεσης σε ιονίζουσα ακτινοβολία. Η μονάδα μέτρησής της είναι τα Gray (Gy=J/kg).

¹ Μονήρες οξυγόνο, διεγερμένη μορφή του μορίου του οξυγόνου που αντιδράει με οργανικές ενώσεις. Χρησιμοποιείται στην φωτοδυναμική θεραπεία

- Ισοδύναμη δόση: Η ποσότητα αυτή λαμβάνει υπόψη τις βλαβερές ιδιότητες διαφορετικών ειδών ακτινοβολίας. Έχει την ίδια τιμή με την απορροφημένη δόση αλλά η μονάδα μέτρησης είναι τα Sievert (Sv). Ενώ η απορροφημένη δόση δίνει την τιμή της ακτινοβολίας που απορροφήθηκε από τον ιστό, η ισοδύναμη δόση αναφέρεται στις επιπτώσεις της στον ιστό. Ανάλογα με τον τύπο της ακτινοβολίας η απορροφημένη δόση πολλαπλασιάζεται με ένα συντελεστή ποιότητας(Q) και δίνει την ισοδύναμη δόση. Για παράδειγμα, τα φωτόνια έχουν $Q=1$, τα πρωτόνια $Q=2$ και τα σωματίια α $Q=20$. [13]
- Ενεργός δόση: Παίρνει τιμή που υπολογίζεται σε Sv λαμβάνοντας υπόψη τρεις παράγοντες, την απορροφημένη δόση σε όλα τα όργανα του σώματος, τα σχετικά επίπεδα βλάβης από την ακτινοβολία και την ευαισθησία κάθε οργάνου στην ακτινοβολία. [12, 16]

Άλλο ένα μέγεθος που χρησιμοποιείται είναι η γραμμική εναπόθεση ενέργειας (Linear Energy Transfer – LET). Ορίζεται ως η ενέργεια που μεταφέρεται από το ιονίζον σωματίδιο στην ύλη που αυτό διαπερνά λόγω των ηλεκτρονιακών αλληλεπιδράσεων. Ισούται με την ενέργεια που χάνει το φορτισμένο σωματίδιο στην απόσταση που διένυσε ($L=dE/dl$). Μονάδα μέτρησης είναι keV/μm. Κατηγοριοποιούμε, επομένως, τις ακτινοβολίες, ως έχοντες μεγάλη ή μικρή LET. Αν και η LET αναφέρεται μόνο σε φορτισμένα σωματίδια, μερικοί ερευνητές την χρησιμοποιούν και για τη γ-ακτινοβολία, αναφερόμενοι στην LET των ηλεκτρονίων που παράγει η γ-ακτινοβολία. [16, 17]

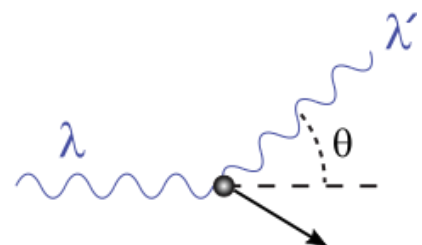
Υπάρχουν δύο τρόποι επίδρασης της ιοντίζουσας ακτινοβολίας στο DNA, ο άμεσος και ο έμμεσος. Άμεσα η ακτινοβολία διεγείρει ή ιοντίζει τα μακρομόρια δημιουργώντας ελεύθερες ρίζες. Έμμεσα, επιδρά στα μακρομόρια, κυρίως μέσω της ραδιόλυσης του νερού που τα περικλείουν, ή γενικότερα δημιουργώντας ουσίες που προκαλούν επακόλουθα τη βλάβη των βιολογικών μακρομορίων. [17]

Η επιβλαβής δράση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας στη βιολογική ύλη διακρίνεται σύμφωνα με την ύπαρξη ή όχι κάποιου κατωφλίου στη δόση. Τα φαινόμενα που διαθέτουν κατώφλι λέγονται αιτιοκρατικά/προσδιοριστικά/ντετερμινιστικά(deterministic). Σε αυτά υπακούει ο κυτταρικός θάνατος, ο οποίος μπορεί να διατυπωθεί και με σχέση αναλογίας ως προς τη δόση. Τα φαινόμενα που δε διαθέτουν κατώφλι ασφαλείας στη δόση λέγονται στοχαστικά (stochastic). Συνήθως σχετίζονται με μακροχρόνιες, μικρού επιπέδου εκθέσεις σε ακτινοβολία, που μπορεί να έχουν σε βάθος χρόνου κλινικές επιπτώσεις. Ένα παράδειγμα αποτελεί η πιθανότητα μετάλλαξης, η οποία μένει υπαρκτή, ακόμη και σε πολύ χαμηλές δόσεις. [18]

2.3.2 Φαινόμενα αλληλεπίδρασης φωτονίων και ύλης

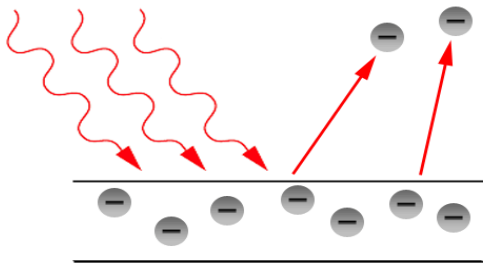
Τα φωτόνια μπορούν να αλληλεπιδράσουν με την ύλη με τρεις τρόπους:

- Σκέδαση Compton: Φωτόνιο με αρχικό μήκος κύματος λ απορροφάται από το υλικό και σκεδάζεται με μειωμένη ενέργεια και μήκος κύματος λ' . Το νέο φωτόνιο διαδίδεται σε διαφορετική γωνία από το πρώτο και με διαφορετική ενέργεια. [18]

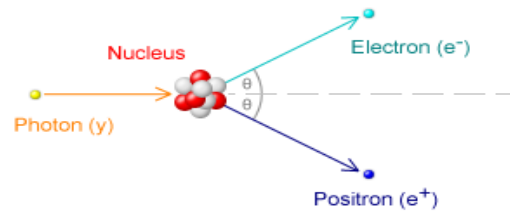


Εικόνα 2.1: Σκέδαση Compton [13]

- Φωτοηλεκτρικό φαινόμενο: Ένα φωτόνιο αλληλεπιδρά με ένα ηλεκτρόνιο που βρίσκεται σε μία ατομική στοιβάδα και του μεταφέρει όλη την ενέργειά του. Το ηλεκτρόνιο ιονίζεται και εκβάλλεται από το άτομο με κινητική ενέργεια ίση με τη διαφορά της ενέργειας του αρχικού φωτονίου και της ενέργειας ιονισμού του.[18]
- Δίδυμη γένεση: Ένα φωτόνιο με ενέργεια μεγαλύτερη από 1.02MeV μπορεί μετά από την αλληλεπίδραση με κάποιον πυρήνα να μετατραπεί σε ύλη παράγοντας ένα ηλεκτρόνιο και ένα ποζιτρόνιο.[2.7]

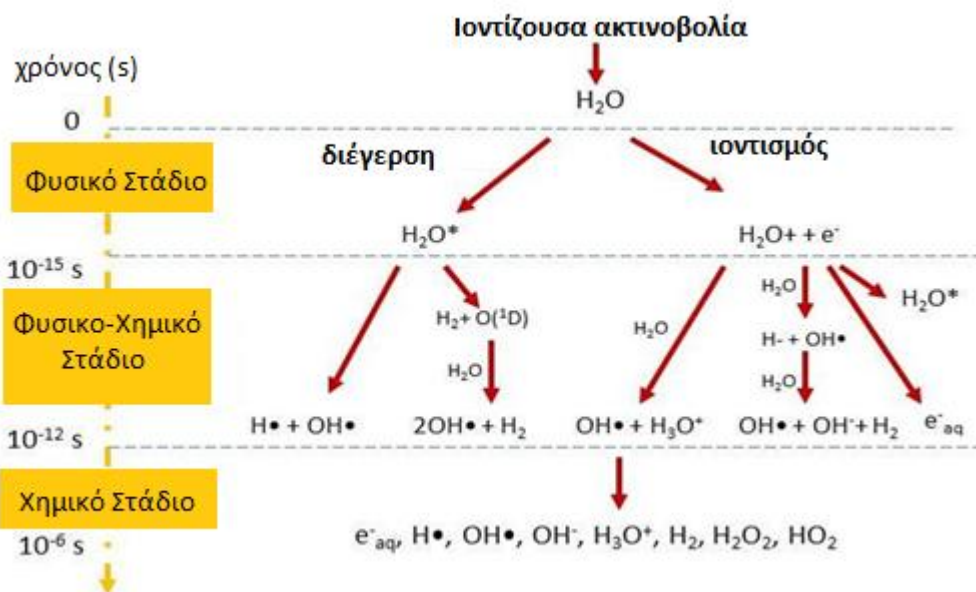


Εικόνα 2.2: Φωτοηλεκτρικό φαινόμενο. [i3]



Εικόνα 2.3: Δίδυμη γένεση. [i3]

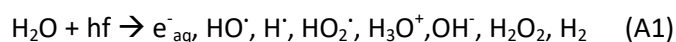
2.4 Η ραδιόλυση του νερού



Εικόνα 2.4: Τα στάδια της ραδιόλυσης [15].

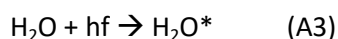
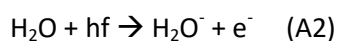
Η ραδιόλυση του νερού είναι η διάσπαση των δεσμών του μορίου του λόγω ιονίζουσας ακτινοβολίας. Συνήθως αυτή η ακτινοβολία προέρχεται από τη διάσπαση πυρήνων, επιταχυνόμενα σωματίδια ή από ακτίνες Χ.

Μία γενική εικόνα της ραδιόλυσης δίνεται στην αντίδραση A1.

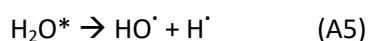
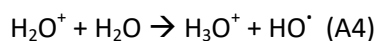


Τα προϊόντα παράγονται σε διαφορετικές σχετικές συγκεντρώσεις και έχουν διαφορετικές βιολογικές επιπτώσεις. Τα στάδια της διαδικασίας είναι τρία:

- Φυσικό στάδιο: Συμβαίνει μέχρι περίπου 10^{-15} δευτερόλεπτα μετά από τον ιοντισμό του νερού. Προκαλεί το σχηματισμό του H_2O^- και e^- και το διεγερμένο H_2O^* .



- Φυσικο-χημικό στάδιο: Συμβαίνει περίπου 10^{-15} ως 10^{-12} περίπου δευτερόλεπτα μετά από τον ιοντισμό. Οι βασικές στου αντιδράσεις είναι οι εξής:

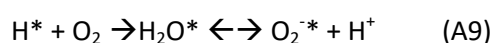
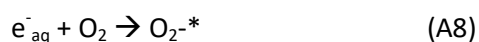


- Χημικό στάδιο: Συμβαίνει περίπου 10^{-12} με 10^{-6} δευτερόλεπτα μετά από τον ιοντισμό του νερού. Εκεί παράγονται τα υπόλοιπα προϊόντα της εξίσωσης. [15]

Για ιστούς κορεσμένους σε NO_2 γίνεται ακόμη η αντίδραση A7, οπότε τα ηλεκτρόνια καταναλώνονται παράγοντας υδροξύλιο.



Ακόμη, για οξυγονωμένους ιστούς γίνονται οι αντιδράσεις A10, A11, που καταναλώνουν πολύ γρήγορα ηλεκτρόνια και οξυγόνο παράγοντας το αβλαβές για το DNA O_2^{-*} και πρωτόνια.



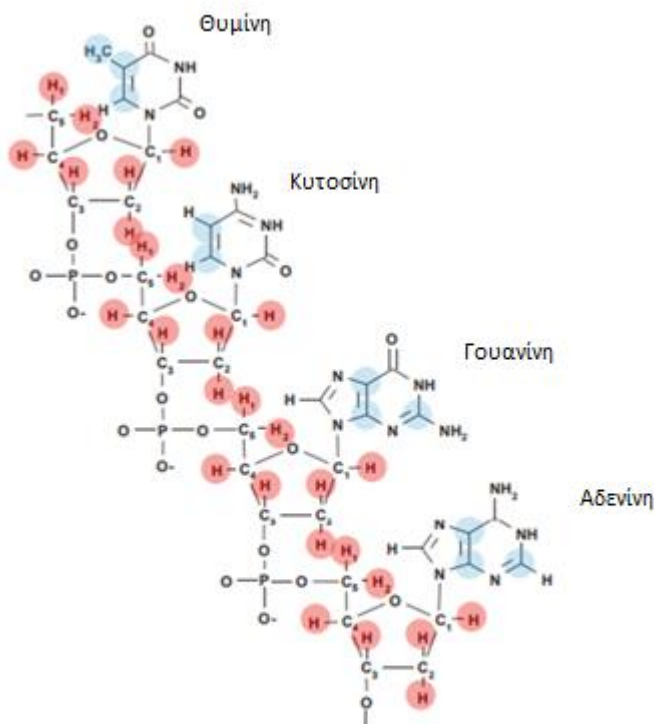
Κάποιες ουσίες παράγονται σε τόσο μικρές ποσότητες που μπορούν να αγνοηθούν. Εκείνες που τελικά μένουν και προκαλούν βλάβες στο DNA είναι το H^* και το HO^\cdot . Το H_2O_2 δεν είναι ελεύθερη ρίζα αλλά μέσω αντιδράσεων τύπου Fenton παράγει HO^\cdot . Τα βασικά χημικά μονοπάτια που προκαλούν την βλάβη στο DNA χοντρικά γράφονται:



Οι ελεύθερες ρίζες στη συνέχεια αντιδρούν δημιουργούνται πολλές διαφορετικές βλάβες. Το κυριότερο απ' τα δύο είναι το HO[•] και έχει μελετηθεί εκτενώς ως προς την επίδρασή του με την βιολογική ύλη. [19, 20]

2.5 Σημεία βλάβης

Το μόριο του DNA αποτελείται από τεράστιο αριθμό ατόμων, τα περισσότερα εκ των οποίων θα μπορούσαν να αποτελέσουν στόχο του παράγοντα που προκαλεί τη βλάβη. Δεν είναι όλα τα σημεία το ίδιο επίφοβα, ούτε έχουν τις ίδιες βιολογικές συνέπειες, ωστόσο πρέπει να ληφθούν υπόψη για να σχηματιστεί πλήρης εικόνα. Μπορεί κανείς να ανατρέξει στην **Εικόνα 2.6** για να δει τις πιθανές θέσεις επίδρασης του HO[•] στο DNA.



Εικόνα 2.6: Σημεία πιθανής βλάβης του DNA από το HO[•][17]

2.5.1 Άμεσες και έμμεσες βλάβες

Ανάλογα με το σημείο εφαρμογής της δράσης (φαρμάκου, σωματιδιακής ή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας) η βλάβη μπορεί να χαρακτηριστεί ως άμεση ή έμμεση. Οι άμεσες βλάβες δρουν κατευθείαν πάνω στο μόριο παράγοντας την αλλοίωση, οι έμμεσες δρουν στο περιβάλλον του μορίου προκαλώντας ένα μονοπάτι που θα προκαλέσει τελικά την αλλοίωση. Η πιο συνηθισμένη περίπτωση έμμεσων βλαβών είναι εκείνες που προέρχονται από τη ραδιόλυση του νερού. Η ακτινοβολία διεγείρει τα μόρια του νερού και παράγει τα αντιδραστήρια που βλάπτουν το DNA. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω παράγει κυρίως το HO[•]. Η πιο χαρακτηριστική άμεση βλάβη είναι η οξείδωση με αποβολή ενός ηλεκτρονίου, που μπορεί να προκληθεί είτε από ουσίες είτε από την ίδια την ακτινοβολία. Οι περισσότερες βλάβες στο DNA είναι αποτέλεσμα της έμμεσης δράσης της ακτινοβολίας [18]. Μάλιστα υπάρχει ένα εύρος βλαβών που προκαλείται τόσο από την οξείδωση ενός ηλεκτρονίου όσο και από το HO[•], ωστόσο θα σχολιαστεί εκτενέστερα στη συνέχεια [14]. Με κριτήριο το LET της ακτινοβολίας μπορεί να χαρακτηριστεί ως πυκνά ιοντίζουσα (υψηλές τιμές LET) ή αραιά ιοντίζουσα (χαμηλές τιμές LET).

2.5.2 Διαφορές ενδογενών και εξωγενών βλαβών

Οι κύριες ενδογενείς πηγές είναι το HO[•] και οξειδωτές ενός ηλεκτρονίου. Αδιάφορα σχετικά είναι το O₂^{•-}, το οποίο δεν βλάπτει το κύτταρο, και το H₂O₂, το οποίο μπορεί να γίνει βλαβερό μέσω άλλων αντιδράσεων παράγοντας HO[•], αλλά ο οργανισμός το διαχειρίζεται με τα υπεροξειδωμάτα των κυττάρων. Άλλη μία σχετική ενδογενής πηγή είναι το CO₃^{•-} που είναι

οξειδωτής ενός ηλεκτρονίου. Τέλος, το ONOO^- παράγεται από αλληλεπίδραση $^*\text{NO}$ και O_2^- κατά τη φλεγμονή στους ιστούς [14].

Από τις εξωγενείς πηγές συνηθέστερη είναι οι ακτινοβολίες (-α,-β ή -γ) που προκαλούν είτε άμεσες είτε έμμεσες βλάβες. Μάλιστα, πολλές από τις χημικές επιδράσεις στο κύτταρο από την iontίζουσα ακτινοβολία σχετίζονται με τη γεωμετρία της αρχικής εναπόθεσης ενέργειας της ακτινοβολίας. Ειδικά στην περίπτωση σωματιδιακής ακτινοβολίας, η δράση της τείνει να συγκεντρώνεται τοπικά στην τροχιά των φορτισμένων σωματιδίων. Τα φωτόνια μπορούν να εναποθέσουν όλη τους την ενέργεια στον αρχικό στόχο ή να σκεδαστούν κατ' επανάληψη προκαλώντας βλάβες τοπικά, ανάλογα με την LET τους. Ακτινοβολία υψηλής LET γενικά προκαλεί πιο τοπικά συγκεντρωμένες βλάβες επιβαρύνοντας σημαντικά το κύτταρο.

Παρατηρεί κανείς πως η πιο σημαντική διαφορά ανάμεσα στις ενδογενείς και τις εξωγενείς βλάβες είναι η πολυπλοκότητά τους. Οι ενδογενείς έχουν πυκνότητα εμφάνισης που είναι αντιμετωπίσιμη εύκολα από τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης. Πολλές από τις εξωγενείς, όμως, μπορεί να προκαλέσουν τόσο πυκνές βλάβες που τα ένζυμα επιδιόρθωσης να προσδένονται λιγότερο και εκτελούν πιο αργά ή ακόμη και καθόλου τη λειτουργία τους.[14, 18]

2.5.3 Μοντελοποίηση των βλαβών

Αξίζει να αναφερθούν ορισμένες πληροφορίες σχετικά με το ρόλο της μοριακής μοντελοποίησης στην κατανόηση των μηχανισμών των βλαβών DNA, καθώς τέτοιες μελέτες δίνουν καλά αποτελέσματα, κάποια εκ των οποίων παρατίθενται στα επόμενα.

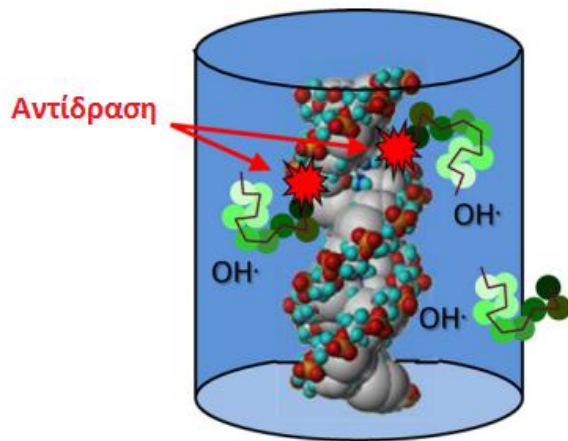
Πολλές πειραματικές μέθοδοι μέτρησης βλαβών χρησιμοποιούν πολλαπλές προσεγγίσεις. Το ίδιο συμβαίνει και στην μοντελοποίηση. Πολλές είναι οι δυσκολίες, οφείλονται κυρίως στην υψηλή ελαστικότητα του DNA και την εντόνως ανομοιογενή ηλεκτροστατική κατανομή του. Οι περισσότερες προσεγγίσεις, αν και όχι όλες, έχουν γεωμετρική φύση, θεωρώντας τα μόρια ως σφαίρες που αλληλεπιδρούν όταν έρθουν σε επαφή.[21]

Μία από τις μεταβλητές που χρησιμοποιούνται κατά κόρον για τη μέτρηση των βλαβών HO^* είναι η SASA (Solvent Accessible Surface Area) που δείχνει την προσβασιμότητα που έχει το HO^* στη θέση που μπορεί να προκαλέσει βλάβη. Εξαρτάται από το πλάτος της ελάσσονος έλικας (minor groove width – mgw) το οποίο είναι η μέση απόσταση ανάμεσα στο κέντρο του $\text{H5}'2$ του N νουκλεοτιδίου και το κέντρο του $\text{H4}'$ του N+3 νουκλεοτιδίου. Η SASA παίρνει για τις πουρίνες τιμές περίπου 0.13nm^2 και για τις πυριμιδίνες $0,16\text{nm}^2$. Το HO^* θεωρείται σφαίρα που κινείται συνήθως με τυχαία βήματα μέχρι να αντιδράσει με κάποια ουσία. Η πιθανότητα να αντιδράσει η ρίζα HO^* με την κάθε θέση υπολογίζεται με αλγορίθμους τύπου Monte Carlo.[17, 21]

Πολλά μοντέλα χρησιμοποιούν Κβαντική Μηχανική για το κέντρο δράσης και τα σωματίδια κοντά στο κέντρο δράσης και Μοριακή Μηχανική για το υπόλοιπο σύστημα (QM/MM). Αυτό το υβριδικό μοντέλο δίνει πολύ καλά αποτελέσματα, που θα αναφερθούν σε επόμενο κεφάλαιο.[21]

Έχουν γίνει ακόμη υπολογισμοί με την θεωρία DFT (Density Functional Theory) που υπολογίζει την Ενέργεια Διάσπασης Δεσμού (Bond Dissociative Energy – BDE) σε διαφορετικές θέσεις της βάσης και του σακχάρου, βρίσκοντας τη σχετική ευπάθεια κάθε θέσης σε πιθανή βλάβη.[21]

Ένας ακόμη αλγόριθμος που έχει χρησιμοποιηθεί είναι ο RADACK (RADical attACK). Είναι όπως τα περισσότερα μοντέλα σε αυτού του τύπου την μοντελοποίηση, βασισμένο σε αλγόριθμους Monte Carlo. Υπολογίζει την πιθανότητα βλάβης για κάθε νουκλεοτίδιο του DNA, είτε υπάρχουν πρωτεΐνες συνδεδεμένες σε εκείνη την περιοχή είτε όχι. Απαιτείται γνώση της τρισδιάστατης δομής του μορίου καθώς και των συμπλόκων του. Το βασικό ελάττωμα του αλγορίθμου είναι πως δε λαμβάνει υπόψη την εσωτερική δυναμική του μορίου στόχου. [17]



Εικόνα 2.7: Σχήμα του μοντέλου RADACK [17]

Στην **Εικόνα 2.7** παριστάνεται η λειτουργία του μοντέλου RADACK. Το DNA προσομοιώνεται εντός όγκου νερού μέσα στον οποίο παράγονται τυχαία τα HO^\bullet . Η τρισδιάστατη δομή του DNA λαμβάνεται από βάσεις δεδομένων συνήθως ή χτίζεται με μοριακή μοντελοποίηση μέσω του λογισμικού SYBYL. Οι ρίζες HO^\bullet αναπαρίστανται ως σφαίρες ακτίνας 0,12nm. Με αυτό το μοντέλο λαμβάνονται ικανοποιητικά θεωρητικά αποτελέσματα, συγκρινόμενα με τα πειραματικά.[17]

Για να μην υποτιμηθεί η σημασία της δυναμικής κατάστασης του μορίου αξίζει να αναφερθεί πως υπάρχουν μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκε η Μοριακή Δυναμική Car-Parinello[22, 23], που υπογραμμίζουν την αντίθεση ανάμεσα στις στατικές και τις δυναμικές περιπτώσεις, δίνοντας διαφορετικά αποτελέσματα από τα στατικά μοντέλα. Για παράδειγμα, δίνουν για την απαγωγή Υδρογόνου στο κενό χρονικές τιμές αντίδρασης περίπου 0,07ps, ενώ σε διάλυμα νερού είναι περίπου 0,12ps. Η απαγωγή Υδρογόνου είναι η αντίδραση στην οποία το πρωτόνιο που βρίσκεται εκτεθειμένο μετά την διέγερση ή τον ιονισμό του Υδρογόνου απάγεται από κάποια ελεύθερη ρίζα με τρόπο αντίστοιχο της αντίδρασης. [17, 21]

2.5.4 Ομοιότητες HO^\bullet και οξειδωτών ενός ηλεκτρονίου

Τα δύο βασικά μονοπάτια οξείδωσης του κυτταρικού DNA είναι μέσω του HO^\bullet και των οξειδωτών ενός ηλεκτρονίου.

Το HO^\bullet μπορεί να προκαλέσει απαγωγή υδρογόνου που αφήνει πίσω μία δραστική ρίζα. Έτσι μπορεί να ξεκινήσει αλυσιδωτές αντιδράσεις. Μπορεί επίσης να προστεθεί σε αζωτούχο βάση σε αιθυλική θέση [B-OH] $^\bullet$ και να πάθει στη συνέχεια περεταίρω κατάτμηση, αφήνοντας πίσω αβασικές περιοχές και θραύσεις στην αλυσίδα.

Οι οξειδωτές ενός ηλεκτρονίου έχουν παρόμοια συμπεριφορά. Ο ιοντισμός στο DNA μπορεί να εξελιχθεί σε αποπρωτονίωση ή υδάτωση. Η αποπρωτονίωση μοιάζει με την απαγωγή υδρογόνου, αφού πρόκειται για την απαγωγή του πρωτονίου (H^+) που μένει πίσω μετά τον ιοντισμό. Η υδάτωση είναι η προσθήκη του HO^\bullet σε κάποια αιθυλική θέση. Οι ομοιότητες αυτές δείχνουν πως υπάρχει ένα εύρος βλαβών που μπορεί να προκληθούν είτε με τον ένα είτε με τον άλλο τρόπο. [14]

2.5.5 Προστασία από προσδεδεμένα μόρια

Το περιβάλλον του DNA είναι πολύ πυκνό, γεμάτο από μικρά και μεγάλα μόρια, πρωτεΐνες, ένζυμα και άλλα συστατικά εκτός του DNA. Έχει αναφερθεί ήδη πόσο σημαντικές είναι οι πρωτεΐνες για τη συμπύκνωση του DNA. Δεν είναι όμως μόνο λειτουργικός ο ρόλος των πρωτεϊνών στον πυρήνα. Υπάρχουν μικρά μόρια τα οποία προσδέονται σε περιοχές κοντά στο DNA και το προστατεύουν από τις βλάβες. Αρχικά, μπορούν να αντιδράσουν με τα μόρια HO[•], ώστε τα τελευταία να μην μπορούν να προσεγγίσουν το DNA. Επίσης, μερικά θετικά φορτισμένα μόρια δένονται στο αρνητικά φορτισμένο DNA και παθαίνουν αυτά τη βλάβη αντί του DNA. Ορισμένες πρωτεΐνες, οι φυσικές πολυαμίνες, είναι καθολικοί προστάτες έναντι της ακτινοβολίας και δένονται λόγω φορτίου στο DNA.[17]

2.6 Μεμονωμένες βλάβες DNA

Λαμβάνοντας υπόψη τα συστατικά του DNA (φωσφορική ομάδα, δεοξυριβόζη, αζωτούχο βάση), τους παράγοντες που μπορεί να προκαλέσουν βλάβη (HO[•], ιοντισμός, φάρμακα, ...) και τις θέσεις στις οποίες μπορεί να προκληθεί η βλάβη, μπορεί να φτιαχτεί μία μεγάλη λίστα με τις μεμονωμένες αλλοιώσεις που εμφανίζονται στο DNA. Η αναλυτική αναφορά των βλαβών που είναι δυνατόν να εμφανιστούν ξεφεύγει από τους σκοπούς του παρόντος κειμένου, εξάλλου στη μεγάλη πλειονότητά τους εμφανίζονται σπανίως ή και ποτέ. Αναφέρονται εδώ οι πιο συχνές. Η σχετική ευπάθεια των περιοχών της βλάβης βρίσκεται πειραματικά ή μέσω προσομοίωσης και σχολιάζεται στην αξιολόγηση των βλαβών.

Οξειδωμένες βάσεις

Πρόκειται για αλλοιωμένες μορφές των αζωτούχων βάσεων. Στις **Εικόνες 2.8A-2.8D** φαίνεται πώς από οξείδωση ενός ηλεκτρονίου και τη δράση του HO[•] προκύπτουν ορισμένες βλάβες στη Γουανίνη (dG²), τη Θυμίνη (dT), την Κυτοσίνη (dC) και την Αδενίνη (dA). Κάποιες υποβαθμισμένες μορφές που παρατηρούνται για τη Γουανίνη είναι οι 8-oxodG, 8-oxodGuo, 8-oxodGua, FapyGua και FapydG Για την Θυμίνη είναι οι dTGly, Tg, HmdU, 5-FodU, 5'R-HydT και 5'S-HydT, ενώ για την Κυτοσίνη είναι οι 5-OHdC, dUGly, ImidC, 5'R-HydU και 5'S-HydU και για την Αδενίνη η 8-oxodA. [14, 17, 24]

Άλλες οξειδωτικές βλάβες

Εκτός από τις αζωτούχες βάσεις, οξείδωση μπορεί να υποστεί και η δεοξυριβόζη. Αυτές οι βλάβες αποτελούν περί το 20% των βλαβών που παθαίνει το DNA από οξειδωτικούς παράγοντες. Τέτοιες οξειδώσεις μπορούν να αποτελέσουν το πρώτο βήμα στα περισσότερα μονοπάτια που οδηγούν σε βλάβες, όπως αυτές που παρουσιάζονται στη συνέχεια.

Στις οξειδωτικές βλάβες περιλαμβάνονται ακόμη η dL και η C4-AP, οι οποίες προκύπτουν μετά από οξείδωση του άνθρακα C1' και C4' της ριβόζης αντίστοιχα. Η dL παρουσιάζεται στην **Εικόνα 2.9** και έχει επιπλέον ενδιαφέρουσες ιδιότητες που θα αναφερθούν στη συνέχεια.[25]

² Το γράμμα d μπροστά από τις αζωτούχες βάσεις δηλώνει ότι είναι ενωμένες με δεοξυριβόζη.

Κυκλοπυρίνες

Από τις κυριότερες βλάβες του HO' είναι οι τέσσερις δομές των κυκλοπυρινών: 5'R-cdG, 5'S-cdG, 5'R-cdA, 5'S-cdA. Εμφανίζονται με το σχηματισμό ομοιοπολικού δεσμού ανάμεσα στον άνθρακα C8 της πουρίνης και τον άνθρακα C5 της δεοξυριβόζης (Εικόνα 2.10). Αυτές συσσωρεύονται όσο περνάει ο καιρός και είναι μία από τις συνέπειες της γήρανσης. Συσσωρεύονται με διαφορετική ταχύτητα σε κάθε ιστό. Ταχύτερα συσσωρεύονται στο ήπαρ και λιγότερο στον εγκέφαλο.[24]

Αβασικές περιοχές

Αν ο δεσμός ανάμεσα στη δεοξυριβόζη και την αζωτούχο βάση διαταραχτεί μπορεί είτε η τελευταία να αποδεσμευτεί άμεσα από το νουκλεοτίδιο και να μείνει η περιοχή χωρίς βάση, είτε να περάσει από ένα ενδιάμεσο χημικά ασταθές στάδιο πριν τελικώς αποδεσμευτεί. Αυτές οι περιοχές λέγονται απουρινικές/απυριμιδινικές ή γενικότερα αβασικές περιοχές.

Μονόκλωνες θραύσεις (Single Strand Breaks – SSB)

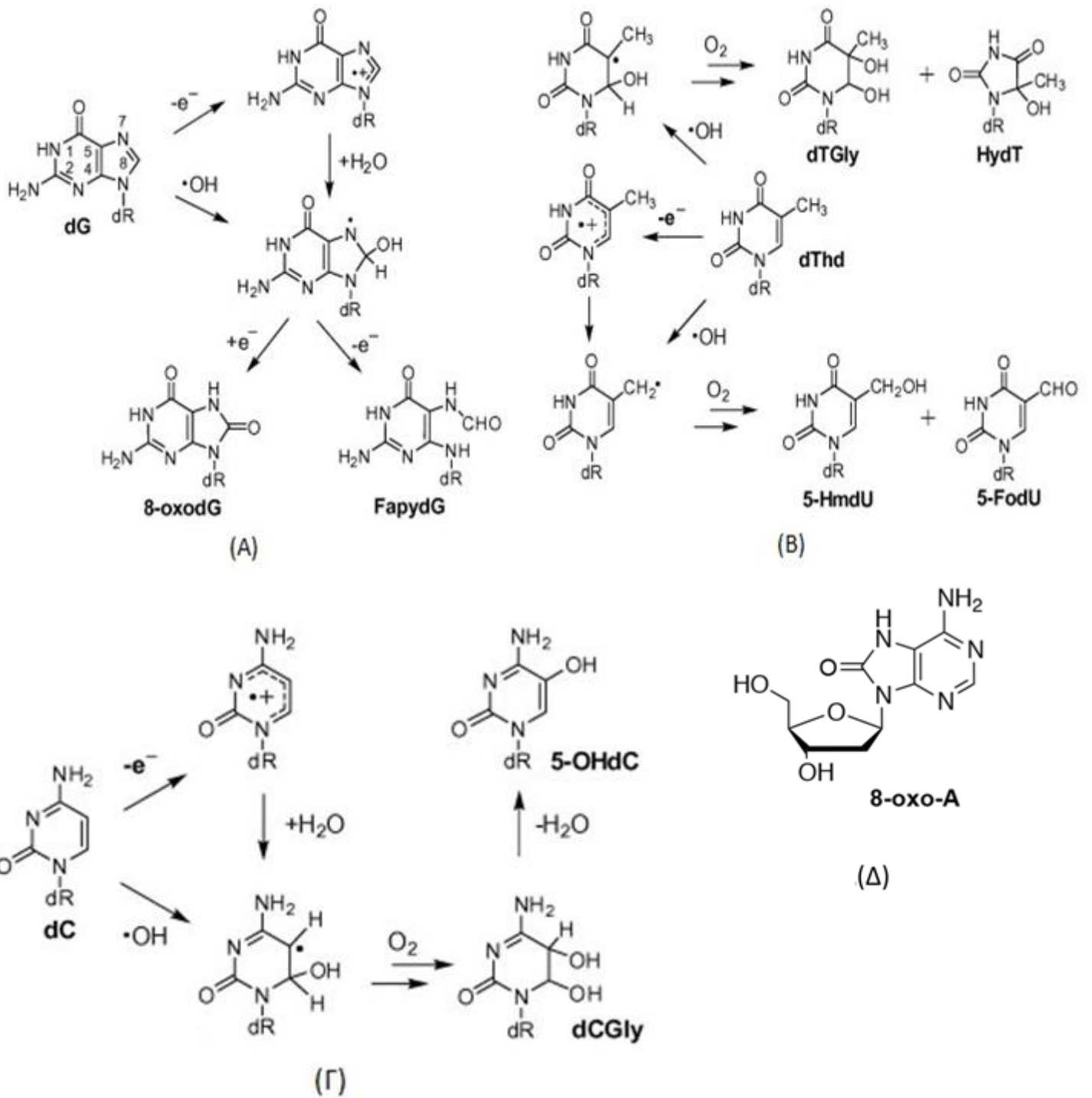
Στην περίπτωση που η βλάβη συμβεί σε άνθρακα της δεοξυριβόζης είναι πιθανό να σπάσει ο δεσμός ανάμεσα σε διαδοχικά νουκλεοτίδια και να γίνει έτσι θραύση στον κλώνο του DNA. Προκύπτουν συνήθως από απαγωγή Υδρογόνου σε κάποιον από τους άνθρακες C3', C4' και C5' του σακχάρου. [24]

2.7 Αξιολόγηση των μεμονωμένων αλλοιώσεων

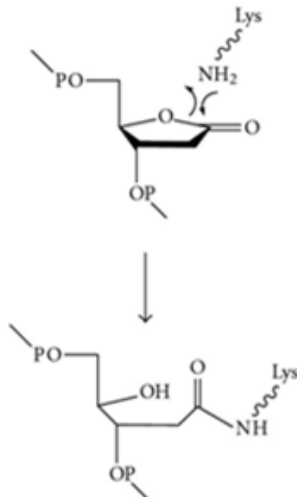
Οι κυριότερες βλάβες του HO* είναι οι τέσσερις διαστερομετρικές δομές των κυκλοπυρινών (5'R-cdG, 5'S-cdG, 5'R-cdA και 5'S-cdA) και οι δύο οξειδωμένες δεοξυπυρίνες (8-oxodG, 8-oxodA). Παρουσία Οξυγόνου, όπως συμβαίνει στους ιστούς ενός οργανισμού, η ιεραρχία των βλαβών από το HO* έχει ως εξής: 8-oxodG >> 8-oxodA > 5'R-cdG > 5'R-cdA > 5'S-cdA > 5'S-cdG [24].

Η θέση C5' του σακχάρου είναι η πιο ευπαθής σε επίθεση από το HO* για απαγωγή υδρογόνου (55% των απαγωγών υδρογόνου στη δεοξυριβόζη)[pdr02]. Λιγότερο ευπαθείς είναι οι θέσεις C4 και C3. Το ποσοστό μονόκλωνων θραύσεων στις θέσεις C5, C4 και C3 είναι αντίστοιχα 57%, 22% και 17%. Σημειώνεται εδώ η συμφωνία του πειράματος με την προσομοίωση που έδωσε για αυτούς τους άνθρακες τιμές SASA 46%, 28% και 14% αντίστοιχα [21].

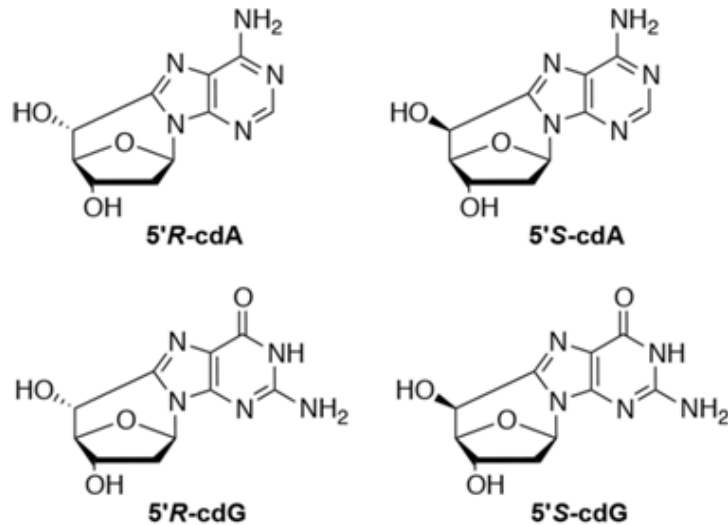
Εκτός από την δομή κάθε νουκλεοτιδίου, σημασία έχει και η ακολουθία βάσεων στο μόριο του DNA, όπως επιβεβαιώνει τόσο η προσομοίωση όσο και το πείραμα. Σε μία μελέτη αφότου υπολογίστηκε η θέση της θραύσης σε ένα ολιγονουκλεοτίδιο με γνωστή ακολουθία βάσεων μετρήθηκε η χημική απόδοση της μετατροπής από ρίζα σε μονόκλωνη θραύση, η οποία συμβολίστηκε $\epsilon = \epsilon(C_n)$ όπου C_n είναι ο αντίστοιχος άνθρακας της δεοξυριβόζης. Για να γίνει αυτό αξιοποιήθηκε ο αλγόριθμος RADACK για διαφορετικές τιμές της χημικής απόδοσης μέχρι να βρεθεί η καμπύλη που ταιριάζει καλύτερα στα πειραματικά δεδομένα. Το καλύτερο fitting έγινε για $\epsilon(C1'):\epsilon(C2'):\epsilon(C3'):\epsilon(C4'):\epsilon(C5')=0:0:0:2.8:1$. Όμοια για τις διαφορετικές αζωτούχες βάσεις η χημική απόδοση μετατροπής της ρίζας σε θραύση ήταν $\epsilon(T):\epsilon(C):\epsilon(A):\epsilon(G)=4:2:2:1$. Η χαμηλή χημική απόδοση για τη Γουανίνη οφείλεται πιθανότατα στην χημική σταθερότητα της συγκεκριμένης βλάβης.



Εικόνα 2.8: Μερικές οξειδωτικές βλάβες του DNA. (A) Μονοπάτια οξείδωσης της Γουανίνης, (B) μονοπάτια οξείδωσης της Θυμίνης, (Γ) μονοπάτια οξείδωσης της Κυτοσίνης (Δ) και κοινότερη οξείδωση της Αδενίνης.



Εικόνα 2.9: Οξείδωση της Δεοξυριβόζης. Παραγωγή της βλάβης dL [25]



Εικόνα 2.10: Οι κυκλοπουρίνες [24]

Σχετικά με τη Γουανίνη, αξίζει να σημειωθεί επίσης πως είναι η αζωτούχος βάση με το μικρότερο δυναμικό ιοντισμού, έτσι ο πληθυσμός της οξειδωμένης Γουανίνης είναι σημαντικά υψηλότερος από τις υπόλοιπες. Επίσης οι βλάβες οξειδωμένης Γουανίνης, λόγω της υψηλότερης συχνότητάς τους, συσσωρεύονται πιο εύκολα στους ιστούς και μπορούν, όταν έχουν συσσωρευτεί αρκετά, να προκαλέσουν μεταλλαξογένεση και απόπτωση. [17, 21]

2.8 Βλάβες DNA λόγω γειννίασης

Μία βλάβη στην αζωτούχο βάση μπορεί να γίνει σε τέτοια θέση ώστε να αλληλεπιδράσει με κάποια γειτονική αζωτούχο βάση και να δημιουργήσει έναν ομοιοπολικό δεσμό. Οι σημαντικότερες τέτοιες βλάβες που εμφανίζονται στο κύτταρο είναι τα διμερή πυριμιδίνης.

Παράγονται αποκλειστικά από την υπεριώδη ακτινοβολία, οπότε είναι ενδεικτικά προϊόντα της δράσης της. Η άμεση επίδρασή της είναι αρκετά διαφορετική από αυτή της ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Τα φωτόνια που έχουν βιολογικό ενδιαφέρον είναι στο εύρος των UVA (320-400 nm) και UVB (280-320 nm), αλλά πολύ λιγότερο στο εύρος των UVC(100-280). Απορροφούνται και προκαλούν τις διεγερμένες καταστάσεις που οδηγούνται στη συνέχεια στις διμερείς αλλοιώσεις.

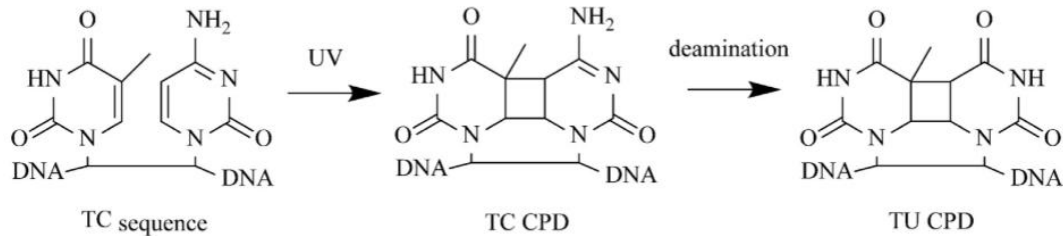
Οι βασικές βλάβες είναι οι τα κυκλοβουτανικά πυριμιδικά διμερή (cyclobutane pyrimidine dimers – CPD) και τα φωτοπροϊόντα πυριμιδίνης (6-4) πυριμιδίνης (pyrimidine (6-4) pyrimidine photoproducts – 64PP).

Ο λόγος ανάμεσα στον αριθμό των CPD και των 64PP εξαρτάται πολύ από τη μεθυλίωση του C5 άνθρακα της Γουανίνης. Παρατηρείται διπλάσιος CPD/64PP στην περίπτωση μεθυλιωμένης Γουανίνης. [21, 26]

CPD

Παράγονται πολύ γρήγορα ανάμεσα σε διπλανά νουκλεοτίδια που περιέχουν Θυμίνη ή Κυτοσίνη, οπότε υπάρχουν τέσσερις CPD, TT, TC, CT και CC. Δύο δεσμοί σχηματίζονται ανάμεσα στους απέναντι C5 και C6 άνθρακες με μία αντίδραση που ονομάζεται [2+2]

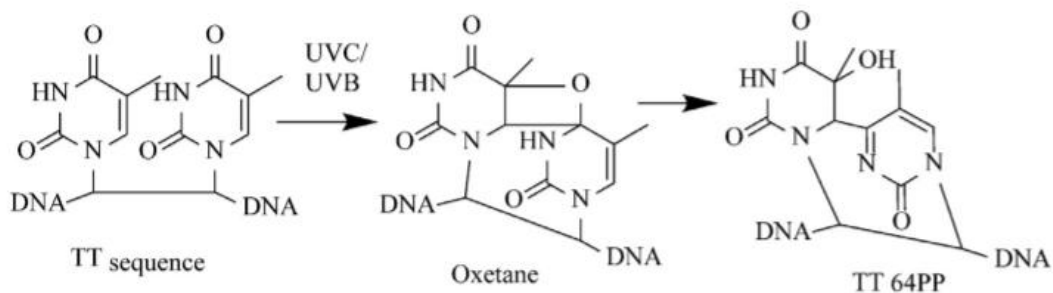
κυκλοπρόσθεση. Ο σχετικός ρυθμός παραγωγής τους σε απομονωμένο κυτταρικό DNA είναι περίπου 10:5:2:1. Η Ουρακίλη ακόμη μπορεί να εμφανιστεί στις CPD με απαμίνωση στην Κυτοσίνη της CPD όπως φαίνεται στην **Εικόνα 2.11**. Η χαμηλή απόδοση στην επιδιόρθωση των CPD τις καθιστά σημαντικές στις μεταλλάξεις. [26]



Εικόνα 2.11: Παραγωγή των CPD Θυμίνης και Κυτοσίνης. [26]

64PP

Παράγονται από τις UVB, UVC αλλά όχι από τις UVA. Αυτή η φωτοαντίδραση περιλαμβάνει τον διπλό δεσμό ανάμεσα στους C5-C6 στο 5' άκρο της πυριμιδίνης και τον C4 άνθρακα της Θυμίνης ή της Κυτοσίνης στο 3' άκρο. Εμφανίζεται μία ενδιάμεση δομή πριν καταλήξει στην τελική αλλοίωση. Παράγονται με μικρότερη απόδοση από τις CPD και επιβαρύνουν λιγότερο το DNA.[26]



Εικόνα 2.12 Η παραγωγή των 64PP μέσω του ενδιάμεσου Οξετανίου. [26]

Ενδοκλωνικοί Σταυροδεσμοί (Intrastand Crosslinks)

Μπορεί να σχηματιστεί ομοιοπολικός δεσμός ανάμεσα σε αζωτούχες βάσεις στον ίδιο κλώνο του DNA είτε είναι γειτονικές είτε έχουν ανάμεσά τους μία αζωτούχο βάση. Τις κατατάσσουμε στις γειτονικές βλάβες στο πλαίσιο αυτής της εργασίας λόγω της κοντινής τους απόστασης, αν και θα μπορούσαν να συμπεριληφθούν στο υποκεφάλαιο των σταυροδεσμών.

Παραδείγματα είναι ενδοκλωνικοί σταυροδεσμοί ανάμεσα στον C8' της Γουανίνης και το N3' της Θυμίνης (dG*-dT* ή dG*rdT*), ανάμεσα στον C8' της Γουανίνης και τη μεθυλική ομάδα του N3' της Θυμίνης (G[8-5m]T) και ανάμεσα στον C8' της Γουανίνης και τον C5 της Κυτοσίνης.[14]

2.9 Σύνθετες (ομαδοποιημένες) βλάβες DNA και δίκλωνες θραύσεις (Double Strand Breaks - DSB)

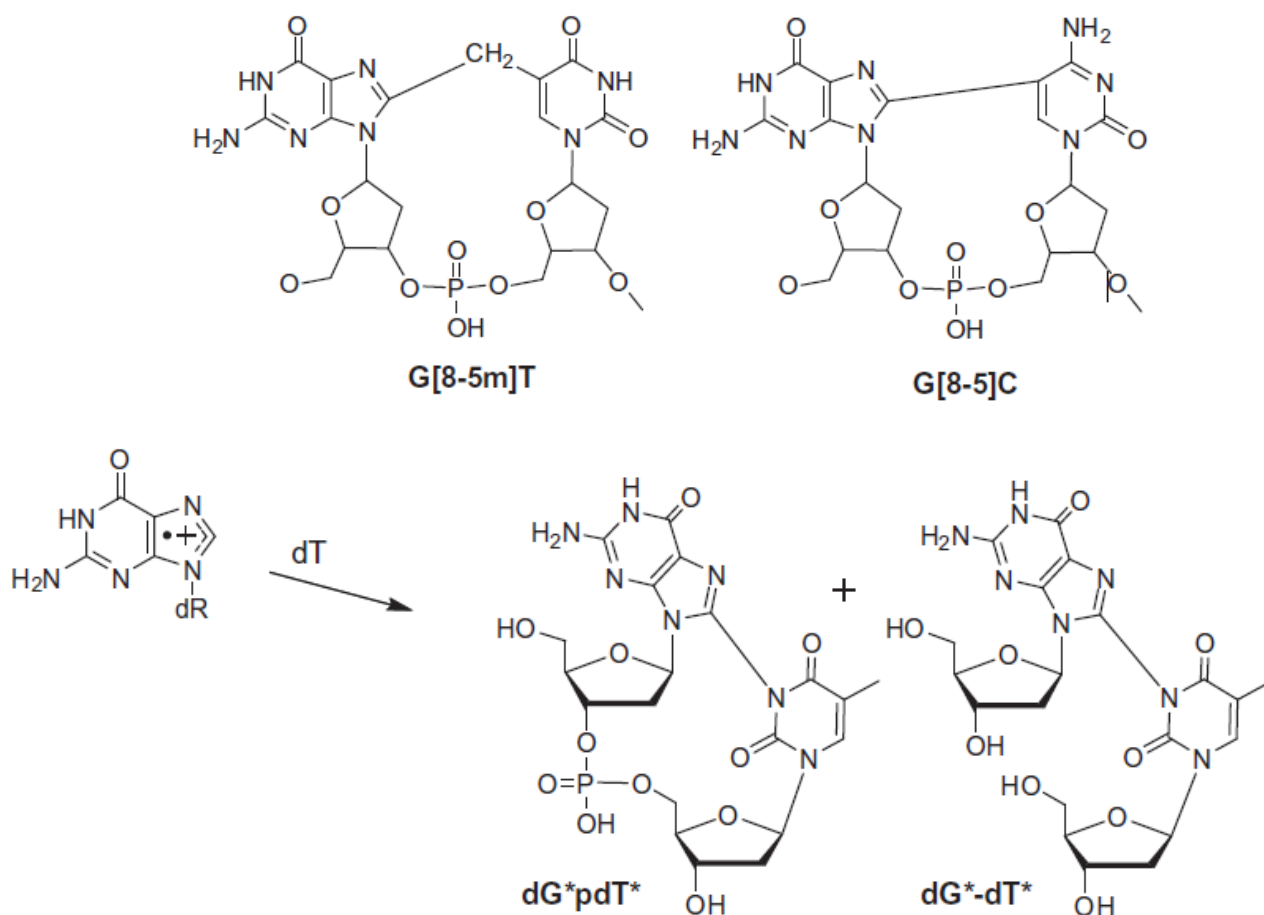
Οι περιοχές συσσωρευμένων/ομαδοποιημένων βλαβών (ή clusters), προκύπτουν όταν σε μία μικρή περιοχή μαζεύονται πάνω από μία βλάβες. Αυτό συμβαίνει όταν η πηγή της βλάβης δεν πλήττει το DNA ομοιογενώς, όπως το οξειδωτικό στρες από τον μεταβολισμό, αλλά με τρόπο ανομοιογενή, όπως στην περίπτωση των ιοντίζουσων ακτινοβολιών.

Ένα μέγεθος της ακτινοβολίας σχετικό με αυτό το φαινόμενο περιγράφηκε παραπάνω και είναι η γραμμική εναπόθεση ενέργειας (LET). Όσο αυξάνεται η LET αυξάνεται και η πιθανότητα εμφάνισης πολύπλοκων βλαβών. Για παράδειγμα, φωτόνια με μεγάλη ενέργεια και σωματιδιακή ακτινοβολία μπορεί να προκαλέσουν πολλαπλούς ιοντισμούς τοπικά μεταφέροντας πολλή ενέργεια διαδοχικά, με τα δευτερεύοντα ηλεκτρόνια που παράγονται να είναι πολύ επικίνδυνα στην γειτονιά που εκπέμπονται. [27]

Αυτές οι πολύπλοκες βλάβες επιβαρύνουν σοβαρά το κύτταρο γιατί αυξάνουν με τρόπο μη γραμμικό τη δυσκολία επιδιόρθωσής τους. Ο κυτταρικός μηχανισμός είναι σχεδιασμένος για να παίρνει θέση και να διορθώνει τις εκάστοτε βλάβες ξεχωριστά, όταν όμως συσσωρεύονται η περιοχή της βλάβης αλλάζει δομή και χημεία πολλαπλώς, με αποτέλεσμα ο κυτταρικός μηχανισμός να χάνει σε σημαντικό ποσοστό την αποτελεσματικότητά του, τόσο στην προσδεσιμότητα στην περιοχή όσο και στη λειτουργία του. Γίνεται πιο αργός και μερικές φορές δεν μπορεί να προχωρήσει στην επιδιόρθωση.

Ακόμη, οι πολύπλοκες βλάβες μπορεί να οδηγήσουν μετά από ορισμένα χημικά βήματα στην πιο δηλητηριώδη για το γονιδίωμα βλάβη, τη δίκλωνη θραύση. Οι δίκλωνες θραύσεις προκύπτουν στην απλούστερη περίπτωση όταν δύο μονόκλωνες θραύσεις βρεθούν στους δύο απέναντι κλώνους και σε απόσταση μικρότερη από τρία ζεύγη βάσεων. Συνήθως, όμως, προκύπτουν από πολύπλοκες βλάβες, αφού η πιθανότητα να εμφανιστούν από κάποια πηγή μόνο δύο μονόκλωνες θραύσεις απέναντι η μία από την άλλη σε απόσταση μικρότερη των τριών ζευγών βάσεων είναι στις περισσότερες περιπτώσεις αμελητέα. Οι δίκλωνες θραύσεις προκύπτουν, λοιπόν ως επί το πλείστον, από την ιοντίζουσα ακτινοβολία και κάποια ραδιομμητικά φάρμακα, όπως η Σισπλατίνη και η Μπλεομυκίνη. [21]

Οι δίκλωνες θραύσεις συνδέονται άμεσα με τη γήρανση (aging) και τον γηρασμό (senescence) των κυττάρων. Ο γηρασμός είναι μία μορφή αναστολής του κυτταρικού κύκλου. Είναι μη αναστρέψιμη διαδικασία και όταν συμβεί το κύτταρο ζει αλλά δεν πολλαπλασιάζεται πλέον. Η κυτταρική γήρανση αλλοιώνει την κυτταρική λειτουργία και επηρεάζεται από εξωγενείς παράγοντες. Οδηγεί σε γονιδιακή αστάθεια, γηρασμό, απόπτωση και σε κάποιες μορφές καρκίνων. Οι θεραπείες που προκαλούν DSB προκαλούν επίσης κυτταρική γήρανση. Η επιδιόρθωση γίνεται πιο αργή και λιγότερο αποτελεσματική όσο η γήρανση προχωράει, γιατί μειώνονται τα επίπεδα των επιδιορθωτικών πρωτεϊνών. Άλλη μία συνέπεια της γήρανσης είναι η ποσοστιαία μείωση της ετεροχρωματινής και η εξομάλυνση των μεταγραφικά ενεργών περιοχών, ενώ οι μεταλλάξεις που προκαλούνται φυσικά δε φαίνεται να επηρεάζουν σημαντικά τη γήρανση. Η γήρανση και ο γηρασμός, εκτός από εξωτερικούς παράγοντες, επηρεάζονται, όπως υποδηλώνει το όνομά τους από την ηλικία. [8, 28]



Εικόνα 2.13: Ενδοκλωνικοί σταυροδεσμοί. [14]

2.10 Σταυροδεσμοί

Μία ιδιαίτερη, από άποψη δομής, απειλή του DNA είναι οι σταυροδεσμοί. Σταυροδεσμοί μπορούν να σχηματιστούν ανάμεσα σε DNA και DNA καθώς και ανάμεσα σε DNA και πρωτεΐνες. Ανάμεσα σε DNA και DNA ονομάζονται διακλωνικοί σταυροδεσμοί (Interstrand Crosslink Lesions – ICL). Οι σταυροδεσμοί ανάμεσα σε DNA και πρωτεΐνες (DNA-Protein Crosslinks-DPC) είναι δηλητηριώδεις για το κύτταρο και συχνότεροι από τις ICL και τις DSB σε φυσιολογικές συνθήκες.[14]

Η dL είναι μία από τις οξειδωτικές βλάβες του DNA που μπορούν να εξελιχθούν σε DPC. Το κύτταρο προσπαθώντας να την επιδιορθώσει μπορεί πιθανά να εγκλωβίσει πρωτεΐνες ανάμεσα στους κλώνους του DNA και μετά να καταφύγει σε άλλο μονοπάτι για να επιδιορθώσει αυτήν την κατάσταση. Υπό φυσιολογικές συνθήκες ειδικά ένζυμα, οι τοποϊσομεράσες, σπάνε και επανενώνουν γρήγορα τους κλώνους του DNA για να ανακουφίσουν τοπικές φορτίσεις. Όμως μπορεί να παγιδευτούν και αυτά με το DNA και να προκαλέσουν DPCs.[14, 25]

2.11 Μη στοχευόμενη επίδραση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας

Όταν ένας οργανισμός δέχεται ακτινοβολία δεν επηρεάζεται μόνο ο ιστός που ακτινοβολείται. Τα φαινόμενα μη στοχευόμενης επίδρασης περιλαμβάνουν:

1. Φαινόμενο του παρατυχόντος (Bystander Effect)
2. Παρεμπύπτον φαινόμενο (abscopal effect)
3. Γονιδιακή αστάθεια
4. Προσαρμοστική απόκριση στην ακτινοβολία (Radiation Induced Adaptive Response – RIAR)
5. Υπερευαισθησία σε χαμηλές δόσεις ακτινοβολίας
6. Ενεργοποίηση γονιδίων από ακτινοβολία

Τα κύτταρα που εκτίθενται στην ακτινοβολία έχουν πολλούς τρόπους να μεταδώσουν σήματα που να προκαλέσουν βλάβες σε κύτταρα του οργανισμού που δεν εκτέθηκαν. Κάθε κυτταρικός τύπος έχει ιδιαιτερότητες ως προς τη λειτουργία του, για αυτό διαφορετικοί κυτταρικοί τύποι αντιδρούν με διαφορετικό τρόπο. Το σήμα μπορεί να διαδοθεί είτε με επαφή, είτε από διαλυτούς παράγοντες που απελευθερώνονται στο μέσο. Έτσι έχουμε μετάδοση μικρής και μεγάλης εμβέλειας. Η μετάδοση μικρής εμβέλειας λέγεται Διακυτταρική Επικοινωνία με Διάστακτη Διασταύρωση (Gap Junctional Intercellular Communication-GJIC) και η μετάδοση μεγάλης εμβέλειας λέγεται Διακυτταρική Επικοινωνία με Απομακρυσμένη Κυτταρική Σηματοδότηση (Distant cell Signaling Intercellular Communication – DSIC).[18]

Στην περίπτωση της GJIC η μετάδοση εξαρτάται από τη δυνατότητα της του κυττάρου να μεταφέρει το σήμα μέσω της επαφής γειτονικών κυττάρων. Στην περίπτωση της DSIC, στην οποία υπάγονται οι παρεπόμενες συνέπειες και η απόκριση απομακρυσμένου ιστού στην ακτινοβολία, είναι σημαντικός ο ρόλος των μικρών μορίων (ROS/RNS, ορμόνες, κυτοκίνες, χημοκίνες, οξειδωτικά ένζυμα και άλλοι δείκτες απόκρισης σε φλεγμονή). Η έκταση των παρεπόμενων συνεπειών είναι περί τα 5mm ενώ η απόκριση απομακρυσμένου ιστού μπορεί να ξεπεράσει την κλίμακα των εκατοστών. Οι ROS συνεισφέρουν στο φαινόμενο εξωκυτταρικά και ενδοκυτταρικά μέσω συνεχών φαινομένων. Εφόσον οι περισσότερες ROS ζουν λίγο, δρουν τοπικά. Ωστόσο η H_2O_2 που έχει μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής και πολύ μικρό μέγεθος μπορεί να περάσει την κυτταρική μεμβράνη και να πλήξει άλλα κύτταρα ή ιστούς, μακριά από τον εκτεθειμένο ιστό. Έχει παρατηρηθεί ότι ακτινοβολίες υψηλής LET είναι πιθανότερο να προκαλέσουν GJIC, ενώ ακτινοβολίες χαμηλής LET πιθανότερα προκαλούν DSIC. [18, 29]

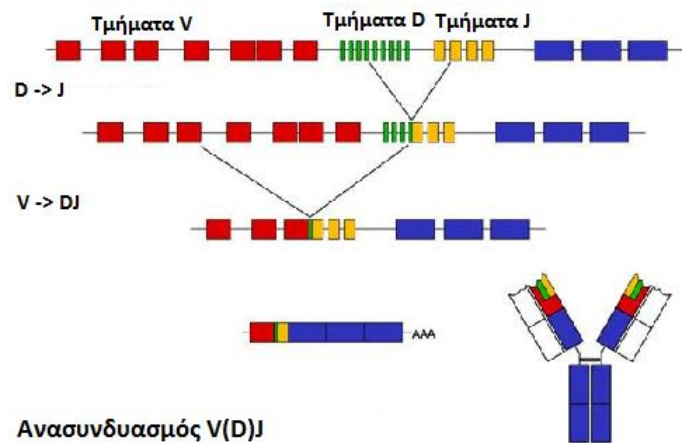
Η απόκριση στη χαμηλή δόση ακτινοβολίας δεν εξηγείται από την κλασική θεωρία της ακτινοβιολογίας, καθώς εμφανίζει ορισμένα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, όπως την προσαρμοστική απόκριση στην ακτινοβολία. Η προσαρμοστική απόκριση στην ακτινοβολία προκαλείται από χαμηλής δόσης και χαμηλής LET ακτινοβολία και μπορεί να προστατεύσει τα κύτταρα και ολόκληρο τον οργανισμό έναντι ενδογενών βλαβών ή βλαβών που μπορεί να προκαλέσει επακόλουθη έκθεση στην ακτινοβολία. Αυτό το φαινόμενο εξαρτάται από τη δόση, το ρυθμό δόσης, το ρυθμό έκφρασης γονιδίων στο κύτταρο, τις συνθήκες καλλιέργειας και τη φάση του κυτταρικού κύκλου. Οι δόσεις στις οποίες αναφερόμαστε είναι της τάξης των 0.01Gy-0.5Gy και οι ρυθμοί 0.01 ως 0.1Gy/min. [18]

2.12 Προγραμματισμένες δίκλωνες θραύσεις

Δεν είναι μόνο εξωτερικοί παράγοντες ή σφάλματα που προκαλούν τις δίκλωνες θραύσεις, αποτελούν και κύριο βήμα σε ορισμένες ενζυματικές διαδικασίες. Ήδη έχει αναφερθεί η δράση των τοποϊσομερασών, που είναι ένζυμα που προκαλούν δίκλωνες θραύσεις και επακόλουθα την επανένωση των άκρων ώστε να ανακουφίσουν την διπλή έλικα από τοπικές φορτίσεις.[25]

Όμως δεν είναι η μόνη περίπτωση. Κατά τη διαδικασία της μείωσης, πριν τα χρωμοσώματα μοιραστούν στα θυγατρικά κύτταρα των γαμετών, παρατηρείται ότι παθαίνουν επιπλέον κατάτμηση, άρα εμφανίζονται επιπλέον DSBs. Σε αυτή την περίπτωση πάλι εμφανίζονται ένζυμα της οικογένειας των τοποϊσομερασών. [25]

Ακόμη ενδιαφέρον παρουσιάζει το μονοπάτι ανασυνδυασμού V(D)J και το μονοπάτι αλλαγής κλάσης (Class Switch Recombination – CSR). Τα συγκεκριμένα μονοπάτια ακολουθούνται από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Το CSR κάνει ανταλλαγές στα εξόνια των περιφερειακών B-λεμφοκυττάρων και ο V(D)J ανασυνδυασμός κατασκευάζει την βαριά και την ελαφριά αλυσίδα της ανοσοσφαιρίνης στα B-λεμφοκύτταρα, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 2.14**. Το κύτταρο προκαλεί τη δίκλωνη θραύση ώστε να ενώσει αρχικά ένα τμήμα D με το J και στη συνέχεια για να ενώσει αυτό το τμήμα με ένα τμήμα V. Παραμένει ένα σταθερό τμήμα εξωνίου, αυτό που απεικονίζεται με μπλε χρώμα. Το γονίδιο στη συνέχεια θα εκφραστεί για να σχηματίσει την αντίστοιχη πρωτεΐνη. Στην **Εικόνα 2.14** φαίνεται κάτω δεξιά η ολοκληρωμένη πρωτεΐνη μετά την μετάφραση. Στο εξωτερικό μέρος έχει δύο λευκά τμήματα. Αντίθετα από τα εσωτερικά, που ονομάζονται βαριές αλυσίδες, τα εξωτερικά είναι οι ελαφριές αλυσίδες και σχηματίζονται με παρόμοιο τρόπο, με τη διαφορά πως δεν υπάρχει τμήμα D στο γονίδιο που εκφράζεται. [30, 31]



Εικόνα 2.14: Ανασυνδυασμός V(D)J [Janway 2001]

Αυτές οι δίκλωνες θραύσεις δεν είναι αποτέλεσμα βλάβης και ο ερευνητής που μελετάει τις βλάβες DNA πρέπει να τις λάβει υπόψη.

Κεφάλαιο 3: Επιδιόρθωση βλαβών DNA

3.1 Απόκριση στη βλάβη του DNA (DNA Damage Response-DDR)

Μετά την πρόκληση της βλάβης το κύτταρο αντιδρά. Το σύνολο των αντιδράσεων που μπορεί να ακολουθήσει το κύτταρο μετά τη βλάβη ονομάζεται απόκριση στη βλάβη του DNA (DNA Damage Response – DDR) και περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό ενζύμων, πρωτεϊνών και τροποποιήσεων που παίρνουν μέρος σε πολλαπλά μονοπάτια, που συχνά μπλέκονται μεταξύ τους, με ανταγωνιστικό τρόπο. Ανάλογα με τη σοβαρότητα της βλάβης και την αποτελεσματικότητα της επιδιόρθωσης, το κύτταρο μπορεί είτε να συνεχίσει τη λειτουργία του, έχοντας διορθώσει τη βλάβη (επιτυχώς) ή έχοντας διατηρήσει τη βλάβη (μεταλλαγμένο), είτε να οδηγηθεί στο θάνατο μέσω της διαδικασίας της απόπτωσης.[32]

3.2 Αναδιαμόρφωση της χρωματίνης στην περιοχή της βλάβης

Το πρώτο πράγμα που συμβαίνει μετά από βλάβη στο DNA είναι οι αλλαγές σε επίπεδο χρωματίνης. Οι ίδιες οι βλάβες μπορούν να επηρεάσουν έντονα διαδικασίες όπως την έκφραση και την αντιγραφή, οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο σε ασθένειες που σχετίζονται με τη γήρανση και τον καρκίνο.[3.18] Δεν επηρεάζεται μόνο το DNA από τη βλάβη αλλά όλο το περιβάλλον της βλάβης. Πλήθος πρωτεϊνών (ιστόνες, πρωτεΐνες συμπύκνωσης, ένζυμα) αλλάζουν χημικά, δομικά και λειτουργικά. Σε αυτήν την εξαιρετική ευαισθησία οφείλει το κύτταρο την αποτελεσματικότητα στην επιδιόρθωση. [33]

Οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA οφείλουν να έχουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά :

1. Να ανιχνεύουν τη βλάβη σε διαφορετικές δομές της χρωματίνης(βλ K1.6.5).
2. Να αναδιαμορφώνουν τοπικά την αρχιτεκτονική της χρωματίνης δίνοντας πρόσβαση στην περιοχή στους παράγοντές τους.
3. Να οργανώνουν την περιοχή κοντά στα νουκλεοσώματα και του DNA ώστε να μπορεί να λάβει χώρα η επιδιόρθωση
4. Να επαναφέρουν την τοπική οργάνωση της χρωματίνης μετά το πέρας της επιδιόρθωσης. [33]

Στα πρώτα βήματα, λοιπόν, της απόκρισης στη βλάβη DNA κάποιες πρωτεΐνες έρχονται κοντά στην περιοχή, κάποιες φεύγουν και κάποιες που παραμένουν αλλάζουν χημικά. Έτσι η δομή της χρωματίνης χαλαρώνει και ανοίγει, δίνοντας πρόσβαση σε επιδιορθωτικά ένζυμα και σε άλλους παράγοντες.

3.3 Μετα-μεταφραστικές Τροποποιήσεις πρωτεϊνών (Post-Translational Modification -PTM)

Πρόκειται για ρυθμιστικές τροποποιήσεις της DDR. Οι αλλαγές αυτές επηρεάζουν τη λειτουργία των αντίστοιχων πρωτεϊνών προσδίδοντάς τους ιδιότητες που δεν είχαν μετά το πέρας της μετάφρασης, εξ ου και το όνομα. Οι τροποποιήσεις αυτές καταλύονται από ένζυμα, τα οποία προσθέτουν ή αφαιρούν χημικές ομάδες σε ένα ή περισσότερα αμινοξέα της πρωτεΐνης[36]. Οι βασικές τροποποιήσεις είναι οι ακόλουθες. Οι τρεις πρώτες φαίνονται στην **Εικόνα 3.2**.

Μεθυλίωση

Μεθυλίωση ονομάζεται η προσθήκη μίας μεθυλομάδας ($-CH_3$) σε κάποιο μοριακό υπόστρωμα, συνήθως σε αμινοξέα των ιστόνων. Καταλύεται από ειδικά ένζυμα που λέγονται Μεθυλο-τρανσφεράσες.

Κατά την επιδιόρθωση, η μεθυλίωση ορισμένων μορίων δημιουργεί υποστρώματα στα οποία μπορούν στη συνέχεια να προσδεθούν τα απαραίτητα ένζυμα. Η μεθυλιωμένη Λυσίνη (K) αποτελεί περιοχή πρόσδεσης πρωτεϊνών που φέρουν τη δομή Tudor³, όπως ισχύει για αρκετά επιδιορθωτικά ένζυμα (πχ 53BP1). Έτσι η μεθυλιωμένη ιστόνη 3 (Histone 3 – H3) στη Λυσίνη 19 (H3K9me) και η H4 στη Λυσίνη 20 (H4K20me2) είναι περιοχές πρόσδεσης αυτών των επιδιορθωτικών ενζύμων. Στο πλαίσιο της οργάνωσης της χρωματίνης, μεθυλιωμένες ιστόνες υπάρχουν συγκεντρωμένες σε περιοχές ετεροχρωματίνης, που είναι περιοχές υψηλής συμπύκνωσης, ανεξάρτητα από την ύπαρξη ή μη βλάβης. Οπότε πιθανώς να συνεισφέρουν στη συμπύκνωση με κάποιο τρόπο. [33, 34]

Ακετυλίωση

Ακετυλίωση ονομάζεται η προσθήκη μίας ακετυλομάδας ($-COCH_3$) σε μοριακό υπόστρωμα. Η ακετυλίωση στις ιστόνες καταλύεται από τις Ακετυλοτρανσφεράσες Ιστόνων (Histone Acetyltransferases – HAT) όπως η Tip60.[35]

Η ακετυλίωση των ιστόνων μειώνει το θετικό φορτίο τους, μειώνοντας τις ασθενείς αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε εκείνες και το DNA. Η ακετυλίωση των ιστόνων, όπως της H4, είναι ένα σημαντικό βήμα για τη χαλάρωση της δομής της χρωματίνης και για την εκκίνηση της επιδιόρθωσης, ιδίως σε περιοχές αυξημένης συμπύκνωσης. Οι περιοχές ετεροχρωματίνης παρουσιάζουν ελάχιστη ενδογενή ακετυλίωση. [33]

Φωσφορυλίωση

Φωσφορυλίωση είναι η προσθήκη μίας φωσφορικής ομάδας ($-PO_4^{3-}$) σε μοριακό υπόστρωμα. Οι Κινάσες είναι τα ένζυμα που καταλύουν τη φωσφορυλίωση, οι Φωσφατάσες καταλύουν την αντίστροφη αντίδραση αφαιρώντας από μοριακό υπόστρωμα την φωσφορική ομάδα. [33]

Οι φωσφορυλιώσεις αλλάζουν τη δραστικότητα πολλών ενζύμων. Μπορεί να τα ενεργοποιήσουν όταν χρειάζεται και παίζουν σημαντικό ρόλο σε όλα τα στάδια της επιδιόρθωσης. Στην **Εικόνα 3.1** παρουσιάζονται οι τέσσερις ρόλοι των πρωτεϊνών στην επιδιόρθωση, όλοι ανατίθενται στα συγκεκριμένα μόρια λόγω της φωσφορυλίωσής τους. [37]

PARυλίωση

PARυλίωση είναι η προσθήκη μίας αλυσίδας διαδοχικών μορίων διφωσφορυλιωμένης Αδενίνης - Ριβόζης (Poly(ADP-Ribose) - PAR) σε μοριακό υπόστρωμα, συνήθως σε αμινοξέα όπως η Λυσίνη και η Κυστεΐνη(C). Καταλύεται από τις αντίστοιχες πολυμεράσες (Poly(ADP-Ribose) Polymerase – PARP). [38]

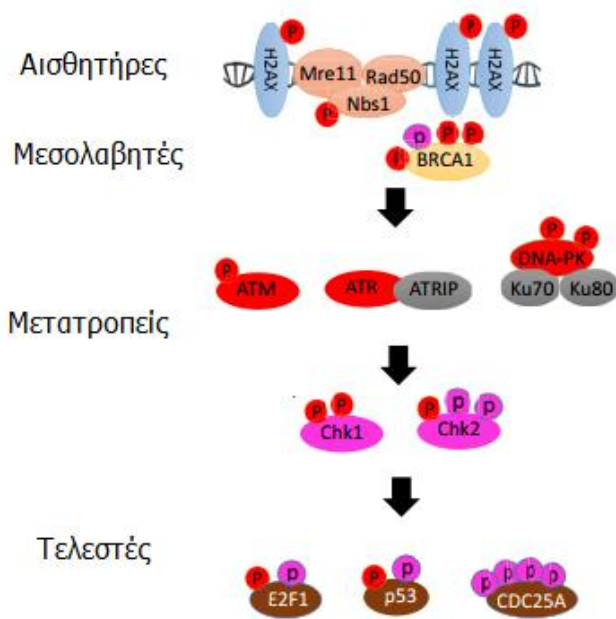
³ Περιοχή 50 αμινοξέων που αλληλεπιδρά με περιοχές άλλων πρωτεϊνών βοηθώντας στην αναγνώρισή τους και την πρόσδεση σε αυτές.

Η PARυλίωση ρυθμίζει πολλές κυτταρικές διαδικασίες, όπως τη μεταγραφή, την απόπτωση, τη μίτωση και φυσικά την επιδιόρθωση. Οι PARυλιωμένες περιοχές αποτελούν περιοχές πρόσδεσης επιδιορθωτικών παραγόντων.[38]

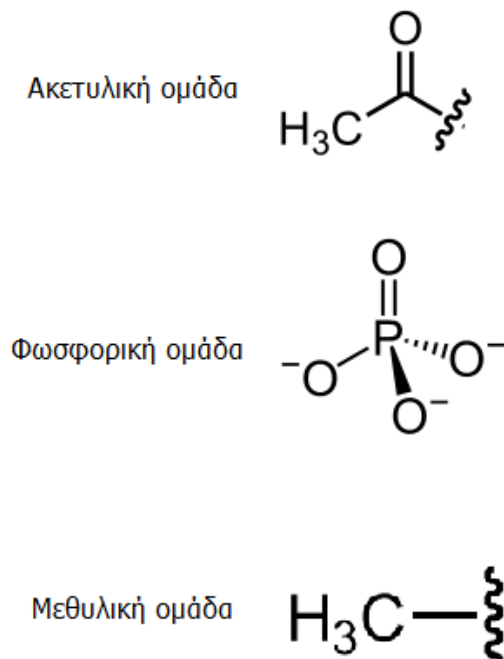
Ουβικιτινίωση

Ουβικιτινίωση είναι η προσθήκη ενός μορίου ουβικιτίνης (ubiquitin) σε μοριακό υπόστρωμα. Καταλύεται από τη συλλογική δράση τριών οικογενειών ενζύμων, των E1, E2 και E3 λιγασών. Η Ουβικουιντίνη είναι μία μικρή ρυθμιστική πρωτεΐνη 76 αμινοξέων, πολύ μεγαλύτερο μόριο, όμως, από τις προηγούμενες ομάδες που αναφέρθηκαν. [39]

Όταν συμβαίνει σε διαφορετικές θέσεις δίνει διαφορετικό είδος σήματος. Η προσθήκη μιας αλυσίδας πολυ-ουβικουιντίνης μέσω της Λυσίνης 48 σε κάποια πρωτεΐνη μπορεί να σηματοδοτήσει την καταστροφή της. Η προσθήκη της μέσω της Λυσίνης 63 συνεισφέρει στον συντονισμό των μηχανισμών επιδιόρθωσης, καθώς οι περιοχές ουβικουιντινίωσης αποτελούν περιοχές πρόσδεσης παραγόντων. [40]



Εικόνα 3.1 : Μερικές τροποποιήσεις της DDR (φωσφορυλιώσεις) και οι λειτουργίες τους. Οι κόκκινες προκαλούνται από την ATM ή την DNA-PK, ενώ οι ροζ από τις Chk1 και Chk2 [37].



Εικόνα 3.2 : Απλές χημικές προσθήκες που συναντώνται στις PTM [i3]

3.4 Οικογένειες ενζύμων που παίρνουν μέρος στην επιδιόρθωση του DNA

- PIKK: Η οικογένεια των βασικών Κινάσεων που διαδίδουν το σήμα της βλάβης και παίρνουν μέρος στην επιδιόρθωση. Περιλαμβάνει την ATM, την ATR και την DNA-PKcs.
- Ενδονουκλεάσες: Ένζυμα που καταλύουν το κόψιμο του φωσφοδιεστερικού δεσμού μίας πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας.
- Εξωνουκλεάσες: Ένζυμα που καταλύουν την αφαίρεση μεμονομένων νουκλεοτιδίων από το άκρο της αλυσίδας.
- Λυάσες: Ένζυμα που καταλύουν το σπάσιμο χημικών δεσμών με διαφορετικό τρόπο από οξειδωση και την υδρόλυση, συχνά δημιουργώντας ένα νέο διπλό δεσμό ή κυκλικές δομές άνθρακα.
- Γλυκοζυλάσες: Ένζυμα που καταλύουν το κόψιμο γλυκοζυλικών δεσμών.
- Πολυμεράσες: Ένζυμα που καταλύουν τη δημιουργία μεγάλων αλυσίδων.
- Λιγάσες: Ένζυμα που καταλύουν τη δημιουργία χημικού δεσμού ανάμεσα σε δύο μεγάλα μόρια.
- Ελικάσες: Ένζυμα που έχουν ως βασικό ρόλο το ξετύλιγμα της διπλής έλικας ώστε να επιτραπεί η έκφραση ή η αντιγραφή.

3.5 Επιβράδυνση ή παύση του κυτταρικού κύκλου

Καθώς η επιδιόρθωση χρειάζεται χρόνο για να επιτελεστεί το κύτταρο αναγκάζεται να επιβραδύνει τη ροή του κυτταρικού κύκλου του ώστε να μην προχωρήσει με βλάβες από τη μία φάση στην άλλη. Έχει γίνει ήδη μία αναφορά στα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, εδώ αναφέρονται οι δύο κύριες οικογένειες πρωτεϊνών που παίρνουν μέρος. Πρόκειται για τις Κυκλίνες και τις Κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες.

Οι Κυκλίνες, αν και δεν είναι ένζυμα, παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ενεργοποίηση των ενζύμων του κυτταρικού κύκλου. Η συσσώρευση και η αποδόμησή τους μέσα στον πυρήνα επηρεάζουν αποφασιστικά τη δράση των ενζύμων που δρουν πάνω στα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Γι αυτό τα αντίστοιχα ένζυμα, οι κινάσες του κυττάρου, ονομάζονται cdk (cyclin-dependent kinases). Ρυθμίζονται θετικά από τις κυκλίνες και αρνητικά από τους αναστολείς τους (Cdk Kinase Inhibitor –CKI). [3]

Οι cdk έχουν ονόματα ανάλογα με τη φάση που προωθούν, έτσι η κυκλίνη που προωθεί στην φάση M λέγεται κυκλίνη M και το αντίστοιχο σύμπλοκο που δρα είναι το M-cdk. Η κυκλίνη M αρχίζει να συντίθεται με το σχηματισμό του θυγατρικού κυττάρου και συνεχίζεται μέχρι να μπει το κύτταρο στη φάση M. Έπειτα αρχίζει πάλι να ελαττώνεται. Η ενεργότητα των cdk ρυθμίζεται από τις τροποποιήσεις που τους συμβαίνουν. Διαφορετικά σύμπλοκα κυκλίνης-cdk πυροδοτούν διαφορετικά στάδια του κυτταρικού κύκλου.[2]

Ανάλογα με την αποτελεσματικότητα των μηχανισμών επιδιόρθωσης το κύτταρο ή συνεχίζει στην επόμενη φάση ή σταματά τελείως τον κυτταρικό κύκλο μπαίνει σε απόπτωση. [41]

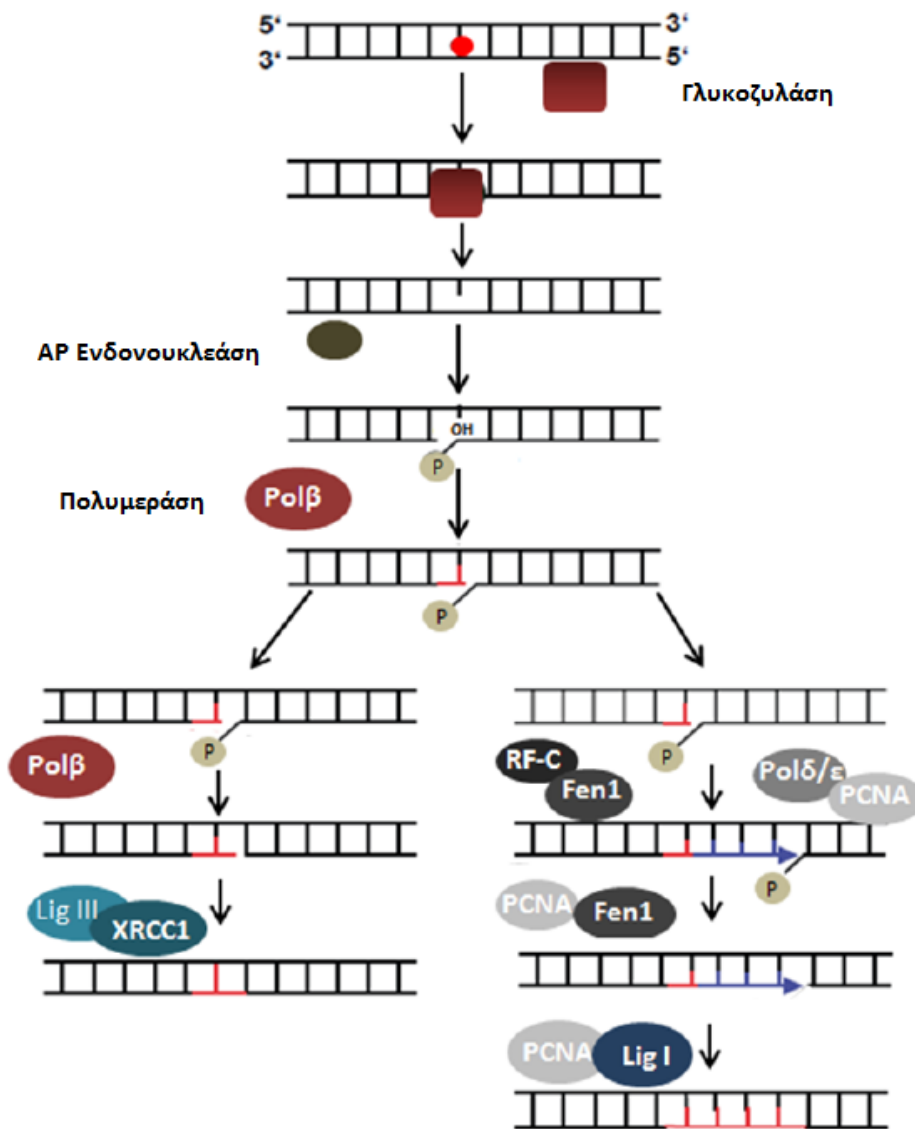
3.6 Μηχανισμοί επιδιόρθωσης DNA

- Επιδιόρθωση με εκτομή βάσης (Base Excision Repair – BER)
- Επιδιόρθωση με εκτομή νουκλεοτιδίου (Nucleotide Excision Repair –NER)
- Επιδιόρθωση αναντιστοιχίας (Mismatch Repair – MMR)
- Ομόλογος ανασυνδυασμός (Homologous Recombination Repair–HRR)
- Μη ομόλογη ένωση άκρων (Non Homologous End Joining –NHEJ)

3.7 Επιδιόρθωση μεμονωμένων νουκλεοτιδίων

Οι τρεις πρώτοι μηχανισμοί ασχολούνται με επιδιόρθωση βλαβών που αφορούν μόνο ένα νουκλεοτίδιο.

3.7.1 Επιδιόρθωση με Εκτομή Βάσης (Base Excision Repair-BER)



Επιδιόρθωση μικρού μπαλώματος

Επιδιόρθωση μεγάλου μπαλώματος

Εικόνα 3.3: Τα δύο μονοπάτια του μηχανισμού BER, Αριστερά το μικρό και δεξιά το μεγάλο μπάλωμα. [17].

Ο μηχανισμός BER μπορεί να διορθώσει αλλοιώσεις στις αζωτούχες βάσεις, όπως την 8-οχοG⁴ και την Tg², αβασικές περιοχές ή και μονόκλωνες θραύσεις. Οι αλλοιώσεις αυτές δεν επηρεάζουν σημαντικά τη δομή της διπλής έλικας, εμποδίζουν όμως την αντιγραφή και την μετάφραση. Το BER είναι ακόμη το κύριο μονοπάτι επιδιόρθωσης της Ουρακίλης-(RNA), η οποία μπορεί να προκύψει ή με λάθος τοποθέτηση ή με τυχαία απαμίνωση της Κυτοσίνης, μια αντίδραση που αφαιρεί την αμινομάδα από τον C4' και τον οξειδώνει. [32, 40]

Οι DNA γλυκοζυλάσες αναγνωρίζουν τη βλάβη της βάσης και είναι ένζυμα-κλειδιά για την έναρξη του μονοπατιού BER. Οι καθαρές γλυκοζυλάσες κόβουν τον γλυκοζυλικό δεσμό ανάμεσα στην προβληματική αζωτούχο βάση και τη δεοξυριβόζη. Συνδυασμένες με τις λυάσες AP αφαιρούν τις βλάβες και κόβουν τον σκελετό του DNA στο άκρο 3'. Η AP ενδονουκλεάση κόβει το 5' άκρο του σκελετού ώστε να εκτεθεί το 3'-OH άκρο, το οποίο απαιτείται να είναι εκτεθειμένο ώστε να αρχίσει η σύνθεση από κενή θέση με τη δράση της πολυμεράσης β. [36]

Ο BER διαθέτει δύο μονοπάτια. Από άποψη μηχανισμού, τα δύο μονοπάτια χωρίζονται μετά την τομή της AP ενδονουκλεάσης (APE1). Το ένα είναι η επιδιόρθωση με μικρό μπάλωμα και το άλλο η επιδιόρθωση με μεγάλο μπάλωμα.

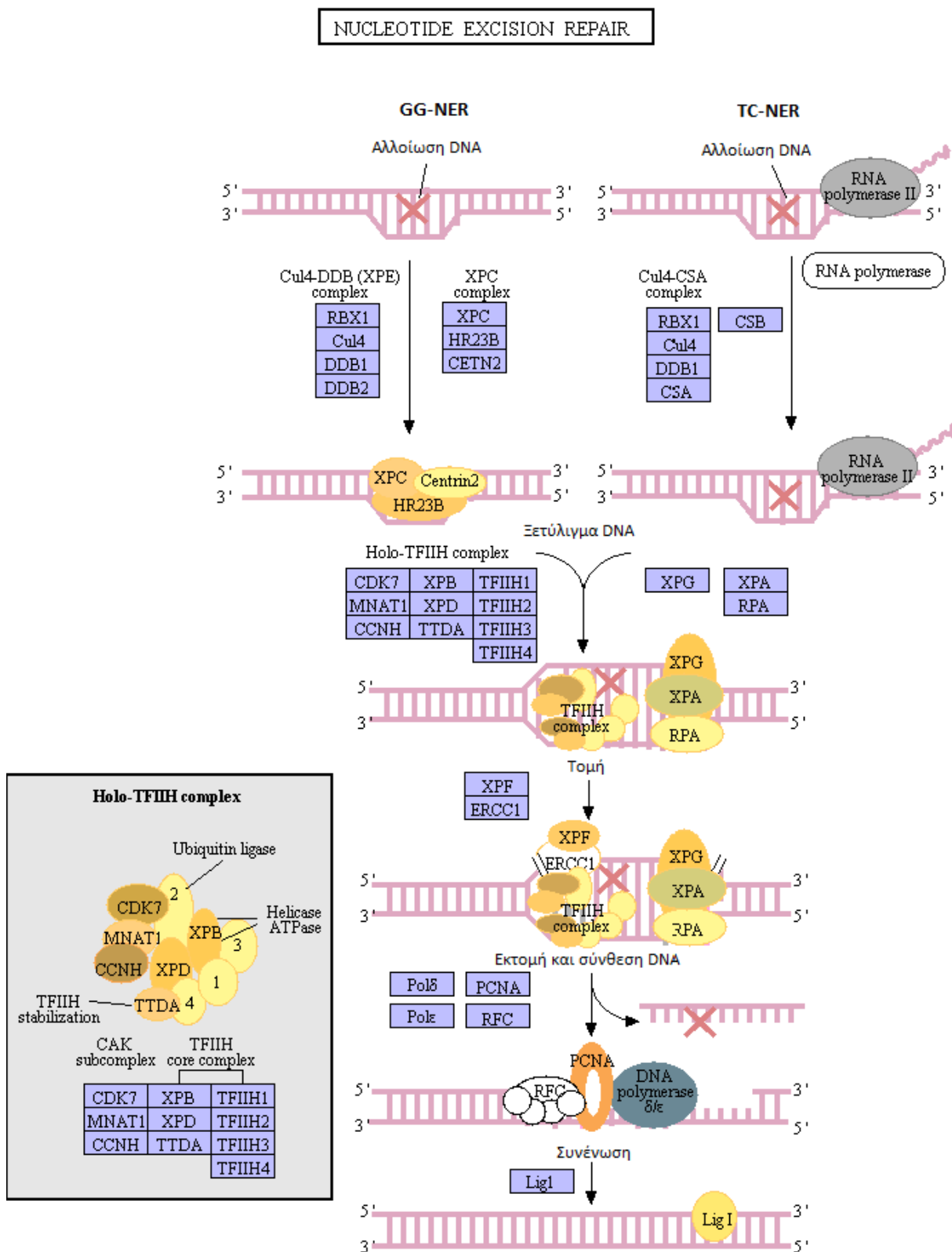
Επιδιόρθωση με μικρό μπάλωμα: Ξεκινάει με τις DNA γλυκοζυλάσες που αναγνωρίζουν και αφαιρούν τη βλάβη αφήνοντας μία θέση χωρίς βάση. Σε αυτή μετά δρα η AP Ενδονουκλεάση (APE1) που κόβει τον κλώνο του DNA στο 5' άκρο του φωσφορικού σακχάρου χωρίς αζωτούχο βάση και μετά η DNA πολυμεράση β καταλύει την β-εξάλειψη του υπολείμματος και γεμίζει τη θέση με το νέο νουκλεοτίδιο. Τελικά η DNA λιγάση III και η XRCC1 συνδέουν τα άκρα της αλυσίδας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ένα 'μπάλωμα' ενός νουκλεοτιδίου. [42]

Επιδιόρθωση με μεγάλο μπάλωμα: Ξεκινάει πάλι με τις DNA γλυκοζυλάσες και τη δράση της APE1. Διαχωρίζεται από το προηγούμενο μονοπάτι μετά απ αυτό το σημείο. Παίρνουν μέρος και άλλες πρωτεΐνες σε αυτό το σημείο, η ενδονουκλεάση FEN1, το αντιγόνο PCNA, η DNA πολυμεράση δ και άλλες DNA λιγάσες. Οι DNA πολυμεράσες, με τη βοήθεια του PCNA και του RFC, χτίζουν το συμπληρωματικό κλώνο για λίγα νουκλεοτίδια (2-6) εκτοπίζοντας τον ήδη υπάρχων κλώνο. Η ενδονουκλεάση FEN1 αναλαμβάνει το κόψιμο του κλώνου που περιττεύει ενώ η λιγάση ενώνει τα άκρα. [42]

Το μονοπάτι BER, όπως και όλα τα μονοπάτια επιδιόρθωσης, δεν είναι τέλειο. Προκαλεί μάλιστα κάποιες βλάβες που δεν θα εμφανίζονταν χωρίς αυτό, κάποιους σταυροδεσμούς DNA-πρωτεΐνης. Χαρακτηριστικά θα αναφερθεί μία περίπτωση που περιλαμβάνει την βλάβη dL που αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο. Η βλάβη dL δεν μπορεί να επιδιορθωθεί από το μικρό μπάλωμα του BER. Η απόπειρα επιδιόρθωσης μπορεί να οδηγήσει στην παγίδευση της DNA πολυμεράσης β μέσα στην διπλή έλικα. Το ίδιο το BER επιδιορθώνει αυτό το λάθος με το μονοπάτι μεγάλου μπάλωματος στη συνέχεια. [25]

⁴ βλ. K2.6

3.7.2 Επιδιόρθωση με Εκτομή Νουκλεοτιδίου (Nucleotide Excision Repair-NER)



03420 1/20/15
(c) Kanehisa Laboratories

Εικόνα 3.4: Το μονοπάτι GG-NER (αριστερά) και το μονοπάτι TC-NER (δεξιά). [i8]

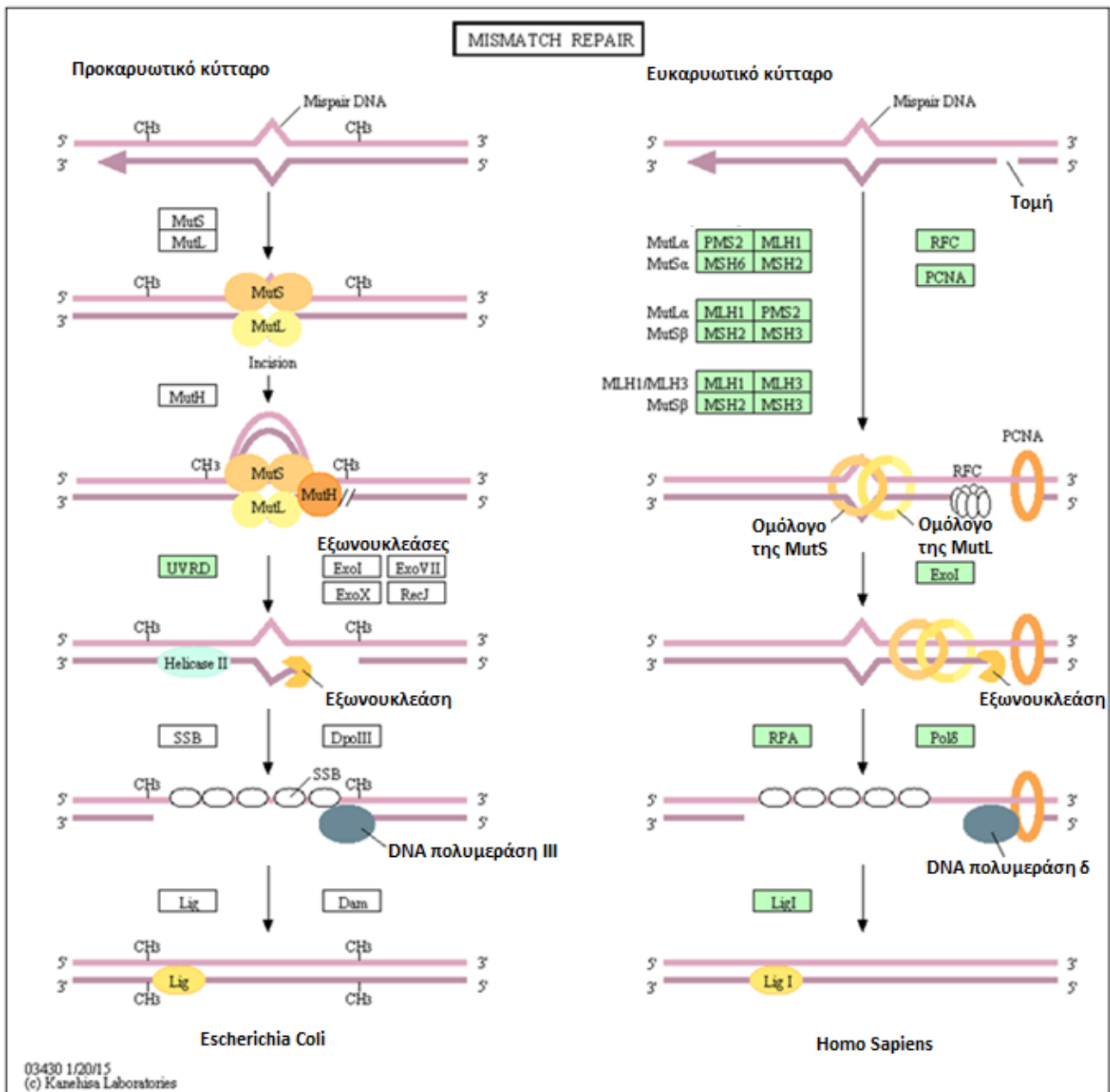
Το μονοπάτι αυτό αφαιρεί μεγάλο εύρος μονόκλωνων αλλοιώσεων που αποσταθεροποιούν την διπλή έλικα και οι παράγοντές του διατηρούνται εξελικτικά. Είναι μία πολύπλοκη διαδικασία με πολλά βήματα που περιλαμβάνουν την δράση τουλάχιστον 25 διαφορετικών πρωτεϊνών. Υπάρχουν δύο διαφορετικά μονοπάτια. Το συνδεδεμένο με τη μετάφραση (Transcription-Coupled - TC) αφαιρεί αποτελεσματικά αλλοιώσεις που καθυστερούν την μεταγραφή των πρωτεϊνών και επιτρέπουν την γρήγορη επαναφορά της διαδικασίας, και το καθολικού γονιδιώματος (Global Genome – GG-NER) βρίσκει τοπικά βλάβες σε όλο το γονιδίωμα. [32]

Δύο γενετικές ασθένειες που βασίζονται στην έλλειψη πρωτεϊνών του μονοπατιού NER είναι η μελαχρωματική ξηροδερμία (Xeroderma Pigmentosum) και το σύνδρομο Κοκέιν (Cockayne Syndrome) και σε αυτές οφείλουν το όνομά τους στις αντίστοιχες πρωτεΐνες (XPA-XPF, CSA, CSB).

GG-NER: Το βασικό σύμπλοκο αναγνώρισης για αυτό το μονοπάτι είναι το ετεροδιμερές XPC-RAD23-Centrin2. Το XPC είναι η μονάδα πρόσδεσης στο DNA που συνεχώς εξετάζει για αλλοιώσεις που προκαλούν διαταραχές στην έλικα. Όταν συναντήσει κάποια τέτοια διαταραχή, προσδένεται στον αβλαβή απέναντι κλώνο. Αυτό είναι σύνηθες για όλες τις βλάβες που προκαλούν το NER μονοπάτι. Αν και η XPC είναι πολύ σημαντικός αισθητήρας του GG-NER για τις βλάβες DNA, δεν μπορεί να αναγνωρίσει τις CPD που προκαλούνται από την υπεριώδη ακτινοβολία, γιατί διαταράσσουν ελάχιστα την δομή της διπλής έλικας. Σε αυτήν την περίπτωση η XPC εξαρτάται από το σύμπλοκο UV-DDB ή Cul4-DDB, το οποίο περιέχει τις DDB1 και την DDB2(αλλιώς και XPE). Το τελευταίο έλκεται από τις βλάβες που προκαλούνται από την υπεριώδη ακτινοβολία, οπότε χρησιμεύει στην επιδιόρθωση των CPD, αλλά και των 6-4PP. Μετά την αναγνώριση της βλάβης, η TFIIH προσδένεται με απευθείας αλληλεπίδραση με την XPC. Η TFIIH αναγνωρίζεται ως παράγοντας με 10 υπομονάδες, που περιέχουν δύο DNA ελικάσες XPB, XPD. Η XPC δένεται σε πολλαπλές δομές DNA, αλλά ο μηχανισμός του NER μπορεί να ολοκληρωθεί μόνο με την επιβεβαίωση της βλάβης και αυτό εξαρτάται από την δράση της XPD και της XPA. Η XPA προσδένεται στον κλώνο με τη βλάβη, ενώ η RPA δένεται στον απέναντι και οι ενδονουκλεάσες ERCC-XPF και XPG τοποθετούνται στο 5' και 3' άκρο αντίστοιχα. Μετά την συντονισμένη τομή, το ολιγονουκλεοτίδιο που περιέχει τη βλάβη αφαιρείται και ο αβλαβής κλώνος χρησιμοποιείται ως καλούπι για την σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας από την PCNA και τις πολυμεράσες δ, ε ή κ. Τελικώς το κενό σφραγίζεται από τη λιγάση I ή τη λιγάση III και την XRCC1, ολοκληρώνοντας το μονοπάτι [32, 43].

TC-NER: Ογκώδεις βλάβες στο DNA εμποδίζουν την μεταγραφή και μπορεί να οδηγήσουν στον κυτταρικό θάνατο. Αυτό το τοξικό για το κύτταρο φαινόμενο αντιμετωπίζεται από το δεύτερο μονοπάτι, το οποίο πολύ ειδικά αφαιρεί βλάβες από το μεταγραφόμενο κλώνο, επιτρέποντας έτσι να συνεχιστεί η ανεσταλμένη μεταγραφή. Η διαδικασία ξεκινάει από το σταμάτημα της RNA πολυμεράσης II στο σημείο της βλάβης. Οι πρώτες πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την RNA πολυμεράση II είναι οι UVSSA και CSB. Η UVSSA χρειάζεται για τη σταθεροποίηση της CSB. Η CSB έπειτα είναι υπεύθυνη για την πρόσληψη της CSA και άλλων κύριων παραγόντων του μονοπατιού. Για να είναι αποτελεσματικό το TC-NER χρειάζεται την επακόλουθη πρόσληψη των HMNG1, XAB2, και TFIIIS, που πιθανότατα βοηθούν τον μετασχηματισμό του συμπλόκου της RNA πολυμεράσης II, δίνοντας έτσι πρόσβαση σε επιδιορθωτικές πρωτεΐνες του NER για να δράσουν πάνω στη βλάβη [32, 43].

3.7.3 Επιδιόρθωση Αναντιστοιχίας (Mismatch Repair-MMR)



Εικόνα 3.5: Το μονοπάτι MMR στο βακτήριο *E. Coli* και σε ανθρώπινα κύτταρα. [19]

Αυτό το μονοπάτι αφαιρεί αναντιστοιχίες βάσης απέναντι σε βάση και αναντιστοιχίες παρεμβολής/διαγραφής (Insertion/Deletion – IDL). Επιπλέον αφαιρεί την βλάβη O6meG, η οποία εμποδίζει τελείως την μεταγραφή και μπορεί να προκαλέσει στην αντιγραφή περισσότερες λάθος τοποθετήσεις βάσεων. Έτσι το MMR αυξάνει 50-1000 φορές την αξιοπιστία της διαδικασίας της αντιγραφής. Τα ευκαρυωτικά κύτταρα έχουν ένα μηχανισμό που έχει σημαντικές αναλογίες με το βακτήριο *Escherichia Coli*. [43, 44]

Σε αυτό το μονοπάτι πρωταγωνιστές είναι τα σύμπλοκα MutS και MutL. Το μονοπάτι ξεκινάει με την πρόσδεση του ομόλογου ετεροδιμερούς της MutS στην περιοχή της βλάβης. Υπάρχουν δύο τέτοια ένζυμα, το MutSα (MSH2/MSH6) και το MutSβ (MSH2/MSH3).

Το MutSα αναγνωρίζει τις αναντιστοιχίες μοναδικών βάσεων και την IDL ενός ή δύο νουκλεοτιδίων. Το MutSβ αναγνωρίζει την παρεμβολή/διαγραφή περισσότερων νουκλεοτιδίων. Παράλληλα, στον σκελετό του υγιούς κλώνου γίνεται μία τομή που θα λειτουργήσει ως σημείο πρόσδεσης για την PCNA που θα χρειαστεί αργότερα. Αφότου δεθεί το σύμπλοκο MutS, έρχεται το ετεροδιμερές MutL. Σε αυτή την κατηγορία υπάρχουν 3 σύμπλοκα: MutLα (MLH1-PMS2), MutLβ (MLH1-PMS1), MutLγ (MLH1-MLH3). Πιο δραστική είναι η Muta. Έχει ιδιότητες ενδονουκλεάσης, κόβει το λάθος τμήμα κοντά στην περιοχή της αναντιστοιχίας. Η Mutβ δεν δείχνει μεγάλη δραστηριότητα σε μελέτες *in vitro*. Η Mutγ συμμετέχει αλλά εμπλέκεται περισσότερο στον ανασυνδυασμό της μείωσης. [45, 46]

Ο σχηματισμός του συμπλόκου MutS-MutL μπορεί να μετακινηθεί σε οποιαδήποτε κατεύθυνση πάνω στο DNA και φαίνεται να εμπλέκεται στην εισαγωγή της εξωνουκλεάσης (Exo1) και ακολούθως, στην εκτομή της βλάβης. Σε περιοχές όπου το DNA είναι αρκετά ανοιχτό λειτουργούν ως ενδονουκλεάσες οι πολυμεράση δ και ε. Με τη βοήθεια της RFN, η PCNA προσδένεται στο σύμπλοκο που έχει σχηματιστεί. Για τη σύνθεση του προπορευόμενου κλώνου, η PCNA καθορίζει την κατεύθυνση της τομής από την Muta. Ύστερα από κατάλληλη επιλογή του κλώνου και της τομής, η PCNA συντονίζεται με την Exo1 και έχουν λειτουργία 5'-3' εξωνουκλεάσης ώστε να αφαιρέσουν την περιοχή με το σφάλμα. Η DNA πολυμεράση δ προχωράει στην ανασύνθεση και τελικά η DNA λιγάση ενώνει τα άκρα. [45, 46]

3.8 Επιδιόρθωση δίκλωνων θραύσεων

Πολυπλοκότερες βλάβες είναι πιο επικίνδυνες, είτε πρόκειται για απομονωμένες DSB είτε για ομαδοποιημένες βλάβες. Στη δεύτερη περίπτωση μάλιστα, λόγω των πολλαπλών αλλαγών στην δομή της διπλής έλικας η πρόσδεση των ενζύμων και η επιδιόρθωση γίνεται αυξανόμενα πιο δύσκολα με την πυκνότητα της βλάβης. Οι αλλαγές στην χρωματίνη είναι πιο έντονες, τόσο λόγω της βλάβης, όσο και στην διαδικασία επιδιόρθωσης.

Η ιδιαιτερότητα των τελομερών είναι πως πρόκειται για τα άκρα του χρωμοσώματος, οπότε μπορούν να φανούν στο κύτταρο ως το ένα άκρο μίας δίκλωνης θραύσης. Έτσι δεν θα ήταν περίεργο αν οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί συνένωναν τα άκρα των τελομερών, κάτι που μπορεί να συμβεί αν τα τελομερή μείνουν εκτεθειμένα. Ευτυχώς για το κύτταρο, όμως, το σύμπλοκο Shelterin φροντίζει να τα καλύπτει.[47]

Οι δίκλωνες θραύσεις επιδιορθώνονται με δύο κύρια μονοπάτια, τον Ομόλογο Ανασυνδυασμό (HR) και τη Μη Ομόλογη Ένωση Άκρων (NHEJ). Το τελευταίο διαχωρίζεται περαιτέρω, σε δύο μονοπάτια, την Κλασική Μη Ομόλογη Ένωση Άκρων (Classical Non-Homologous End Joining – c-NHEJ) και την Εναλλακτική Μη Ομόλογη Ένωση Άκρων (Backup Non-Homologous End Joining – b-NHEJ) που περιλαμβάνει τις παραλλαγές του κλασικού μονοπατιού και πιθανά χρήση μικρών περιοχών ομολογίας [32].

Το μονοπάτι HR φροντίζει να διορθώσει τη βλάβη προστατεύοντας όσο το δυνατόν καλύτερα την αλληλουχία των βάσεων. Γι αυτό αναζητάει την ομόλογη αλληλουχία του προβληματικού τμήματος στην αδελφή χρωματίδη (σπανιότερα στο ομόλογο χρωμόσωμα) και τη χρησιμοποιεί ως καλούπι για να συμπληρώσει τις βάσεις που χρειάζονται για να καλυφθεί η βλάβη. Το σημαντικότερο πλεονέκτημά της είναι η διατήρηση της αλληλουχίας των βάσεων. Το μειονέκτημα είναι ότι πρόκειται για πολύπλοκη διαδικασία που θέλει χρόνο και καλό

συντονισμό, ειδικά στην αναζήτηση της αδελφής χρωματίδης. Η προϋπόθεση της αδελφής χρωματίδης σημαίνει πως το HR εμφανίζεται κυρίως στην φάση S και τη φάση G2. [6, 32]

Το μονοπάτι NHEJ επεξεργάζεται τα άκρα στο σημείο της βλάβης και τα ενώνει. Η διατήρηση της αλληλουχίας δεν είναι σημαντική σε αυτό το μονοπάτι, αυτό είναι και το βασικό του ελάττωμα. Είναι, ωστόσο, πολύ πιο γρήγορο από το HR και αντιμετωπίζει αποτελεσματικά τις περισσότερες δίκλωνες θραύσεις.[6, 32]

Η επιλογή ανάμεσα στα δύο μονοπάτια εξαρτάται από αρκετούς παράγοντες, μεταξύ των οποίων είναι η φάση του κυτταρικού κύκλου, η πολυπλοκότητα και η φύση της βλάβης, η πυκνότητα και η δομή της χρωματίνης, η αρχική επεξεργασία των άκρων στις δίκλωνες θραύσεις. Υπάρχουν ένζυμα τα οποία συμβάλλουν στην επιλογή μονοπατιού, όπως η 53BP1 που εμποδίζει το HR και προωθεί το NHEJ και η BRCA1 που προωθεί το HR [3.12]. Σε κατώτερους οργανισμούς, στους οποίους το παραμικρό λάθος μπορεί να έχει μεγάλες επιπτώσεις, το HR προτιμάται. Σε ανώτερους οργανισμούς όμως, στους οποίους υπάρχει μεγαλύτερη ποσότητα DNA και το μεγαλύτερο μέρος του δεν εκφράζεται, προτιμάται η γρήγορη επιδιόρθωση που αποφεύγει χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Γενικά, λοιπόν, σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου το NHEJ προτιμάται. [6, 32, 48]

3.8.1 Σηματοδότηση της βλάβης

Κοντά στις δίκλωνες θραύσεις γίνεται πολύ γρήγορα η φωσφορυλίωση της ιστόνης H2AX στη Σερίνη-140, η οποία ονομάζεται και γH2AX. Πρόκειται για την βασικότερη και πρότερη τροποποίηση που αφορά στις δίκλωνες θραύσεις, αφού εμφανίζεται σχεδόν αποκλειστικά λόγω δίκλωνων θραύσεων, διαδίδεται σε μεγάλη περιοχή της χρωματίνης (περί τις 30Mbp) σχηματίζοντας εστίες και αποτελεί περιοχή πρόσδεσης επιδιορθωτικών ενζύμων. Εκτός από την Γη2αχ υπάρχουν και άλλες πρωτεΐνες του μηχανισμού απόκρισης στις βλάβες DNA που σχηματίζουν εστίες (πχ ATM, BRCA1, 53BP1, MDC1, RAD51,...).[47, 49, 50]

Η φωσφορυλίωση της H2AX γίνεται από τις κινάσες της οικογένειας PIKK. Τα τρία βασικά μέλη της είναι η ATM, η ATR και η DNA-PK. Η δράση της ATM είναι εντονότερη και πιο εκτεταμένη. Η ATR δρα μόνο κατά την αντιγραφή γιατί ενεργοποιείται από την ATRIP που προσδέεται κοντά στα μονόκλινα τμήματα που μένουν στο σημείο που καταρρέει η διχάλα διπλασιασμού. Η DNA-PK δρα σε πολύ μικρότερη εμβέλεια από την ATM. Όταν λείπει η ATM, τότε η DNA-PK μπορεί να φροντίσει σε κάποιο βαθμό την φωσφορυλίωση στην περιοχή της βλάβης, αλλά η σηματοδότηση είναι λιγότερο αποτελεσματική. [6, 47]

Οι PTM στην περιοχή είναι δύσκολο να τοποθετηθούν σε χρονική σειρά εμφάνισης, γιατί οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί λειτουργούν παράλληλα και με μεγάλη ταχύτητα. Εκτός από τη φωσφορυλίωση εμφανίζονται πολλές PTM κοντά στην περιοχή. Η PARP1 τοποθετεί γρήγορα αλυσίδες PAR πάνω στον εαυτό της και στην ATM, οι E3 λιγάσες (RNF8, RNF168) ενώνουν την Ουβικιντίνη από την Λυσίνη 63 πάνω σε πρωτεΐνες. Αυτές τις τροποποιήσεις τις αναγνωρίζουν πολλοί παράγοντες των μηχανισμών απόκρισης στη βλάβη DNA. Έτσι γίνεται καλύτερα ο συντονισμός των μηχανισμών.[47, 50]

3.8.2 Αναδιαμόρφωση της χρωματίνης

Οι αλλαγές στην χρωματίνη συμβαίνουν με τις ακόλουθες διαδικασίες:

- Ενεργό κατανάλωση ATP από ένζυμα αναδιαμόρφωσης που ανήκουν στην οικογένεια SWI/SNF των εξαρτώμενων από το DNA ATPασών, οι οποίες διώχνουν ιστόνες ή ολόκληρα νουκλεοσώματα.
- Συνεργασία διαφορετικών ιστόνων με ειδικά ένζυμα που τις συνοδεύουν μέσα στον πυρήνα.
- Αλλαγή στον τρόπο πρόσδεσης ιστόνων που δεν βρίσκονται στο νουκλεόσωμα (H1) ή άλλων πρωτεϊνών που παίρνουν μέρος στη συμπύκνωση.
- Ομοιοπολικές τροποποιήσεις των ιστόνων στον πυρήνα του νουκλεοσώματος.[32]

Μετά τη βλάβη η δομή της χρωματίνης χαλαρώνει. Οι HAT (συνήθως η Tip60) ακετυλιώνουν τις ιστόνες αποδυναμώνοντας την ελκτική αλληλεπίδρασή τους με το DNA, χαλαρώνοντας τη δομή. Μερικά συστατικά των νουκλεοσωμάτων αντικαθίστανται με άλλα, για παράδειγμα φαίνεται πως σε νουκλεοσώματα κοντά στην δίκλινη θραύση τοποθετείται η H2A.Z που συνεισφέρει στην προστασία των άκρων. Η χαλάρωση επιτρέπει και την έκθεση περισσότερων περιοχών πρόσδεσης επιδιορθωτικών ενζύμων. [40, 51]

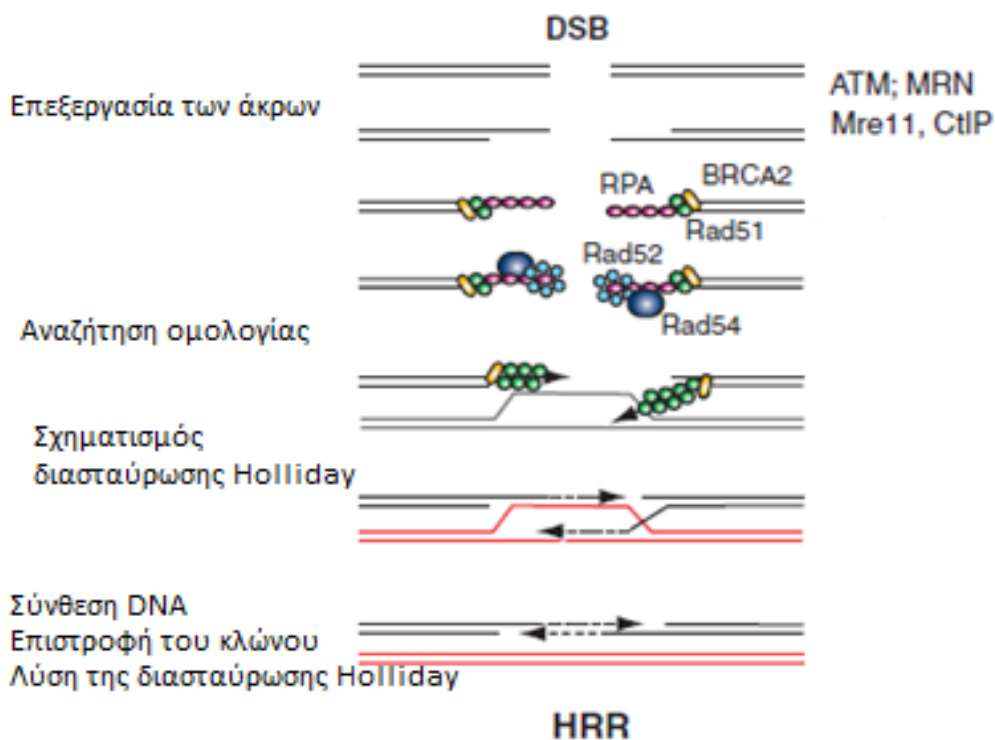
Ακόμη η κινητικότητα της αυξάνεται, αν και τα δύο άκρα στην βλάβη τείνουν να μείνουν σταθερά. Η κινητικότητα της χρωματίνης εξαρτάται από μηχανισμούς που καταναλώνουν ενέργεια με τη μορφή της ATP, από τον αριθμό των δίκλωνων θραύσεων, την ενεργοποίηση των CHK και γενικότερα από τον κυτταρικό κύκλο. Υπερβολική αύξηση της κινητικότητάς της θα αύξανε σημαντικά την πιθανότητα χρωμοσωμικών ανωμαλιών. Οι μοριακοί παράγοντες που επηρεάζουν την κινητικότητα του DNA είναι οι αναδιαμορφωτές χρωματίνης (πχ INO80, RSC), οι πρωτεΐνες της χρωματίνης (πχ HP1, ιστόνες) και κάποια σχετικά γονίδια (πχ RAD51, RAD43, 53BP1, MEC1...). Στα κύτταρα των θηλαστικών κυττάρων, η κίνηση των χρωμοσωμάτων είναι πιο περιορισμένη από ό,τι σε κατώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα, όπως τον μύκητα της ζύμης. Ακόμη υπάρχουν περιοχές των χρωμοσωμάτων που είναι πιο περιορισμένα από τα υπόλοιπα, πιο συγκεκριμένα τα τελομερή που δεσμεύονται μερικώς πάνω στον πυρηνικό φάκελο και τα κεντρομερή που δεσμεύονται στον άξονα της ατράκτου.[52, 53]

Ανάλογα με το μονοπάτι που θα λάβει δράση και την περιοχή της χρωματίνης που θα συμβεί η βλάβη, η δομή της και η κινητικότητά της αλλάζουν ανάλογα. Έτσι, στην ετεροχρωματίνη γίνονται μεγαλύτερες προσπάθειες και αλλαγές λόγω της μεγαλύτερης πυκνότητας. Η ATM προωθεί, μέσω της φωσφορυλίωσης της KAP1, την απομάκρυνση της πρωτεΐνης CHD3.1 από την περιοχή της βλάβης, κάτι που χαλαρώνει τη δομή. Η HP1 είναι βασική πρωτεΐνη της ετεροχρωματίνης και συνεισφέρει στη συμπύκνωσή της. Γι αυτό δεν είναι περίεργο το γεγονός πως οι CK μετά από τη βλάβη προκαλεί την απομάκρυνση της HP1β, αν και η HP1α παραμένει. Οι δίκλωνες θραύσεις που δεν καταφέρνουν να επιδιορθωθούν γρήγορα μετακινούνται προς τα όρια της ετεροχρωματίνης με την ευχρωματίνη για να διορθωθούν. [47, 51, 52]

Όταν η επιδιόρθωση γίνεται με το NHEJ η αναδιαμόρφωση απλά βελτιώνει λίγο την αποτελεσματικότητα του μονοπατιού με τη χαλάρωση της χρωματίνης. Στην περίπτωση του μονοπατιού HR απαιτείται εκτενής αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και παρατηρείται αυξημένη κινητικότητα, γιατί το προβληματικό τμήμα DNA πρέπει να εντοπίσει την περιοχή της αδελφής χρωματίνης συνήθως, και σπανιότερα κάποιο τμήμα με ίδια ακολουθία στο ομόλογο χρωμόσωμα. [51, 52]

3.8.3 Ομόλογος Ανασυνδυασμός (Homologous Recombination -HR)

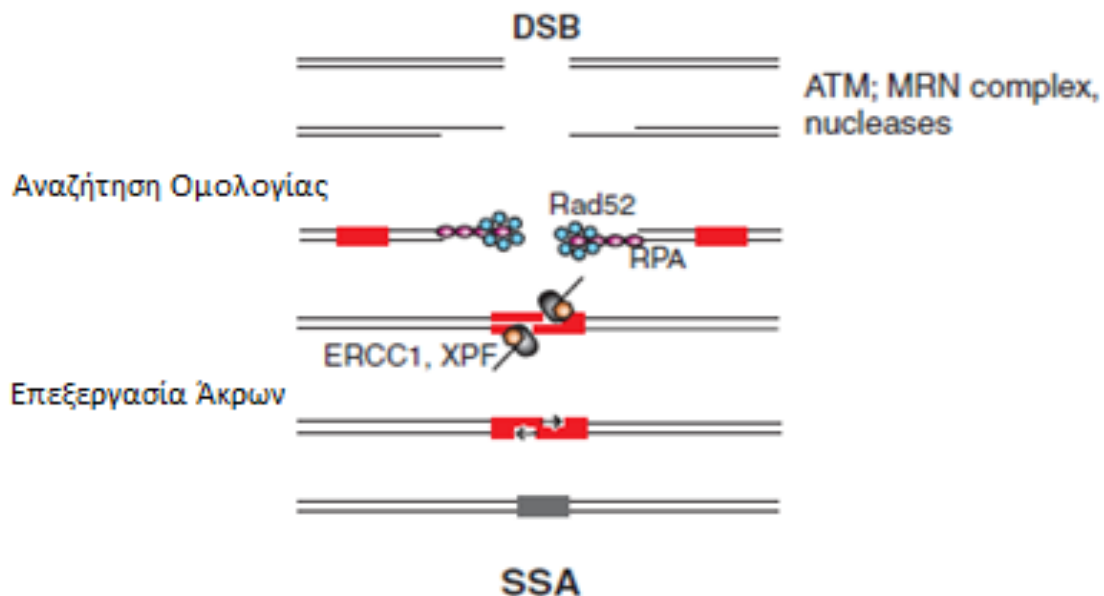
Το μονοπάτι HR ξεκινάει με την σύνδεση του συμπλόκου MRN(MRE11/Rad50/NBS1) στην δίκλωνη θραύση και η λειτουργία του είναι να κρατάει τα σπασμένα κομμάτια κοντά και να φέρνει βάσεις για την CtIP νουκλεάση. Το σύμπλοκο MRN-CtIP καταλύει την εκτομή των άκρων στο σημείο του σπασίματος μαζί με την εξονουκλεάση I (EXO1), έτσι ώστε να δημιουργήσει ένα μονόκλωνο τμήμα DNA. Στη συνέχεια, η RPA συνδέεται με την μονόκλωνη περιοχή και μέσω μιας πολύπλοκης διαδικασίας, στην οποία είναι απαραίτητη η BRCA2, το νήμα της RPA αντικαθίσταται με ένα νήμα RAD51 νουκλεοπρωτεΐνης.



Εικόνα 3.6: Το μονοπάτι Επιδιόρθωσης Ομόλογου Ανασυνδυασμού (HRR) [6]

Το τελευταίο είναι απαραίτητο για να γίνει η σύνδεση με την αδελφή χρωματίδη. Αυτή σύνδεση ονομάζεται διασταύρωση Holiday. Η RAD51 φεύγει ενώ γίνεται η σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου και στους δύο. Τέλος η διασταύρωση Holliday λύνεται και οι κλώνοι επιστρέφουν στη θέση τους. [47, 50]

3.8.4 Ανασύνδεση Μονού Κλώνου (Single Strand Annealing –SSA)

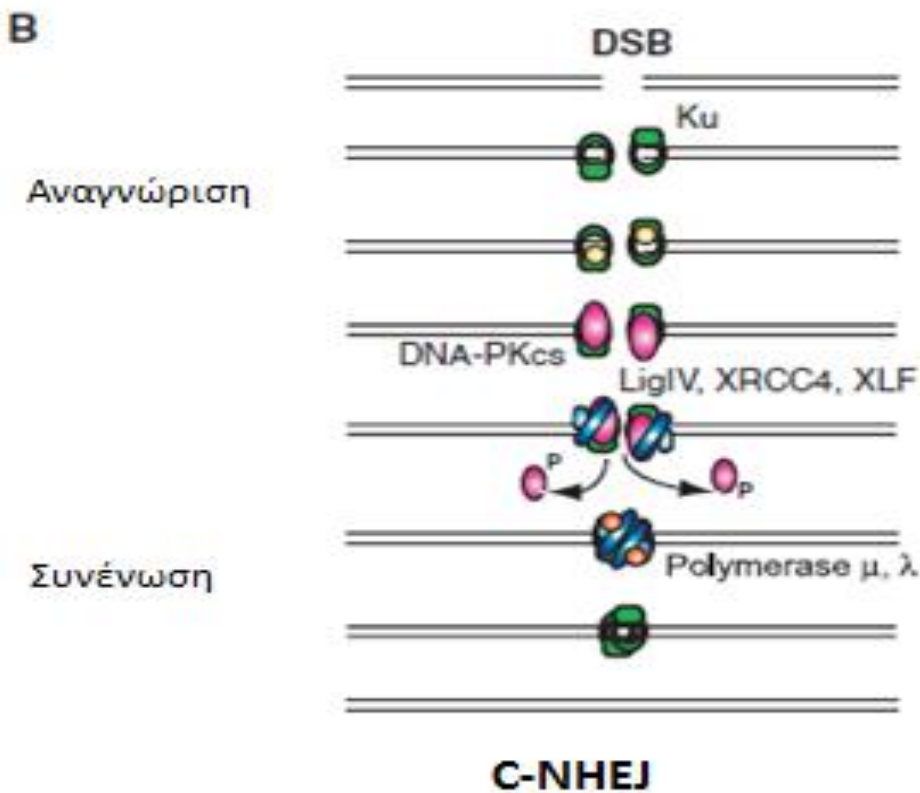


Εικόνα 3.7: Το μονοπάτι Ανόπτωσης Μονού Κλώνου (Single Strand Annealing). [6]

Αυτό το μονοπάτι είναι κάτι ενδιάμεσο από τα κεντρικά, HR και NHEJ. Θεωρητικά ανήκει στο πρώτο, αν και τα κύρια ένζυμά του ανήκουν στο B-NHEJ. Στην αρχή τα άκρα της βλάβης εντοπίζονται και εκατέρωθεν της βλάβης εντοπίζονται δύο ομόλογες περιοχές. Κάποια εξωνουκλεάση, πιθανότατα το σύμπλοκο MRN, αφαιρεί νουκλεοτίδια ενώ ταυτόχρονα η RPA συνδέεται στον εκτεθειμένο κλώνο για να τον προστατεύσει. Τα άκρα κόβονται ώσπου να εκτεθούν οι ομόλογες περιοχές. Η σύνδεση γίνεται μέσω της Rad52 και μετά η συμπλήρωση του κενού γίνεται με το σύμπλοκο των πρωτεϊνών ERCC1 και XPF. Τέλος η DNA λιγάση ενώνει τα άκρα για να ολοκληρώσει τη διαδικασία. [47]

3.8.5 Μη Ομόλογη Ένωση Άκρων (Non-Homologous End Joining – NHEJ)

Αρχικά θα περιγραφεί το κλασικό μονοπάτι c-NHEJ. Οι δίκλωνες θραύσεις αναγνωρίζονται γρήγορα από τις πρωτεΐνες Ku70 και Ku80 που ενώνονται στα εκτεθειμένα άκρα σχηματίζοντας το ετεροδιμερές Ku70/Ku80 που ονομάζεται Ku. Το Ku προστατεύει τα άκρα από την εκτομή και προωθεί το συγκεκριμένο μονοπάτι. Το ετεροδιμερές αλληλεπιδρά με κινάσες και πάνω σε αυτό συνδέεται η καταλυτική υπομονάδα της DNA-PK (DNA-PKcs) συναρμολογώντας την DNA-PK (Ku70/Ku80/DNA-PKcs). Το σύμπλοκο MRN και η ενδονουκλεάση Artemis έρχονται επίσης στην περιοχή. Η συνένωση γίνεται τελικά από το σύμπλοκο XRCC4/LigIV και την XLF που είναι παρόμοια με την XRCC4, αλλά κάνει πιο αδύναμες αλληλεπιδράσεις. Το μονοπάτι είναι δυνατόν να χρησιμοποιήσει ακόμη τις πρωτεΐνες PNKP, APTX, APLF, Polιμ, Polιλ και τις Artemis, MRN που προαναφέρθηκαν για να κόψει και να προσαρμόσει τα άκρα ώστε να μην έχουν περισσευούμενα μονόκλινα τμήματα. [32, 35, 54]



Εικόνα 3.8: Η Κλασική Μη Ομόλογη Ένωση Άκρων (c-NHEJ) [6]

Η αξιοπιστία του μονοπατιού δεν είναι πολύ καλή. Κάνει γρήγορη επανένωση των άκρων αλλά δεν είναι δύσκολο να παραλειφθούν νουκλεοτίδια ή να παραβλεφθούν αναντιστοιχίες στα άκρα, αλλοιώνοντας την αρχική αλληλουχία. Αυτή η παράλειψη δεν θα προκαλέσει πρόβλημα στο κύτταρο εκτός αν γίνει σε περιοχή που εκφράζεται στο συγκεκριμένο κύτταρο. Το c-NHEJ, λοιπόν, καταστέλλει την γονιδιακή αστάθεια και τις χρωμοσωμικές ανωμαλίες εις βάρος, στατιστικά, της αλληλουχίας. [16, 51]

3.8.6 Εφεδρική Μη Ομόλογη Ένωση Άκρων (Backup-NHEJ – B-NHEJ)

Δεν είναι απόλυτα ξεκάθαρος ο διαχωρισμός των υπόλοιπων μονοπατιών. Η περιγραφή απλοποιείται ορίζοντας ως Εφεδρική Μη Ομόλογη Ένωση Άκρων (Backup-NHEJ, B-NHEJ) τα μονοπάτια που αποκλίνουν από την c-NHEJ. Συνήθως χρησιμοποιούν μικρά τμήματα ομολογίας. [51, 54]

Το B-NHEJ μπορεί να λειτουργήσει απουσία των Ku, RAD51, BRCA2, Lig4 αλλά χρειάζεται αναγκαστικά μερικά ένζυμα όπως την ATM, το MRN, κάποια από τις πολυμεράσες Polθ, Polδ ή Polε, CtIP, PARP1, την FEN1 και την LigI ή την LigIII. Εκθέτει ή σχηματίζει μικρά τμήματα ομολογίας και μετά συνδέει με τη βοήθειά τους τα άκρα της βλάβης. [54]

Το B-NHEJ, όπως προδίδει το όνομά του, είναι η τελευταία επιλογή του κυττάρου. Δουλεύει πιο αργά από το c-NHEJ και πιο άτσαλα από το HR. Το κύτταρο δίνει προτεραιότητα στο c-NHEJ, έπειτα στο HR και τελικώς στο B-NHEJ. Όταν τα συστατικά του c-NHEJ είναι παρόντα, το B-NHEJ αποφεύγεται, χάρη στο ετεροδιμερές Ku, το οποίο βρίσκεται σε αφθονία στα ανθρώπινα κύτταρα και συνεισφέρει στην επιλογή του c-NHEJ. Όταν, ωστόσο, λείπουν ουσιώδεις παράγοντες του c-NHEJ, το B-NHEJ δίνει τις καλύτερες ελπίδες στο κύτταρο να επιβιώσει. [47, 54]

Είναι το μονοπάτι με τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης μεταλλάξεων και, λόγω της αργής επιδιόρθωσης, έχει μεγάλη συχνότητα εμφάνισης χρωμοσωμικών ανωμαλιών, κάτι που γίνεται ξεκάθαρο σε πειράματα με κύτταρα που δεν μπορούν να ακολουθήσουν το c-NHEJ. Όταν χρησιμοποιείται στον ανασυνδυασμό V(D)J και στον CSR στα λευκά αιμοσφαίρια που επιδιορθώνουν σχεδόν αποκλειστικά με το c-NHEJ τις προγραμματισμέ-νες βλάβες τους προκαλεί μεγάλο αριθμό σφαλμάτων. [16, 47, 51, 54]

Κεφάλαιο 4. Ο ρόλος της γH2AX στην ανίχνευση των δίκλωνων θραύσεων

4.1 Περισσότερα για την γH2AX

4.1.1 Χημεία της H2AX

Η H2AX ανήκει στην οικογένεια των ιστόνων H2A. Είναι μία πρωτεΐνη με 143 αμινοξέα και εμφανίζεται στα ανθρώπινα κύτταρα με διαφορετική συχνότητα ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο. Σε σχέση με την H2A εμφανίζεται σε ποσοστό από 2% ως και 25%. Στην **Εικόνα 4.1** παρουσιάζεται η H2AX με κάποιες χαρακτηριστικές περιοχές της.[6]



Εικόνα 4.1: Η ιστόνη H2AX και μερικές βασικές PTMs: Ακετυλίωση στη Λυσίνη-5, Φωσφορυλίωση στη Θρεονίνη-121, Σερίνη-140, Τυροσίνη-143 και ουβικιτίνωση στη Λυσίνη-120. [i3]

Η φωσφορυλιωμένη H2AX στην Σερίνη-140 ονομάζεται γH2AX και έχει σημαντικό ρόλο στην επιδιόρθωση. Το μοτίβο SQ έχει διατηρηθεί κατά τη διαδικασία της εξέλιξης των ειδών, γεγονός που δείχνει τη σπουδαιότητά του. Μόρια που έχουν δύο διαδοχικές δομές BRCT⁵ μπορούν να προσδεθούν στην φωσφορυλιωμένη Σερίνη της γH2AX. Αρκετές επιδιορθωτικές πρωτεΐνες, όπως η 53BP1, έχουν διαδοχικές δομές BRCT. [6, 55]

4.1.2 Συμμετοχή των εστιών γH2AX στην απόκριση στη βλάβη DNA

Η γH2AX έχει ρόλο στη σηματοδότηση της βλάβης και παίρνει μέρος στην επιδιόρθωση ενεργά. Επεκτείνεται σε μεγάλες περιοχές της χρωματίνης, που μπορούν να απεικονιστούν με μικροσκοπία ανοσοφθορισμού. Οι περιοχές που φαίνονται στο μικροσκόπιο ονομάζονται εστίες γH2AX (γH2AX foci) και προσελκύουν αναδιαμορφωτές της χρωματίνης (όπως NuA4, Ipo80, SWR) και επιδιορθωτικά ένζυμα (NBS1, 53BP1, MDC1). Τα ένζυμα αυτά παίρνουν μέρος σε όλα τα βήματα που έχουν αναλυθεί στο Κεφάλαιο 3. [55]

Η φωσφορυλίωσή γίνεται από τις Κινάσες (ATM, ATR, DNA-PKcs) και οι αποφωσφο-ρυλιώσεις από τις Φωσφατάσες.

Το σύμπλοκο MRN αλληλεπιδρά με την ATM και την MDC1. Η ATM πρέπει να φωσφορυλιωθεί για να ενεργοποιηθεί, αυτό μπορεί να το κάνει μόνη της (αυτοφωσφορυλίωση) ή μέσω της MDC1 να την φωσφορυλιώσει η CK2. Στην συνέχεια η ATM φωσφορυλιώνει την γH2AX.

Μετά την πρώτη φωσφορυλίωση η διάδοση της σηματοδότησης μέσω της γH2AX γίνεται με μία επαναλαμβανόμενη διαδικασία θετικής ανάδρασης. Το σύμπλοκο MRN είναι ο αρχικός αισθητήρας και τελεστής. Αλληλεπιδρά με την ATM και την MDC1. Η MDC1 προσδέεται στην γH2AX και η NBS1, που είναι συστατικό του συμπλόκου MRN, δένεται με την MDC1. Η ATM πρέπει να φωσφορυλιωθεί για να ενεργοποιηθεί. Αυτό γίνεται με δύο τρόπους. Μπορεί να

⁵ αλληλουχία μερικών εκατοντάδων αμινοξέων που υπάρχει σε αρκετές πρωτεΐνες επιδιόρθωσης και αλληλεπιδρούν με φωσφορυλιωμένες περιοχές

αυτοφωσφορυλιωθεί ή να φωσφορυλιωθεί από την CK2 μέσω της MDC1. Μετά η ATM φωσφορυλιώνει την H2AX, στην γH2AX που σχηματίζεται προσδένεται η MDC1, στην οποία δένεται η NBS1 που σχηματίζει το MRN και η διαδικασία της θετικής ανάδρασης προχωράει σε μία μεγάλη έκταση της χρωματίνης. [6, 47, 55]

Αυτές οι εστίες όταν προκαλούνται από ιονίζουσα ακτινοβολία ονομάζονται IRIF (Ionizing Radiation Induced Foci). Έχει υπολογιστεί πειραματικά ότι κάθε DSB προκαλεί φωσφορυλίωση περίπου στο 0.03% των H2AX του πυρήνα. Ακόμη, αν ληφθεί υπόψη πως το ποσοστό των H2AX στις H2A είναι περίπου 10%, περιμένει κανείς να εντοπίσει στο πείραμα εστίες σε έκταση 2 Mbp της χρωματίνης. Όμως η έκταση των εστιών που παρατηρείται είναι περίπου 30 Mbp, κάτι που υποδεικνύει πως σε μία εστία δεν φωσφορυλιώνονται όλα τα μόρια H2AX. [6]

Η αποφωσφορυλίωση μπορεί να γίνει με δύο τρόπους. Μπορεί να γίνει *in situ*, με φωσφατάσες, όπως την PP2A και την PP4 που θα αφαιρέσουν την φωσφορική ομάδα από την ιστόνη. Ακόμη μπορεί η ιστόνη να αφαιρεθεί από ένζυμα, τα οποία αφαιρούν το διμερές γH2AX-H2B και το αντικαθιστούν με άλλο H2A-H2B. Αυτό γίνεται από ένζυμα που ονομάζονται συνοδοί ιστόνων (όπως η FACT και η PPCγ) και οδηγούν την φωσφορυλιωμένη ιστόνη σε άλλη περιοχή για να αποφωσφορυλιωθεί. [6, 55]

Η κατανομή της ιστόνης H2AX στο γονιδίωμα είναι ομοιογενής κατά περιοχές αλλά αυτές οι περιοχές δεν είναι ομοιογενείς στον πυρήνα, υποδηλώνοντας περιοχές επιδιόρθωσης. Οι εστίες αναπτύσσονται σταδιακά και μεγιστοποιούνται περίπου 30 λεπτά μετά την DSB και αρχίζουν να μειώνονται σε έκταση μέχρι να εξαφανιστούν μετά την επιδιόρθωση. Σε πολλούς κυτταρικούς τύπους έχει υπολογιστεί πως είναι 2-7 ώρες. Βεβαίως, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, την διαδικασία της επιδιόρθωσης και ασθένειες που αφορούν ένζυμά της (AT, Werner Syndrome) μπορεί να έχουν πολύ διαφορετικά αποτελέσματα. Όταν η πηγή των βλαβών είναι η ιονίζουσα ακτινοβολία, τότε παίζουν ακόμη ρόλο η δόση και ο τύπος της ακτινοβολίας, η ακτινοευαισθησία του ασθενούς, η κλασματοποίηση και ο χρόνος από την έκθεση της ακτινοβολίας ως την ανάλυση. [8, 55, 56]

Η εμφάνιση εστιών γH2AX επηρεάζεται από τον κυτταρικό κύκλο. Στη φάση S το DNA διπλασιάζεται και υπάρχει το στρες διπλασιασμού, ενώ στη φάση G2 το κύτταρο έχει διπλάσιο DNA από την φάση G1 και εμφανίζει διπλάσιο αριθμό εστιών. [56]

Οι εστίες γH2AX χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Τις παροδικές και τις παραμένουσες. Οι παροδικές οπτικοποιούν δίκλωνες θραύσεις οι οποίες πρόκειται να διορθωθούν σύντομα από το μονοπάτι NHEJ (περίπου 80%), ενώ οι παραμένουσες (περίπου 20%) μπορεί να μείνουν για χρονικά διαστήματα που μπορεί να φτάσουν τους μήνες. Είναι ενδεικτικές μη επιδιορθωμένης DSB, αργής επιδιόρθωσης, γηρασμού, απόπτωσης ή μπορεί να βρίσκονται στα τελομερή (βλ K4.1.3). [8]

Οι επιμένουσες βλάβες είναι σημαντικές για τις μελέτες της επιδιόρθωσης και όχι μόνο. Μπορούν, επίσης, να αποτελέσουν βιοδείκτες για ανίχνευση ακτινοευαίσθητων ατόμων που έχουν υψηλότερο ρίσκο εμφάνισης δυσμενών συνεπειών σε ακτινοθεραπεία ή χημειοθεραπεία. [8]

4.1.3 Άλλες περιπτώσεις εμφάνισης-απουσίας γH2AX

Οι εστίες γH2AX έχει φανεί ως τώρα πως αφορούν δίκλωνες θραύσεις και η κινητική τους έχει περιγραφεί. Όμως η ερμηνεία πειραματικών αποτελεσμάτων που αφορά τα επίπεδα γH2AX στον πυρήνα ή τις αντίστοιχες εστίες έχει αρκετούς επιπλέον παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη. Οι κυριότεροι από αυτούς θα περιγραφούν εδώ.

Η περιοχή της βλάβης (ετεροχρωματίνη/ευχρωματίνη) και η φάση του κυτταρικού κύκλου (G0, G1, S, G2) έχει σημασία, όπως έχει περιγραφεί στο Κεφάλαιο 3. Όταν η βλάβη γίνεται σε περιοχή κοντά σε εκφραζόμενο γονίδιο (<4kbp) τότε δεν εμφανίζονται εστίες γH2AX, η επιδιόρθωση γίνεται αθόρυβα ως προς αυτόν τον παράγοντα. [8, 47]

Η φωσφορυλίωση της γH2AX δεν είναι πάντα αποτέλεσμα βλάβης, αφού μπορεί να γίνει και για άλλους λόγους, εστίες, όμως, σχηματίζονται μόνο κατόπιν βλάβης. Υψηλότερα επίπεδα γH2AX παρουσιάζονται σε ινοβλάστες που παθαίνουν γηρασμό[1.10] και σε ασθενείς με χρόνια φλεγμονή[57]. Γενικά έχουν συσχετιστεί θετικά τα υψηλά επίπεδα γH2AX και μεγαλύτερο ποσοστό παραμενουσών εστιών γH2AX με τη γήρανση και τον γηρασμό(βλ 2.9), καθώς και με ασθένειες που προκαλούν επιταχυνόμενη γήρανση (Alzheimer, Werner, καρκίνος,...)[8, 56]. Στα τελομερή εμφανίζονται σταδιακά με το χρόνο. Οι βλάβες στα τελομερή, και ως εκ τούτου οι εστίες γH2AX, διατηρούνται στον πυρήνα, καθώς η Σελτερίνη τα προστατεύει από τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς[8].

Η απόπτωση προκαλεί εκτενή φωσφορυλίωση της H2AX σε όλον τον πυρήνα. Άρα η φωσφορυλίωση σε όλον τον πυρήνα είναι ενδεικτική της απόπτωσης, αλλά όχι αποκλειστική. Η ομάδα του S. Horn ακτινοβόλησε με σωματία- LET 135KeV/μm και παρατήρησε ολόκληρους πυρήνες με φωσφορυλιωμένη την H2AX. Ωστόσο επιπλέον ενζυματική ανάλυση έδειξε πως το κύτταρο συνέχισε να ζει και να λειτουργεί, οπότε δεν ήταν σε απόπτωση. [58]

Υπάρχουν γενετικές ασθένειες που επηρεάζουν την απόκριση του κυτταρικού κύκλου στις DSB. Μέσα σε αυτές περιλαμβάνεται η αταξία τηλεαγγειεκτασία (Ataxia Telangiectasia – AT) στην οποία είναι μεταλλαγμένη η ATM, το σύνδρομο Nijmegen (Nijmegen Breakage Syndrome) στο οποίο είναι μεταλλαγμένη η NBS1, και άλλες. Ανάλογα με την αδυναμία τους, πλήττεται η ικανότητα των κυττάρων να δημιουργούν, να επεκτείνουν ή να εξαφανίζουν τις εστίες γH2AX, ενώ στα συμπτώματά τους συμπεριλαμβάνονται η ελαττωματική επιδιόρθωση των βλαβών, η υπερευαισθησία στην ακτινοβολία και την χημειοθεραπεία και η χρωμοσωμική αστάθεια, όπως παρουσιάστηκε σε πειράματα που η H2AX δεν εκφράζεται. [49, 55, 59]

4.2 Μέθοδοι μέτρησης των δίκλωνων θραύσεων

Η ανίχνευση των βλαβών DNA, είτε πρόκειται για οξειδωτικές βλάβες, είτε για ομαδοποιημένες βλάβες και δίκλωνες θραύσεις, γινόταν με ηλεκτροφορητικές μεθόδους. Ακόμη θα παρουσιαστεί η δοκιμή γH2AX που χρησιμεύει αποκλειστικά στην ανίχνευση δίκλωνων θραύσεων, οι οποίες υποδηλώνουν και προϋπάρχουσες ομαδοποιημένες αλλοιώσεις.

4.2.1 Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση εκμεταλλεύεται το αρνητικό φορτίο του DNA. Το DNA που πρόκειται να μελετηθεί μπαίνει σε πήκτωμα αγαρόζης και του εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο. Τα διαφορετικά θραύσματα που έχουν προκύψει μετά τις βλάβες κινούνται με διαφορετική ταχύτητα μέσα στο πήκτωμα. Τα μεγαλύτερα κομμάτια δυσκολεύονται να κινηθούν ενώ τα μικρότερα είναι πιο ευκίνητα. Η πρώτη από τις θέσεις στο πήκτωμα χρησιμοποιείται ως κλίμακα για να βοηθήσει στο μέτρημα των τμημάτων DNA. Το πρωτόκολλο της Ηλεκτροφόρησης Πηκτώματος Αγαρόζης (Agarose Gel Electrophoresis –AGE) έχει τρία βήματα. Αρχικά προετοιμάζεται το πήκτωμα με συγκεντρώσεις κατάλληλες για το μέγεθος των τμημάτων DNA που θα μετρηθούν. Μετά φορτώνεται το δείγμα στα μικρά πηγάδια στο πήκτωμα και εφαρμόζεται η διαφορά δυναμικού για κάποιο χρονικό διάστημα ώστε να γίνει ο διαχωρισμός. Τέλος, απεικονίζεται το αποτέλεσμα, αν έχει χρησιμοποιηθεί το βρωμιούχο αιθίδιο, τότε απεικονίζεται ευθέως με υπεριώδη ακτινοβολία.[60]

Υπάρχουν παραλλαγές, ανάμεσα στις οποίες επιλέγει ο ερευνητής την κατάλληλη για το πείραμά του.

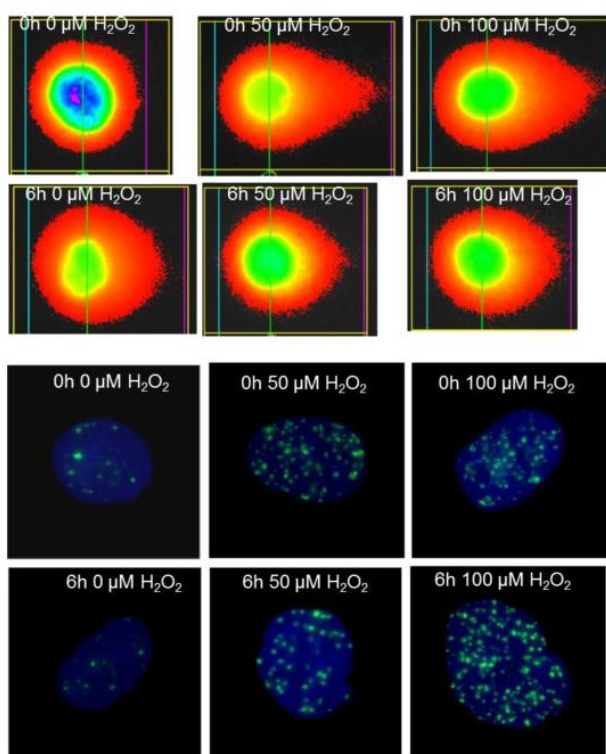
Μπορεί να επιλέξει αλκαλικές αντί για ουδέτερες συνθήκες, ώστε να ανοίξει η διπλή έλικα. Σε αυτήν την περίπτωση μετράει, όχι μόνο δίκλωνες θραύσεις, αλλά και μονόκλωνες θραύσεις. Αν στο μείγμα του DNA βάλει και ενδονουκλεάσες που στοχεύουν και κόβουν οξειδωτικές βλάβες βάσεων, τότε θα μπορέσει να μετρήσει όλες τις δίκλωνες, μονόκλωνες θραύσεις και οξειδωτικές βλάβες. [60]

Για μικρά τμήματα DNA (από 500bp ως 25000bp) χρησιμοποιείται η κλασική Ηλεκτροφόρηση Πηκτώματος Αγαρόζης Σταθερού Πεδίου (Constant Field Gel

Electrophoresis – CFGE), για μεγαλύτερα τμήματα χρησιμοποιείται η Ηλεκτροφόρηση Πηκτώματος με Παλμικό Πεδίο (Pulsed-Field Gel Electrophoresis – PFGE). Όταν πρέπει να μετρηθούν οι βλάβες σε ένα μόνο κύτταρο, χρησιμοποιείται η Ηλεκτροφόρηση Πηκτώματος Ενός Κυττάρου (Single Cell Gel Electrophoresis – SCGE) στην οποία το κύτταρο τοποθετείται στο πήκτωμα και, μετά από την αποδόμηση των μεμβρανών του υπό αλκαλικές ή ουδέτερες συνθήκες, δέχεται την εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου. Ονομάζεται και Δοκιμασία Comet (Comet Assay) λόγω της εικόνας που προκύπτει. Το αποτέλεσμα της δοκιμασίας Comet φαίνεται στην **Εικόνα 4.2**. [56, 61]

4.2.2 Δοκιμές γH2AX

Περιλαμβάνει τεχνικές που έχουν στο επίκεντρο την ανίχνευση της γH2AX με αντισώματα. Μερικές τεχνικές που ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία είναι η δοκιμασία ELISA, η Western Blot (ή ανοσοκηλίδωση), (Fluorescence Activated Cell Sorting – FACS), η κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry – FC) και, φυσικά, η τεχνική που αναλύεται στο πειραματικό μέρος της εργασίας, η

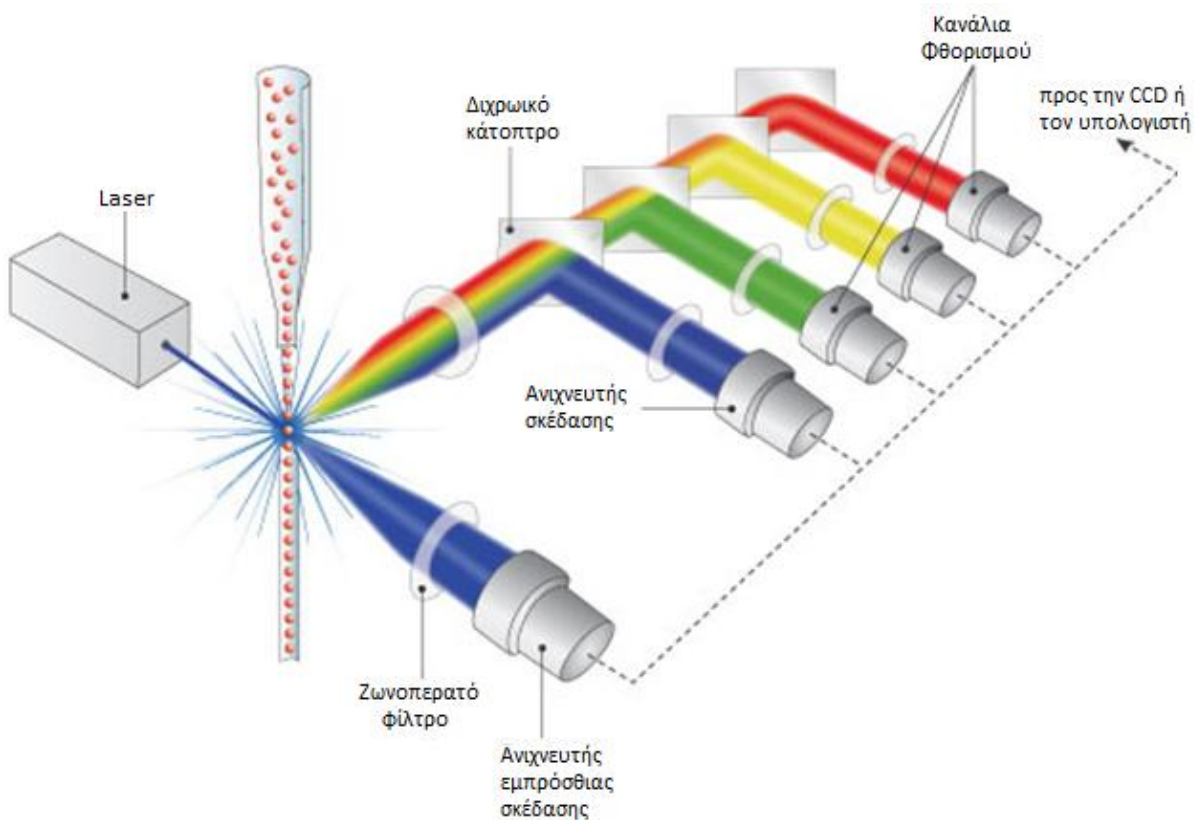


Εικόνα 4.2: Δοκιμασία Comet (πάνω και δοκιμασία εστιών γH2AX (κάτω)[4.15])

μικροσκοπία ανοσοφθορισμού. Εδώ θα αναλυθούν η κυτταρομετρία ροής και η μικροσκοπία ανοσοφθορισμού. Έχουν μεγαλύτερη ακρίβεια από την ηλεκτροφόρηση, χρειάζονται λιγότερα κύτταρα για να βγάλουν συμπέρασμα και είναι πιο ευαίσθητες. Το βασικό ελάττωμά τους είναι πως δεν μετρούν τις βλάβες άμεσα, όπως οι ηλεκτροφορήσεις, αλλά έμμεσα, υπολογίζοντας τις συνέπειές τους, που είναι οι γΗ2ΑΧ. Ακόμη δεν μετρούν άλλα είδη βλαβών. [56, 59, 62]

4.2.3 Κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιείται για την εκτίμηση των δίκλωνων θραύσεων στο DNA. Παρουσιάζεται στην **Εικόνα 4.3**. Τα κύτταρα περνούν μπροστά από το laser που τα διεγείρει και το σήμα που εκπέμπεται από τις διάφορες φθορίζουσες βαφές που έχουν χρησιμοποιηθεί για να βαφούν τα μόρια περνάει για ανάλυση. Η τεχνική μπορεί να παραθέσει πολλούς ανιχνευτές και να μελετήσει, έτσι, ταυτόχρονα πολλές διαφορετικές επισημασμένες πρωτεΐνες, μετρώντας την ένταση φθορισμού τους. Μία από αυτές θα είναι η γΗ2ΑΧ στη συγκεκριμένη περίπτωση, μία άλλη είναι το DAPI που χρησιμοποιείται για να χρωματίσει το DNA. Είναι μία πολύ γρήγορη τεχνική που μετράει τα επίπεδα της γΗ2ΑΧ, μπορεί να ξεχωρίσει τη φάση του κυτταρικού κύκλου βάσει της έντασης του DAPI (G1 και G2 κυρίως. Η φάση S, επειδή δεν είναι ξεκάθαρη η αρχή και το τέλος της, ίσως να μην διακριθεί σωστά). Μπορεί να αναλύσει μεγάλο αριθμό κυττάρων με μεγάλη ταχύτητα και ταυτόχρονα να εκτιμήσει τα επίπεδα και άλλων πρωτεϊνών. [56, 62]

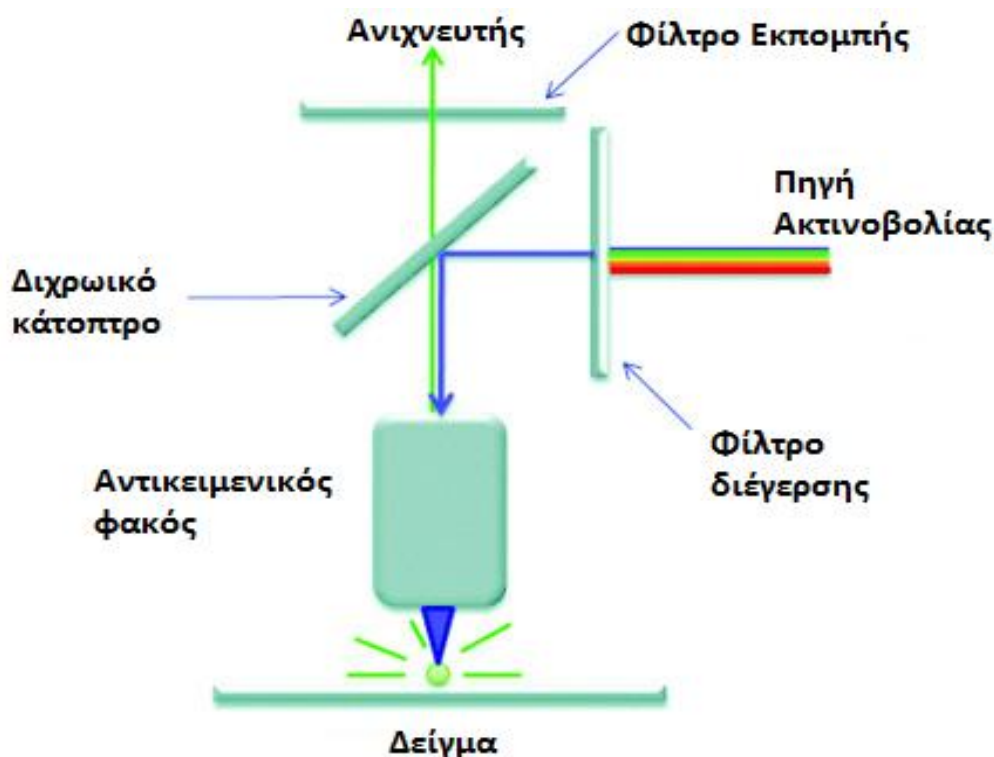


Εικόνα 4.3: Πειραματική διάταξη της κυτταρομετρίας ροής. [i10]

Η ένταση της γΗ2ΑΧ δεν μπορεί να εκφραστεί άμεσα σε αριθμό βλαβών, μόνο μετά από ανάλυση όταν συγκριθεί με τα κύτταρα ελέγχου. Μάλιστα, επειδή κάθε κυτταρικός τύπος έχει διαφορετική ένταση υποβάθρου, η συσχέτιση που προαναφέρθηκε εξαρτάται και από αυτόν τον παράγοντα. Γενικά καλό είναι να συγχρονιστούν τα κύτταρα σε μία φάση για να μειωθούν τα περιθώρια σφάλματος λόγω διαφορετικού κυτταρικού κύκλου. Στην μίτωση παρατηρείται ένταση πέντε φορές μεγαλύτερη από την G1 και στα κύτταρα σε απόπτωση είναι 5-10 φορές μεγαλύτερη. Στην φάση S είναι περίπου 3 φορές μεγαλύτερη η ένταση υποβάθρου. Στο DAPI ένταση στην G2 είναι διπλάσια από ότι στην G1 αφού το DNA είναι διπλασιασμένο. [62]

4.2.4 Μικροσκοπία ανοσοφθορισμού

Αυτή η τεχνική μικροσκοπίας περιλαμβάνει χρήση φθορίζουσών βαφών οι οποίες συνδέονται μέσω αντισωμάτων με τις πρωτεΐνες που πρόκειται να μελετηθούν. Έχουν κατασκευαστεί αντιγόνα που συνδέονται με την γΗ2ΑΧ αναγνωρίζοντας τα τελευταία 9 αμινοξέα της. Κατόπιν, ένα δεύτερο αντίσωμα που φέρει μία φθορίζουσα ουσία συνδέεται με αυτό το πρώτο αντίσωμα. Δε θα αναλυθούν εδώ τα πρωτόκολλα, σχολιάζονται στο Κεφάλαιο 7 πιο αναλυτικά. Σε αυτό το σημείο αρκεί να γίνει σαφές πως μία διεγείρουσα ακτινοβολία προκαλεί τον φθορισμό των φθορίζουσών πρωτεϊνών ο οποίος καταγράφεται από κάμερα ή παρατηρείται με το μάτι. [8, 62]



Εικόνα 4.4: Διάταξη Μικροσκοπίας φθορισμού [i3]

Η μικροσκοπία ανοσοφθορισμού δίνει τη δυνατότητα να μελετηθούν ξεχωριστά οι εστίες γΗ2ΑΧ. Στην **Εικόνα 4.2** παρατηρούνται οι εστίες γΗ2ΑΧ που δημιουργούνται από διαφορετικές

συγκεντρώσεις του H₂O₂. Είναι πολύ ευαίσθητη τεχνική που μπορεί να εντοπίσει βλάβες από δόσεις ως και 0.02Gy, μπορεί να αναλύσει ξεχωριστά τις εστίες, είτε με το μάτι είτε με κατάλληλα προγράμματα. Για δόσεις μεγαλύτερες από 10 Gy αρχίζουν να εμφανίζονται προβλήματα στην ανάλυση λόγω της αλληλοεπικάλυψη εστιών. Πάλι το DAPI μπορεί να λειτουργήσει ως χρωστική για το DNA και δίνει χρήσιμες πληροφορίες. [8, 56, 62]

Η καταμέτρηση των εστιών μπορεί να γίνει είτε με το μάτι είτε με προγράμματα ανάλυσης εικόνας. Στην πρώτη περίπτωση η μόνη μεταβλητή που υπολογίζεται είναι ο αριθμός των εστιών και είναι μία διαδικασία που θέλει χρόνο ακόμη και για κάποιον έμπειρο αναλυτή. Στην δεύτερη εξαρτάται από την ποιότητα του προγράμματος, των εικόνων και, της ανάλυσης. [59]

4.2.5 Σύγκριση Κυτταρομετρίας Ροής και Μικροσκοπίας Ανοσοφθορισμού

Οι δύο τεχνικές έχουν χαρακτηριστικές διαφορές μεταξύ τους. Αρχικά, στην μικροσκοπία μετρώνται foci ενώ στην κυτταρομετρία ροής υπολογίζεται μόνο η ένταση από το φθορισμό της γH2AX, με αποτέλεσμα να χρησιμοποιούνται μεταβλητές όπως 'αριθμός κυττάρων θετικών στη γH2AX όταν δεν μπορεί να γίνει συσχέτιση έντασης-αριθμού βλαβών.[8, 56]

Η ευαισθησία και η εξειδίκευση της μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού είναι μεγαλύτερη από εκείνη της κυτταρομετρίας ροής. Επιπλέον επιτρέπει την ανάλυση περισσότερων μεταβλητών σχετικών με την γH2AX από όσων η κυτταρομετρία ροής. Ακόμη μπορεί να αναλύσει περισσότερους τύπους δειγμάτων, γιατί η κυτταρομετρία ροής μπορεί να αναλύσει μόνο μεμονωμένα κύτταρα και όχι ιστούς. Η κυτταρομετρία ροής είναι πολύ γρηγορότερη από την μικροσκοπία. Γενικά, η χρήση και των δύο τεχνικών έχει κριθεί κατάλληλη για να πάρει ληφθούν όσες πληροφορίες γίνεται για την γH2AX. [61, 56, 63]

4.2.6 Σύγκριση Ηλεκτροφόρησης και Μεθόδου γH2AX

Οι δύο γενικότερες αυτές κατηγορίες τεχνικών έχουν διαφορές.

Η ηλεκτροφόρηση υπολογίζει άμεσα τις βλάβες (δίκλωνες και μονόκλωνες θραύσεις, οξειδωμένες βάσεις, σταυροδεσμούς) μετρώντας τα θραύσματα DNA που προκύπτουν μετά την ακτινοβολία. Η μέθοδος γH2AX αναλύει τη συγκεκριμένη μετα-μεταφραστική τροποποίηση, η οποία, όμως, είναι συνέπεια βλαβών. Συνδέεται με τις δίκλωνες θραύσεις, την παύση της αντιγραφής και την απόπτωση, αλλά έμμεσα. Έτσι η ερμηνεία των αποτελεσμάτων της μεθόδου γH2AX μπορεί να χρειαστεί περισσότερη δουλειά. Η ηλεκτροφόρηση, λοιπόν, είναι πιο ευέλικτη, ως προς τον τύπο της βλάβης που θα ανιχνευτεί, από ό, τι η μέθοδος γH2AX που μπορεί να μετρήσει τις δίκλωνες θραύσεις μόνο. [61,63]

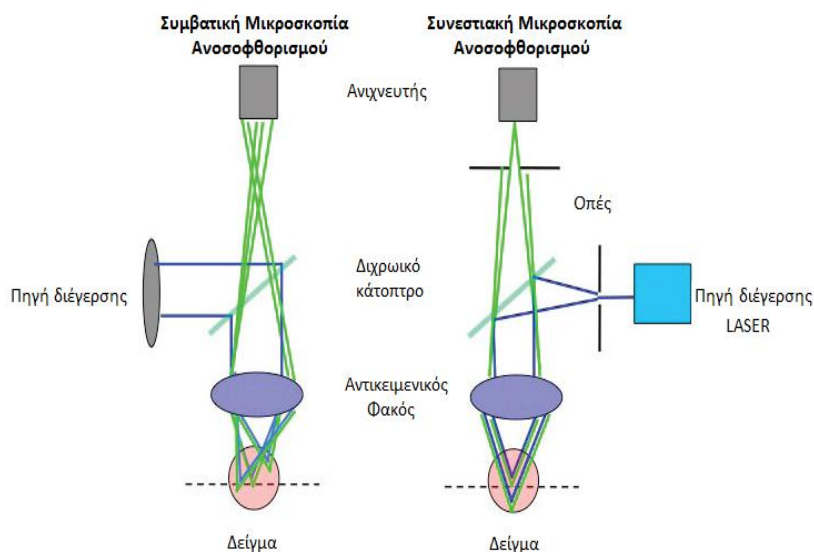
Η ηλεκτροφόρηση δεν έχει καλή ευαισθησία για την ανίχνευση δίκλωνων θραύσεων, γιατί χρειάζεται μεγάλο αριθμό δίκλωνων θραύσεων ανά κύτταρο για να δώσει ακριβή αποτελέσματα. Αυτό σημαίνει ότι σε πειράματα που χρησιμοποιείται ηλεκτροφόρηση χρειάζονται συχνά μεγάλες δόσεις που ξεφεύγουν από τα συνήθη επίπεδα ενδοαφέροντος για ιατρικές εφαρμογές. Αντίθετα, η μέθοδος γH2AX είναι πολύ πιο ευαίσθητη, ανιχνεύοντας ως και 0,1 βλάβες ανά κύτταρο και μπορεί να εκτιμήσει βλάβες ακόμη και για δόσεις κοντά στα 0,05Gy.[62,64]

Επιπλέον, η ηλεκτροφόρηση είναι αρκετά χρονοβόρα διαδικασία, ενώ υπάρχουν μέθοδοι γΗ2ΑΧ, όπως η κυτταρομετρία ροής, που είναι πολύ γρήγορες. [62]

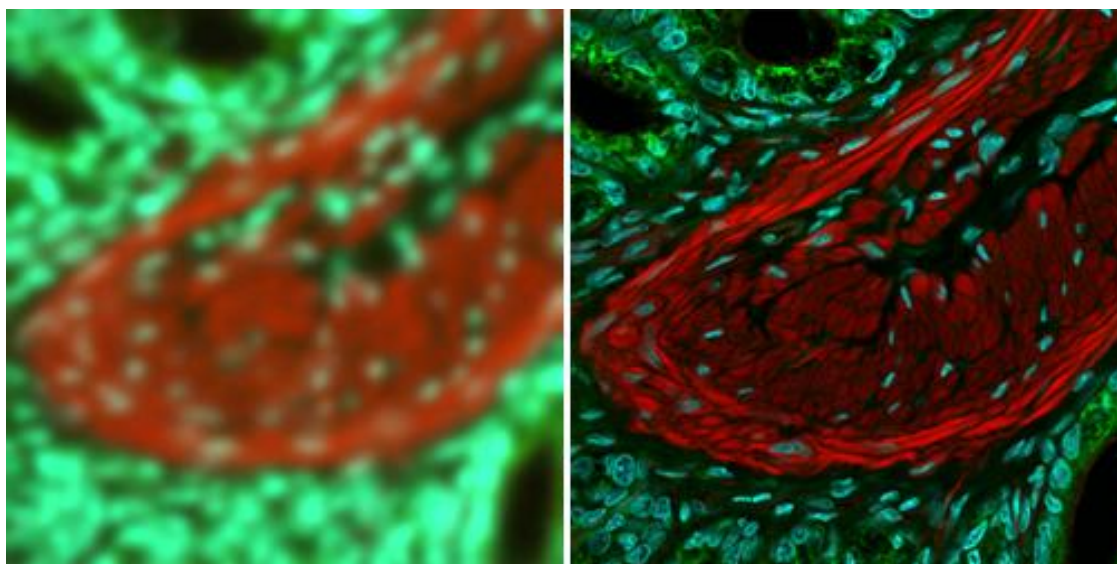
4.3 Συνεστιακή μικροσκοπία ανοσοφθορισμού (Confocal Immunofluorescence Microscopy)

Η βασική ιδέα της μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού είναι αρκετά γενική ώστε να επιδέχεται αρκετές τροποποιήσεις και βελτιώσεις ανάλογα με τις δυνατότητες του εργαστηρίου και τις απαιτήσεις του πειράματος.

Μία τροποποίηση που αξίζει να σημειωθεί είναι η συνεστιακή μικροσκοπία ανοσοφθορισμού. Στην συμβατική μικροσκοπία η πηγή φωτός προκαλεί φθορισμό σε όλο το βάθος του δείγματος, όχι μόνο στο επίπεδο εστίασης. Έτσι η ανάλυση της εικόνας μειώνεται, αφού ο ανιχνευτής δέχεται σήμα τόσο από το επίπεδο εστίασης όσο και από τα υπόλοιπα επίπεδα που φθορίζουν και είναι εκτός εστίασης.



Εικόνα 4.5: Διάταξη της συμβατικής και της συνεστιακής μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού. [i11]



Εικόνα 4.6: Σύγκριση ανάλυσης μεταξύ της συμβατικής μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού και συνεστιακής μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού [i12]

Αντίθετα, η συνεστιακή μικροσκοπία ανοσοφθορισμού χρησιμοποιεί δύο οπές. Μία οπή μετά την πηγή για να επιλέξει το επίπεδο εστίασης και μία πριν από τον ανιχνευτή για την ανίχνευση φθορισμού μόνο από τον μικρό όγκο εντός της περιοχής εστίασης, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 4.5**. Έτσι, τα μη εστιασμένα επίπεδα δεν επηρεάζουν την εικόνα, γιατί είναι ελάχιστη η

συνεισφορά τους μέσα από την οπή. Το σημείο εστίασης μετά κινείται σε όλη την έκταση του δείγματος, και έτσι 'χτίζεται' όλη η εικόνα κομμάτι-κομμάτι με υψηλή ανάλυση. [64]

Η διαφορά της ποιότητας της εικόνας είναι εμφανής στην Εικόνα 4.6, οπότε αν υπάρχει η δυνατότητα, η συνεστιακή μικροσκοπία συνίσταται.

4.4 Μέθοδος γΗ2ΑΧ και καρκίνος

Παθολογικές καταστάσεις, όπως ο καρκίνος, μπορούν να εκτιμηθούν σε κάποιο βαθμό με την μέθοδο γΗ2ΑΧ. Μπορεί να είναι δύσκολη η βιοψία ιστού από καρκινικούς όγκους, αλλά συχνά στον καρκίνο υπάρχουν παθολογικά κύτταρα που κυκλοφορούν στο αίμα και ονομάζονται κυκλοφορικά ογκικά κύτταρα (Circulating Tumor Cells – CTC). Είναι περίπου 1-10 ανά 7,5ml αίματος και μπορούν να απομονωθούν και να μελετηθούν ως προς τα υψηλότερα επίπεδα της γΗ2ΑΧ [66]. Η γΗ2ΑΧ εμφανίζονται επίσης και σε προκαρκινικούς ιστούς, μελάνωμα, καρκίνο του παχέως εντέρου και πολλές άλλες παρόμοιες περιπτώσεις, κάνοντας την γΗ2ΑΧ πιθανό βιοδείκτη για την εκτίμηση καρκινικών ασθενειών στα αρχικά στάδιά τους. Λόγω των πολλών πιθανών ερμηνειών που μπορούν να δοθούν στην φωσφορυλίωση της γΗ2ΑΧ, πρέπει να ληφθούν και άλλοι παράγοντες υπόψη, όπως η μορφολογία τους (με μικροσκοπία ανοσοφθορισμού, αφού η κυτταρομετρία ροής δεν δίνει τέτοια στοιχεία), το ιστορικό των ασθενών και η ηλικία. [56, 63]

Η ακτινοευαισθησία, η ευπάθεια, δηλαδή, στις ιοντίζουσες ακτινοβολίες, είναι μία ιδιότητα που έχουν οργανισμοί με γενετικά προβλήματα στην έκφραση επιδιορθωτικών παραγόντων (όπως ATM, NBS1). Είναι, όμως, ιδιότητα που μπορεί να έχει και επίκτητο χαρακτήρα, να εμφανιστεί δηλαδή λόγω κάποιων εξωτερικών παραγόντων χωρίς να υπάρχει γενετική προδιάθεση. Γενικά, η απόκριση της γΗ2ΑΧ και η εμμονή των εστιών αρκετό καιρό μετά την έκθεση μπορεί να είναι ενδεικτική της ακτινοευαισθησίας. Επειδή η ακτινοθεραπεία είναι πολύ σημαντικό εργαλείο, είναι χρήσιμο να εντοπίζονται οι πιο ακτινοευαίσθητοι ασθενείς, ώστε να προσαρμόζονται τα θεραπευτικά πρωτόκολλα στην ιδιαιτερότητα αυτή και να αποφεύγονται οι δυσάρεστες παρενέργειες της ακτινοβολίας.[56, 59]

4.5 Βιοδοσιμετρία

Η βιοδοσιμετρία είναι η μέτρηση βιολογικών δεικτών που μπορούν να συσχετιστούν ποσοτικά με τη δόση ακτινοβολίας που έχει δεχτεί ο οργανισμός. Στον τομέα της βιοδοσιμετρίας υπάρχει έντονο ενδιαφέρον για όποια πηγή ακτινοβολίας μπορεί να έχει συνέπειες στον οργανισμό. Μπορεί να πρόκειται για κάποια από τις ελεγχόμενες πηγές που έχουν αναφερθεί ή για ατυχήματα ακτινοβολίας. Είναι σημαντική για την εκτίμηση των μακροπρόθεσμων προβλημάτων υγείας που μπορεί να αντιμετωπίσει ο οργανισμός που δέχτηκε την ακτινοβολία. Πρέπει να σημειωθεί ότι η βιοδοσιμετρία δεν περιλαμβάνει τη μέτρηση της ακτινοβολίας καθ' εαυτής, αλλά περιορίζεται στη μέτρηση των βιολογικών δεικτών που επηρεάζονται από τη δόση. Αφού μετρώνται βιοδείκτες που είναι συνέπειες της ακτινοβολίας, η γΗ2ΑΧ φαίνεται πως ταιριάζει ως επιλογή. [67]

4.5.1 Χρήση της γΗ2ΑΧ στη βιοδοσιμετρία

Μεταξύ των συνηθισμένων πηγών που έχουν αναφερθεί μπορεί να πρόκειται για κάποιο ατύχημα ακτινοβολίας είτε για την υποχρεωτική έκθεση σε ακτινοβολία λόγω θεραπειών ή ως μέρος συγκεκριμένων εξετάσεων (Υπολογιστική Τομογραφία, ακτινογραφίες χ). Η έκθεση μπορεί να γίνει εσωτερικά με ραδιενεργά ισότοπα (¹¹¹In, ¹²⁵I, ²¹³Bi,...) ή εξωτερικά (τυπική

ακτινοθεραπεία). Η γH2AX είναι μία τροποποίηση που μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά στη βιοδοσιμετρία λόγω της γραμμικής συσχέτισης ανάμεσα στην δόση και τις εστίες ή την ένταση των γH2AX. [8, 56]

Πολλές απεικονίσεις χρησιμοποιούν ιοντίζουσα ακτινοβολία. Η έκθεση σε αυτές τις μικρές δόσεις κρίνεται αμελητέα σε σχέση με την ανάγκη της εξέτασης, για αυτό άλλωστε γίνονται αυτές οι εξετάσεις. Τούτο δε σημαίνει πως δεν πρέπει να μελετηθούν. Η ακτινογραφία (ακτίνες-Χ) αποθέτει δόσεις μέχρι 8mSv, η υπολογιστική τομογραφία ως 20mSv και η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων ως 25mSv. Η Διεθνής Επιτροπή Ακτινοπροστασίας (International Commission of Radiation Protection – ICRP) υποδεικνύει τα 20mSv ανά χρόνο για 5 χρόνια, χωρίς να υπερβούν τα 50mSv ανά χρόνο ως ακίνδυνη δόση.[68]

Οργανισμοί των οποίων η απόκριση στην ακτινοβολία είναι ανάλογη με την ανθρώπινη μπορούν να χρησιμεύσουν σε μελέτες βιοδοσιμετρίας. Η μελέτη της κινητικής των εστιών γH2AX σε μέλη της οικογένειας πιθήκων *Macaca Mulatta* έχουν δείξει πολύ κοντινή απόκριση στην ακτινοβολία-γ (από πηγή ραδιενεργού Κοβαλτίου ⁶⁰Co) για δόσεις 0.2-2Gy στα λεμφοκύτταρά τους σε σχέση με τα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα. Το ίδιο ισχύει και για το ρυθμό εξαφάνισης των εστιών μετά από 2 Gy ως και μετά από 48 ώρες. 48 ώρες μετά την ακτινοβολία οι εστίες γH2AX μένουν στο 3% του μεγίστου αριθμού τους. Συμπεραίνεται, έτσι, πως λεμφοκύτταρα της οικογένειας *Macaca Mulatta* είναι εξαιρετικό μοντέλο για την μελέτη της απόκρισης [64]

4.5.2 Εκτίμηση αποτελεσματικότητας θεραπειών με τη μέθοδο γH2AX

Πολλές από τις μεθόδους αντιμετώπισης του καρκίνου στοχεύουν στο να προκαλέσουν πολύπλοκες βλάβες στο DNA των καρκινικών κυττάρων. Έτσι, ακτινοθεραπεία και φάρμακα που έχουν επίδραση αντίστοιχη της ακτινοβολίας επιδέχονται μελέτη με τη μέθοδο γH2AX.

Στη θεραπεία ραδιονουκλιδίων χρησιμοποιούνται ραδιενεργά ισότοπα, όπως το ¹¹¹In. Τα ραδιονουκλίδια εκπέμπουν, εκτός από ακτινοβολία-γ, και ακτινοβολία-β και βαριά ιόντα. Έτσι υπάρχει ένα εύρος συνεπειών. Η επίδρασή τους εξαρτάται από το σημείο πρόσδεσης του φαρμάκου που τα περιέχει και η χρονική εξέλιξη της ακτινοβολίας δεν είναι σταθερή αλλά εκθετική. Μαζί με τη πιθανή ακτινοευαισθησία ασθενών, είναι αρκετοί οι παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη στη μελέτη με τη μέθοδο γH2AX. [59]

Πραγματοποιούνται, επίσης, μελέτες σχετικά με την αποτελεσματικότητα φαρμάκων παράλληλα με την ακτινοθεραπεία. Ένα παράδειγμα είναι η ουσία ¹¹¹In-DTPA-anti-γH2AX-Tat (6MBq/μg). Μεταφέρει το ραδιενεργό ¹¹¹In με τη βοήθεια του πεπτιδίου Tat που διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη και προσδένεται σε περιοχές με γH2AX. Λόγω του ραδιενεργού ισότοπου και της εξειδικευμένης πρόσδεσης, αυτή η ουσία προκαλεί εντονότερα προβλήματα σε περιοχές που είναι πλούσιες σε εστίες γH2AX, που είναι ήδη αρκετά κρίσιμες. Ο συνδυασμός της ουσίας αυτής με ακτινοθεραπεία μελετήθηκε *in vitro* σε κύτταρα από καρκίνο του μαστού και έδωσε καλύτερα αποτελέσματα από την ακτινοθεραπεία μόνη της, εμφανίζοντας προοπτική για φάρμακα που βασίζονται σε αυτή την ιδέα. [69]

4.5.3 Τα λεμφοκύτταρα πρώτη επιλογή για βιοδοσιμετρία με τη μέθοδο γΗ2ΑΧ

Η μέθοδος γΗ2ΑΧ χρησιμοποιείται επιτυχώς σε πολλούς διαφορετικούς τύπους κυττάρων και ιστών. Κάθε ένας από αυτούς τους τύπους έχει διαφορετική απόκριση στην ακτινοβολία. Τα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος (Peripheral Blood Monocytes – PBMC), και συγκεκριμένα τα λεμφοκύτταρα (Peripheral Blood Lymphocytes – PBL) πληρούν μία σειρά από κριτήρια. Αυτά τα κριτήρια τα κάνουν το καλύτερο βιολογικό δείγμα στον ανθρώπινο οργανισμό για βιοδοσιμετρία, όταν χρησιμοποιείται η μέθοδος γΗ2ΑΧ.

1. Είναι μεμονωμένα κύτταρα, επιτρέποντας τη μελέτη με κυτταρομετρία ροής, η οποία δεν είναι δυνατή σε ιστούς και είναι πολύ χρήσιμη τεχνική.
2. Απομονώνεται εύκολα μεγάλος αριθμός κυττάρων χωρίς κίνδυνο για τον δότη.
3. Βρίσκονται στη φάση G0, οπότε δεν υπάρχει ανάγκη να ληφθεί υπόψη κάποια συνεισφορά της φάσης του κυτταρικού κύκλου όπως συμβαίνει σε κύτταρα που διπλασιάζονται.
4. Σχηματίζουν πολύ φωτεινές εστίες γΗ2ΑΧ.
5. Στα λεμφοκύτταρα το ποσοστό Η2ΑΧ ως προς τις Η2Α είναι περίπου 2% και έχει πολύ χαμηλό υπόβαθρο γΗ2ΑΧ (λιγότερες από μία εστίες ανά πέντε κύτταρα).
6. Μπορούν να ανιχνευτούν σε λεμφοκύτταρα βλάβες ακόμη και από πολύ χαμηλές δόσεις, της τάξης των mGy.
7. Διαφορετικές υποομάδες της οικογένειας των λεμφοκυττάρων αποκρίνονται στην ιοντίζουσα ακτινοβολία με αρκετά όμοιο τρόπο.
8. Τα λεμφοκύτταρα διαφορετικών ασθενών αποκρίνονται στην ιοντίζουσα ακτινοβολία με αρκετά όμοιο τρόπο.[55, 56, 69]

4.5.4 Αποτελέσματα μελετών πάνω στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα

Αναφέρθηκε ήδη πως τα λεμφοκύτταρα έχουν πολύ χαμηλά επίπεδα υποβάθρου στη γΗ2ΑΧ. Επίσης, η ετεροχρωματίνη είναι περίπου το 80% της χρωματίνης. Όπως σε πολλούς κυτταρικούς τύπους, φαίνεται η Η2ΑΧ δεν είναι ομοιόμορφα κατανομημένη στη χρωματίνη. Μισή ώρα μετά την ακτινοβόληση φαίνεται πως στην ετεροχρωματίνη παρατηρείται λιγότερο από το 8% των εστιών, και για δόσεις που υπερβαίνουν τα 100 Gy εμφανίζονται οι πυρήνες με την Η2ΑΧ φωσφορυλιωμένη σε όλη την έκταση, κάτι που υποδεικνύει απόπτωση. [55]

Λιγότερες από 0,1 εστίες ανά κύτταρο παρατηρούνται στα λεμφοκύτταρα ελέγχου. Ο αριθμός των εστιών ανά κύτταρο και ανά Gy είναι μία μεταβλητή που αξιοποιείται σε αυτές τις μελέτες. Ο μέγιστος αριθμός εστιών εμφανίζεται, όπως έχει ήδη αναφερθεί, περίπου 30 λεπτά μετά την ακτινοβόληση. Για τα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα είναι περίπου 14 εστίες ανά κύτταρο ανά Gy [55]. Επειδή η σχέση είναι σχεδόν γραμμική, αλλά όχι τελείως, υπάρχουν αποτελέσματα για μικρές δόσεις (από μηδέν ως μερικά δέκατα του Gy) και για μεγαλύτερο εύρος (από μηδέν ως μερικά Gy). Για παράδειγμα, στο πείραμα της ομάδας του Redon, στα 30 λεπτά μετά την ακτινοβόληση, για δόσεις από 0 ως 0,1 Gy η γραμμική προσέγγιση μεταξύ των εστιών ανά κύτταρο (N) και της δόσης(D) είναι $N=14,7 \cdot D+0,0366$ με $R^2=0,9986$, ενώ για το εύρος από 0 ως 2Gy η γραμμική προσέγγιση δίνει $N=11,5+0,8297$ με $R^2=0,939$ [75]. Υπάρχει αρκετά καλή συμφωνία μεταξύ των αποτελεσμάτων αρκετών ομάδων, όσον αφορά τον αριθμό των εστιών ανά κύτταρο και Gy, όταν υπολογίζονται μισή ώρα μετά την ακτινοβόληση και για δόσεις μέχρι 2Gy. Η απόκλιση των αποτελεσμάτων δεν είναι μεγάλη και μπορεί να εξαρτάται από το είδος της ακτινοβολίας και το πρωτόκολλο.[71]

Συγκεκριμένα:

- Η ομάδα του Mandina βρίσκει περίπου 11,66 εστίες ανά κύτταρο και Gy (100kVp x-rays) [71].
- Η ομάδα του Redon βρίσκει 12,6 εστίες ανά κύτταρο και Gy(¹³⁷Cs)-[72].
- Η ομάδα του Rothkamm βρίσκει 14,7 εστίες ανά κύτταρο και Gy (150kVp x-rays)-[73].
- Η ομάδα του Scherthan βρίσκει 9 εστίες ανά κύτταρο και Gy (220kVp x-rays)-[74].

Αυτά τα αποτελέσματα μπορούν να αξιοποιηθούν ώστε να αναπτυχθούν μοντέλα βιοδοσιμετρίας για ευρύτερη χρήση με γνώμονα τα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα.

ΜΕΡΟΣ Β - ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ

Κεφάλαιο 5: Βασικό εγχειρίδιο του προγράμματος επεξεργασίας εικόνων JCount

Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των εικόνων στο πλαίσιο αυτής της εργασίας είναι το JCount, το λογισμικό επεξεργασίας εικόνων που αναπτύχθηκε από τον δρ Pavel Lobachevsky (Peter McCallum Institute, Melbourne, Australia) και παραχωρήθηκε στην ομάδα του εργαστηρίου βλαβών DNA του Εθνικού Μετσοβίου Πολυτεχνείου. Η συνεισφορά του δρ Lobachevsky συνεχίστηκε με την ανάπτυξη παραλλαγών και ενημερώσεων του προγράμματος ανάλογα με τις ανάγκες του εργαστηρίου, οι οποίες είναι επίσης διαθέσιμες, αλλά η εργασία εστιάζεται στη χρήση του βασικού προγράμματος JCount.

5.1 Εισαγωγή

Το JCount είναι αναπτυγμένο κυρίως με σκοπό την ανάλυση συγκεκριμένου τύπου εικόνων βιολογικών δειγμάτων από μικροσκοπία ανοσοφθορισμού. Ο βασικός στόχος της ανάλυσης είναι να αναγνωριστούν σχετικά μεγάλα αντικείμενα σε κάθε εικόνα που αντιπροσωπεύουν κύτταρα ή πυρήνες και έπειτα να αναγνωριστούν και να καταμετρηθούν, εντός αυτών των μεγάλων αντικειμένων, μικρότερα αντικείμενα που αντιστοιχούν σε εστίες επιδιόρθωσης βλαβών DNA.

Τα βασικά χαρακτηριστικά του JCount που του διαχωρίζουν από άλλα παρόμοια προγράμματα είναι τρία:

- Η αυξημένη παραγωγικότητα λόγω της αυτοματοποίησης σημαντικών διαδικασιών της ανάλυσης εικόνων.
- Το περιβάλλον που επιτρέπει στον χρήστη να έχει οπτικό έλεγχο της επίδρασης των παραμέτρων που επιλέγει.
- Η αυτόματη ανάλυση πολλαπλών εικόνων.

Το JCount μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά και για να εκτελέσει άλλες διαδικασίες ανάλυσης εικόνων από αυτές που αναφέρθηκαν.

5.2 Επισκόπηση του προγράμματος

Το JCount έχει τρεις βασικές ενότητες: Περιήγηση Εικόνων (Image Browser), Ανάλυση αντικειμένων (Object Analysis) και Ανάλυση εστιών (Foci Analysis).

- Περιήγηση Εικόνων: Επιτρέπει την εύρεση μίας λίστας εικόνων μέσω του παραθύρου Επιλογή Αρχείων (File Selection) και ενσωματώνει ένα σύνολο λειτουργιών που επιτρέπει την οπτική επιθεώρηση των εικόνων μέσω της καρτέλας Έκθεση Καμπύλης (Display Curve), των εργαλείων Zoom και Διαχωρισμός καναλιών RGB (Split RGB Channels). Η Περιήγηση Εικόνων είναι ενσωματωμένη στις άλλες δύο ενότητες ώστε να είναι δυνατή η επιθεώρηση της εκτέλεσης διάφορων διαδικασιών που περιλαμβάνουν χειροκίνητη αναγνώριση και ανάλυση αντικειμένων και εστιών.
- Ανάλυση Αντικειμένων: Αυτή η ενότητα είναι αφιερωμένη στην αναγνώριση και ανάλυση των σχετικά μεγάλων αντικειμένων εντός μίας εικόνας. Αυτές, στο πλαίσιο των βιολογικών πειραμάτων που αναλύονται, αντιπροσωπεύουν είτε κύτταρα είτε πυρήνες. Αυτό το βήμα είναι προαπαιτούμενο για την αναγνώριση και μέτρηση των εστιών αργότερα, γιατί εδώ τίθενται οι περιοχές εντός των οποίων το πρόγραμμα θα ψάξει αυτά τα μικρότερα αντικείμενα.

Εδώ υπάρχουν πάλι διαδικασίες για αυτόματη αναγνώριση των αντικειμένων, σημαντικότερες των οποίων είναι το εργαλείο Διαχωρισμός Ορίων (Threshold Segmentation), ένα σύνολο εργαλείων για χειροκίνητη επεξεργασία (Manual Object Editing Tools) και η user interface Επιλογές αντικειμένων (Object Options) για να τεθούν παράμετροι για την αυτόματη αναγνώριση των αντικειμένων και το χειρισμό τους.

Η Ανάλυση Αντικειμένων παράγει για κάθε εικόνα ένα Αρχείο Συλλογής Αντικειμένων (Object Collection File) το οποίο θα χρησιμοποιηθεί στην Ανάλυση Εστιών στην συνέχεια για την αναγνώριση και την καταμέτρηση των Εστιών εντός των μεγάλων αντικειμένων. Ακόμη μπορεί να χρησιμοποιηθεί από μόνο του για την ανάλυση αντικειμένων σε μία εικόνα. Παράγει αποτελέσματα σχετικά με τις ιδιότητες των αντικειμένων, όπως Επιφάνεια, Συνολική ένταση χρώματος, Σφαιρικότητα και άλλα.

- Ανάλυση Εστιών: Αυτή η ενότητα είναι αφιερωμένη στην αναγνώριση και καταμέτρηση των εστιών και χρειάζεται για να πραγματοποιηθεί ένα Αρχείο Συλλογής Αντικειμένων, που περιέχει την πληροφορία που χρειάζεται για τα μεγάλα αντικείμενα. Η ανάλυση θα εντοπίσει και θα μετρήσει τα μικρά αντικείμενα εντός των μεγάλων για κάθε η εικόνα. Η διαδικασία είναι αυτόματη και εξαρτάται από τις τιμές που θα δώσει ο χρήστης στις παραμέτρους της ανάλυσης.

Η Ανάλυση Αντικειμένων και η Ανάλυση Εστιών μπορούν να αναλύσουν μία εικόνα ή μία λίστα εικόνων. Τα αριθμητικά αποτελέσματα της ανάλυσης παρουσιάζονται σε μία σειρά φύλων στο Φύλλο Εργασίας (Worksheet).

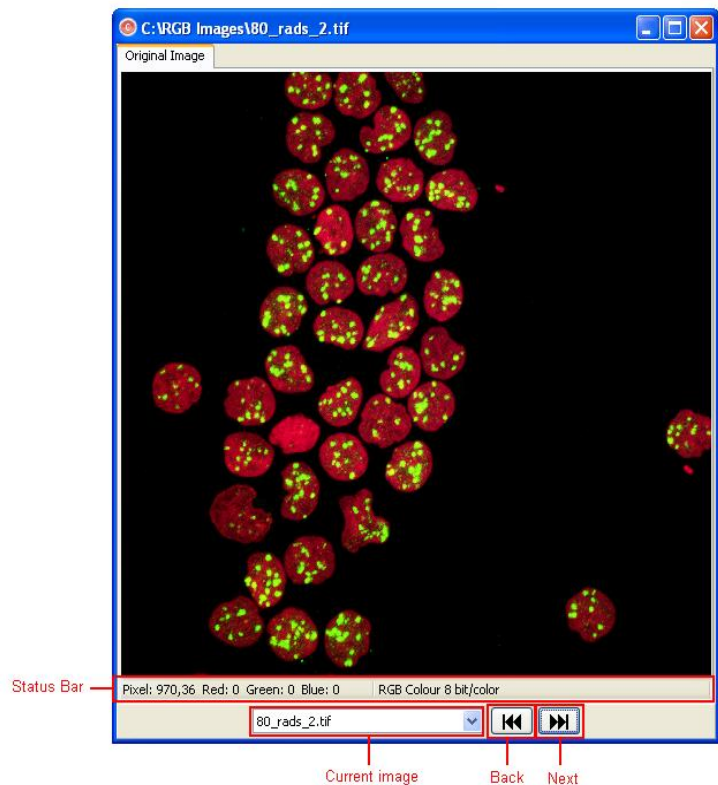
5.3 Περιήγηση Εικόνων

5.3.1 Έκθεση Εικόνων (Display Images)

Αυτή η λειτουργία δείχνει τη λίστα των εικόνων που επιλέχθηκαν από το χρήστη στο προηγούμενο παράθυρο της Επιλογής Αρχείων. Οι επιλεγμένες

εικόνες παρουσιάζονται σε ένα πρόγραμμα περιήγησης εικόνων, μέσω του οποίου ο χρήστης πλοηγείται μέσα στη λίστα των αρχείων. Αυτός μπορεί να εμφανιστεί πατώντας το κουμπί Έκθεση Εικόνων πάνω στη γραμμή εργαλείων.

Επιπρόσθετα, το πρόγραμμα περιήγησης αυτό παρουσιάζει χρήσιμα δεδομένα σχετικά με τις εικόνες στην γραμμή κατάστασης κάτω από την εικόνα. Η γραμμή αυτή έχει δύο τμήματα, το πρώτο παρουσιάζει τις ακριβείς συντεταγμένες του κέρσσορα σε pixels πάνω στην εικόνα και την ένταση του χρώματος, το δεύτερο τον τύπο της εικόνας (RGB, Grayscale, κλπ) και το βάθος του χρώματος (το πλήθος των bit ανά pixel).



Εικόνα 5.1: Έκθεση της συλλογής εικόνων στο πρόγραμμα.

Η δεύτερη γραμμή έχει το όνομα του αρχείου που φαίνεται και τα κουμπιά πλοήγησης για να κινείται ο χρήστης στην προηγούμενη και την επόμενη εικόνα. Ακόμη πατώντας πάνω στο όνομα της εικόνας μπορεί κανείς να πάει σε μία συγκεκριμένη εικόνα της λίστας.

Ο χρήστης μπορεί να αλλάξει το μέγεθος του παραθύρου, αλλάζοντας έτσι το zoom της εικόνας, οι αναλογίες της ωστόσο διατηρούνται.

5.3.2 Καμπύλη Έκθεσης

Το παράθυρο Καμπύλης Διάταξης επιτρέπει στο χρήστη να προσαρμόσει τα επίπεδα της φωτεινότητας και της αντίθεσης της εικόνας που παρουσιάζεται στο παράθυρο Περιήγησης Εικόνων. Είναι σημαντικό να σημειωθεί η πραγματική ένταση των pixel της εικόνας στην μνήμη και να διατηρηθεί ώστε τα αποτελέσματα της ανάλυσης της εικόνας να μην επηρεάζονται από αυτήν την αλλαγή. Το παράθυρο περιέχει ένα ιστόγραμμα συχνότητας (ποσοστό του αριθμού των pixel) που χαρτογραφεί την ένταση σε ένα επιλεγμένο κανάλι χρώματος (Red, Green, Blue, RGB Average).

Το παράθυρο εμφανίζεται πατώντας το Κουμπί Καμπύλης Έκθεσης (Display Curve Button) πάνω στη γραμμή εργαλείων ή μέσω της επιλογής

Εικόνα(Image) → Καμπύλη Έκθεσης.

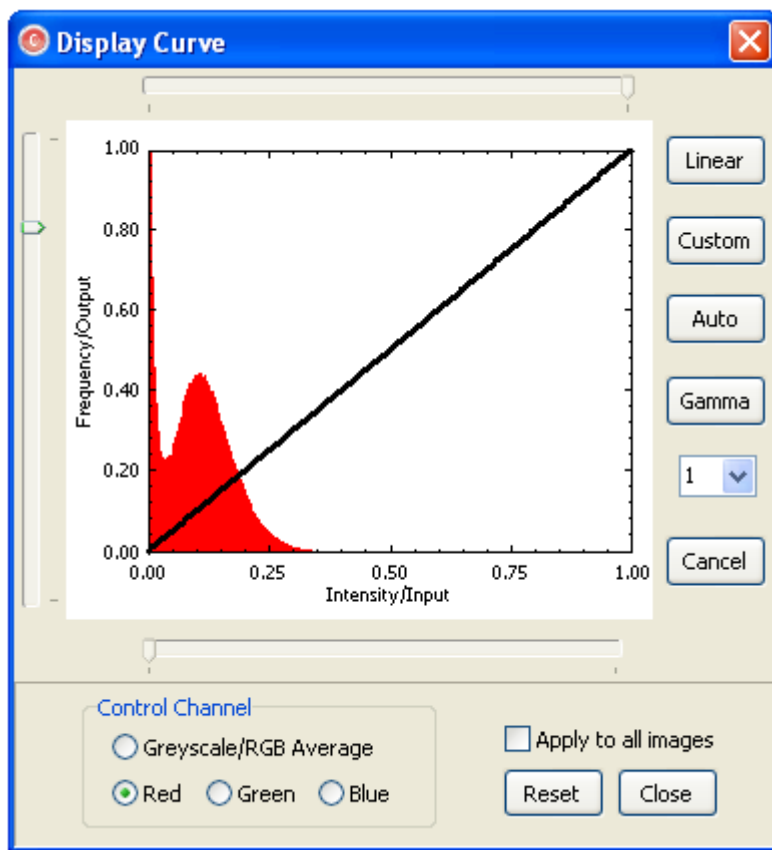
Κανάλια:

Υπάρχουν 4 δυνατά κανάλια που μπορεί να προσαρμοστούν εδώ. Red για το κόκκινο χρώμα, Green για το πράσινο, Blue για το μπλε και Greyscale/RGB Average για τη μέση τιμή της έντασης των τριών αυτών χρωμάτων. Επιλέγοντας το κανάλι παίρνουμε το αντίστοιχο ιστόγραμμα. Ο χρήστης μπορεί να επεξεργαστεί μόνο ένα από το κάθε κανάλι κάθε φορά. Όταν αλλάζει κανάλι οι αλλαγές του προηγούμενου αναιρούνται.

Σχετικά με το Ιστόγραμμα:

Το ιστόγραμμα αναπαριστά ένα πίνακα τιμών ανάμεσα στις τιμές της έντασης της εικόνας ανηγμένες στη μονάδα (άξονας x) και τη συχνότητα με την οποία εμφανίζονται στα pixel της εικόνας (άξονας y).

Υπάρχει επίσης μία μαύρη καμπύλη η οποία αρχικά είναι διαγώνιος. Σε αυτήν αναφέρονται οι δεύτερες ταμπέλες των αξόνων, Input και Output. Εδώ, στον άξονα x είναι η ένταση των pixel της αποθηκευμένης εικόνας ανηγμένη στη μονάδα και στον άξονα y είναι η ένταση των pixel της εικόνας που φαίνεται στο παράθυρο. Το εύρος των εντάσεων είναι από 0 έως 255. Η



Εικόνα 5.2: Το παράθυρο επεξεργασίας της καμπύλης διάταξης.

διαγώνια ευθεία δηλώνει ένα προς ένα αντιστοιχία, οπότε η εικόνα που βλέπουμε είναι η ίδια με την αποθηκευμένη.

Λειτουργίες Καμπύλης Διάταξης: Υπάρχουν 4 λειτουργίες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να αλλάξει η Έκθεση Καμπύλης: Γραμμική (Linear), Ειδική (Custom), Αυτόματη (Auto) και η Γάμμα (Gamma). Ωστόσο, μόνο μία απ τις λειτουργίες είναι δυνατόν να ενεργοποιηθεί κάθε φορά. Η γραμμική καμπύλη δημιουργεί ευθεία καμπύλη.

Το κουμπί της Γραμμικής καμπύλης διατηρεί διαγώνια, και 1-1, συσχέτιση ανάμεσα στην είσοδο και την έξοδο.

Το κουμπί της Ειδικής καμπύλης επιτρέπει στο χρήστη να αλλάξει την κλίση της καμπύλης σύροντας τα άκρα των γραμμών πάνω και κάτω απ την γραφική παράσταση.

Το κουμπί της Αυτόματης καμπύλης προσαρμόζει αυτόματα την καμπύλη που εκτίθεται ώστε να επιτύχει την καλύτερη δυνατή έξοδο της εικόνας βασιζόμενη στο δυναμικό εύρος των τιμών των εντάσεων.

Το κουμπί της Γάμμα καμπύλης δημιουργεί μία συναρτησιακή καμπύλη παίρνοντας κάθε τιμή έντασης και υψώνοντάς την στη δύναμη της γάμμα τιμής της, που καθορίζεται στο κουτί κάτω απ το κουμπί.

Έπειτα από την πλοήγηση σε διαφορετικές εικόνες, το πρόγραμμα σώζει αυτόματα τις καταστάσεις του ιστογράμματος και της καμπύλης. Κάθε αλλαγή στο ιστογράμμο ή την καμπύλη μπορεί να αναστραφεί με το κουμπί Αναίρεσης (Cancel).

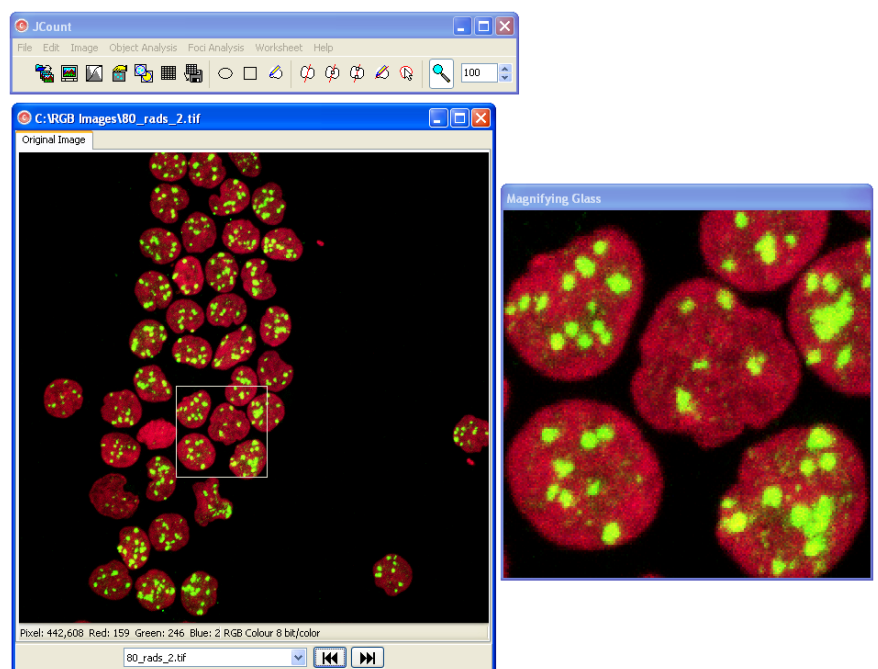
Το κουμπί Επαναφοράς (Reset) βρίσκεται στο κάτω πάνελ του παραθύρου και αλλάζει την καμπύλη που εκτίθεται πίσω στις προεπιλεγμένες ρυθμίσεις του.

Το κουμπί Εφαρμογής σε όλες τις εικόνες (Apply to all images) εφαρμόζει τις τρέχουσες ρυθμίσεις της καμπύλης και του ιστογράμματος σε όλες τις εικόνες της λίστας.

5.3.3 Zoom

Με αυτό το εργαλείο ο χρήστης μπορεί να παρατηρήσει μία συγκεκριμένη περιοχή της εικόνας από πιο κοντά με τη χρήση του ηλεκτρονικού μεγεθυντικού φακού. Ενεργοποιείται από το αντίστοιχο κουμπί Zoom ή μέσω της σειράς Εικόνα → Zoom On στο κεντρικό μενού.

Όταν ενεργοποιηθεί ανοίγει ένα ξεχωριστό παράθυρο που παρουσιάζει ένα μικρό τμήμα της εικόνας μεγεθυμένο. Για να μεγεθυνθεί μία συγκεκριμένη περιοχή πρέπει ο χρήστης να κρατήσει το αριστερό κουμπί του ποντικιού πατημένο και να κινήσει τον κέρσορα μέσα στην εικόνα. Όσο



Εικόνα 5.3: Η λειτουργία του Zoom.

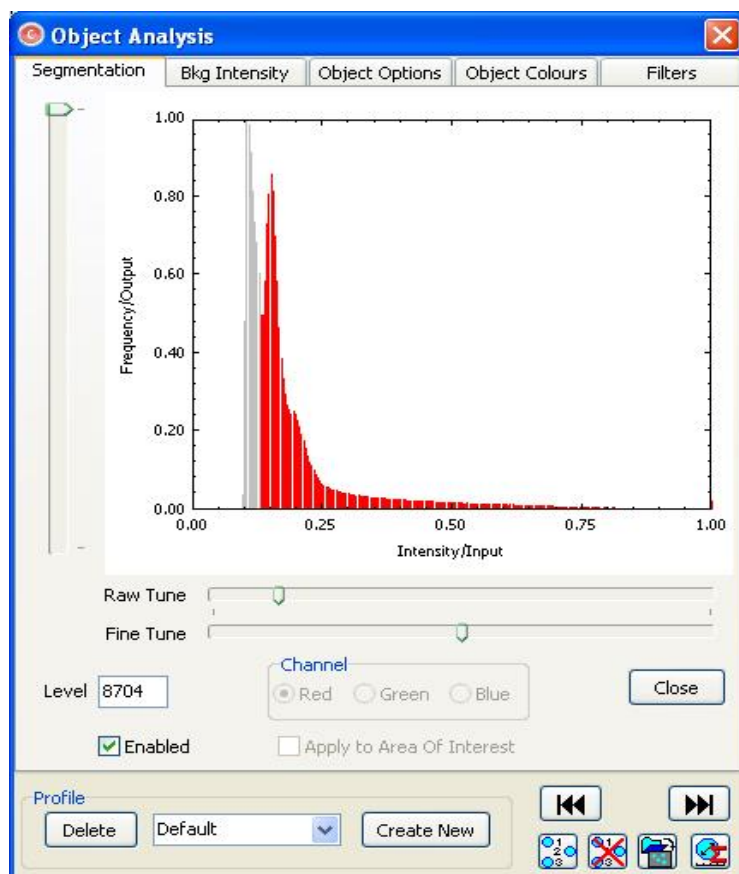
κινείται ο κέρσορας υπάρχει γύρω του ένα τετραγωνικό πλαίσιο που δηλώνει την περιοχή που μεγεθύνεται. Ο βαθμός μεγέθυνσης εξαρτάται από το μέγεθος του αντίστοιχου παραθύρου. Όσο μεγαλύτερο είναι το παράθυρο, τόσο μεγαλύτερη είναι η μεγέθυνση. Για να αλλάξει το μέγεθος της επιφάνειας ο χρήστης πατάει τα πάνω και κάτω βέλη δεξιά απ το κουμπί του Zoom στη γραμμή εργαλείων. Για να απενεργοποιηθεί το Zoom και να κλείσει το παράθυρο ο χρήστης πατάει πάλι το κουμπί με το μεγεθυντικό φακό ή απ το κεντρικό μενού Εικόνα → Zoom Off.

5.3.4 Διαχωρισμός των καναλιών RGB

Αυτή η λειτουργία χρησιμοποιείται για να εμφανιστούν ξεχωριστά τα διαφορετικά χρώματα της εικόνας. Μπορεί να επιλεγεί απ το κεντρικό μενού: Εικόνα → Διαχωρισμός καναλιών RGB (Split RGB Channels). Όταν εκτελεστεί θα εμφανιστούν τρεις νέες καρτέλες στο πρόγραμμα περιήγησης εικόνων, κάθε ένα έχει ένα αντίγραφο της εικόνας μόνο με το αντίστοιχο χρώμα. Οι επιπλέον καρτέλες κλείνουν και από το κεντρικό μενού: Εικόνα → Κλείσιμο καναλιών RGB(Close RGB Channels).

5.4 Ανάλυση Αντικειμένων (Object Analysis)


Το τμήμα της Ανάλυσης Αντικειμένων περιέχει εργαλεία που χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση και την ανάλυση των αντικειμένων μίας εικόνας. Ο χρήστης έχει πρόσβαση σε αυτό από το αντίστοιχο κουμπί στη γραμμή εργαλείων ή από το κεντρικό μενού.



Εικόνα 5.4: Η καρτέλα διαχωρισμού στο παράθυρο ανάλυσης αντικειμένων.

5.4.1 Διαχωρισμός (Segmentation)

Ο διαχωρισμός των εικόνων με κατώφλι είναι σύνηθες εργαλείο για την ανάλυση των εικόνων. Η διαδικασία χωρίζει μία ψηφιακή εικόνα σε ξεχωριστά τμήματα ή σύνολο pixel που βασίζεται στην ένταση των χρωμάτων. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται συχνά για την αναγνώριση συγκεκριμένων αντικειμένων ή ορίων με την εικόνα. Η περιοχή ενδιαφέροντος γεμίζει στην εικόνα με ένα χρώμα που προσδιορίζεται στο Κουτί Επιλογών Αντικειμένου (Object Option Dialog Box).

Το παράθυρο διαχωρισμού ενεργοποιείται πατώντας το κουμπί  στη γραμμή εργαλείων ή από το κεντρικό μενού: Ανάλυση Αντικειμένων(Object Analysis) → Διαχωρισμός(Segmentation).

Οι ιδιότητες του Διαχωρισμού περιέχονται στην πρώτη καρτέλα του παραθύρου της Ανάλυσης Αντικειμένων. Ένα ιστόγραμμα (παρόμοιο με εκείνο που αναφέρθηκε στην Καμπύλη Διάταξης) παρουσιάζει την ένταση των pixel σε συγκεκριμένο κανάλι που έχει επιλεγεί από το χρήστη. Για εικόνες με χρώμα 8-bit, το εύρος της έντασης είναι από 0 έως 255, με το 255 να είναι το

μέγιστο που μπορεί να πάρει και άρα η ένταση κορεσμού του pixel. Για εικόνες Greyscale 16-bit, το εύρος της έντασης είναι από 128 έως 65535, όπου η 65535 είναι η ένταση κορεσμού.

Υπάρχουν δύο μπάρες που ονομάζονται Raw Tune και Fine Tune. Αυτές χρησιμοποιούνται για να τεθεί το κατώφλι ή όριο διαχωρισμού. Το Raw Tune χρησιμοποιείται για να θέσει το αρχικό κατώφλι, το οποίο εμφανίζεται και στο κουτί Επιπέδου(Level). Η γκρι περιοχή του ιστογράμματος παρουσιάζει τις εντάσεις που βρίσκονται εντός του ορίου διαχωρισμού, ενώ οι κόκκινη τις εντάσεις που βρίσκονται εκτός εύρους. Ως εκ τούτου, τα pixel που βρίσκονται στην γκρι την περιοχή θα τονιστούν στην εικόνα. Αλλάζοντας την μπάρα του Fine Tune επιτρέπει στο χρήστη να αυξήσει ή να μειώσει την επιφάνεια διαχωρισμού λίγο, βάσει του τρέχοντος κατωφλιού.


Επιλέγοντας το Enabled οι επιλογές διαχωρισμού εμφανίζονται στο πρόγραμμα περιήγησης των εικόνων.

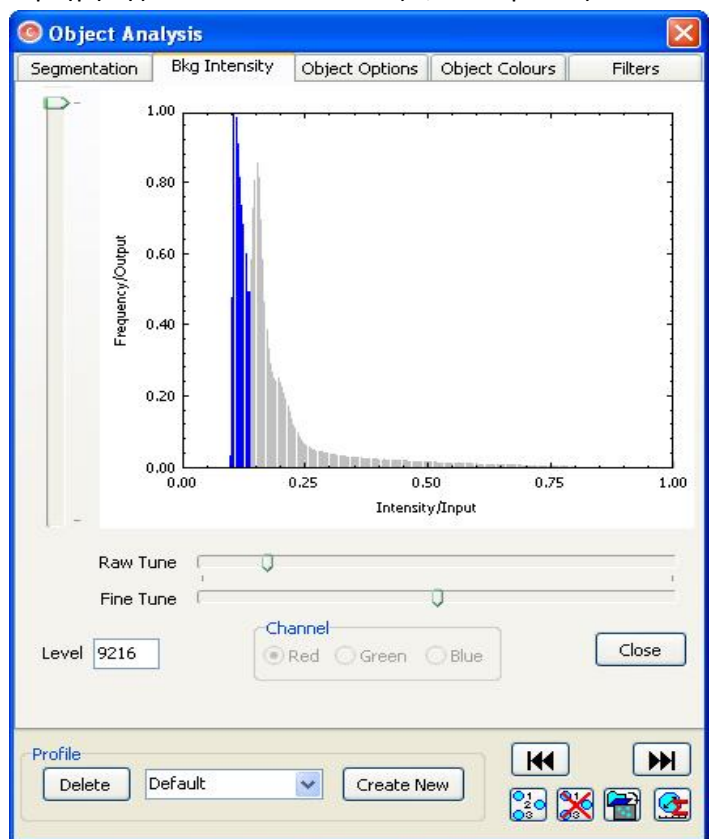
Το κουτί Εφαρμογή στην Περιοχή Ενδιαφέροντος (Apply to Area of Interest) ανοίγει όταν έχει φορτωθεί κάποιο αρχείο ΑΟΙ στο πρόγραμμα περιήγησης εικόνων. Όταν ανοίξει, επιλέγοντάς το, επιτρέπεται η εφαρμογή των επιλογών διαχωρισμού μόνο σε αυτές τις περιοχές και όχι σε ολόκληρη την εικόνα.

5.4.2 Ένταση Υποβάθρου (Background Intensity)

Το ιστογράμμο χρησιμοποιείται για να εφαρμοστούν διορθώσεις στο υπόβαθρο για τις εικόνες στις οποίες έχουν εντοπιστεί αντικείμενα. Οι ρυθμίσεις γίνονται με τον ίδιο τρόπο που έγιναν στην καρτέλα του διαχωρισμού. Τα pixel που βρίσκονται στην γκρι περιοχή θεωρούνται υποβάθρου και θα τονίζονται στην περιήγηση εικόνων.

Έπειτα από την εκτέλεση της εντολής Αναγνώριση Αντικειμένων(Identify Objects) ή της Αυτόματης Εκτέλεσης (Auto Run), το πρόγραμμα θα υπολογίσει πάλι την ένταση και την πυκνότητα κάθε αντικειμένου αφαιρώντας το υπόβαθρο από αυτά.


Ο χρήστης έχει πρόσβαση σε αυτό το παράθυρο είτε από το κουμπί  στη γραμμή εργαλείων και πηγαίνοντας στην καρτέλα Bkg Intensity ή μέσω του κεντρικού μενού από το μονοπάτι Ανάλυση Αντικειμένων → Ένταση Υποβάθρου




Εικόνα 5.5: Η καρτέλα υποβάθρου του παραθύρου ανάλυσης αντικειμένων


5.4.3 Επιλογές Αντικειμένων (Object Options)

Η καρτέλα επιλογών των αντικειμένων περιέχει όλες τις παραμέτρους που προσαρμόζονται για να βρεθούν μετά τα αντικείμενα αυτόματα και να εμφανιστούν στην περιήγηση εικόνων.

Το παράθυρο μπορεί να ανοίξει είτε απ το κουμπί  στη γραμμή εργαλείων και έπειτα επιλέγοντας την αντίστοιχη καρτέλα, είτε από το κεντρικό μενού μέσω του Ανάλυση Αντικειμένων → Επιλογές Αντικειμένων.

Οι Επιλογές Top Hat εφαρμόζουν τον αντίστοιχο μετασχηματισμό στην εικόνα. Ο μετασχηματισμός Top-Hat χρησιμοποιείται συνήθως για να τονίσει συγκεκριμένες λεπτομέρειες της εικόνας. Ο χρήστης μπορεί να εφαρμόσει το μετασχηματισμό στην τρέχουσα εικόνα με το κουμπί  στο κάτω μέρος του παραθύρου.

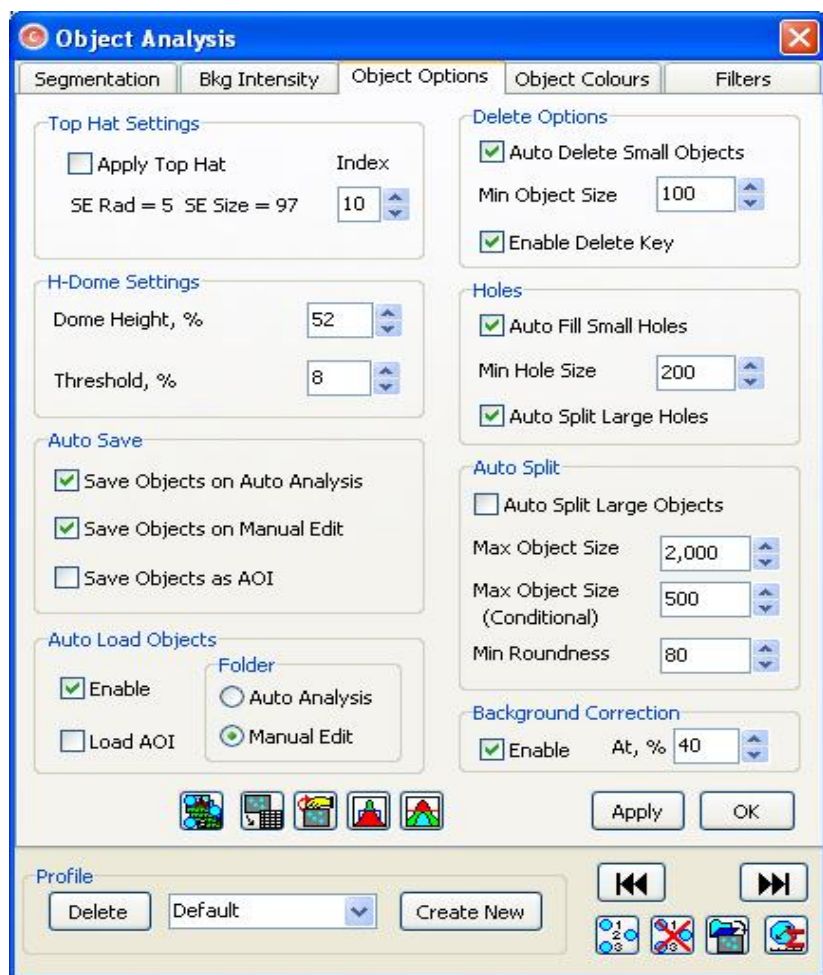
Για να γίνει αυτόματα η εφαρμογή του μετασχηματισμού στην Αναγνώριση Αντικειμένων ή στην Αυτόματη Εκτέλεση, πρέπει να έχει επιλεγεί το κουτί της Εφαρμογής της Top-Hat. Το μέγεθος του Δομικού Στοιχείου μπορεί να τροποποιηθεί με τα βέλη πάνω και κάτω στο αντίστοιχο πεδίο του Δείκτη (Index).

Οι Επιλογές H-Dome εφαρμόζουν τον αντίστοιχο μετασχηματισμό στην εικόνα. Ο μετασχηματισμός H-Dome επιτρέπει στο χρήστη μία εναλλακτική μέθοδο διαχωρισμού της εικόνας. Αντίθετα από τον Top-Hat που εφαρμόζεται σε κάθε εικόνα, αυτή η διαδικασία μπορεί να εφαρμοστεί μόνο σε μία συγκεκριμένη εικόνα. Εφαρμόζεται με το κουμπί  στην τρέχουσα εικόνα.

Η Αυτόματη Αποθήκευση Αντικειμένων (Auto Save Objects) αποθηκεύει τα αντικείμενα που αναγνωρίστηκαν μέσω της εντολής Αναγνώρισης Αντικειμένων σε ένα Αρχείο Συλλογής Αντικειμένων (Object Collection File - .ioc).

Αποθήκευση Αντικειμένων στην Αυτόματη Ανάλυση (Save Objects on Auto Analysis): Αν αυτό το κουτί είναι επιλεγμένο, τα αντικείμενα που φτιάχνονται που με τις αυτόματες ρυθμίσεις αυτού του παραθύρου αποθηκεύονται σε ένα φάκελο Αυτόματης Ανάλυσης.

- Αποθήκευση αντικειμένου στην Χειροκίνητη Επεξεργασία (Save Objects on Manual Edit): Αν αυτό το κουτί είναι επιλεγμένο, κάθε επιπλέον χειροκίνητη αλλαγή που γίνεται στα αντικείμενα με χρήση των εργαλείων. Αυτά αποθηκεύονται στον φάκελο Χειροκίνητης Επεξεργασίας.



Εικόνα 5.6: Η καρτέλα επιλογής αντικειμένων στην καρτέλα ανάλυσης αντικειμένων

- Αποθήκευση αντικειμένων ως AOI (Save Objects as AOI): Αν επιλεγεί, κάθε αντικείμενο που αναγνωρίζεται θα μετατρέπεται σε AOI, που μπορεί μετά να φορτωθεί αν είναι επιλεγμένο το κουτί Φόρτωσης AOI (Load AOI).
- Αυτόματη Φόρτωση Αντικειμένων (Auto Load Objects) επαναφέρει το Αρχείο Συλλογής Αντικειμένων που αποθηκεύτηκε για τη συγκεκριμένη εικόνα, εφόσον αυτό ακόμη υπάρχει. Για να ενεργοποιηθεί αυτή η επιλογή το κουτί Ενεργοποιημένο (Enabled) πρέπει να είναι επιλεγμένο. Ακόμη πρέπει να επιλεγεί ο τύπος αρχείου που θα ληφθεί από τον φάκελο Αυτόματης Ανάλυσης ή Χειροκίνητης Επεξεργασίας. Επιλέγοντας το κουτί Φόρτωσης AOI θα ληφθούν και τα αποθηκευμένα αρχεία AOI αντικειμένων.

Οι Επιλογές Διαγραφής (Delete Options) αφαιρεί ορισμένα αντικείμενα από το καινούριο αρχείο συλλογής.

- Αυτόματη Κάλυψη Μικρών Οπών (Auto Fill Small Holes): Οι οπές με μέγεθος μικρότερο (σε pixel) από το επιλεγμένο Ελάχιστο Μέγεθος Οπών (Min Hole Size) θα γεμίζουν και θα λαμβάνονται υπόψη ως μέρος του αντικειμένου.
- Αυτόματος Διαχωρισμός Μεγάλων Οπών (Auto Split Large Holes): Αυτή η επιλογή είναι διαθέσιμη μόνο αν είναι και η προηγούμενη. Οι οπές με μέγεθος μεγαλύτερο απ το Ελάχιστο Μέγεθος Οπών θα αφαιρούνται από το αντικείμενο βρίσκοντας το συντομότερο σημείο από το περίγραμμα του αντικειμένου στην οπή και εξαιρώντας το από το αντικείμενο. Αυτή η επιλογή είναι χρήσιμη ως πρώτο βήμα για τον διαχωρισμό αντικειμένων με πολλά κύτταρα μέσα.
Σημείωση: Αν και οι δύο επιλογές είναι ενεργοποιημένες, τα αντικείμενα που δημιουργούνται από την εντολή Identify Objects δεν θα έχουν καθόλου οπές.

Ο Αυτόματος διαχωρισμός δίνει επιπλέον επιλογές για τον διαχωρισμό μεγάλων αντικειμένων στην εικόνα. Επιλέγοντας το αντίστοιχο κουτί σε αυτό το τμήμα υπάρχουν οι ακόλουθοι παράμετροι:

- Μέγιστο Μέγεθος Αντικειμένων (Max Object Size): Ο χρήστης ορίζει το μέγιστο επιτρεπτό μέγεθος που μπορεί να έχουν τα αντικείμενα. Τα αντικείμενα εκτός αυτού του εύρους θα διαχωρίζονται.
- Μέγιστο Μέγεθος Αντικειμένων – Υπό όρους (Max Object Size – Conditional): Αυτή η παράμετρος χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με την Ελάχιστη Σφαιρικότητα (Min Roundness). Αν ένα αντικείμενο δεν πληροί τις δύο παραμέτρους τότε διαχωρίζεται.

Διόρθωση Υποβάθρου (Background Correction): Αφαιρεί από την ένταση των pixel της εικόνας την ένταση του υποβάθρου στα αντικείμενα, ώστε να λάβει μία πιο ακριβή πυκνότητα έντασης. Επιλέγεται με το κουτί Ενεργοποιημένο. Ο χρήστης προσαρμόζει την τιμή υποβάθρου στο “At, %” για να αλλάξει η αρχική τιμή κατωφλιού που χρησιμοποιείται για την διόρθωση υποβάθρου. Αυτή η τιμή ακυρώνεται αν έχει γίνει διόρθωση από την καρτέλα Έντασης Υποβάθρου.



Αναγνώριση Αντικειμένων (Identify Objects): Ανιχνεύει τα μεγάλα αντικείμενα σε μία εικόνα βασιζόμενη στις παραμέτρους διαχωρισμού που έχει θέσει ο χρήστης. Ένα αντικείμενο ορίζεται ως μία συνεχής περιοχή από χωρισμένα pixel. Όταν τα αντικείμενα έχουν ανιχνευτεί, ένα σύνορο ή περίγραμμα είναι σχεδιασμένο γύρω από την περιοχή. Αυτή η εντολή μπορεί ακόμη να δοθεί από το κεντρικό μενού **Ανάλυση Αντικειμένων** → **Αναγνώριση Αντικειμένων**

Για κάποιες εικόνες που περιέχουν πιθανά αντικείμενα πολύ κοντά το ένα στο άλλο, σε βαθμό που αλληλοεπικαλύπτονται, ο επιθυμητός τρόπος να κοπούν δεν γίνεται με τη διαδικασία της Ανίχνευσης Αντικειμένων, χρειάζονται και άλλα εργαλεία.

Ο χρήστης έχει μερικές επιλογές για αυτό. Μία μέθοδος είναι να χωρίσει τα μεγάλα αντικείμενα σε μικρότερα χειροκίνητα με τα **Εργαλεία Χωρισμού Αντικειμένων (Object Splitting Tools)**. Άλλος τρόπος είναι η μετατροπή των μεγάλων διαχωρισμένων αντικειμένων σε ΑΟΙ και η ανάλυση αυτής της περιοχής με το **Μετασχηματισμό H-Dome**.



Διαγραφή Αντικειμένων (Delete Objects): Απομακρύνει όλα τα αναγνωρισμένα αντικείμενα από την εικόνα. Αυτή η εντολή δίνεται και απ το κεντρικό μενού: **Ανάλυση Αντικειμένων** → **Διαγραφή Όλων των Αντικειμένων (Delete All Objects)**



Αυτόματη Εκτέλεση (Auto Run): Τρέχει μέσα σε όλες τις εικόνες της λίστας και αναγνωρίζει τα αντικείμενα εφαρμόζοντας τις ρυθμίσεις για κάθε εικόνα.



Φόρτωση Αντικειμένων (Load Objects): Επαναφέρει τα αντικείμενα που προηγουμένως ανιχνεύτηκαν και αποθηκεύτηκαν για μία εικόνα με την επαναφόρτωση των αντίστοιχων Αρχείων Συλλογής Αντικειμένων. Αυτή η εντολή δίνεται και από το κεντρικό μενού: **Ανάλυση Αντικειμένων** → **Φόρτωση Αντικειμένων (Load Objects)**.



Σύνοψη Αντικειμένων (Object Summary): Εξετάζει τα Αρχεία Συλλογής Αντικειμένων για όλες τις εικόνες και τοποθετεί μία σύνοψη των δεδομένων στο Φύλλο Εργασίας Σύνοψης Αρχείων (Object Summary Worksheet). Αυτή η λειτουργία αρχικά εφαρμόζεται πριν να εμφανιστεί η περιήγηση εικόνων για κάθε υπάρχον χειροκίνητα επεξεργασμένο Αρχείο Αντικειμένων. Ωστόσο, αν ο χρήστης αποφασίσει να αλλάξει τις επιλογές για την φόρτωση αντικειμένων στην Αυτόματη Ανάλυση, τότε αυτή η εντολή μπορεί να εκτελεστεί για να ξαναφτιάξει το Φύλλο Εργασίας Σύνοψης Αντικειμένων για διαφορετικά Αρχεία Συλλογής Αντικειμένων.



Επαναφορά Προεπιλογών (Restore Default Options): Επαναφέρει τις επιλογές και τις αρχικές τιμές των παραμέτρων.



Μετασχηματισμός Top-Hat (Top-Hat Transformation): Ανοίγει μία δεύτερη εικόνα στην περιήγηση και εφαρμόζει σε αυτήν τον μετασχηματισμό.



Διαχωρισμός H-Dome (H-Dome Segmentation): Εφαρμόζει το κατώφλι του διαχωρισμού H-Dome στην τρέχουσα εικόνα.

Το κουμπί **Εφαρμογή (Apply)** εφαρμόζει στην εικόνα τις τρέχουσες ρυθμίσεις, προσαρμοσμένες στις ρυθμίσεις των αντικειμένων.

Το κουμπί **OK** Εφαρμόζει τις τρέχουσες ρυθμίσεις και κλείνει το παράθυρο.

5.4.4 Χρώματα Αντικειμένων (Object Colours)

Τα Χρώματα Εμφάνισης Αντικειμένων (Object Display Colours) προσδιορίζει τα χρώματα που θα χρησιμοποιήσει το πρόγραμμα για να ζωγραφίσει τα διάφορα στοιχεία της εικόνας:

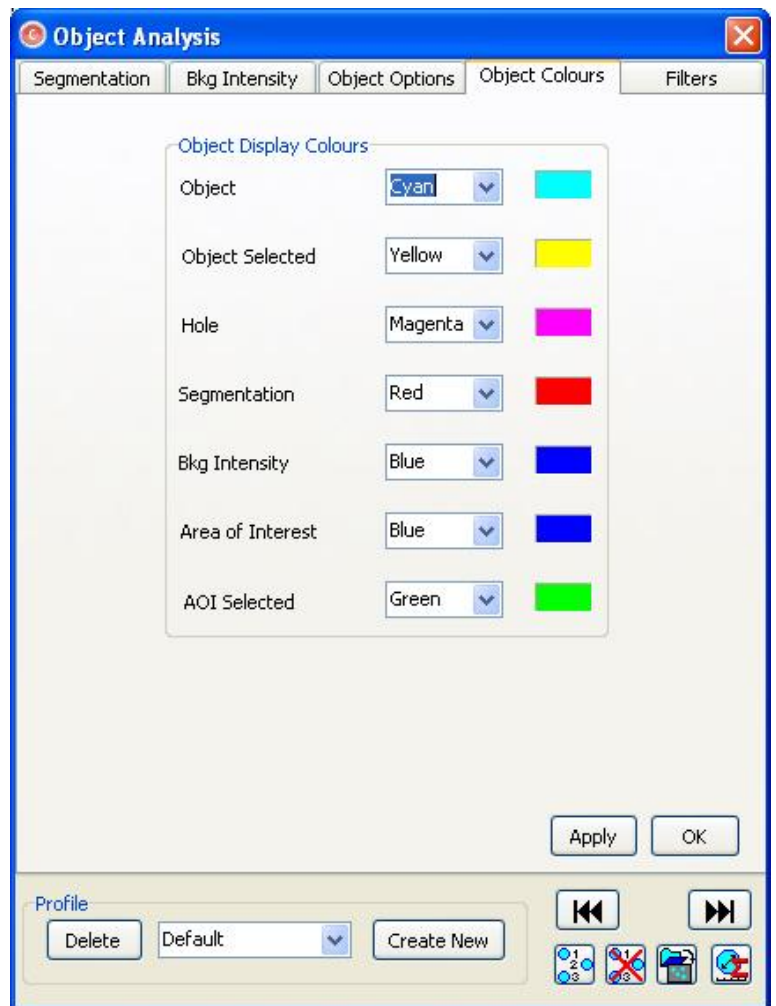
Αντικείμενο(Object): Το χρώμα του περιγράμματος του αντικειμένου

Επιλεγμένο Αντικείμενο (Selected Object): Το χρώμα του περιγράμματος του επιλεγμένου αντικειμένου. Ακόμη είναι το χρώμα της γραμμής σχεδιασμού.

Οπή (Hole): Το χρώμα με το οποίο γεμίζει η οπή μέσα σε ένα αντικείμενο.

Περιοχή Ενδιαφέροντος (Area of Interest): Το χρώμα του περιγράμματος των AOI.

Επιλεγμένα AOI (Selected AOI): Το χρώμα του περιγράμματος των επιλεγμένων αντικειμένων.



Εικόνα 5.7: Η καρτέλα χρωμάτων στο παράθυρο ανάλυσης αντικειμένων

5.4.5 Προφίλ(Profile)

Επιτρέπουν στο χρήστη να αποθηκεύσει τις ρυθμίσεις του. Οι ρυθμίσεις αυτές αποθηκεύονται σε ένα αρχείο που μπορεί να ανακτηθεί και εφαρμοστεί σε κάθε εικόνα στη συνέχεια. Αυτές οι ρυθμίσεις ακόμη είναι διαθέσιμες όταν το πρόγραμμα κάνει επανεκκίνηση. Σε ένα προφίλ μπορούν να αποθηκευτούν οι ακόλουθες ρυθμίσεις: Χρώματα Εμφάνισης Αντικειμένων, Επιλεγμένα Αντικείμενα, Αποθήκευση Αντικειμένων στην Αυτόματη Ανάλυση (Save Objects on Auto Analysis), Επιλογές Διαγραφής (Delete Options), Οπές (Holes), Αυτόματο Χώρισμα (Auto Split).

Οι επιλογές αυτές βρίσκονται στο κάτω μέρος της καρτέλας. Για να δημιουργηθεί ένα νέο προφίλ, ο χρήστης τυπώνει το όνομα στο αντίστοιχο κουτί και πατάει το κουμπί Δημιουργία Νέου (Create New). Ένα νέο προφίλ θα δημιουργηθεί τώρα με το επιλεγμένο όνομα.

Για να προσαρμόσει το προφίλ ο χρήστης αλλάζει τις παραμέτρους και πατάει Εφαρμογή (Apply) ή OK. Για να διαγράψει ένα προφίλ, επιλέγει το επιθυμητό προφίλ και πατάει Διαγραφή(Delete).

5.4.6 Φίλτρα (Filters)

Η καρτέλα των Φίλτρων μπορεί να ανοίξει από το κουμπί Επιλογές Αντικειμένων (Object Options) στη γραμμή εργαλείων είτε από το κεντρικό μενού: Ανάλυση Αντικειμένων → Φίλτρα. Το παράθυρο αυτό περιέχει δύο τύπους φίλτρων. Ένα Φίλτρο Αντικειμένων (Objects Filter) και Φίλτρο Θορύβου (Noise Filter).

Το Φίλτρο Αντικειμένων επιτρέπει στο χρήστη να αφαιρέσει ορισμένα αντικείμενα από την εικόνα με κριτήριο τρεις ιδιότητες: Επιφάνεια, Σφαιρικότητα, Ένταση. Η Επιφάνεια αφορά στο μέγεθος του αντικειμένου σε pixel, η Σφαιρικότητα παίρνει τιμές έως 1, η Ένταση αφορά στο πόσο φωτεινό είναι το χρώμα των pixel των αντικειμένων σε σχέση με το υπόβαθρο.

Για να επιτραπούν αυτές οι ρυθμίσεις στην εικόνα, πρέπει να επιλεγεί το αντίστοιχο κουτί.

Κάθε ιδιότητα έχει μία καρτέλα που περιέχει ένα ιστόγραμμα που χαρτογραφεί τα επίπεδα της συγκεκριμένης ιδιότητας στην εικόνα. Για να αφαιρέσει ο χρήστης αντικείμενα από την εικόνα, επιλέγει το εύρος των αντικειμένων που πρέπει να συμπεριληφθούν στην εικόνα με τη χρήση των μπαρών κάτω από το ιστόγραμμα. Η πρώτη μπάρα προσδιορίζει την αρχή του εύρους ενώ η δεύτερη το τέλος. Το επιλεγμένο εύρος θα τονιστεί με κόκκινες γραμμές. Όλα τα αντικείμενα έξω από αυτήν την περιοχή θα εξαιρεθούν στην εικόνα.

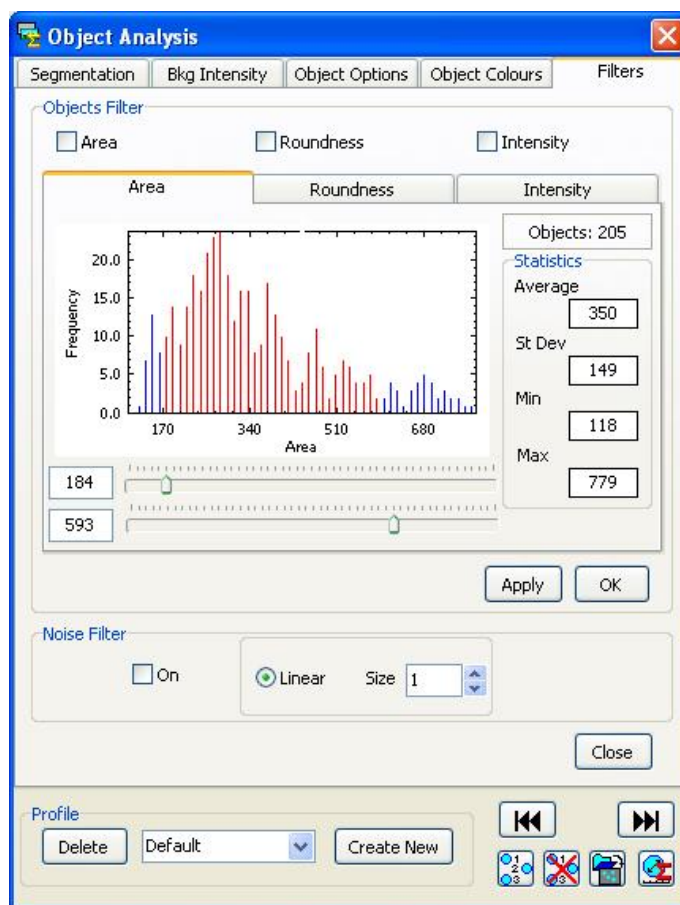
Η καρτέλα Στατιστικά(Statistics) περιέχει επιπλέον πληροφορία σχετικά με τις τιμές που επιλέγονται. Έχει τη μέση τιμή των δεδομένων (Average), την τυπική απόκλιση (St Dev), την ελάχιστη τιμή (Min) και τη μέγιστη τιμή (Max).

Το κουμπί Εφαρμογή (Apply) εφαρμόζει τις τρέχουσες επιλογές στην εικόνα.

Το κουμπί OK εφαρμόζει τις τρέχουσες επιλογές στην εικόνα και κλείνει το παράθυρο.

Το Φίλτρο Θορύβου χρησιμοποιείται για να μειώσει το θόρυβο σε μία εικόνα. Δουλεύει λειαινώντας τα pixel της εικόνας. Η ένταση αυτού του φαινομένου μπορεί να ελεγχθεί αλλάζοντας τις παραμέτρους μεγέθους από το 1 έως το 4. Για την εφαρμογή του φίλτρου επιλέγεται το OK.

Το κουμπί Κλείσιμο(Close) κλείνει το παράθυρο.



Εικόνα 5.8: Η καρτέλα φίλτρων στο παράθυρο ανάλυσης αντικειμένων

5.5 Εργαλεία Χειροκίνητης Επεξεργασίας Αντικειμένων (Manual Object Editing Tools)

Τα εργαλεία επεξεργασίας των αντικειμένων επιτρέπουν στο χρήστη να κάνει επιπλέον διορθώσεις στα αντικείμενα που ανιχνεύτηκαν από την Αυτόματη Ανάλυση.

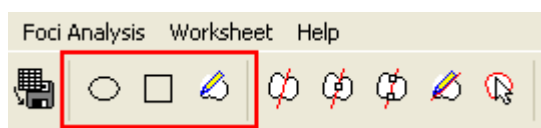
Υπάρχουν δύο τύποι Εργαλείων Επεξεργασίας Αντικειμένων: Εργαλεία Σχεδίασης Αντικειμένων (Object Drawing tools) και Εργαλεία Χωρισμού Αντικειμένων (Object Splitting tools). Αυτά τα εργαλεία μπορεί να βρεθούν και μέσα από την κεντρική γραμμή εργαλείων.


Για να χρησιμοποιήσει ο χρήστης το εργαλείο πατάει το αντίστοιχο κουμπί στην γραμμή εργαλείων. Τότε η κατάσταση της περιήγησης εικόνων θα αλλάξει και θα μείνει σε αυτήν την νέα κατάσταση έως ότου ο χρήστης να επιλέξει άλλο εργαλείο ή ακυρώσει αυτό πατώντας πάλι το κουμπί του. Κάθε εργαλείο έχει μοναδικό κέρσορα που του αντιπροσωπεύει.


Εναλλακτικά, δεξί κλικ στην αρχική εικόνα μέσα στην περιήγηση εικόνων θα εμφανίσει ένα μενού που περιέχει αυτά τα εργαλεία. Επιλέγεται εκεί το επιθυμητό εργαλείο και χρησιμοποιείται. Αυτά τα εργαλεία μπορούν ακόμη να χρησιμοποιηθούν άμεσα στο μεγεθυντικό φακό για να επεξεργαστούν μικρότερες περιοχές της εικόνας. Ωστόσο, ενώ το Zoom είναι ενεργοποιημένο, η επεξεργασία μπορεί να γίνει μόνο μέσα σε αυτό το παράθυρο.


Αντικείμενα που επεξεργάζονται με τη χρήση αυτών των εργαλείων αποθηκεύονται στον φάκελο 'ManualEdit' στον ίδιο κατάλογο όπως και το αρχείο της εικόνας.

5.5.1 Εργαλεία Σχεδιασμού Αντικειμένων (Object Drawing Tools)

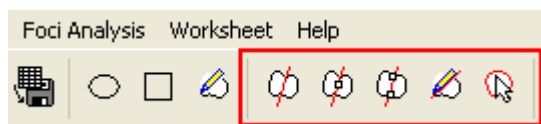



 Αυτό το εργαλείο σχεδιάζει ένα Ελλειπτικό αντικείμενο. Το πρώτο κλικ ορίζει την αρχή της έλλειψης και μετά κρατώντας το πατημένο και σέρνοντάς τον κέρσορα αλλάζει το μέγεθος της έλλειψης μέχρι να το αφήσει. Τότε δημιουργείται το αντικείμενο. Για να σχεδιαστεί Κύκλος, ο χρήστης κρατάει ακόμη το πλήκτρο Shift πατημένο όσο σχεδιάζει.

 Αυτό το εργαλείο σχεδιάζει ένα Ορθογώνιο αντικείμενο με τον ίδιο τρόπο που σχεδιάστηκε το Ελλειπτικό. Για να σχεδιαστεί ένα Τετράγωνο, ο χρήστης κρατάει ακόμη το πλήκτρο Shift πατημένο όσο σχεδιάζει.

 Αυτό το εργαλείο σχεδιάζει ένα Ελεύθερο αντικείμενο. Ο χρήστης χαράζει σέρνοντας τον κέρσορα το σχήμα που επιθυμεί. Αφήνοντας το αριστερό κλικ όταν ολοκληρωθεί μία κλειστή διαδρομή το σχήμα φτιάχνεται.

5.5.2 Εργαλεία Χωρισμού Αντικειμένων (Object Splitting Tools)



 Αυτόματος Χωρισμός (Auto Split): Χωρίζει αυτόματα το αντικείμενο σε δύο, βασιζόμενο στο σχήμα και το μοτίβο της έντασης. Για να χωρίσει ο χρήστης το αντικείμενο με αυτό το εργαλείο πρέπει να κάνει αριστερό κλικ εντός του αντικειμένου. Μία γραμμή θα εμφανιστεί

που αντιπροσωπεύει το μονοπάτι χωρισμού. Για να επιβεβαιωθεί πρέπει να μετακινηθεί το ποντίκι. Μπορεί να ακυρωθεί αν ο χρήστης κάνει πάλι αριστερό κλικ.



Χωρισμός Ενός Σημείου (One-Point Split): Χωρίζει το αντικείμενο λαμβάνοντας υπόψη ένα σημείο που τίθεται από το χρήστη με το αριστερό κλικ του ποντικιού. Όταν γίνει το αριστερό κλικ μέσα στο αντικείμενο, το εργαλείο χρησιμοποιεί την θέση αυτή και τα γειτονικά pixels για να δημιουργήσει το μονοπάτι διαχωρισμού με την ελάχιστη ένταση. Η επιβεβαίωση και η ακύρωση γίνεται όπως στον Αυτόματο Χωρισμό.



Χωρισμός Δύο Σημείων (Two-Point Split): Χωρίζει το αντικείμενο όπως το προηγούμενο εργαλείο, αλλά με δύο σημεία ως δεδομένα αυτή τη φορά. Η επιβεβαίωση και η ακύρωση του σχήματος γίνεται όπως στον Αυτόματο Χωρισμό.



Ελεύθερος Χωρισμός (Free-Hand Split): Επιτρέπει στο χρήστη να χωρίσει μόνος του το αντικείμενο ορίζοντας ολόκληρο το μονοπάτι. Με αριστερό κλικ τίθεται η αρχή της διαδρομής και στη συνέχεια σέρνοντας τον κέρσορα ο χρήστης καθορίζει το μονοπάτι. Όταν ένα επιτρεπτό μονοπάτι επιλεγεί, ο χρήστης κινεί τον κέρσορα εκτός του αντικειμένου και αφήνει το αριστερό κλικ. Για να χωριστεί το αντικείμενο, το μονοπάτι που φτιάχνει ο χρήστης πρέπει να εκτείνεται πέρα από τα όρια του σχήματος.



Διαγραφή Αντικειμένου (Click Delete): Όταν αυτό το εργαλείο είναι επιλεγμένο τότε ο χρήστης μπορεί να διαγράψει αυτόματα τα αντικείμενα κάνοντας αριστερό κλικ μέσα τους. Αυτό ισοδυναμεί με την επιλογή του αντικειμένου και την χρήση του πλήκτρου Delete.

5.5.3 Επιλογή και Διαγραφή Αντικειμένων (Selecting and Deleting Objects)

Μεμονωμένα αντικείμενα μπορεί να επιλεγθούν με αριστερό κλικ πάνω τους. Αντικείμενα επιλέγονται έτσι αν δεν έχει ενεργοποιηθεί κάποιο απ τα εργαλεία επεξεργασίας. Όταν επιλεγθούν, το χρώμα του περιγράμματος του αντικειμένου θα αλλάξει σύμφωνα με την επιλογή που τέθηκε στο παράθυρο Επιλογών Αντικειμένου. Το αντικείμενο θα παραμείνει επιλεγμένο μέχρι ο χρήστης να κάνει πάλι αριστερό κλικ.

Πολλαπλά αντικείμενα μπορούν να επιλεγθούν κάνοντας κλικ και σέρνοντας τον κέρσορα πάνω από μία επιφάνεια με αντικείμενα. Ένα λευκό τετραγωνικό κουτί θα εμφανιστεί και όσα αντικείμενα πέφτουν εντός των ορίων του θα επιλεγθούν. Αφήνοντας το ποντίκι ολοκληρώνεται η επιλογή.

Επιλογή Όλων: Ανάλυση Αντικειμένων → Επιλογή Όλων(Select All Objects) ή Ctrl+A. Επιλέγει όλα τα αντικείμενα της εικόνας.

Απόρριψη Όλων: Ανάλυση Αντικειμένων → Απόρριψη Όλων(Deselect All Objects) ή Ctrl+D. Αναίρει την επιλογή όλων των επιλεγμένων αντικειμένων της εικόνας.

Εναλλαγή Επιλογής: Ανάλυση Αντικειμένων → Εναλλαγή Επιλογής(Invert Selection) ή Ctrl+I. Επιλέγει όλα τα αντικείμενα που δεν έχουν επιλεγεί και αναίρει την επιλογή όλων των επιλεγμένων αντικειμένων.

Διαγραφή Επιλεγμένων: Ανάλυση Αντικειμένων → Διαγραφή Επιλεγμένων>Delete Selected Objects) ή Del. Διαγράφει όλα τα επιλεγμένα αντικείμενα της εικόνας.


5.5.4 Αναίρεση/Επανάληψη (Undo/Redo)

Το πρόγραμμα αναίρει είτε επαναλαμβάνει αλλαγές σχετικές με τη χρήση των εργαλείων επεξεργασίας αντικειμένων.

Αναίρεση: Εκτελείται από το μενού: Επεξεργασία(Edit) → Αναίρεση ή Ctrl+Z.

Επανάληψη: Εκτελείται από το μενού: Επεξεργασία → Επανάληψη ή Ctrl+Y.

5.5.5 Χειροκίνητη Επεξεργασία με το Μεγεθυντικό Φακό (Manual Editing with Magnifying Glass)

Ο μεγεθυντικός φακός επιτρέπει την ευκολότερη επεξεργασία και τη διαγραφή μικρών αντικειμένων σε μία εικόνα. Ενεργοποιείται από το μενού Εικόνα(Image) → Zoom In ή από το κουμπί  στη γραμμή εργαλείων.

Όσο είναι ενεργοποιημένος ο μεγεθυντικός φακός, ο χρήστης δεν μπορεί να επεξεργαστεί τα αντικείμενα άμεσα στην περιήγηση εικόνων, αλλά μπορεί να χρησιμοποιήσει τις ίδιες επιλογές στο αντίστοιχο παράθυρο της μεγέθυνσης.

5.6 Ανάλυση Εστιών (Foci Analysis)

Η ανάλυση των εστιών μπορεί να περιγραφθεί γενικά ως η μέτρηση των μικρών αντικειμένων εντός των μεγαλύτερων και ο προσδιορισμός ορισμένων τιμών σχετικά με αυτά.

Οι εικόνες μπορούν είτε να αναλυθούν ξεχωριστά ή συλλογικά ως λίστα. Η μεμονωμένη προσέγγιση είναι απαραίτητη για να μάθει κανείς την διαδικασία που ακολουθείται για την ανάλυση foci. Επιπρόσθετα, ο χρήστης μπορεί να δει τα αποτελέσματα των διαδικασιών και να συγκρίνει τα αποτελέσματα των επιλογών του στην αρχική εικόνα. Ωστόσο, αυτή είναι χρονοβόρα διαδικασία, για αυτό το JCount αυτοματοποιεί τη διαδικασία.

Η διαδικασία μπορεί να ξεκινήσει από το κουμπί  στην γραμμή εργαλείων. Το παράθυρο περιέχει τρεις καρτέλες. Επιλογής Αρχείων(Select Files), Ανάθεση Ομάδων(Select Groups) και Μέτρηση Foci(Foci Counting).

5.6.1 Επιλογή Αρχείων (Select Files)

Η καρτέλα επιλογής αρχείων χρησιμοποιείται για να επιλεχθούν ειδικά τα αρχεία που θέλει ο χρήστης για αυτήν την ανάλυση. Αυτό το παράθυρο είναι παρόμοιο με το παράθυρο Επιλογής Αρχείων που χρησιμοποιείται στην Ανάλυση Αντικειμένων. Ωστόσο, αυτή τη φορά ο χρήστης καλείται να επιλέξει, εκτός από τα αρχεία εικόνων, τα αντίστοιχα Αρχεία Συλλογής Αντικειμένων, τα οποία φυσικά οφείλουν να έχουν κατασκευαστεί εκ των προτέρων.

Το πλαίσιο με τη λίστα των Αρχείων Εικόνων (Image Files) περιέχει εικόνες σε μορφή .tif και επιλέγονται για την ανάλυση πατώντας το κουμπί >> .

Το πλαίσιο με τη λίστα των Αρχείων Συλλογής Αντικειμένων (Object Collection Files) περιέχει τα αντίστοιχα αρχεία σε μορφή .ios και επιλέγονται για την ανάλυση πατώντας το κουμπί >>.

Τα αρχεία Εικόνων και Συλλογής Αντικειμένων πρέπει να είναι σωστά αντιστοιχισμένα ένα προς ένα στα δύο πλαίσια.

Η Εμφάνιση Αρχείων (View Files) περιλαμβάνει ένα σύνολο κουμπιών που λειτουργούν ως φίλτρα για να συγκεκριμένους τύπους αρχείων στον τρέχων φάκελο.

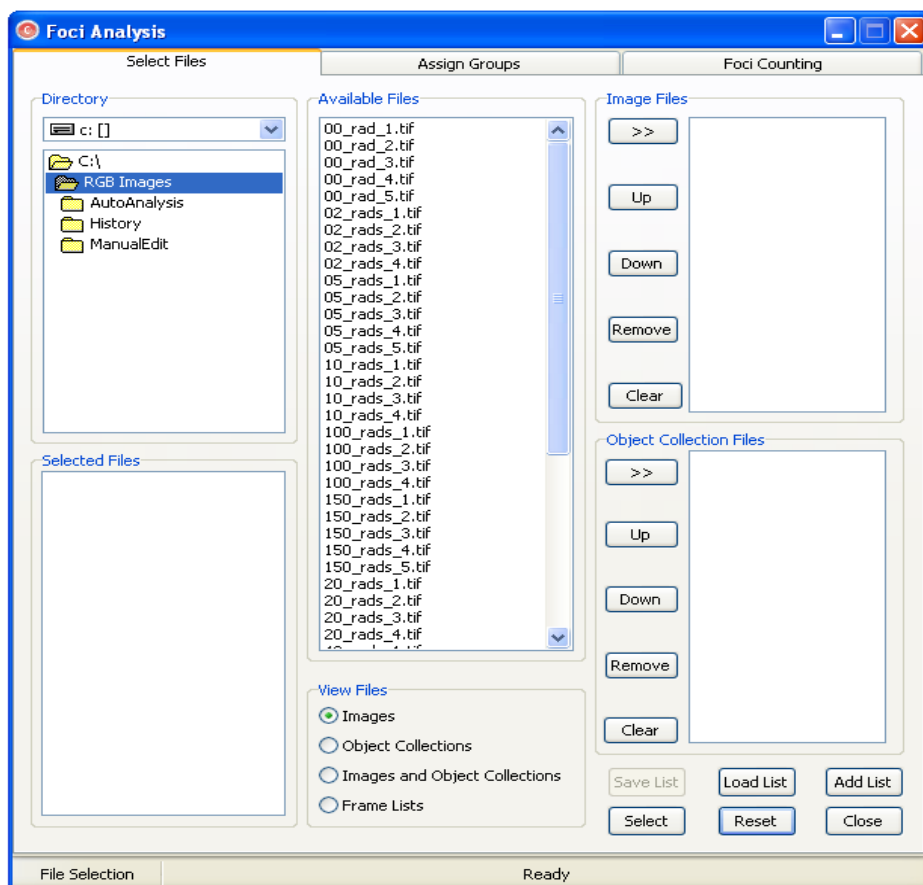
Αφότου ολοκληρωθεί η λίστα με τις αρχεία εικόνων και συλλογής αντικειμένων ο χρήστης πατάει το κουμπί Επιλογή(Select) για να ξεκινήσει η Ανάλυση Εστιών σε αυτές τις εικόνες. Ανοίγει η περιήγηση εικόνων και εμφανίζει τις εικόνες και τα αντικείμενα που ανιχνεύθηκαν σε κάθε μία απ αυτές. Το χρώμα των αντικειμένων μπορεί να διαφέρει, καθώς τώρα πρόκειται για ΑΟΙ και το χρώμα τους καθορίζεται απ τις Επιλογές Αντικειμένων. Ακόμη η περιήγηση εικόνων μπορεί να περιλαμβάνει μία επιπλέον καρτέλα που λέγεται Αντιγραφή Εικόνας (Copy Image), που περιλαμβάνει ένα αντίγραφο της αρχικής εικόνας. Κάθε αλλαγή κατά την Ανάλυση Εστιών θα φαίνεται σε αυτήν την εικόνα.

Το κουμπί Αποθήκευση Λίστας (Save List) επιτρέπει στον χρήστη να αποθηκεύσει τη λίστα των εικόνων με τα αντικείμενα και τα αρχεία συλλογής αντικειμένων σε ένα αρχείο λίστας τύπου .tfl ώστε να μπορούν μετά να επαναφερθούν με το κουμπί Φόρτωση Λίστας (Load List). Το κουμπί Προσθήκη Λίστας (Add List) συνδυάζει διαφορετικά .tfl αρχεία.

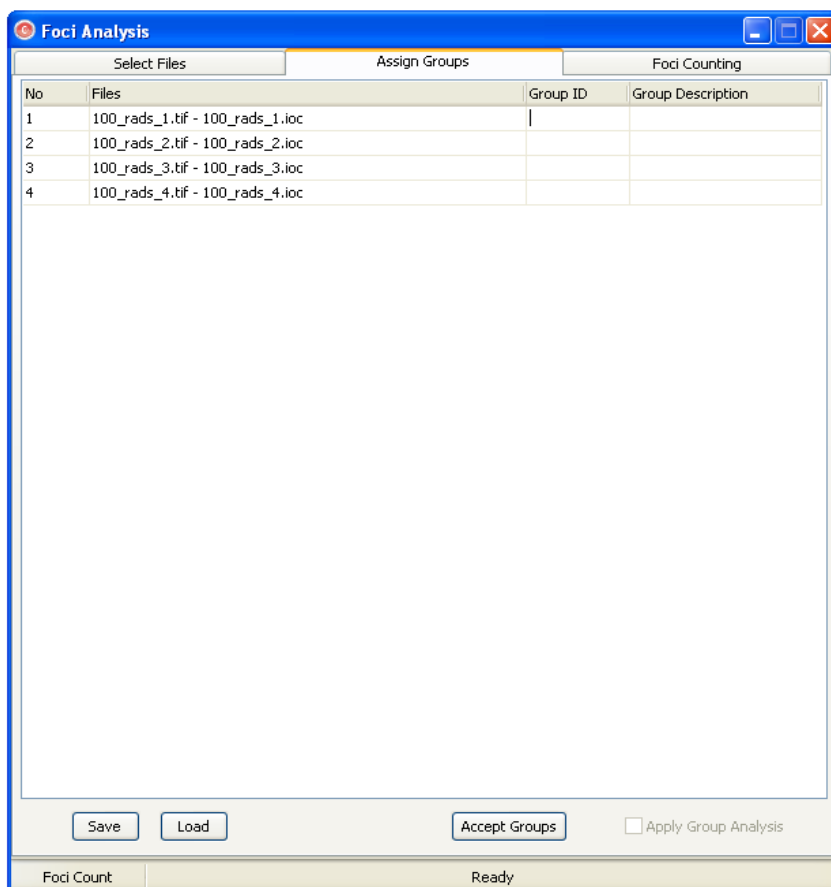
5.6.2 Ανάθεση Ομάδων (Assign Groups)

Οι εικόνες που επιλέγονται μπορούν να χωριστούν σε ομάδες για να γίνει ξεχωριστά στην κάθε μία η στατιστική ανάλυση στη συνέχεια.

Αφότου τα αρχεία επιλέχθηκαν από



Εικόνα 5.9: Η καρτέλα επιλογής αρχείων στο παράθυρο ανάλυσης εστιών

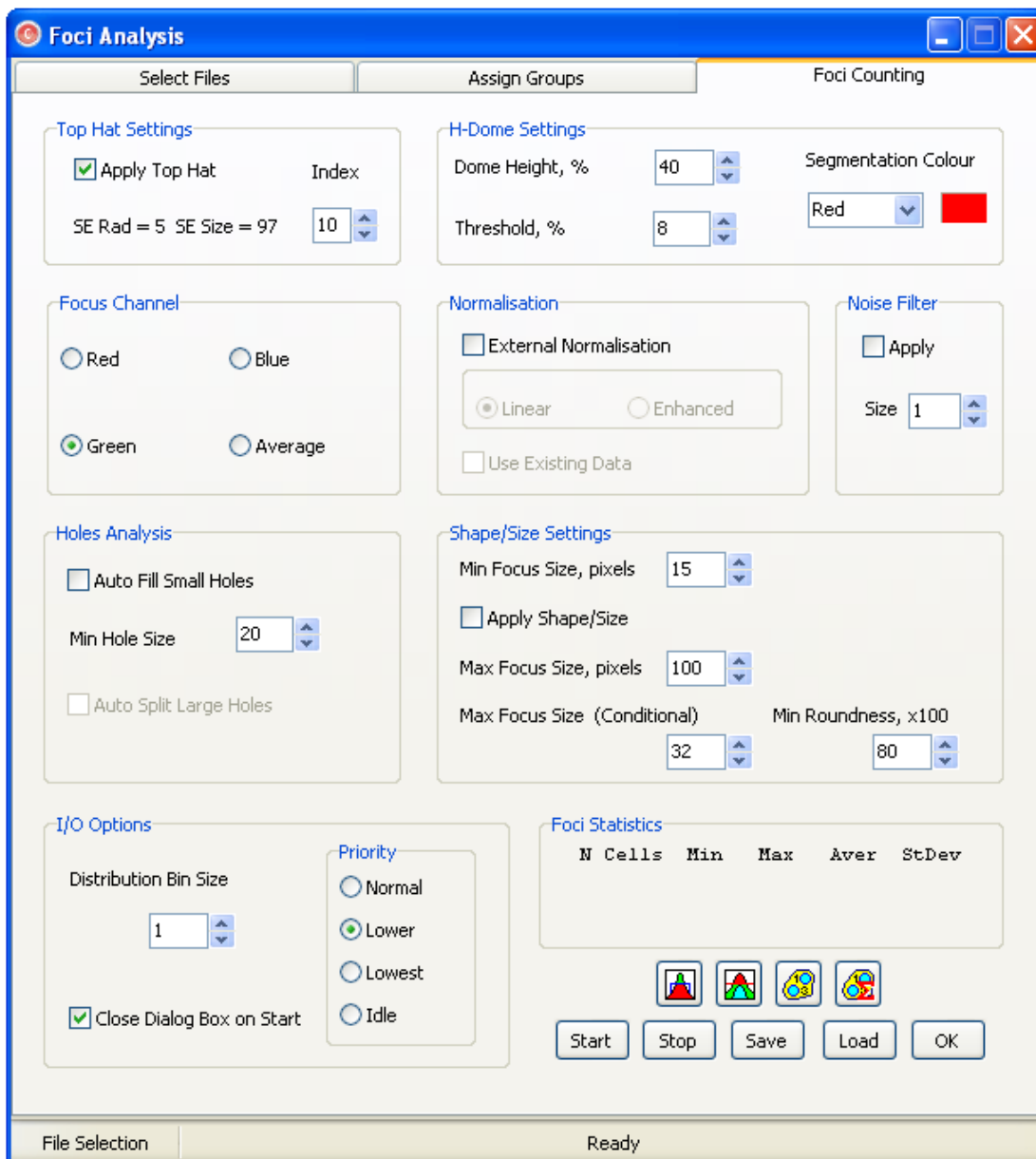


Εικόνα 5.10: Η καρτέλα ανάθεσης ομάδων στο παράθυρο ανάλυσης εστιών

τις επιλογές του μενού Επιλογή Αρχείων, αυτές οι εικόνες εμφανίζονται σε ένα πίνακα με τα αντίστοιχα Αρχεία Συλλογής Εικόνων, όπως φαίνεται στην παραπάνω εικόνα.

Ο χρήστης αποφασίζει ποιες εικόνες θα είναι σε ποιες ομάδες. Εισάγει μία Ταυτότητα της Ομάδας (Group ID) με ένα αριθμό (1, 2, 3...). Βάζει στην πρώτη εικόνα τον αριθμό 1, στην πρώτη εικόνα της δεύτερης ομάδας τον αριθμό 2, στην πρώτη εικόνα της τρίτης ομάδας τον αριθμό 3 και ούτω καθεξής. Ύστερα πατάει το κουμπί Αποδοχή Ομάδων (Accept Groups) και συμπληρώνονται τα κενά. Όταν οι ομάδες έχουν γίνει αποδεκτές τότε πρέπει να τσεκάρει ο χρήστης το κουτί Εφαρμογή Ανάλυσης Ομάδων (Apply Group Analysis) και τα αποτελέσματα θα συμπεριληφθούν στο Φύλλο Εργασίας όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία.

5.6.3 Μέτρηση Εστιών (Foci Counting)



Εικόνα 5.11: Η καρτέλα μέτρησης εστιών στο παράθυρο ανάλυσης εστιών


Πολλές από τις επιλογές εδώ δεν τις βλέπουμε πρώτη φορά, έχουν χρησιμοποιηθεί και στην ανίχνευση αντικειμένων στο βήμα της Ανάλυσης Αντικειμένων. Ο χρήστης πρέπει να καθορίσει τις παραμέτρους ώστε να έχει το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα.

Μετασχηματισμός Top-Hat (Top-Hat Transformation):

Αυτή η διαδικασία τονίζει μικρά στοιχεία και λεπτομέρειες στην εικόνα. Μπορεί να βελτιώσει σημαντικά τα αποτελέσματα στον υπολογισμό εστιών, ειδικά σε κακής ποιότητας εικόνες. Βοηθάει στην απομόνωση μεμονωμένων εστιών που, διαφορετικά, θα συμπεριλαμβάνονταν σε μεγαλύτερα αντικείμενα. Συχνά είναι το πρώτο βήμα της ανάλυσης.

Η βασική παράμετρος του μετασχηματισμού είναι το μέγεθος σε pixel του Δομικού Στοιχείου που καθορίζεται στο κουτί των Ρυθμίσεων Top-Hat (Top-Hat Settings). Ο μετασχηματισμός ενισχύει τις φωτεινές περιοχές της εικόνας που έχουν αντίστοιχο μέγεθος με το Δομικό Στοιχείο. Περιοχές μικρότερες από το Δομικό Στοιχείο ελάχιστα επηρεάζονται, ενώ μεγαλύτερες χάνονται απ την εικόνα. Ως εκ τούτου, το μέγεθος του Δομικού Στοιχείου πρέπει να επιλεγθεί ως το μέσο μέγεθος περίπου των εστιών.

Είναι σημαντικό να εφαρμοστεί ο μετασχηματισμός σε ένα μόνο χρώμα μίας RGB εικόνας. Το επιθυμητό χρώμα επιλέγεται με το αντίστοιχο κουμπί του Καναλιού (Focus Channel) στο πάνελ κάτω από τις Ρυθμίσεις Top-Hat. Αν η εικόνα είναι grayscale τότε το πάνελ αυτό απενεργοποιείται.


Για την εκτέλεση του μετασχηματισμού, ο χρήστης πατάει το κουμπί  στο κάτω μέρος του παραθύρου. Όταν πατηθεί δημιουργείται μία καινούρια εικόνα που λαμβάνεται από την αρχική εικόνα. Αυτές οι αλλαγές επηρεάζουν μόνο το αντίγραφο της εικόνας και όχι αυτή στο φάκελο.

Διαχωρισμός H-Dome (H-Dome Segmentation):

Αυτή η διαδικασία διαχωρίζει τις περιοχές των εστιών παρόμοια με το διαχωρισμό που εφαρμόζεται στην Ανάλυση Αντικειμένων. Ωστόσο, χρειάζεται δύο παραμέτρους: Ύψος Θόλου(Dome Height) και Κατώφλι(Threshold). Η μέθοδος βασίζεται στα επίπεδα της έντασης ενός καναλιού. Εξετάζει κάθε κορυφή στο ιστογράμμο και υπολογίζει ένα ποσοστό του μήκους αρχίζοντας από το μέγιστο σημείο με τη χρήση της παραμέτρου Ύψος Θόλου. Τα επίπεδα έντασης που προκύπτουν για κάθε κορυφή εξάγονται για την υπόλοιπη γραφική παράσταση, παράγοντας έτσι μία ακολουθία δομών που μοιάζουν με θόλους. Τα pixel που πέφτουν εντός αυτών των επιπέδων έντασης τονίζονται στην εικόνα στο χρώμα που προσδιορίζεται στις Επιλογές Αντικειμένων.

Η παράμετρος του Κατωφλίου λειτουργεί ως τελικός περιοριστικός παράγοντας. Μόνο τα pixel που βρίσκονται εντός του εύρους αυτού μένουν στην εικόνα. Το όριο είναι ένα ποσοστό της περιοχής του ιστογράμματος για ένα δεδομένο κανάλι.

Στο Focus Channel επιλέγεται το χρώμα του καναλιού που θα αναλυθεί στην Ανάλυση Εστιών.

Για να εκτελεστεί ο Μετασχηματισμός H-Dome, ο χρήστης πατάει το κουμπί  στο κάτω μέρος του παραθύρου.

Αναγνώριση Εστιών (Identify Foci):

Αυτή η διαδικασία θα αναγνωρίσει περιοχές με foci βασιζόμενη στο διαχωρισμό που έχει γίνει από τον Διαχωρισμό H-Dome. Αυτή η εντολή είναι παρόμοια με την εντολή Αναγνώριση


Αντικειμένων της ενότητας Ανάλυσης Αντικειμένων. Εφαρμόζεται στις ΑΟΙ και όχι σε όλη την εικόνα. Χρησιμοποιεί παρόμοιες παραμέτρους ρυθμίσεων και προσδιορίζονται στο κουτί Επιλογών Αντικειμένων (Object Options) που περιλαμβάνει το Φίλτρο Θορύβου (Noise Filter) και Ανάλυση Οπών (Holes Analysis).

Επιπρόσθετα, χρησιμοποιεί τις παραμέτρους Σχήμα/Ρυθμίσεις Μεγέθους (Shape/Size Settings) αν είναι επιλεγμένη η Εφαρμογή Σχήματος/Μεγέθους (Apply Shape/Size).

Το Ελάχιστο Μέγεθος Focus (Min Focus Size) προσδιορίζει το ελάχιστο επιτρεπτό μέγεθος του focus σε pixel. Κάθε focus μικρότερο από αυτό θα αφαιρείται.

Το Μέγιστο Μέγεθος Focus (Max Focus Size) προσδιορίζει το μέγιστο επιτρεπτό μέγεθος του focus σε pixel. Κάθε μεγαλύτερο focus από αυτό θα αφαιρείται.

Το Υπό Όρους Μέγιστο Μέγεθος Focus (Max Focus Size(Conditional)) θα χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με την παράμετρο Ελαχίστης Σφαιρικότητας (Min Roundness). Αυτές θα χρησιμοποιηθούν για να χωριστούν οι εστίες.

Αυτά τα τρία βήματα μπορούν να εκτελεστούν διαδοχικά με το κουμπί  που κάνει την Αυτόματη Μέτρηση Εστιών (Auto Foci Count). Ωστόσο όλες οι παράμετροι που τέθηκαν προηγουμένως για κάθε μία απ τις τρεις διαδικασίες λαμβάνεται υπόψη στην τρέχουσα δράση.

Ενώ η μέθοδος βήμα-βήμα μπορεί να είναι χρήσιμη στην κατανόηση των διαδικασιών που βρίσκονται πίσω από την ανάλυση, το γεγονός ότι χρησιμοποιεί 4 διαφορετικές εντολές στο μενού είναι χρονοβόρο και όχι παραγωγικό. Αν και η Αυτόματη Μέτρηση Εστιών είναι γρηγορότερη, απαιτεί να ανοίγει κάθε εικόνα και να εισάγει τα αντίστοιχα Αρχεία Συλλογής Εικόνων. Άρα χρειάζεται μία γρηγορότερη μέθοδος.

5.6.4 Μέτρηση εστιών σε Πολλαπλές Εικόνες (Foci Counting with Multiple Images)

Η αυτόματη μέτρηση εστιών σε πολλαπλές εικόνες περιλαμβάνει όλα τα βήματα που περιγράφηκαν στο προηγούμενο τμήμα. Αν ο μετασχηματισμός Top-Hat δεν περιμένει ο χρήστης να έχει μεγάλη επίδραση στην ανάλυση, μπορεί να μην επιλέξει το αντίστοιχο κουτί και έτσι να επιταχύνει την διαδικασία. Αφού βελτιστοποιηθούν οι παράμετροι, η αυτόματη μέτρηση γίνεται πατώντας το κουμπί Εκκίνηση(Start) στο κάτω μέρος του παραθύρου. Τα αποτελέσματα τοποθετούνται στα φύλλα εργασίας Ανάλυση Εστιών (Foci Analysis), Σύνοψη Κυττάρου (Cell Summary) και Σύνοψη Focus (Focus Summary). Πατώντας το κουμπί Διακοπή(Stop) η διαδικασία σταματάει.

Άλλη μία λειτουργία που υπάρχει εδώ είναι η Κανονικοποίηση_(Normalization). Αυτό είναι χρήσιμο όταν υπάρχει σημαντική διαφορά ανάμεσα στα επίπεδα έντασης των εστιών για κάθε εικόνα. Αφότου τα δεδομένα των εστιών προστεθούν στα φύλλα εργασίας, η Εξωτερική Κανονικοποίηση_(External Normalization) θα αρχίσει να τρέχει σε όλες τις εικόνες άλλη μία φορά υπολογίζοντας τη μέση Πυκνότητα(Density) για κάθε εικόνα. Ύστερα προσπαθεί να ελαχιστοποιήσει το εύρος των διαφορών μεταξύ αυτών των τιμών φέρνοντάς τις πιο κοντά. Ο Συντελεστής(Coefficient) Εξωτερικής Κανονικοποίησης χρησιμοποιείται για αυτό. Επιτρέπει στις εικόνες με τις μικρότερες σχετικά εντάσεις να ανιχνευτούν.

Για επιπλέον κανονικοποίηση των επιπέδων έντασης εστιών ο χρήστης επιλέγει τη Χρήση Υπαρχόντων Δεδομένων (Use Existing Data) και πατάει πάλι Εκκίνηση. Το πρόγραμμα θα τρέξει ξανά σε όλες τις εικόνες, αλλά τώρα θα κανονικοποιήσει τις ήδη υπάρχουσες τιμές Πυκνότητας. Πρέπει, όμως, να υπάρχει ήδη ένα τουλάχιστον Φύλλο Εργασίας.

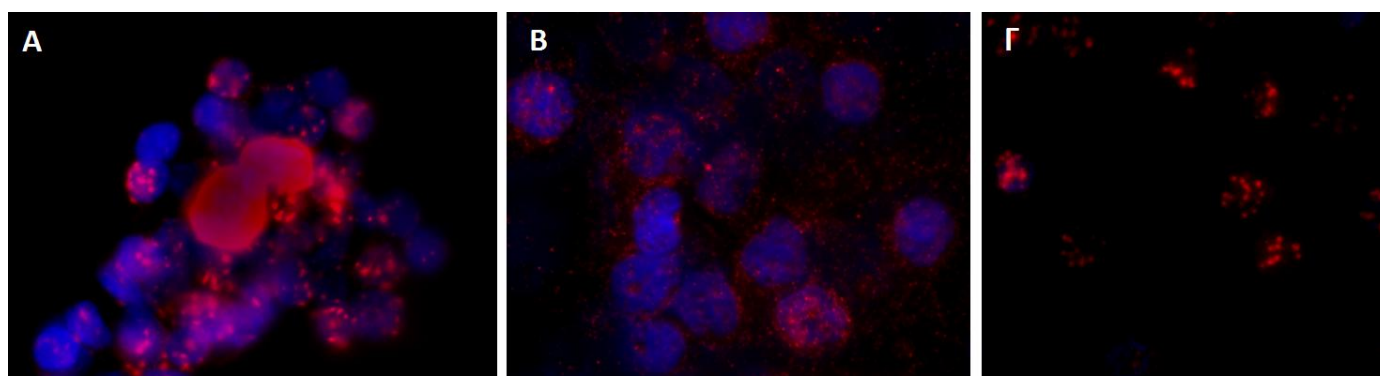
Κεφάλαιο 6: Μία τυπική ανάλυση με το JCount

6.1 Το πείραμα

Σε αυτό το πείραμα λήφθηκε αίμα και ακτινοβολήθηκε με ακτίνες γ από πηγή ^{60}Co από την ομάδα σε δύο δόσεις, 0Gy, 1Gy. Μετά την ακτινοβολήση φυγοκεντρήθηκε και απομονώθηκαν τα λευκά αιμοσφαίρια και επώαστηκαν για διαφορετικούς χρόνους πριν τελικά φιξαριστούν. Τα πρώτα φιξαρίστηκαν για δεκαπέντε λεπτά σε φορμαλδεΰδη ώστε να σταματήσει κάθε μεταβολική διαδικασία και να διατηρηθούν ως έχουν. Ξεπλύθηκαν χημικά και προστέθηκε το διάλυμα blocking που φροντίζει να μην προσδεθούν τα αντισώματα σε ανεπιθύμητες περιοχές. Ακόλουθα επώαστηκαν για μία ώρα, προστέθηκε το αντίσωμα που θα προσδεθεί στην γH2AX ξεπλύθηκαν και προστέθηκε πάλι διάλυμα blocking. Μετά από άλλη μία ώρα επώαση προστέθηκε το δεύτερο αντίσωμα που φέρει τη φθορίζουσα ουσία και προσδέεται στο πρώτο. Τρία τέταρτα της ώρας μετά ξεπλύθηκαν για τελευταία φορά και χρώστηκαν με DAPI. Τα υπόλοιπα φιξαρίστηκαν μετά από 6, 12, 24 και 48 ώρες.

6.2 Επιλογή εικόνων

Όταν το πείραμα έχει ολοκληρωθεί και αρχίζει η ανάλυση των εικόνων, το πρώτο βήμα είναι να επιλεγούν οι εικόνες που θα αναλυθούν. Οι εικόνες που μπορούν να αναλυθούν από το JCount μπορούν να έχουν μέχρι τρία χρώματα. Στο συγκεκριμένο πείραμα εμφανίζεται με μπλε χρώμα το DNA (DAPI) και με κόκκινο η γH2AX.



Εικόνα 6.1: Απορριπτές εικόνες μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού. (Α) Δεν μπορεί να αναλυθεί γιατί απεικονίζει συσσωματώματα λεμφοκυττάρων. (Β) Επιλέχθηκε να μην αναλυθεί διότι απεικονίζει μία πειραματική συνθήκη, η οποία προέκυψε κατά τη διαδικασία ευρέσεως του κατάλληλου πρωτοκόλλου, που περιλάμβανε στέγνωμα των κυττάρων πριν τη μονιμοποίηση και, τελικά, λόγω χαμηλής ποιότητας της εικόνας, η συνθήκη απερίφητη. (Γ) Δεν αναλύεται λόγω ελλιπούς απεικόνισης στο DAPI, κάτι που καθιστά δύσκολη τη σφαή έυρεση των ορίων των κυττάρων.

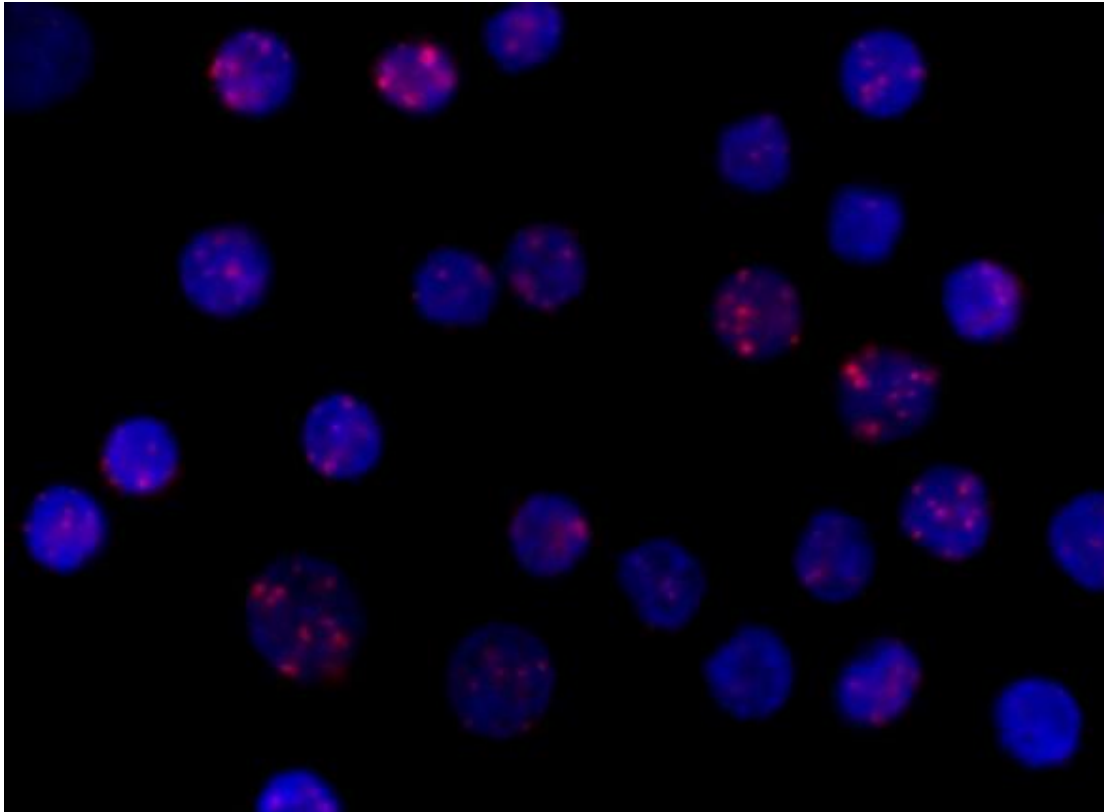
Αυτό είναι το πρώτο από τα βήματα που χρειάζονται κάποια πρωτοβουλία, αφού ο ερευνητής καλείται να κρίνει ποιες από τις εικόνες είναι πολύ κακές για να ληφθούν υπόψη. Δεν υπάρχει ξεκάθαρη γραμμή σε αυτό. Στις εικόνες φαίνονται παραδείγματα εικόνων που απορρίπτονται από την ανάλυση. Επίσης, πρέπει να απορριφθούν εικόνες που υπάρχουν δύο φορές και εκείνες που έχουν διαφορετική μεγέθυνση, αφού στην αυτόματη ανάλυση θα εμφανίσουν προβλήματα. Καλό είναι αφότου γίνει η εκλογή να δημιουργηθεί ένας φάκελος με τις εικόνες που επιλέχθηκαν για ευχέρεια.

Μετά την εκκίνηση του προγράμματος JCount ανοίγει η γραμμή εργαλείων. Για να επιλεγούν οι εικόνες πιέστε File -> Select Images. Ανοίγει το παράθυρο επιλογής. Αριστερά είναι το ευρετήριο, στο οποίο επιλέγεται ο φάκελος που περιέχει τις εικόνες. Στο μεσαίο παράθυρο εμφανίζονται οι εικόνες που μπορούν να αναλυθούν από το πρόγραμμα. Με τον κέρσορα

μπορούν να επιλεγθούν και να προστεθούν στη λίστα που θα αναλυθεί με το κουμπί Add. Αν χρειαστεί να αφαιρεθεί κάποια από τη λίστα, χρησιμοποιείται το Delete, ενώ για να αφαιρεθούν όλες χρησιμοποιείται το Clear. Με τα Up και Down μετακινούνται μεμονωμένες εικόνες στη λίστα. Τελικώς, με το Display αρχίζουν να φορτώνονται οι εικόνες.

6.3 Επιλογή πυρήνων

Ένα βήμα που μπορεί να φανεί χρήσιμο, αν και γενικά δεν χρειάζεται, είναι η αλλαγή της



Εικόνα 6.2: Μία χαρακτηριστική εικόνα της ανάλυσης (A1: 1Gy 20min)

καμπύλης απεικόνισης που εμφανίζεται από την γραμμή εργαλείων επιλέγοντας Image -> Display Curve.

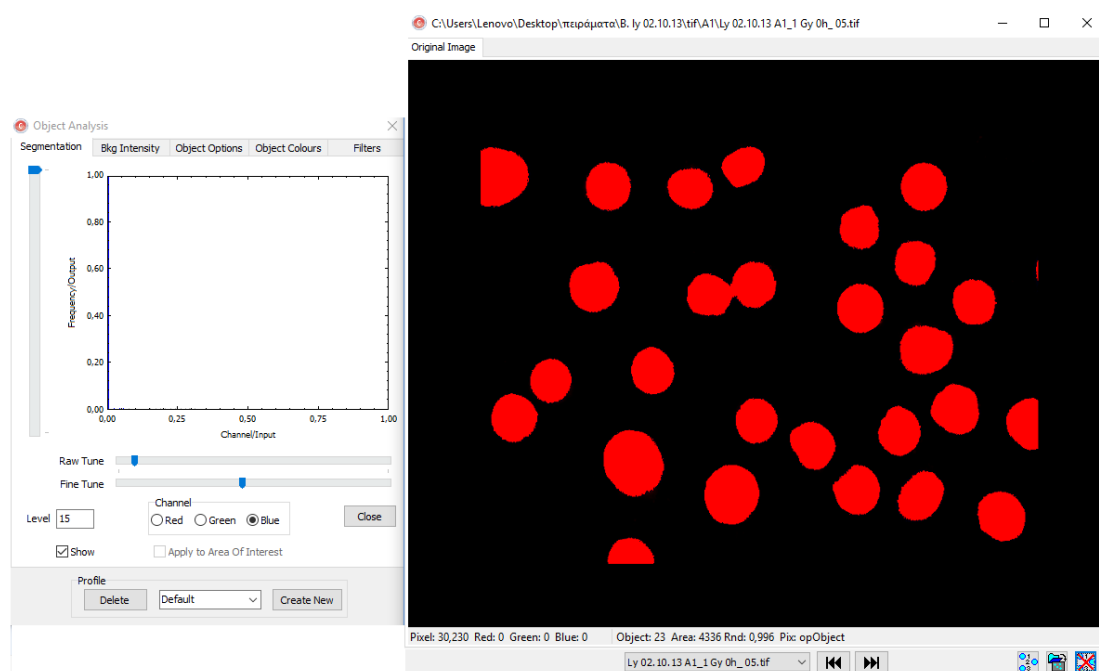
Όπως είναι λογικό, η σχέση ανάμεσα στην ένταση των pixel που καταγράφηκαν από την κάμερα και την ένταση των pixel που φαίνονται στην οθόνη είναι ένα προς ένα για κάθε χρώμα. Ωστόσο αυτή η σχέση μπορεί να αλλάξει με τις επιλογές των κουμπιών που φαίνονται δεξιά στο Display Curve (βλ. 5.3.2). Η πιο ευέλικτη επιλογή είναι η Custom που διατηρεί τη γραμμικότητα της σχέσης, αλλά επιτρέπει να αλλάξει η κλίση και η θέση της ευθείας αλλάζοντας τη θέση της πάνω και της κάτω μπάρας.

Παρά την πρακτικότητα αυτών των αλλαγών, αφού μπορεί να βοηθήσουν να διακρίνονται καλύτερα τα αντικείμενα, δεν είναι η πρώτη επιλογή για αυτό το ζήτημα και ίσως πρέπει να εξεταστεί αφότου οι εξειδικευμένοι μετασχηματισμοί που χρησιμοποιεί (που θα αναφερθούν ακολούθως) δεν επαρκούν.

Για την επιλογή των πυρήνων από την γραμμή εργαλείων ανοίγει το παράθυρο Object Analysis -> Segmentation.

Επιλέγοντας το μπλε χρώμα για το DAPI, η μπάρα που μας ενδιαφέρει εδώ κυρίως είναι η Raw Tune. Η θέση στην μπάρα προσδιορίζει ένα κατώφλι έντασης. Το πρόγραμμα 'βλέπει' μόνο τα

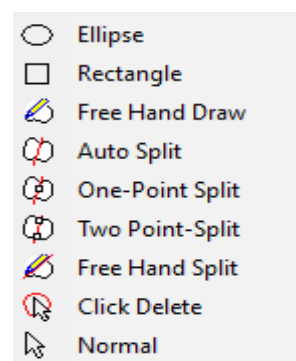
ριxel που έχουν ένταση μεγαλύτερη από το κατώφλι. Έτσι όταν βρίσκεται τελείως δεξιά βλέπει μόνο τα κορεσμένα ριxel και όταν βρίσκεται τελείως αριστερά βλέπει οτιδήποτε έχει ένταση από 1 και πάνω.



Εικόνα 6.3: Χρήση του Raw Tune για την επιλογή των πυρήνων.

Οι πυρήνες θα επιλεγούν ανάλογα με τη μεταβλητή που θα μετρηθεί. Αν η μέση ένταση στο DAPI ενδιαφέρει την ανάλυση, τότε τα όρια του αντικειμένου επιλέγονται όσο πιο κοντά στα όρια του πυρήνα. Για τον αριθμό των εστιών, όμως, η υπερεκτίμηση του μεγέθους του πυρήνα δεν θα προκαλέσει πρόβλημα. Οπότε δεν είναι κακό να μειωθεί το κατώφλι στο Raw Tune μόνο τόσο ώστε να καλύπτει το αντικείμενο σίγουρα τον πυρήνα.

Αφότου βρεθεί το κατάλληλο κατώφλι, το επόμενο βήμα είναι στην καρτέλα Object Options. Εκεί θα επιλεγούν το Auto Delete Small Objects για να μην ληφθούν υπόψη αντικείμενα που σίγουρα δεν είναι πυρήνες, και το Auto Fill Small Holes που θα γεμίσει πιθανά κενά μέσα στα αντικείμενα, ώστε να μην υπάρχουν 'τρύπες' στους πυρήνες. Η επιλογή αυτή είναι πολύ χρήσιμη σε περιπτώσεις όπου σκοτεινές περιοχές στο DAPI, όπως οι πυρηνίσκοι στους οποίους δεν προσδέεται το DAPI, ενδέχεται να προκαλέσουν εσφαλμένο σχήμα επιλεγόμενου αντικειμένου. Ο μετασχηματισμός Top Hat θα χρησιμοποιηθεί στο στάδιο της ανάλυσης των εστιών. Σε μερικές εικόνες είναι χρήσιμη και η επιλογή Auto Split Large Objects, αν και αυτό μπορεί να το κάνει και ο χρήστης χειροκίνητα για μεγαλύτερη ευελιξία. Οι αλλαγές εφαρμόζονται με το κουμπί Apply. Σχετικά με τις τιμές είναι καλός ο πειραματισμός με κάθε εικόνα, γιατί δίνει καλύτερη αίσθηση της επιλογής των παραμέτρων. Για παράδειγμα, στην πρώτη εικόνα, το Raw Tune φαίνεται να φτάνει για να εντοπιστούν τα αντικείμενα.



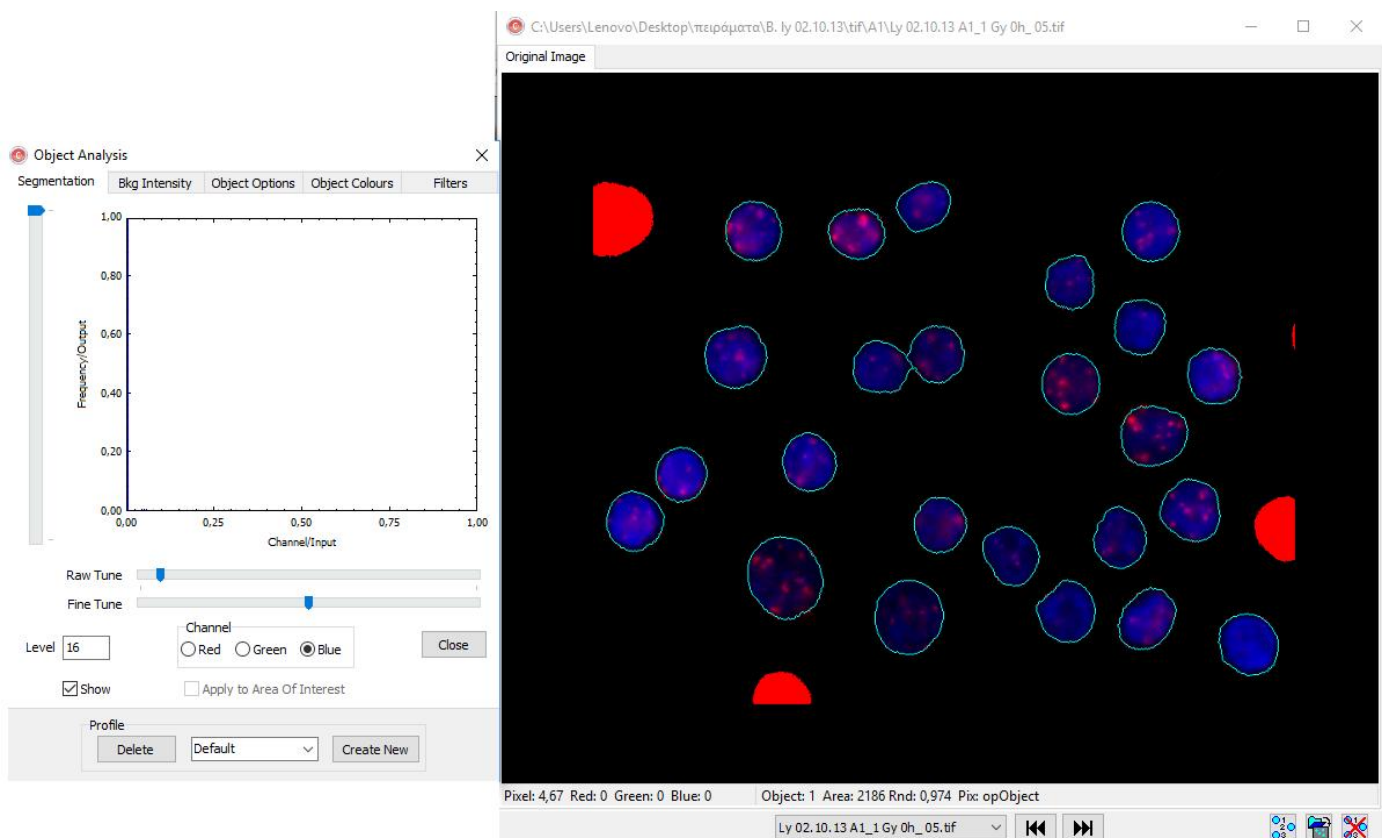
Όσον αφορά στην επιλογή των αντικειμένων, μεγάλο μέρος των διαδικασιών είναι χειροκίνητο, αφού υπάρχουν πυρήνες που αλληλοεπικαλύπτονται σε μικρό βαθμό (αρκετά μικρό ώστε να τους λάβουμε υπόψη, αλλά αρκετά μεγάλο ώστε να συγχέονται ως ένα αντικείμενο), πυρήνες που πρέπει να απορριφθούν λόγω ποιότητας σε καλές εικόνες και πυρήνες που είναι κομμένοι

γιατί είναι στα όρια της εικόνας. Σε κάθε περίπτωση, ο χρήστης θα πρέπει να διαγράψει ή να σχεδιάσει αντικείμενα μερικές φορές σε κάθε εικόνα, ή ακόμη και να χωρίσει αντικείμενα μεταξύ τους. Αυτές οι επιλογές εμφανίζονται με δεξί κλικ πάνω στην εικόνα. Κάθε μία αλλάζει τον κέρσορα επιτρέποντας διαφορετική λειτουργία. Επαναφορά του κέρσορα γίνεται με την τελευταία επιλογή, Normal.



Σημειώνεται σε αυτό το σημείο πως τα κουμπιά στο κάτω μέρος της καρτέλας Object Options που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι το πρώτο (αναγνωρίζει όλα τα αντικείμενα της εικόνας βάσει των παραμέτρων που τέθηκαν), το δεύτερο (σβήνει όλα τα αντικείμενα) το τέταρτο (φορτώνει το αρχείο .ios που είναι αποθηκευμένο στον φάκελο Manual Edit – εξηγείται στην επόμενη παράγραφο) και το τελευταίο (εφαρμόζει τον μετασχηματισμό H-Dome).

Τα υπόλοιπα, αναφέρονται και στο κεφάλαιο 5, δεν είναι τόσο χρήσιμα σε αυτό το βήμα. Το προτελευταίο κουμπί, το οποίο εφαρμόζει το μετασχηματισμό Top Hat, είναι πολύ χρήσιμο στην διαδικασία εντοπισμού εστιών, αλλά όχι απαραίτητο στη διαδικασία εντοπισμού των αντικειμένων, δηλαδή εδώ των πυρήνων.

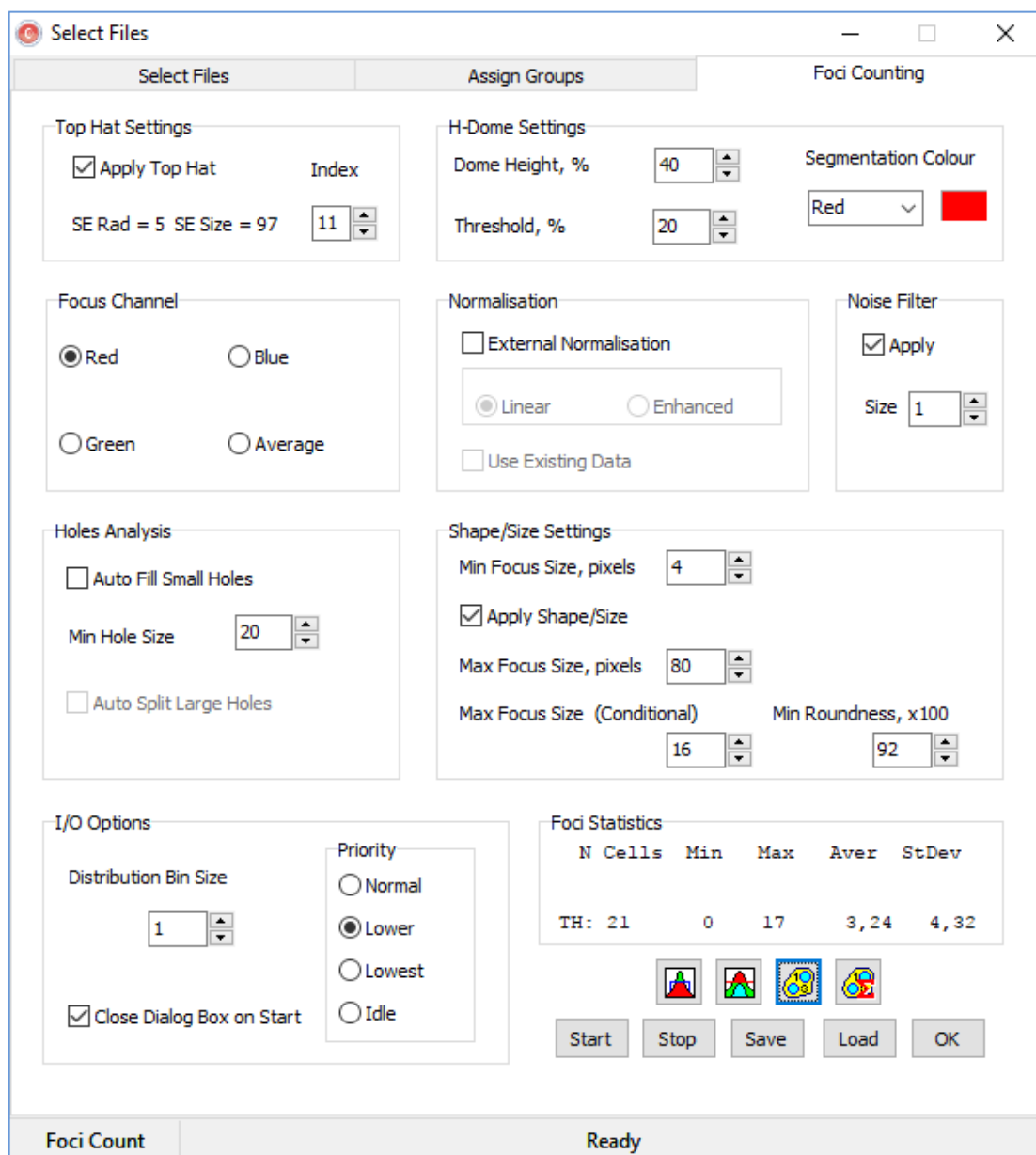


Εικόνα 6.4: Επιλογή των πυρήνων.

Όταν εντοπιστούν όλα τα αντικείμενα, προχωράμε στην επόμενη εικόνα. Από τη στιγμή που θα ξεκινήσει η επεξεργασία, εμφανίζονται στον φάκελο με τις εικόνες τρεις νέοι φάκελοι: Auto Analysis, History και Manual Edit. Ο Manual Edit είναι εκείνος που ενδιαφέρει κυρίως, γιατί περιέχει τα αρχεία τύπου .ios που είναι τα αρχεία με τα σχήματα των αντικειμένων που φαίνονται επί της αρχικής εικόνας. Επειδή αυτοί οι φάκελοι δέχονται επεξεργασία άμεσα από

το πρόγραμμα, καλό είναι να δημιουργηθεί άλλος ένας φάκελος ως back-up που θα περιέχει τα περιεχόμενα του Manual Edit όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία ώστε να μην χαθούν κατά λάθος.

6.4 Εντοπισμός των εστιών γΗ2ΑΧ



Εικόνα 6.5: Παράθυρο ανίχνευσης εστιών γΗ2ΑΧ.

Γραμμή εργαλείων: Foci Analysis -> Select Files. Όταν ανοίξει το παράθυρο επιλογής το ευρετήριο μοιάζει με το προηγούμενο. Η διαφορά είναι πως θα επιλεγούν δύο ειδών αρχεία, τα .tif που είναι οι εικόνες και τα .ios που είναι τα αρχεία αντικειμένων. Από το ευρετήριο βρίσκεται ο φάκελος των εικόνων και προστίθενται στο πάνω δεξιά μέρος με το Add. Από κάτω ακριβώς τοποθετούνται τα αρχεία αντικειμένων με το Add, με προσοχή να είναι ένα προς ένα σωστά ώστε να μην υπάρχει σύγχυση ως προς τα αντικείμενα.

Όταν σχηματιστούν αυτές οι δύο λίστες προχωράμε στο επόμενο βήμα πατώντας Select. Ανοίγει ένα παράθυρο όπου τα δύο αρχεία επικαλύπτονται και δεν γίνεται πλέον να δεχτούν

επεξεργασία. Στο παράθυρο Select Files στην δεύτερη καρτέλα, Assign Groups, θα χωριστούν οι τρεις καταστάσεις του πειράματος, ώστε να αναλυθούν ως ομάδες αφότου ξεκινήσει η ομαδική επεξεργασία. Δίνοντας ταυτότητα στο πρώτο μέλος κάθε ομάδας(1,2,3...) και πατώντας Accept Groups συμπληρώνονται όλα τα ενδιάμεσα. Η ομαδική ανάλυση ενεργοποιείται επιλέγοντας Apply Group Analysis.

Στην τρίτη καρτέλα, Foci Counting (Εικόνα 6.5), θα επιλεχθούν οι παράμετροι που είναι καλύτερες για τον εντοπισμό των εστιών βάσει των εικόνων.

Στο Focus Channel επιλέγεται το κόκκινο.

Ο Top Hat είναι μετασχηματισμός που εφαρμόζεται στην εικόνα. Επιλέγεται γιατί θα χρειαστεί. Ο δείκτης που επιλέγεται συσχετίζεται με την ακτίνα και το μέγεθος των εστιών που θα ανιχνευτούν. Η ακτίνα του δομικού στοιχείου (SE Rad) και η επιφάνειά του (SE Size) εξαρτώνται από τον δείκτη και φαίνονται αριστερά του. Αυτό το δομικό στοιχείο είναι το μέγεθος αντικειμένου που πρέπει να ανιχνευτεί, οπότε ο αλγόριθμος αφαιρεί τα υπόλοιπα στοιχεία. Στο συγκεκριμένο πείραμα τιμές ανάμεσα σε 9 και 12 δίνουν καλά αποτελέσματα.

Ο H-Dome είναι μετασχηματισμός που ζητάει δύο παραμέτρους. Το ύψος του θόλου και το κατώφλι. Το ύψος του θόλου είναι η παράμετρος που συμβολίζει το ποσοστό της μέγιστης έντασης πάνω από το οποίο αναζητούνται τα μέγιστα. Έτσι όταν γίνει ο μετασχηματισμός θα αναζητηθούν οι θόλοι γύρω από τα τοπικά μέγιστα που υπερβαίνουν αυτή την παράμετρο. Το κατώφλι είναι η παράμετρος κάτω από την οποία αγνοούνται τα pixel στον μετασχηματισμό.

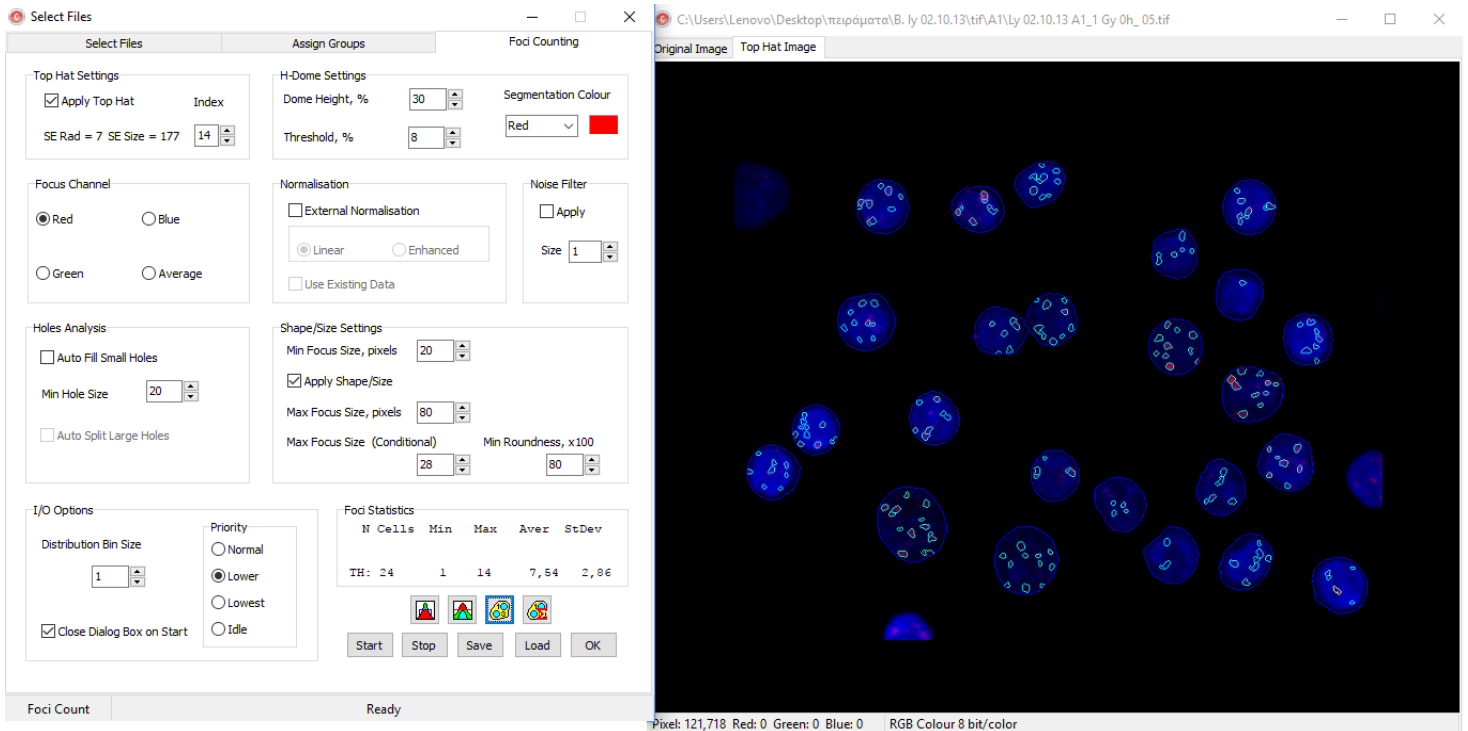
Δε χρειάζεται για να χρησιμοποιηθεί το Auto Fill Small Holes αυτή τη φορά, γιατί ήδη οι εστίες είναι πολύ μικρές και χρειάζονται οι λεπτομέρειες ώστε να διακριθούν οι διαφορές.

Το τμήμα Shape/Size Settings είναι πολύ χρήσιμο, αφού επιτρέπει την εκλογή ελαχίστου και μεγίστου στον αριθμό των pixel κάθε εστίας. Επιλέγεται το Apply Shape/Size. Το Max Focus Size(Conditional) και Min Roundness δεν είναι τόσο σημαντικό, αν και στο Min Roundness ίσως βοηθάει να επιλεγεί κάποια τιμή μεγαλύτερη από 90%, γιατί οι εστίες αναμένεται να σχηματίζονται σφαιρικά και άρα να έχουν κυκλική τομή στο επίπεδο.

Τα κουμπιά κάτω δεξιά είναι όπως και στο προηγούμενο υποκεφάλαιο και καλό είναι να χρησιμοποιούνται ώστε να εκτιμάται η βέλτιστη επιλογή παραμέτρων. Πάντα θα υπάρχει κάποιου είδους σφάλμα, ωστόσο μπορούν να επιλεγούν με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι όσο μικρότερο γίνεται. Όταν πειραματιστεί ο χρήστης με τις παραμέτρους για μερικές εικόνες και δει πώς αποδίδονται στην απεικόνιση, μπορεί να κρίνει καλύτερα τις βέλτιστες τιμές. Στην εικόνα 6.6 φαίνεται η ανάλυση της πρώτης εικόνας ως προς τις εστίες.

Να σημειωθεί σε αυτό το σημείο ότι δύσκολα θα βρεθεί κάθε εστία. Στην 6.6 παρατηρείται ένα σαφές κόκκινο σημάδι σε έναν από τους κεντρικούς πυρήνες που δεν είναι . Επίσης είναι πιθανό να υπολογιστεί μία εστία ως δύο ή το ανάποδο. Αυτά τα παρατηρεί ο χρήστης δοκιμάζοντας τις παραμέτρους του προγράμματος. Ο ρεαλιστικός στόχος δεν είναι να είναι να εντοπιστούν όλες οι εστίες μία προς μία σε κάθε εικόνα, αλλά να εκτιμηθούν οι παράμετροι που δίνουν το ελάχιστον σφάλμα στον εντοπισμό των εστιών, όπως το κρίνει ο χρήστης του προγράμματος.

Η δουλειά του χρήστη είναι να εντοπίσει τις εστίες ή άλλες σχετικές παραμέτρους. Αυτό σημαίνει πως δεν κάνει ποιοτικό έλεγχο. Όχι, τουλάχιστον, εκτενή. Όμως πρέπει να αξιοποιεί κάποιες γνώσεις ώστε να έχει καλύτερη απόδοση η ανάλυση. Για παράδειγμα, το πρωτόκολλο του πειράματος, το είδος της ακτινοβολίας, ακόμη και η διαφορετική δόση ανά ομάδα, δε θα έπρεπε να παίζουν ρόλο στο στάδιο της ανάλυσης εικόνων, είναι παράμετροι που λαμβάνονται υπόψη στην στατιστική ανάλυση. Αλλά το γεγονός πως πρόκειται για λεμφοκύτταρα, και άρα πολύ στρογγυλούς πυρήνες παρόμοιου μεγέθους, ή το γεγονός πως για δόση 0Gy το υπόβαθρο σε γΗ2ΑΧ είναι πολύ μικρό, θα έπρεπε να επηρεάσει τον χρήστη ως προς την επιλογή των πυρήνων που θα αναλυθούν.



Εικόνα 6.6: Αυτόματη επιλογή εστιών γΗ2ΑΧ.

Όταν αποφασιστεί ποιος είναι ο καλύτερος συνδυασμός παραμέτρων για τις συγκεκριμένες εικόνες, τότε το Start αρχίζει την αυτόματη ανάλυση όλων των εικόνων που έχουν επιλεγεί. Όταν ολοκληρωθεί η ανάλυση εμφανίζεται ένας πίνακας με επτά καρτέλες:

- Image Summary
- Object Summary
- Foci Analysis
- Cell Summary
- Focus Summary
- Group Analysis
- Distributions

Image Summary

Περιέχει πληροφορίες για το αρχείο, την προέλευσή του, το μέγεθος και χαρακτηριστικά των εικόνων.

- Όνομα αρχείου εικόνας (Image File)
- Πλάτος εικόνας (Image Width)
- Μήκος εικόνας (Image Length)
- Δείγματα ανά pixel (Samples per pixel)
- Bits ανά δείγμα (Bits per Sample)
- Τύπος εικόνας (Image Type)
- Αριθμός αντικειμένων (N of Objects)

Object Summary

Για κάθε εικόνα υπάρχει μία καταχώρηση που δίνει πληροφορίες για αυτήν.

- Όνομα αρχείου εικόνας (Image File)
- Παράμετροι (Parameters): επίπεδο διαχωρισμού, υπόβαθρο, ελάχιστο μέγεθος
- Αριθμός αντικειμένων (N of Objects)
- Ελάχιστη επιφάνεια (Min Area)
- Μέγιστη επιφάνεια (Max Area)
- Μέση επιφάνεια και η τυπική απόκλισή της (Avg Area/Std Area)
- Μέση ένταση στο μπλε και η τυπική απόκλισή της (Avg Intensity/Std Intensity)
- Ένταση υποβάθρου (Bkg Intensity)

Foci Analysis

- Όνομα αρχείου εικόνας (Image File)
- Παράμετροι (Parameters) :Top Hat, H-Dome υψος θόλου και κατώφλι, συν ό, τι άλλο χρησιμοποιήθηκε ως παράμετρος σε αυτό το στάδιο.
- Αριθμός κυττάρων (Number of Cells) (των πυρήνων στην πραγματικότητα)
- Μέση επιφάνεια Κυττάρων (Avg Cell Area)
- Ελάχιστος αριθμός εστιών ανά κύτταρο (Min Foci N)
- Μέγιστος αριθμός εστιών ανά κύτταρο (Max Foci N)
- Μέση τιμή αριθμού εστιών ανά κύτταρο και η τυπική απόκλισή του (Avg Foci N/ StDev Foci N)
- Super Average
- Μέση επιφάνεια εστίας και η τυπική απόκλισή της (Focus Area/StDev Focus Area)
- Πυκνότητα έντασης εστιών με την τυπική απόκλισή της (Density/StDev Density)
- Συντελεστής εξωτερικής κανονικοποίησης (Ext Norm Co)

Group Analysis

- Ταυτότητα ομάδας (Group ID)
- Περιγραφή ομάδας (Group Description)
- Μέσος αριθμός εστιών (Average Foci N)
- Διακύμανση (Variance)
- Τυπική απόκλιση (StDev)
- Σφάλμα τυπικής απόκλισης (StDev Err)

Οι υπόλοιπες καρτέλες, Cell Summary, Focus Summary, Distributions, δίνουν πολύ αναλυτικά αποτελέσματα και χρησιμοποιούνται για πιο εξειδικευμένους στόχους.

Από το φύλλο εργασιών μπορεί κανείς να δει άμεσα τον αριθμό εστιών για κάθε κατάσταση μαζί με την τυπική απόκλισή τους, οπότε ο στόχος που τέθηκε στην αρχή του κεφαλαίου επιτεύχθηκε.

6.5 Πιο εξειδικευμένοι στόχοι και άλλες εκδόσεις του JCount

Το JCount μπορεί να αναγνωρίσει τρία χρώματα και να αναλύσει τα δύο. Στο πρώτο χρώμα εντοπίζει κανείς τα αντικείμενα, δηλαδή τα κύτταρα ή τους πυρήνες σε βιολογικές αναλύσεις. Σε αυτό ο χρήστης μπορεί να πάρει πληροφορίες σχετικά με τον αριθμό των αντικειμένων, το μέγεθος και την έντασή τους. Μετά γίνεται η επεξεργασία στο δεύτερο χρώμα, εντός των αντικειμένων του πρώτου χρώματος. Σε αυτό ο χρήστης μπορεί να πάρει πληροφορίες σχετικά με τον αριθμό των μικρών αντικειμένων στα μεγάλα, την έκταση και την έντασή τους.

Υπάρχουν, όμως, πολλές περισσότερες μεταβλητές που έχουν ενδιαφέρον και αξίζουν να μελετηθούν. Για αυτόν το λόγο αναπτύσσονται συνεχώς νέες εκδόσεις επί του βασικού JCount. Μία από αυτές είναι το JQuantPro.

Το JQuantPro μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πιο εξειδικευμένες αναλύσεις. Ο χρήστης μπορεί να αναλύσει ταυτόχρονα δύο χρώματα εντός των αντικειμένων που επιλέγονται με κάποιο τρίτο χρώμα, αν το θέλει ο χρήστης. Έτσι είναι δυνατόν να ληφθούν δεδομένα σχετικά με την επικάλυψη εστιών, όπως ο αριθμός των αλληλοεπικαλυπτόμενων εστιών και ο βαθμός αλληλοεπικάλυψης.

Στο πλαίσιο της εργασίας δεν έγινε ανάλυση εικόνων με δύο χρώματα.

Κεφάλαιο 7: Υπολογισμός αριθμού εστιών γΗ2ΑΧ ανά κύτταρο σε λεμφοκύτταρα

7.1 Σκοπός ανάλυσης

Σε αυτό το κεφάλαιο γίνεται ανάλυση εικόνων ανοσοφθορισμού από τρία διαφορετικά πειράματα επιδιόρθωσης, ώστε να υπολογιστεί ο αριθμός εστιών γΗ2ΑΧ ανά κύτταρο. Στα πειράματα επιδιόρθωσης υπολογίζεται ο αριθμός εστιών γΗ2ΑΧ σε σχέση με το χρόνο μετά την ακτινοβολήση. Έτσι μελετάται σε αυτά τα τρία πειράματα η διαδικασία σχηματισμού και επιδιόρθωσης δίκλωνων θραύσεων από ακτινοβολία-γ σε λεμφοκύτταρα, αφού κάθε εστία γΗ2ΑΧ θεωρείται πως αντιστοιχεί σε μία δίκλωνη θραύση. Δεν πρέπει να λησμονείται πως η εστία σχηματίζεται σταδιακά μετά την πρόκληση της δίκλωνης θραύση και το σχήμα της μεγιστοποιείται μισή ώρα μετά την ακτινοβολήση. Επίσης μετά την επιδιόρθωση εξαφανίζεται σταδιακά.

Όπου χρειάστηκε, οι ομάδες των λεμφοκυττάρων αναλύθηκαν ξεχωριστά από το λογισμικό ώστε να ληφθούν με καλύτερη ακρίβεια τα αποτελέσματα. Στα αποτελέσματα, στη συνέχεια εφαρμόστηκαν δύο στατιστικές αναλύσεις, μία απλή, στην οποία υπολογίστηκε η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση του δείγματος, και μία που αξιοποίησε την κατανομή Poisson. Τα αποτελέσματα των δύο αναλύσεων συγκρίνονται για να εξεταστεί η σχετική ακρίβειά τους.

Το πρωτόκολλο προετοιμασίας του πρώτου πειράματος αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 6, στο οποίο εξηγήθηκε και η διαδικασία της ανάλυσης εικόνων με το λογισμικό. Όλα τα πειράματα είχαν αντίστοιχο πρωτόκολλο. Τα πειράματα έγιναν από την δρ. Ζαχαρένια Νικητάκη στο κτίριο Υγειοφυσικής του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος» σε συνεργασία με την ομάδα του εργαστηρίου βλαβών DNA του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

7.2 Πείραμα 1: Το πρώτο πείραμα επιδιόρθωσης λεμφοκυττάρων

Αρχικά λήφθηκαν 7,5mL αίματος. Από 4mL αίματος απομονώθηκαν τα λεμφοκύτταρα και χωρίστηκαν σε πέντε φυαλίδια που ακτινοβολήθηκαν με δόση 1Gy από πηγή ⁶⁰Co. Κάθε φυαλίδιο επώαστηκε και φιξαρίστηκε με φορμαλδεΰδη σε διαφορετικούς χρόνους: 0', 6, 12, 24 και 48 ώρες. Για τις 0' ώρες, στην πραγματικότητα πέρασαν 50' από την ώρα που βγήκαν από τον πάγο ώσπου να μπουν στην φορμαλδεΰδη, τα οποία οι ερευνητές εκτίμησαν και θεώρησαν πως ισοδυναμούν με 20' επώασης. Από το αίμα που περίσσεψε απομονώθηκαν λεμφοκύτταρα για δείγματα ελέγχου, δηλαδή δόσης 0Gy, για τις 12, 24 και 48 ώρες.

	0Gy - ομάδα 1	0Gy - ομάδα 2	1Gy - ομάδα 1	1Gy - ομάδα 2
"0"h (20')	X	X	A1	A2
6h	X	X	B1	X
12h	Γ3	Γ4	Γ1	Γ2
24h	Δ4	Δ3	Δ1	Δ2
48h	Ε3	Ε4	Ε1	Ε2

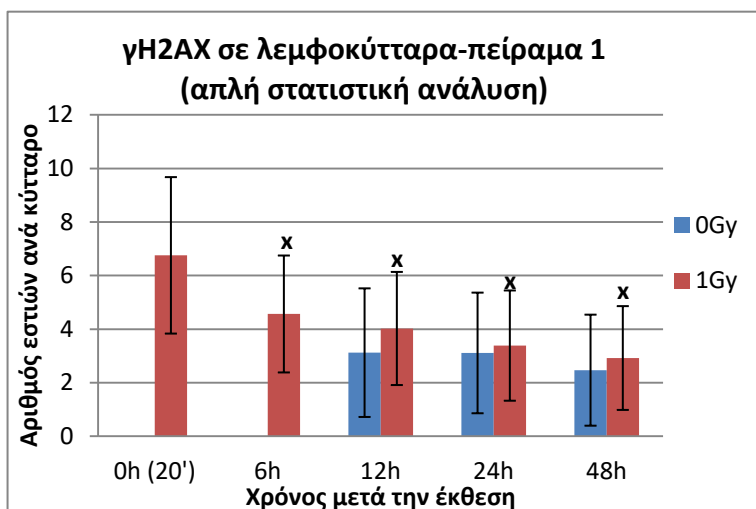
7.2.1 Απλή στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Οι εικόνες επιλέχθηκαν όπως περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 6. Απορρίφθηκαν όποιες ήταν ακατάλληλες και από αυτές που αναλύθηκαν εξαιρέθηκαν ακατάλληλοι πυρήνες.

Η πρώτη στατιστική ανάλυση είναι απλή: Συγκεντρώνονται τα αποτελέσματα με τον αριθμό εστιών ανά κύτταρο για κάθε πυρήνα που αναλύθηκε και υπολογίζεται η μέση τιμή αυτής της μεταβλητής και η τυπική απόκλισή της στο δείγμα. Το ελάττωμα αυτής της ανάλυσης είναι πως

η τυπική απόκλιση ως σφάλμα είναι πολύ μεγάλη, με αποτέλεσμα να υπάρχει αρκετή αβεβαιότητα ως προς την εγκυρότητα της μέσης τιμής. Στο **Γράφημα 7.1** παρουσιάζονται αυτά τα αποτελέσματα.

Και με το μάτι μπορεί να παρατηρηθεί στις εικόνες η ποιοτική διαφορά που υπάρχει όσο περνάει η ώρα, καθώς οι εστίες ελαττώνονται. Να δίνεται προσοχή στον αριθμό των πυρήνων, όσον αφορά στην στατιστική μελέτη, γιατί σε κάποια δείγματα ο αριθμός που αναλύθηκε ήταν σχετικά μικρός. Για παράδειγμα, στην ομάδα 2 των 0Gy στις 6 ώρες δεν υπάρχουν καλές εικόνες, για αυτό ο αριθμός των κυττάρων στην συνθήκη 1Gy 6h είναι μικρός.



Τα κύτταρα ελέγχου φαίνεται να έχουν γύρω στις 3 εστίες ανά κύτταρο. Τα κύτταρα που έχουν δεχτεί ακτινοβολία έχουν περί τις 7 ανά κύτταρο στα 20 λεπτά. Τα σφάλματα, όμως είναι αρκετά μεγάλα ώστε να βρίσκονται όλες οι εκτιμήσεις στα περιθώρια σφάλματος.

Γράφημα 7.1: Αριθμός εστιών γΗ2ΑΧ ανά κύτταρο και τυπική απόκλιση. Για δόσεις 0Gy και 1Gy και για χρόνους 20 λεπτά, 6, 12, 24 και 48 ώρες μετά την ακτινοβολία. 0Gy → 12 ώρες: 3,12±2,40 (504 κύτταρα) , 24 ώρες: 3,11±2,25 (186 κύτταρα) , 48 ώρες: 2,47±2,07 (342 κύτταρα). 1Gy → 0' ώρες: 6,75±2,92 (451 κύτταρα) , 6 ώρες: 4,56±2,18 (186 κύτταρα) , 12 ώρες: 4,02±2,11 (565 κύτταρα) , 24 ώρες: 3,38±2,06 (160 κύτταρα) , 48 ώρες: 2,92±1,94 (586 κύτταρα). Το x δηλώνει στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα ($p < 0.05$) σε σχέση με τις 0h (20min).

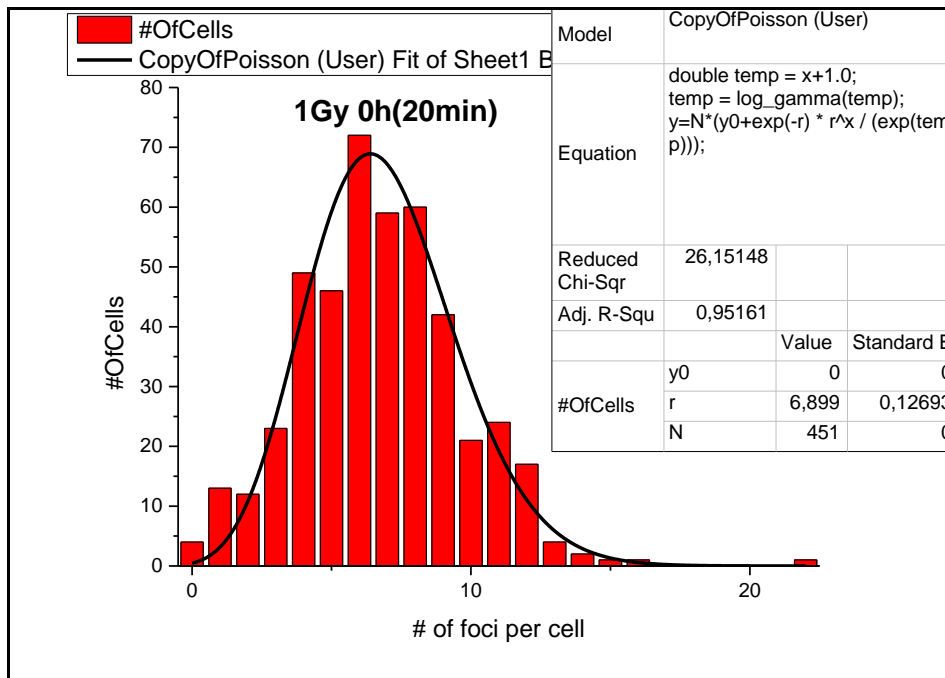
Η βιβλιογραφία δίνει μικρότερα επίπεδα γΗ2ΑΧ για τα μη ακτινοβολημένα λεμφοκύτταρα. Τα υψηλότερα επίπεδα μπορεί να έχουν να κάνουν με τη διαχείριση του δείγματος ή την ανάλυση με το πρόγραμμα.

7.2.2 Προσαρμογή της κατανομής Poisson

Για να προσδιοριστεί καλύτερα η μέση τιμή του δείγματος χρησιμοποιείται η προσαρμογή κατάλληλης κατανομής. Η κατανομή Gauss είναι η πρώτη που έρχεται στο μυαλό. Όμως, από άποψη φυσικού νοήματος, η κατανομή Poisson είναι καταλληλότερη, αφού ένας πυρήνας δεν μπορεί να έχει αρνητικές τιμές εστιών ανά κύτταρο. Βασίζεται στην υπόθεση πως ο αριθμός των εστιών γΗ2ΑΧ που εμφανίζονται στον πυρήνα μετά από ακτινοβολία ακολουθεί την κατανομή Poisson [76].

Η προσαρμογή της κατανομής Poisson γίνεται με το OriginPro9 και στα γραφήματα που προκύπτουν από αυτό το σημείο ως το τέλος της εργασίας παρουσιάζονται με το σφάλμα της κορυφής και όχι με την τυπική απόκλισή τους. Αυτό γίνεται γιατί η κατανομή Poisson έχει τυπική απόκλιση που καθορίζεται από τη μέση τιμή της, οπότε δεν παίρνουμε πραγματικά πληροφορία που δεν έχουμε ήδη για το σφάλμα του δείγματος από την τυπική απόκλιση της κατανομής.

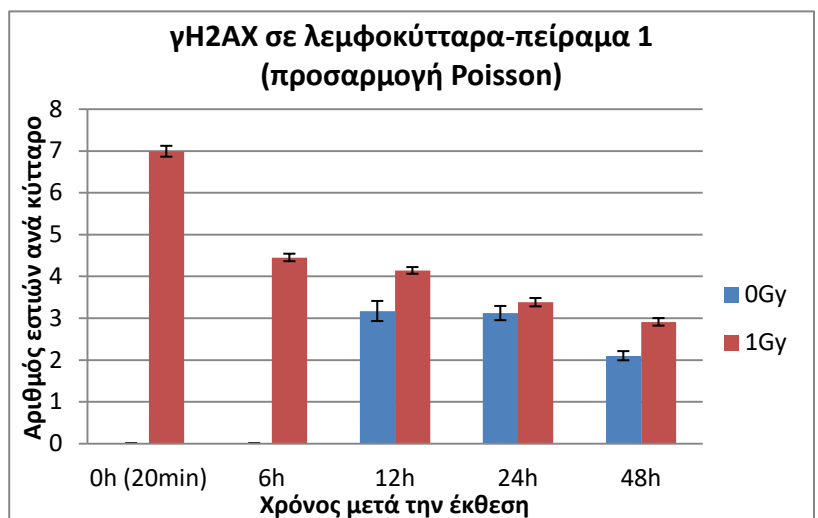
Στο **Γράφημα 7.2** φαίνεται το ιστόγραμμα συχνοτήτων της συνθήκης 1Gy 0h(20min) στο οποίο γίνεται η προσαρμογή Poisson. Στον πίνακα κάθε τέτοιου γραφήματος του OriginPro9 η μέση τιμή δίνεται από το r .



Γράφημα 7.2: Ιστογράμμο συχνοτήτων εστιών γH2AX. Για τη συνθήκη 1Gy 0h(20min). Η μέση τιμή που προκύπτει είναι $6,9 \pm 0,13$ (451 κύτταρα).

Στο **Γράφημα 7.3** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την προσαρμογή της κατανομής Poisson.

Συγκρίνοντας τις μέσες τιμές με την απλή ανάλυση παρατηρείται πως δεν υπάρχει ουσιαστική διαφορά. Η μεγαλύτερη διαφορά των δύο διαγραμμάτων είναι στην συνθήκη 0Gy 28 ώρες ($2,92 \pm 1,94$ από την απλή ανάλυση έναντι $2,91 \pm 0,09$ από την προσαρμογή της Poisson). Αυτό είναι το αναμενόμενο, άλλωστε, όσο πιο χαμηλές είναι οι μέσες τιμές (κάτω από 4 εστίες ανά κύτταρο, πρακτικά τα κύτταρα ελέγχου κυρίως ή για μεγάλους χρόνους) τόσο περισσότερο θα διαφέρει η κατανομή Poisson από την απλή κατανομή. Οπότε φαίνεται η Poisson να συμβαδίζει σε καλό βαθμό με την απλή στατιστική κατανομή, δίνοντας ακριβέστερα αποτελέσματα.



Γράφημα 7.3: Αριθμός εστιών γH2AX ανά κύτταρο με το σφάλμα της προσαρμογής Poisson. Για δόσεις 0Gy και 1Gy και για χρόνους 20 λεπτά, 6, 12, 24 και 48 ώρες μετά την ακτινοβόληση. 0Gy → 12 ώρες: $3,17 \pm 0,24$ (504 κύτταρα), 24 ώρες: $3,12 \pm 0,17$ (186 κύτταρα), 48 ώρες: $2,10 \pm 0,11$ (342 κύτταρα). 1Gy → 0' ώρες: $6,99 \pm 0,13$ (451 κύτταρα), 6 ώρες: $4,45 \pm 0,09$ (186 κύτταρα), 12 ώρες: $4,14 \pm 0,08$ (565 κύτταρα), 24 ώρες: $3,38 \pm 0,10$ (160 κύτταρα), 48 ώρες: $2,91 \pm 0,09$ (586 κύτταρα).

7.3 Πείραμα 2: Το δεύτερο πείραμα επιδιόρθωσης λεμφοκυττάρων

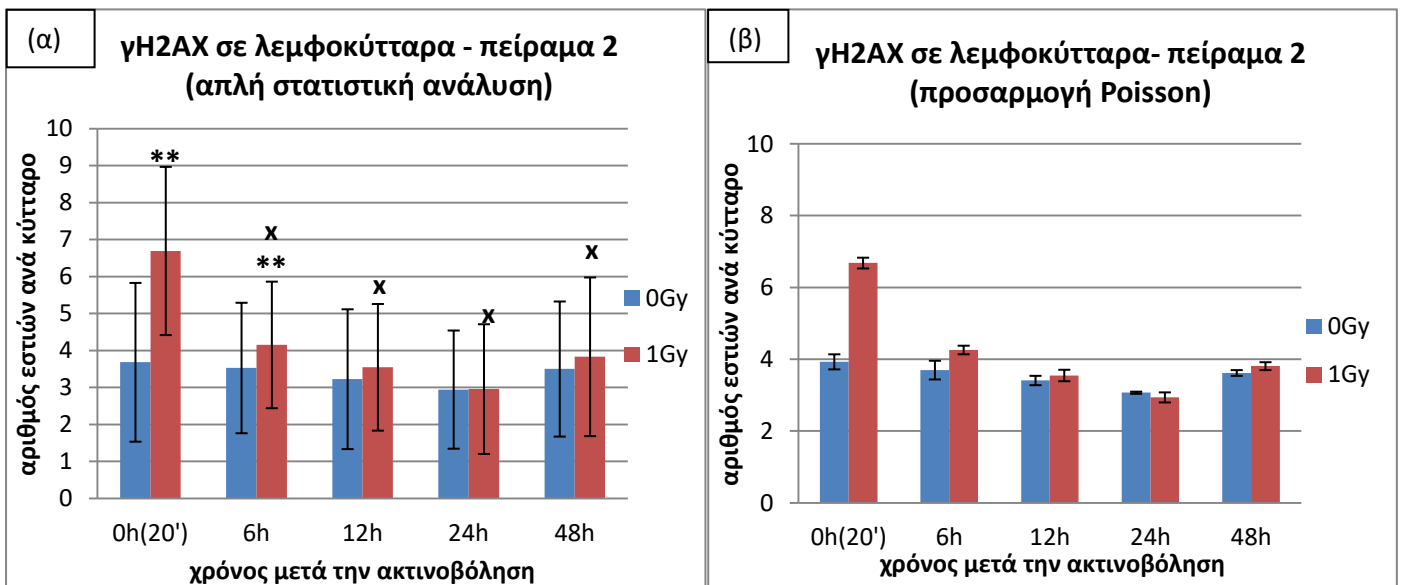
Σε αυτό το πείραμα τα δείγματα προετοιμάστηκαν με τον ίδιο τρόπο και ακτινοβολήθηκαν με μία δόση, 1Gy, από πηγή ⁶⁰Co, χωριζόμενα στις ακόλουθες συνθήκες:

	0Gy	1Gy - ομάδα 1	1Gy - ομάδα 2
0h (20')	A3	A1	A2
6h	B3	B1	B2
12h	Γ3	Γ1	Γ2
24h	Δ3	Δ1	Δ2
48h	Ε3	Ε1	Ε2

7.3.1 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Υπάρχουν αρκετές καλές εικόνες σε όλες τις συνθήκες ώστε να αναλυθούν. Επιλέγονται οι πυρηνές βάσει των κριτηρίων που τέθηκαν και πραγματοποιείται η στατιστική ανάλυση.

Γίνονται πάλι δύο αναλύσεις. Από την πρώτη προκύπτει η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των δεδομένων. Η δεύτερη χρησιμοποιεί την κατανομή Poisson για να εκτιμήσει την μέση τιμή με το σφάλμα της. Στα **Γραφήματα 7.4** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα.



Γραφήματα 7.4: Αριθμός εστιών γH2AX ανά κύτταρο με την τυπική απόκλιση στην απλή στατιστική ανάλυση(α) και το σφάλμα της προσαρμογής Poisson_(β). Για δόσεις 0Gy και 1Gy και σε χρόνους 20 λεπτά, 6, 12, 24 και 48 ώρες μετά την ακτινοβολήση.(α) **Απλή στατιστική ανάλυση:** 0Gy → 0h(20'): 3,68±2,15 (211 κύτταρα), 6h: 3,53 ±1,76 (212 κύτταρα), 12h: 3,22±1,89 (217 κύτταρα), 24h: 2,94±1,60 (233 κύτταρα), 48h: 3,50±1,83 (121 κύτταρα). 1Gy →0h(20'): 6,69±2,27 (381 κύτταρα), 6h: 4,15±1,71 (367 κύτταρα), 12h: 3,55±1,71 (393 κύτταρα), 24h: 2,96±1,75 (521 κύτταρα), 48h: 3,83±2,15 (244 κύτταρα). (β)**Προσαρμογή Poisson:** 0Gy → 0h(20'): 3,93±0,15 (211 κύτταρα), 6h: 3,7 ±0,12 (212 κύτταρα), 12h: 3,41±0,16 (217 κύτταρα), 24h: 3,07±0,14 (233 κύτταρα), 48h: 3,62±0,11 (121 κύτταρα). 1Gy →0h(20'): 6,68±0,21 (381 κύτταρα), 6h:4,26±0,26 (367 κύτταρα), 12h:3,55±0,13 (393 κύτταρα), 24h: 2,94±0,03 (521 κύτταρα), 48h: 3,81±0,08 (24 4 κύτταρα).Οι δύο αστερίσκοι(**) δηλώνουν στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα (p<0.05) σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου του αντίστοιχου χρονικού σημείου. Το x δηλώνει στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα (p<0.05) σε σχέση με τις 0h (20min), της ίδιας δόσης.

Παρατηρείται στα **Γραφήματα 7.4** ότι διαφέρουν αρκετά τα επίπεδα των εστιών γΗ2ΑΧ ανάμεσα στις 0h(20') και τις υπόλοιπες χρονικές συνθήκες της δόσης 1Gy. Επίσης η διαφορά ανάμεσά τους είναι στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$). Ακόμη τα επίπεδα των κυττάρων ελέγχου φαίνονται αρκετά σταθερά, οπότε η επώαση έξω από τον οργανισμό δεν τα επηρεάζει σημαντικά. Από τις 6 ώρες και μετά φαίνεται πως οι περισσότερες εστίες έχουν εξαφανιστεί και δεν είναι δυνατόν να διακριθεί η ακτινοβολημένη κατάσταση από τα κύτταρα ελέγχου.

7.4 Πείραμα 3: Το τρίτο πείραμα επιδιόρθωσης λεμφοκυττάρων

Πρόκειται για το ίδιο πείραμα επιδιόρθωσης με τα προηγούμενα, η προετοιμασία των κυττάρων δεν έχει κάποια διαφορά. Οι χρόνοι στους οποίους εξετάζονται τα λεμφοκύτταρα είναι 1, 6, 12, 24 και 48 ώρες. Η διαφορά από τα προηγούμενα είναι πως εξετάζεται μία ακόμη δόση, τα 2Gy. Η ακτινοβολήση έγινε πάλι με ^{60}Co . Οι συνθήκες, λοιπόν, είναι οι ακόλουθες:

	0Gy - ομάδα 1	0Gy - ομάδα 2	1Gy - ομάδα 1	1Gy -ομάδα 2	2Gy - ομάδα 1	2Gy - ομάδα 2
1h	A5	A6	A1	A2	A3	A4
6h	B5	B6	B1	B2	B3	B4
12h	Γ5	Γ6	Γ1	Γ2	Γ3	Γ4
24h	Δ5	Δ6	Δ1	Δ2	Δ3	Δ4
48h	Ε5	Ε6	Ε1	Ε2	Ε3	Ε4

7.4.1 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

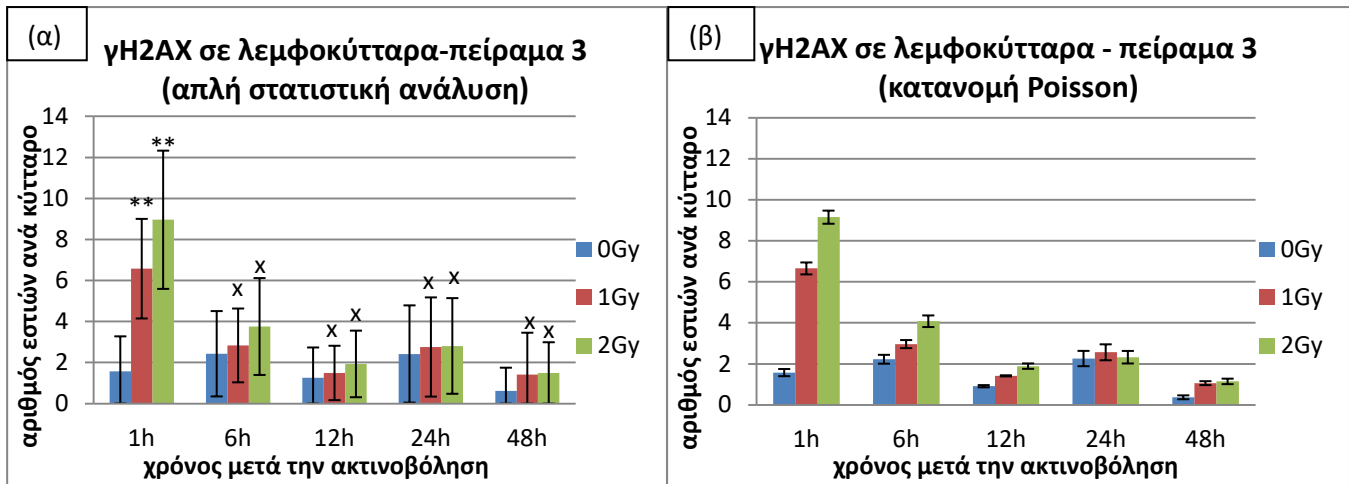
Ακολουθώντας τα ίδια βήματα, επιλέγονται οι εικόνες και αναλύονται. Τα γραφήματα για την ανάλυση των δεδομένων με την τυπική απόκλισή τους και με την προσέγγιση με την κατανομή Poisson παρουσιάζονται στα **Γραφήματα 7.5 (α)-(β)**.

Οι δύο ομάδες που δέχονται ίδια δόση αναλύονται ξεχωριστά.

Αρχικά, για την δόση 1Gy, είναι παρατηρήσιμη η διαφορά με τα κύτταρα ελέγχου στην 1 και τις 6 ώρες, αλλά στη συνέχεια τα επίπεδα των κυττάρων ελέγχου είναι ίδια με τα επίπεδα των ακτινοβολημένων κυττάρων.

Στην δόση 2Gy η διαφορά ανάμεσα σε αυτές τις ομάδες και τις ομάδες των 1Gy και 0Gy είναι φανερή (αν και στο περιθώριο σφάλματος στην πρώτη περίπτωση) στην 1 ώρα. Στις 6 ώρες, φαίνεται η δόση 2Gy να ξεχωρίζει από τα κύτταρα ελέγχου.

Σε όλες τις περιπτώσεις, μετά τις 12 ώρες δεν ξεχωρίζουν στην ανάλυση τα ακτινοβολημένα κύτταρα από τα μη ακτινοβολημένα. Κάποιες διακυμάνσεις στα επίπεδα των εστιών παρατηρείται τότε σε όλες τις δόσεις και έχουν, πιθανότατα, να κάνουν με τις συνθήκες επώασης.



Γραφήματα 7.5: Αριθμός εστιών γH2AX ανά κύτταρο με την τυπική απόκλιση στην απλή στατιστική ανάλυση(α) και το σφάλμα της προσαρμογής Poisson(β). Για δόσεις 0Gy, 1Gy και 2Gy και σε χρόνους 1, 6, 12, 24 και 48 ώρες μετά την ακτινοβολήση. **(α) Απλή στατιστική ανάλυση:** 0Gy → 1h: 1,56±1,71 (213 κύτταρα), 6h: 2,43 ±2,08 (215 κύτταρα), 12h: 1,26±1,47 (316 κύτταρα), 24h: 2,42±2,37 (67 κύτταρα), 48h: 0,62±1,13 (105 κύτταρα). 1Gy →1h: 6,58±2,43 (431 κύτταρα), 6h: 2,83±1,80 (349 κύτταρα), 12h: 1,49±1,33 (248 κύτταρα), 24h: 2,76±2,42 (95 κύτταρα), 48h: 1,41±2,04 (98 κύτταρα) 2Gy →1h: 8,96±2,43 (431 κύτταρα), 6h: 3,76±2,36 (348 κύτταρα), 12h: 1,93±1,62 (264 κύτταρα), 24h: 2,80±2,33 (115 κύτταρα), 48h: 1,49±1,5 (92 κύτταρα). **(β) Προσαρμογή Poisson:** 0Gy → 1h: 1,58±0,17 (213 κύτταρα), 6h: 2,25 ±0,22 (215 κύτταρα), 12h: 0,91±0,05 (316 κύτταρα), 24h: 2,26±0,37 (67 κύτταρα), 48h: 0,37±0,09 (105 κύτταρα). 1Gy →1h: 6,65±0,29 (431 κύτταρα), 6h: 2,97±0,20 (349 κύτταρα), 12h: 1,42±0,03 (248 κύτταρα), 24h: 2,57±0,39 (95 κύτταρα), 48h: 1,06±0,09 (98 κύτταρα) 2Gy →1h: 9,16±0,32 (431 κύτταρα), 6h: 4,08±0,28 (348 κύτταρα), 12h: 1,89±0,13 (264 κύτταρα), 24h: 2,33±0,31 (115 κύτταρα), 48h: 1,15±0,13 (92 κύτταρα). Οι δύο αστερίσκοι(**) δηλώνουν στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα (p<0.05) σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου. Το x δηλώνει στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα (p<0.05) σε σχέση με τη 1h.

7.5 Συμπεράσματα

Η κατανομή Poisson φαίνεται κατάλληλη για τον υπολογισμό του μέσου αριθμού εστιών γH2AX ανά κύτταρο στα λεμφοκύτταρα. Η Poisson για μεγάλες μέσες τιμές προσεγγίζεται από την κατανομή Gauss με τυπική απόκλιση ίση με τη ρίζα της μέσης τιμής. Οπότε αναμένεται οι διαφορές στην προσαρμογή Poisson και την απλή στατιστική ανάλυση να είναι εντονότερες όσο μικρότερη είναι η μέση τιμή.

Σε όλα τα διαγράμματα παρατηρείται πως σύντομα μετά την ακτινοβολήση, 20 λεπτά και 1 ώρα μετά, ο αριθμός των εστιών γH2AX είναι αρκετά μεγαλύτερος από ότι είναι στους υπόλοιπους χρόνους. Αυτό είναι ένδειξη της επιδιόρθωσης, αφού οι εστίες γH2AX σχηματίζονται γύρω από τις δίκλωνες θραύσεις και μετά την επιδιόρθωσή τους αποφωσφορυλιώνονται. Στις 6 ώρες οι περισσότερες από τις δίκλωνες θραύσεις έχουν επιδιορθωθεί και τα επίπεδα των εστιών γH2AX των ακτινοβολημένων κυττάρων είναι πολύ κοντά σε εκείνα των κυττάρων ελέγχου.

Συγκρίθηκαν, ακόμη, τα δείγματα ώστε να βρεθεί αν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δόσεις. Όταν παρατηρείται αυτή η διαφορά (p<0.05), σημαίνει πως μπορεί να διακριθούν σε αυτές τις ομάδες κυττάρων εκείνες που έχουν ακτινοβοληθεί με ικανοποιητική ακρίβεια. Αυτό είναι πολύ σημαντικό για τη βιοδοσιμετρία. Στο Πείραμα 3 φαίνεται πως η δόση 2Gy αφήνει ανιχνεύσιμες διαφορές στο πλήθος των εστιών γH2AX για περισσότερο χρόνο από ότι η δόση 1Gy, κάτι που προβλέπεται και από τη θεωρία, αφού μεγαλύτερες δόσεις συνεπάγονται εντονότερες βλάβες.

Παρατηρείται, ωστόσο, έλλειψη γραμμικότητας όταν συγκρίνονται οι δόσεις 1Gy και 2Gy, στο πρώτο χρονικό σημείο, όπου και παρουσιάζεται το μέγιστο. Καταδεικνύεται έτσι ο περιορισμός της μεθόδου, όταν εφαρμόζεται σε λεμφοκύτταρα, τα οποία είναι μικρά σε μέγεθος, επομένως οι εστίες ενδέχεται να αλληλοεπικαλύπτονται. Ένας ακόμη λόγος είναι ότι η λήψη των εικόνων που λήφθηκαν είναι στις δύο διαστάσεις (και όχι στο χώρο, όπως θα μπορούσαν να ληφθούν με συνεστιακή μικροσκοπία). Ως εκ τούτου, η λήψη ενός μόνο εστιακού επιπέδου έχει ως αποτέλεσμα κάποιες εστίες φθορισμού να μην απεικονίζονται εστιασμένος και να χάνονται ή να επιμερίζονται κατά την καταμέτρησή τους με το λογισμικό. Το φαινόμενο αυτό είναι εντονότερο στις υψηλότερες δόσεις ακτινοβολήσης.

Κεφάλαιο 8: Χρήση κατάλληλων κατανομών για τον υπολογισμό του αριθμού εστιών γΗ2ΑΧ στις φάσεις G0/G1

8.1 Σκοπός ανάλυσης

Πολλά από τα δεδομένα των πειραμάτων που έχουν αναλυθεί είναι σε κύτταρα που πολλαπλασιάζονται. Υπάρχουν, λοιπόν, μέσα στις καλλιέργειες κύτταρα σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου.

Σε αυτό το κεφάλαιο αναζητείται κάποιος τρόπος να υπολογιστεί η μέση τιμή των εστιών γΗ2ΑΧ μόνο για τις φάσεις G0/G1. Για να επιτευχθεί αυτό, αρχικά κατασκευάστηκαν ιστογράμματα συχνότητας για τις εστιές γΗ2ΑΧ ανά κύτταρο, στα οποία στη συνέχεια έγιναν προσαρμογές καμπύλης με χρήση διαφόρων κατανομών. Αυτές οι κατανομές προτείνονται από τη βιβλιογραφία [76] είτε δοκιμάστηκαν στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας.

8.2 Κατασκευή κατάλληλων κατανομών

Πρέπει, αρχικά, να γίνουν μερικές παραδοχές:

1. Η κατανομή Poisson είναι κατάλληλη για την περιγραφή της εμφάνισης βλαβών από ιοντίζουσα ακτινοβολία [76]. Είναι μία παραδοχή που έχουμε κάνει ήδη.
2. Τα κύτταρα στη φάση G0/G1 έχουν περίπου σταθερή ποσότητα DNA. Το ίδιο και τα κύτταρα στη φάση G2. Αυτό είναι γνωστό πως σε καρκινικές κυτταρικές γραμμές, όπως αυτές που θα αναλύσουμε σε αυτό το κεφάλαιο, ισχύει μόνο κατά προσέγγιση.
3. Ένα κύτταρο στη φάση G2 έχει ακριβώς διπλάσιο DNA από ένα κύτταρο στη φάση G1. Αυτή η παραδοχή θα ήταν αυτονόητη αν η ποσότητα του DNA σε ένα κύτταρο στην φάση G1 ήταν σταθερή. Όμως δεδομένης της κυτταρικής σειράς είναι μία ελαστική παραδοχή.
4. Ο αριθμός των βλαβών που προκαλούνται από την ιοντίζουσα ακτινοβολία είναι ανάλογος της ποσότητας DNA στον πυρήνα. Γίνεται, λοιπόν, η παραδοχή πως οι πυρήνες με διπλάσιο DNA έχουν διπλάσιο αριθμό βλαβών.
5. Τα κύτταρα στην φάση S επηρεάζουν αμελητέα την ανάλυση. Τα κύτταρα στην φάση S αναμένεται να έχουν ενδιάμεσες τιμές τιμές εστιών ανά κύτταρο, ομοιόμορφα κατανεμημένα σε σχέση με τις κύριες φάσεις. Όμως είναι μικρός ο αριθμός τους και δεν έχουν καθορισμένη θέση ανάμεσα στις δύο κορυφές, οπότε δεν είναι σημαντική η συνεισφορά τους.

Συνδυάζοντας αυτές τις παραδοχές, κατασκευάζεται μία κατανομή Poisson με δύο κορυφές συσχετισμένες μεταξύ τους. Έχοντας στον άξονα x τον αριθμό εστιών γΗ2ΑΧ ανά κύτταρο, η θέση της δεύτερης κορυφής είναι στον διπλάσιο αριθμό εστιών γΗ2ΑΧ από την πρώτη κορυφή. Αυτό γίνεται γιατί αναμένεται η πρώτη κορυφή να αντικατοπτρίζει τις βλάβες στα κύτταρα που είναι στις φάσεις G0/G1 και η δεύτερη κορυφή τα κύτταρα που είναι στη φάση G2. Ανάμεσά τους βρίσκονται και μερικά κύτταρα που είναι στη φάση S, αλλά δεν υπάρχει τρόπος να εξαιρεθούν. Επειδή είναι στη μέση και αυτό που μετράται είναι η θέση των κορυφών, αναμένεται πως δεν θα επηρεάσουν σημαντικά τα αποτελέσματα. Αυτή η κατανομή ονομάζεται Bimodal Poisson και έχει εισαχθεί από τους O. Martin et al [76].

Εκτός από αυτήν την κατανομή, μπορεί να κατασκευαστεί και μία που θα έχει ανεξάρτητες τις δύο κορυφές, ώστε να υπολογίσει το ίδιο το πρόγραμμα τον σχετικό αριθμό βλαβών ανάμεσα στις φάσεις G0/G1 και G2.

Η κατανομή Poisson έχει τον τύπο $E1(\alpha)$ και η σύνταξή της στο OriginPro9 είναι όπως ο $E1(\beta)$:

$$y = N(e^{-r} \frac{r^x}{x!}) \quad E1(\alpha)$$

$$y=N*(e^{(-r)} * r^x / (x!)) \quad E1(\beta)$$

όπου x είναι ο αριθμός των εστιών γΗ2ΑΧ ανά κύτταρο, y ο αριθμός των κυττάρων, r είναι η μέση τιμή, και τέλος N ο συνολικός αριθμός των κυττάρων που μελετήθηκαν.

Κατασκευάζουμε την Bimodal Poisson (BP) εισάγοντας μία νέα μεταβλητή f που είναι το κλάσμα των κυττάρων που βρίσκονται στις φάσεις G0/G1 προς όλα τα κύτταρα. Τότε ο τύπος παίρνει τη μορφή $E2(\alpha)$ και στο OriginPro9 συντάσσεται όπως η $E2(\beta)$:

$$y = N[f e^{-r} \frac{r^x}{x!} N((1-f) * e^{-2r} * \frac{2r^x}{x!})] \quad E2(\alpha)$$

$$y=N*(f*e^{(-r)} * r^x / (x!)+(1-f)* e^{(-2*r)} * (2*r)^x / (x!)) \quad E2(\beta)$$

Η Bimodal Poisson χρησιμοποιήθηκε συμπληρωματικά για την εκτίμηση των βλαβών στο άρθρο [77]. Εκτός από αυτήν συνεχίστηκε η αναζήτηση κατάλληλων κατανομών στο πλαίσιο της εργασίας. Αν θέλουμε να κατασκευάσουμε και μία με ανεξάρτητες κορυφές, ως την πούμε Bimodal Poisson Independent (BPI) τότε πρέπει να εισαγάγουμε και τη μεταβλητή $r2$ που είναι η θέση της δεύτερης κορυφής. Ο τύπος της παίρνει τη μορφή $E3(\alpha)$ και στο OriginPro9 συντάσσεται όπως η $E3(\beta)$:

$$y = N * [f * e^{-r} * \frac{r^x}{x!} N * ((1-f) * e^{-r2} * \frac{r2^x}{x!})] \quad E3(\alpha)$$

$$y=N*(f*e^{(-r)} * r^x / (x!)+(1-f)* e^{(-r2)} * r2^x / ((x)!)) \quad E3(\beta)$$

Σε αυτήν την περίπτωση παραλείπεται η παραδοχή σχετικά με την αυστηρώς διπλάσια ποσότητα DNA στα G2 σε σχέση με τις G0/G1 και η παραδοχή πως οι βλάβες είναι ανάλογες με την ποσότητα του DNA. Ακριβέστερα, αυτές τις δύο παραδοχές εξετάζουμε όταν αφήνουμε ελεύθερες μεταξύ τους τις δύο κορυφές, διατηρώντας τις υπόλοιπες.

Επειδή οι καρκινικές σειρές έχουν μεγάλο αριθμό βλαβών ανά κύτταρο, και η κατανομή Poisson προσεγγίζεται από την κατανομή Gauss για μεγάλες μέσες τιμές, θα χρησιμοποιηθούν για μεγάλες δόσεις και οι Bimodal Gauss(BG) και Bimodal Gauss Independent(BGI) με τις κορυφές και τα εύρη των κορυφών ανεξάρτητα μεταξύ τους, οι τύποι των οποίων φαίνονται στις $E5(\alpha),(\beta)$ και $E6(\alpha),(\beta)$ αντίστοιχα, βάσει της κανονικής κατανομής Gauss $E4(\alpha),(\beta)$:

$$y = \frac{A}{w\sqrt{\pi/2}} e^{-2\left(\frac{x-xc}{w}\right)^2} \quad E4(\alpha)$$

$$y=(A/(w*\text{sqrt}(\text{PI}/2)))*\text{exp}(-2*((x-xc)/w)^2) \quad E4(\beta)$$

όπου x είναι ο αριθμός των εστιών γΗ2ΑΧ ανά κύτταρο, y ο αριθμός των κυττάρων, xc είναι θέση της κορυφής (μέση τιμή), w το εύρος της κατανομής και A η επιφάνεια του γραφήματος που καλύπτει η καμπύλη της κατανομής.

$$y = A\left(\frac{f}{w\sqrt{\frac{\pi}{2}}} e^{-2\left(\frac{x-xc}{w}\right)^2} + \frac{1-f}{w\sqrt{\frac{\pi}{2}}} e^{-2\left(\frac{x-2xc}{w}\right)^2}\right) \quad E5(\alpha)$$

$$y=A((f/(w*\text{sqrt}(\text{PI}/2)))*\text{exp}(-2*((x-xc)/w)^2)+((1-f)/(w*\text{sqrt}(\text{PI}/2)))*\text{exp}(-2*((x-2*xc)/w)^2) \quad E5(\beta)$$

όπου f το κλάσμα των κυττάρων στις G0/G1 προς τον συνολικό αριθμό των κυττάρων.

$$y = A\left(\frac{f}{w\sqrt{\frac{\pi}{2}}} e^{-2\left(\frac{x-xc}{w}\right)^2} + \frac{1-f}{w2\sqrt{\frac{\pi}{2}}} e^{-2\left(\frac{x-xc2}{w2}\right)^2}\right) \quad E6(\alpha)$$

$$y=A((f/(w*\text{sqrt}(\text{PI}/2)))*\text{exp}(-2*((x-xc)/w)^2)+((1-f)/(w2*\text{sqrt}(\text{PI}/2)))*\text{exp}(-2*((x-xc2)/w2)^2) \quad E6(\beta)$$

όπου $xc2$ η θέση της δεύτερης κορυφής και $w2$ το εύρος της δεύτερης κατανομής.

Μία παραλλαγή της BGI, θα την ονομάσουμε BGI2 (E7(α) και (β)), απαιτεί οι δύο κατανομές να έχουν το ίδιο εύρος.

$$y = A\left(\frac{f}{w\sqrt{\frac{\pi}{2}}} e^{-2\left(\frac{x-xc}{w}\right)^2} + \frac{1-f}{w\sqrt{\frac{\pi}{2}}} e^{-2\left(\frac{x-xc2}{w}\right)^2}\right) \quad E7(\alpha)$$

$$y=A((f/(w*\text{sqrt}(\text{PI}/2)))*\text{exp}(-2*((x-xc)/w)^2)+((1-f)/(w*\text{sqrt}(\text{PI}/2)))*\text{exp}(-2*((x-xc2)/w)^2) \quad E7(\beta)$$

8.3 Πείραμα 4: Κύτταρα MCF7

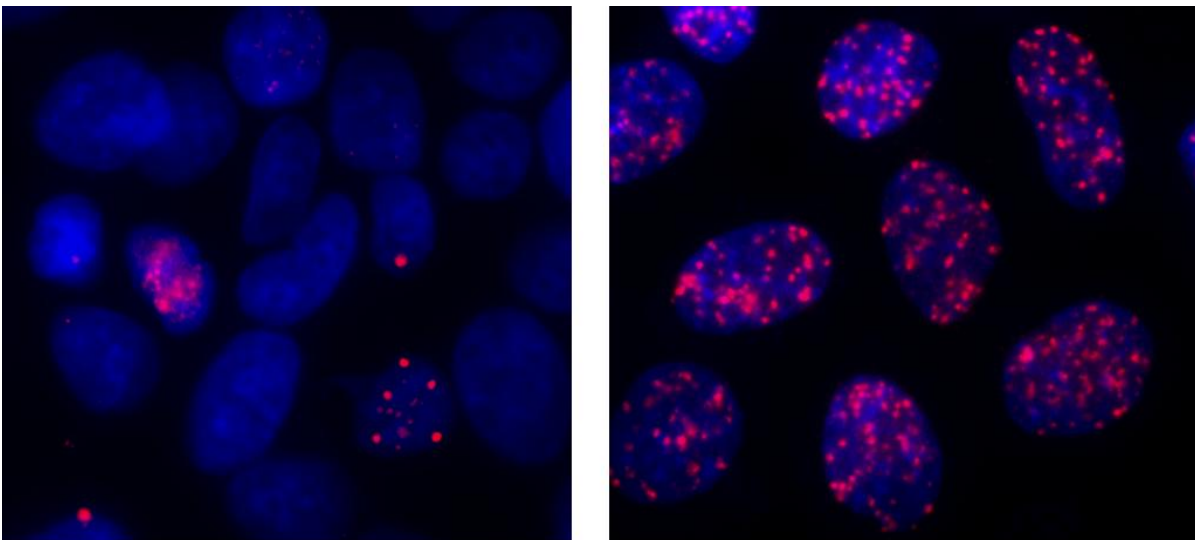
Τα κύτταρα MCF7 είναι κύτταρα μαστικού αδενοκαρκινώματος. Όπως συμβαίνει συνήθως σε καρκινικά κύτταρα, ο αριθμός των χρωμοσωμάτων και η ποσότητα του DNA μέσα στον πυρήνα δεν είναι επακριβώς γνωστός για την κάθε εκτέλεση του πειράματος, εφόσον δεν έχει προηγηθεί καρυωτική ανάλυση. Ενδέχεται στο ίδιο δείγμα να υπάρχουν κύτταρα με διαφορετικό αριθμό χρωμοσωμάτων. Επιπλέον, σε αντίθεση με τα λεμφοκύτταρα που μένουν έξω από τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G0, τα MCF7 πολλαπλασιάζονται κανονικά. Έτσι υπάρχουν όλες οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου στο δείγμα.

8.3.1 Σκοπός πειράματος

Σε αντίθεση με τα προηγούμενα πειράματα, τα οποία ήταν πειράματα επιδιόρθωσης, εδώ δεν μελετάται η πορεία των βλαβών σε σχέση με το χρόνο, αλλά η εξάρτηση του πλήθους των βλαβών από τη δόση. Όλα τα δείγματα μελετώνται μία ώρα μετά την ακτινοβολήση από πηγή ^{60}Co για τις ακόλουθες δόσεις: 0Gy, 0,5Gy, 1Gy, 2Gy, 4Gy.

8.3.2 Επιλογή εικόνων

Η επιλογή των πυρήνων δεν διαφέρει πολύ από τα λεμφοκύτταρα. Η κύρια διαφορά είναι ότι δεν πρόκειται για το ίδιο απλούς, στρογγυλούς πυρήνες.

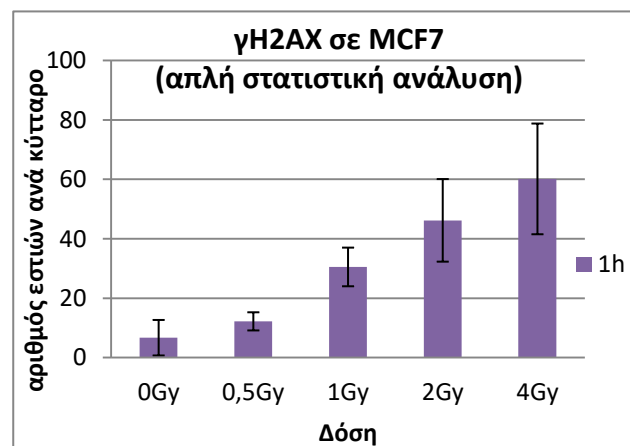


Εικόνα 8.1: Πυρήνες MCF7 σε διαφορετικές δόσεις. 0Gy (αριστερά) και 2Gy (δεξιά)

Λαμβάνοντας υπόψη πως τα κύτταρα αυτά εμφανίζονται σε όλες τις φάσεις, καλό θα ήταν να μπορέσουμε να μελετήσουμε μόνο τα κύτταρα που βρίσκονται σε μία από τις φάσεις, ώστε να έχουμε ακριβέστερα αποτελέσματα. Προς αυτήν την κατεύθυνση χρησιμοποιήθηκε αυτή τη φορά μία νέα κατανομή προσέγγισης αντί της απλής Poisson.

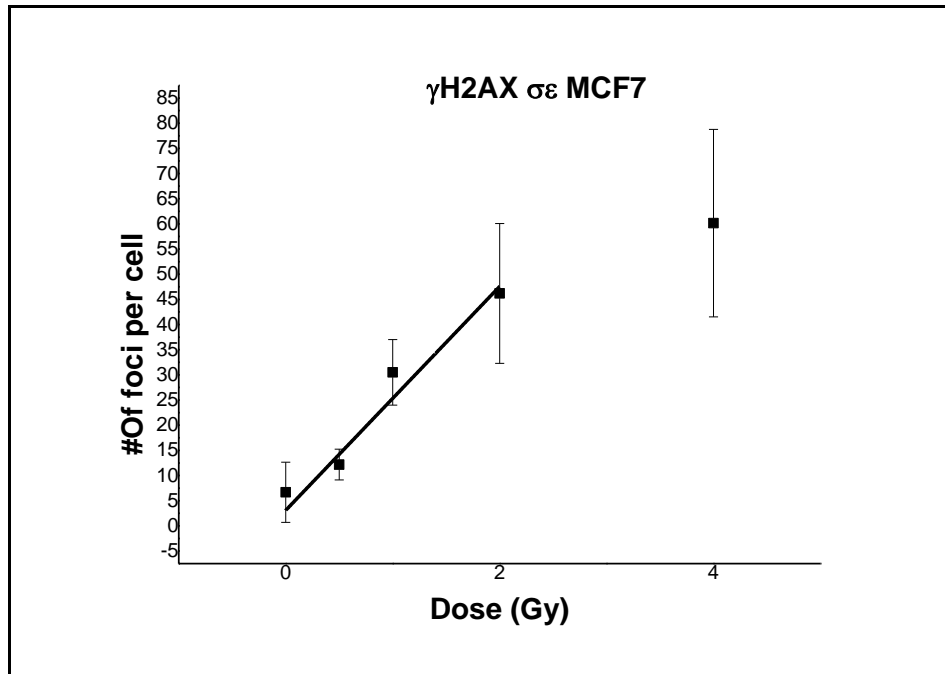
8.3.3: Απλή στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων – μέση τιμή και τυπική απόκλιση

Για αρχή, και ως μέτρο σύγκρισης των υπόλοιπων αποτελεσμάτων, γίνεται πρώτα η κλασική ανάλυση, η οποία δίνει το **Γράφημα 7.11**. Παρατηρείται μία σχεδόν γραμμική σχέση ανάμεσα στο αριθμό εστιών ανά κύτταρο και τη δόση. Όπως αναμένεται, στη μία ώρα, που είναι μισή ώρα μετά τη μεγιστοποίηση του σήματος των γH2AX, το πλήθος των εστιών, και άρα ο αριθμός των δίκλωνων θραύσεων αυξάνεται με τη δόση.



Γράφημα 8.1: Αριθμός εστιών γH2AX μία ώρα μετά την ακτινοβολήση σε σχέση με τη δόση. 0Gy: 6,67±5,97 (321 κύτταρα), 0,5Gy: 12,18±3,05 (694 κύτταρα), 1Gy: 30,50±6,51 (120 κύτταρα), 2Gy: 46,18±13,90 (267 κύτταρα), 4Gy: 60,14±18,63 (298 κύτταρα).

Στο **Γράφημα 8.2** γίνεται γραμμική προσαρμογή στα δεδομένα του **Γραφήματος 8.1**. Το σημείο των 4Gy ξεφεύγει από τη γραμμική σχέση λόγω υποεκτίμησης που συμβαίνει σε μεγάλες δόσεις, για αυτό δεν λαμβάνεται υπόψη στην γραμμική σχέση. Η κλίση δίνει τον αριθμό των εστιών γH2AX που επάγονται ανά κύτταρο από δόση 1Gy, δηλαδή $22,24 \pm 5,44$ ανά Gy.

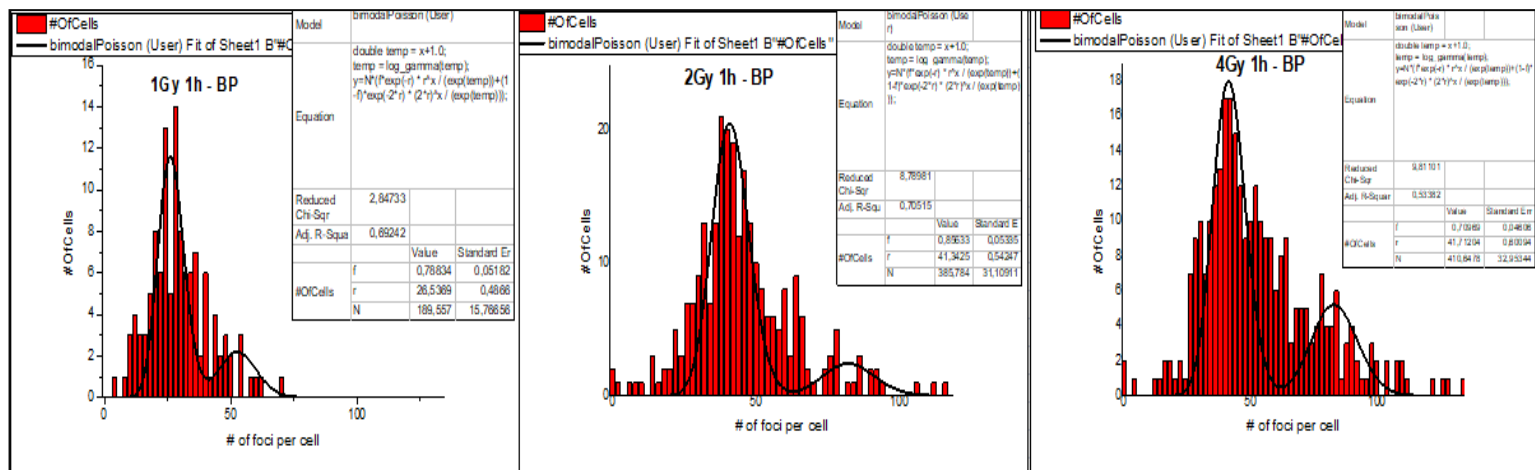


Γράφημα 8.2: Γραμμική συσχέτιση του αριθμού εστιών γH2AX ανά κύτταρο με τη δόση. $y=22,24x+3,33$. y είναι ο αριθμός των εστιών και x η δόση όπως φαίνονται στο σχήμα. Μαζί με το σφάλμα τους, η κλίση είναι $\alpha=22,24 \pm 5,44$ και η τομή με τον άξονα y είναι $\beta=3,33 \pm 2,29$.

8.3.4: Προσαρμογή της Bimodal Poisson στα ιστογράμματα συχνότητας

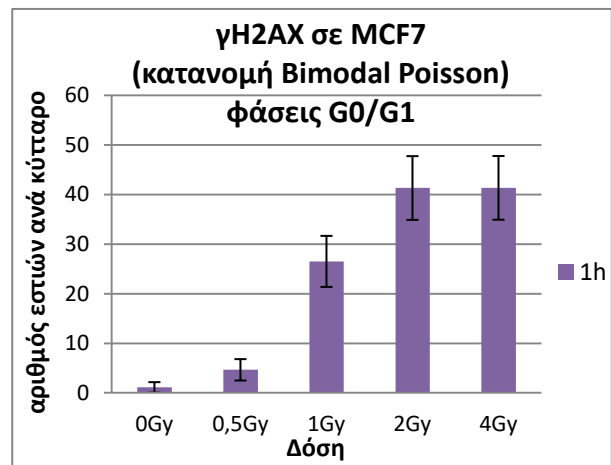
Ακολουθώντας την υπόδειξη της βιβλιογραφίας σχετικά με την κατανομή Bimodal Poisson, την προσαρμόζουμε σε όλα τα ιστογράμματα συχνότητας του πειράματος για να υπολογιστεί η μέση τιμή των εστιών γH2AX ανά κύτταρο σε σχέση με τη δόση.

Η κατανομή Bimodal Poisson φαίνεται να αποκλίνει από το ιστογράμμα για πολύ μεγάλες μέσες τιμές, δηλαδή στις δόσεις 2Gy και 5Gy, όπως φαίνεται στα **Γραφήματα 9.3**.



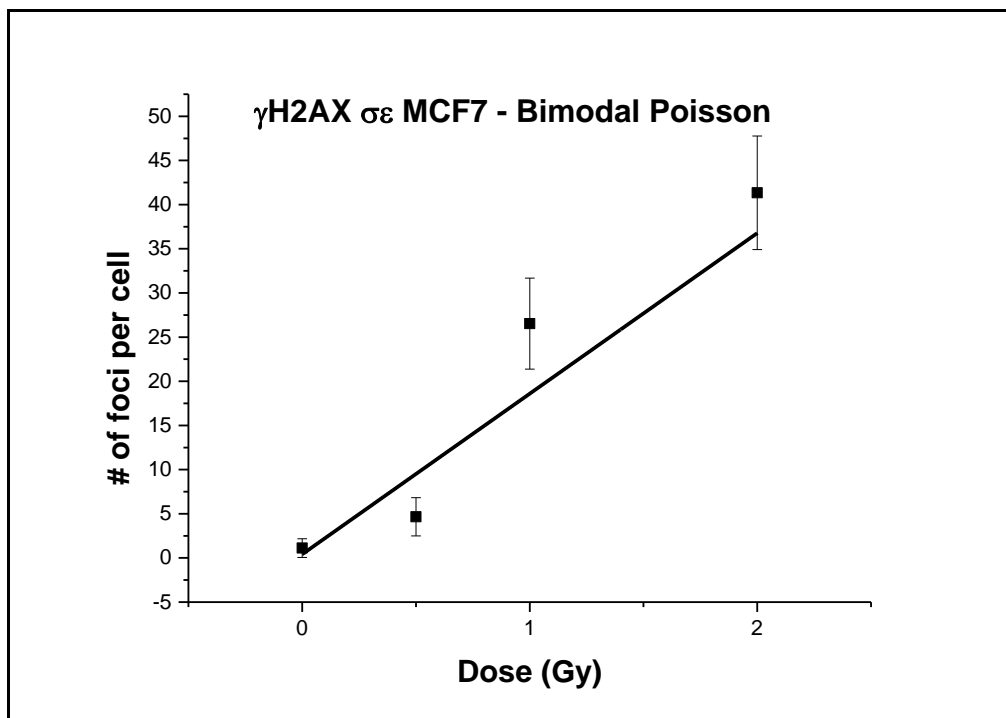
Γραφήματα 8.3: Ιστογράμματα συχνότητας εστιών γH2AX ανά κύτταρο σε διαφορετικές δόσεις με την προσαρμογή της Bimodal Poisson. Από αριστερά προς τα δεξιά είναι για 1Gy, 2Gy και 4Gy.

Στο **Γράφημα 9.4** παρουσιάζεται η μέση τιμή των εστιών γΗ2ΑΧ ανά κύτταρο για κάθε δόση. Από αυτό το γράφημα μπορεί να αναζητηθεί η γραμμικότητα ανάμεσα στα δύο μεγέθη, τον αριθμό των εστιών ανά κύτταρο και την δόση. Όμως πρέπει να βρεθεί για τις χαμηλότερες δόσεις, για τις οποίες τα δεδομένα δείχνουν πως ισχύει, γιατί μετά τα 2Gy, στα 4Gy δεν φαίνεται να υπάρχει πια γραμμική σχέση.



Γράφημα 8.4: Αριθμός εστιών γΗ2ΑΧ μία ώρα μετά την ακτινοβολή σε σχέση με τη δόση. Μέση τιμή με τυπική απόκλιση για τις φάσεις G0/G1. **0Gy:** 1,12±1,06 (321 κύτταρα), **0,5Gy:** 4,66±2,15 (694 κύτταρα), **1Gy:** 26,53±5,15 (120 κύτταρα), **2Gy:** 41,34±6,42 (267 κύτταρα), **4Gy:** 41,37±6,43 (298 κύτταρα).

Κατασκευάζεται, έτσι, το **Γράφημα 8.5**, στο οποίο η κλίση είναι 18,18±5,17 εστίες ανά κύτταρο ανά Gy.



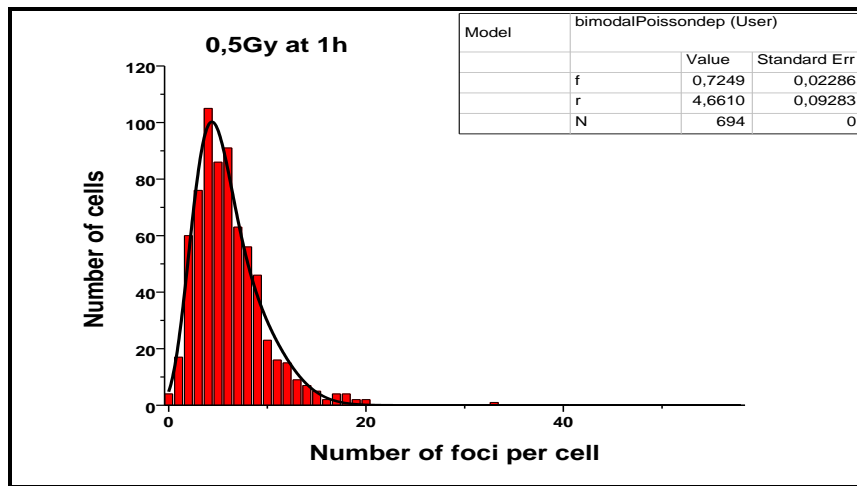
Γράφημα 8.5: Γραμμική συσχέτιση του αριθμού εστιών γΗ2ΑΧ ανά κύτταρο με τη δόση. $y=16,88x+5,71$. y είναι ο αριθμός των εστιών και x η δόση όπως φαίνονται στο σχήμα. Μαζί με το σφάλμα τους, η κλίση είναι $\alpha=18,18\pm5,17$ και η τομή με τον άξονα y είναι $\beta=0,41\pm2,07$.

8.3.5: Αναζήτηση κατάλληλων διπλών κατανομών για προσαρμογή στα ιστογράμματα

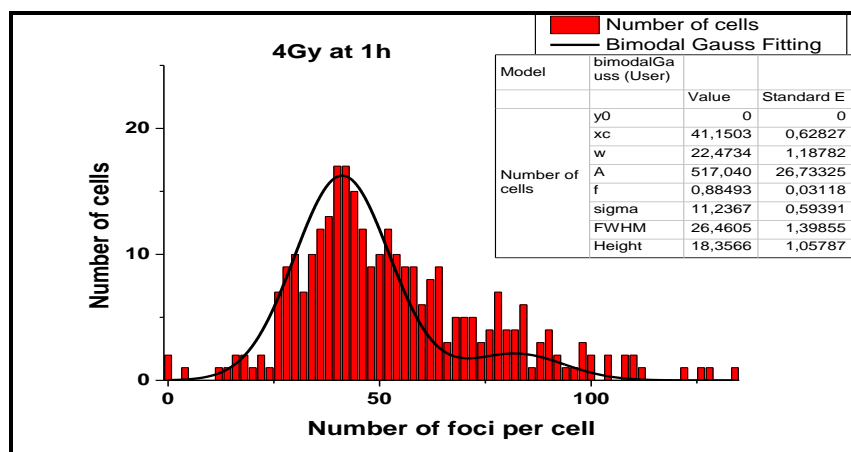
Σκοπός αυτής της ανάλυσης είναι η επιλογή των κατάλληλων κατανομών για την εκτίμηση του αριθμού των εστιών γΗ2ΑΧ στα MCF7.

Αφότου γίνουν κάποιες δοκιμές, τελικώς χρησιμοποιήθηκε η BP για τα 0Gy και 0,5Gy και η BG για τις δόσεις 1Gy, 2Gy και 4Gy που η μέση τιμή ξεπερνάει τις 25 ανά κύτταρο. Η επιλογή της BP έχει αιτιολογηθεί σε προηγούμενο υποκεφάλαιο και η BPI δεν κρίθηκε να έχει κάποιο προτέρημα ως προς τη BP ή τις BGI/BGI2 κατά την ανάλυση. Μένει να αιτιολογηθεί εδώ η επιλογή της κατανομής Gauss έναντι της Poisson.

Ο λόγος αυτής της επιλογής έχει να κάνει με την τυπική απόκλιση της κατανομής. Έχει αναφερθεί και προηγουμένως ότι η κατανομή Poisson περιγράφεται μόνο από τη μέση τιμή της. Η τυπική απόκλισή της είναι η ρίζα της μέσης τιμής. Αυτό σημαίνει πως σε οποιοδήποτε δείγμα με μέση τιμή n η τυπική απόκλιση θα είναι πάντα \sqrt{n} . Ακόμη, για μεγάλες μέσες τιμές η κατανομή Poisson προσεγγίζει την κατανομή Gauss. Για αυτούς τους λόγους, σε μέσες τιμές μεγαλύτερες από 20, καλείται η Bimodal Gauss να χρησιμοποιηθεί, αφού έχει μία παραπάνω χρήσιμη ελεύθερη μεταβλητή και μπορεί να προσεγγίσει έτσι καλύτερα τα δεδομένα. Στα **Γραφήματα 8.6** και **8.7** παρουσιάζεται η προσαρμογή της BP στη δόση 0,5Gy και της BG στη δόση 4Gy αντίστοιχα.



Γράφημα 8.6: Ιστόγραμμα συχνοτήτων των εστιών γΗ2ΑΧ για τη δόση 0,5Gy. Η BP δίνει την πρώτη κορυφή στη θέση $4,66 \pm 0,09$.



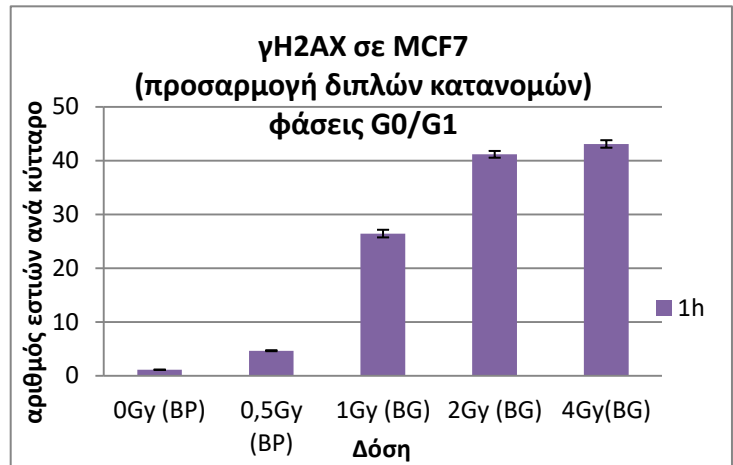
Γράφημα 8.7: Ιστόγραμμα συχνοτήτων εστιών γΗ2ΑΧ για δόση 4Gy. Η BG δίνει την πρώτη κορυφή στο $41,15 \pm 0,63$.

Μετά την επιλογή των κατανομών και την εφαρμογή τους λαμβάνεται το **Γράφημα 8.8**. Να σημειωθεί σε αυτό το σημείο πως τα διαγράμματα επιλέγεται να παρουσιαστούν με το Standard Error της κορυφής στην κατανομή ή με την τυπική απόκλιση (Standard Deviation). Στην περίπτωση που προσαρμόζεται και η κατανομή Gauss, που έχει τυπική απόκλιση ανεξάρτητη από την μέση τιμή, έχει νόημα να παρουσιαστούν και με τον

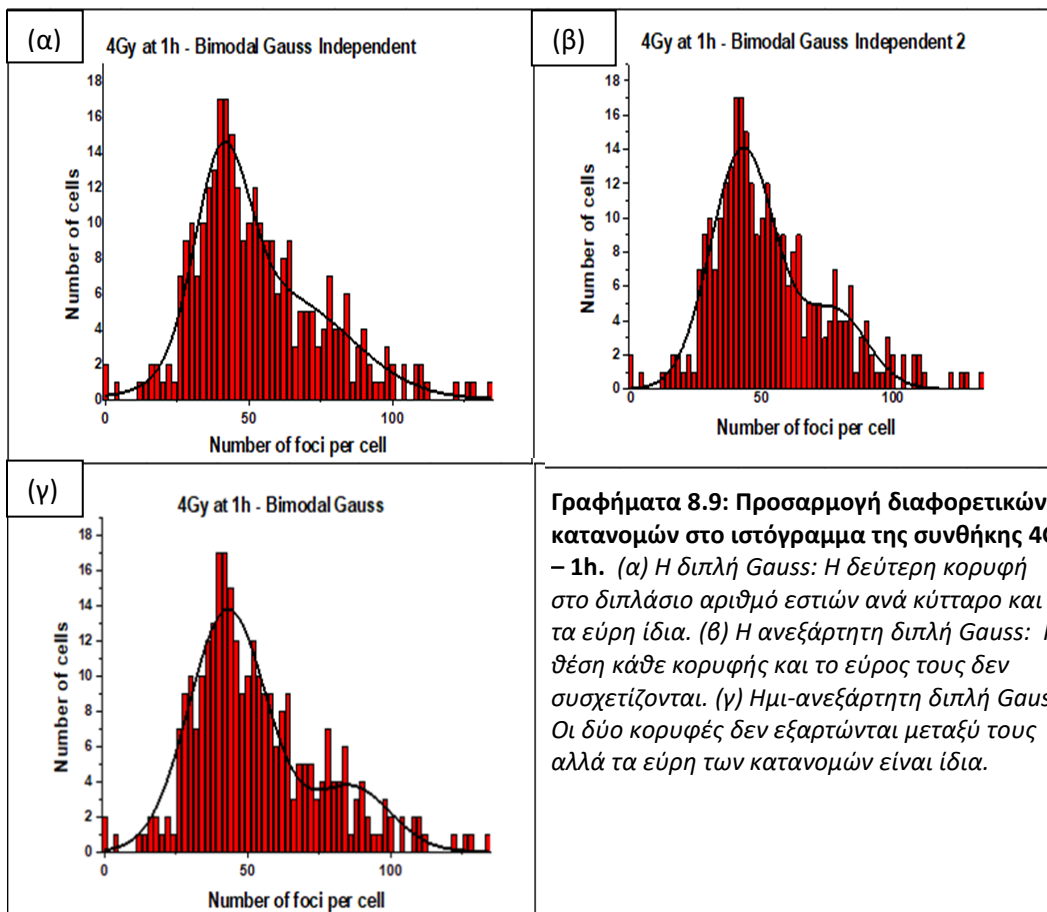
δεύτερο τρόπο.

Στο **Γράφημα 8.8** προκύπτει ότι η μεγαλύτερη διαφορά ανάμεσα στην απλή στατιστική ανάλυση και την προσαρμογή των κατανομών είναι στα 4Gy. Για το λόγο αυτό προσπαθούμε να δούμε πώς συμπεριφέρονται και άλλες κατανομές σε αυτήν τη συνθήκη. Διατηρώντας την κατανομή BP ως την καταλληλότερη για την προσέγγιση των 0Gy και 0,5Gy, κατασκευάζονται και συγκρίνονται τα ιστογράμματα με την προσέγγιση των BG, BGI και BGI2.

Πρώτα συγκρίνονται ως προς το βαθμό προσαρμογής στο ιστογράμμα συχνοτήτων:



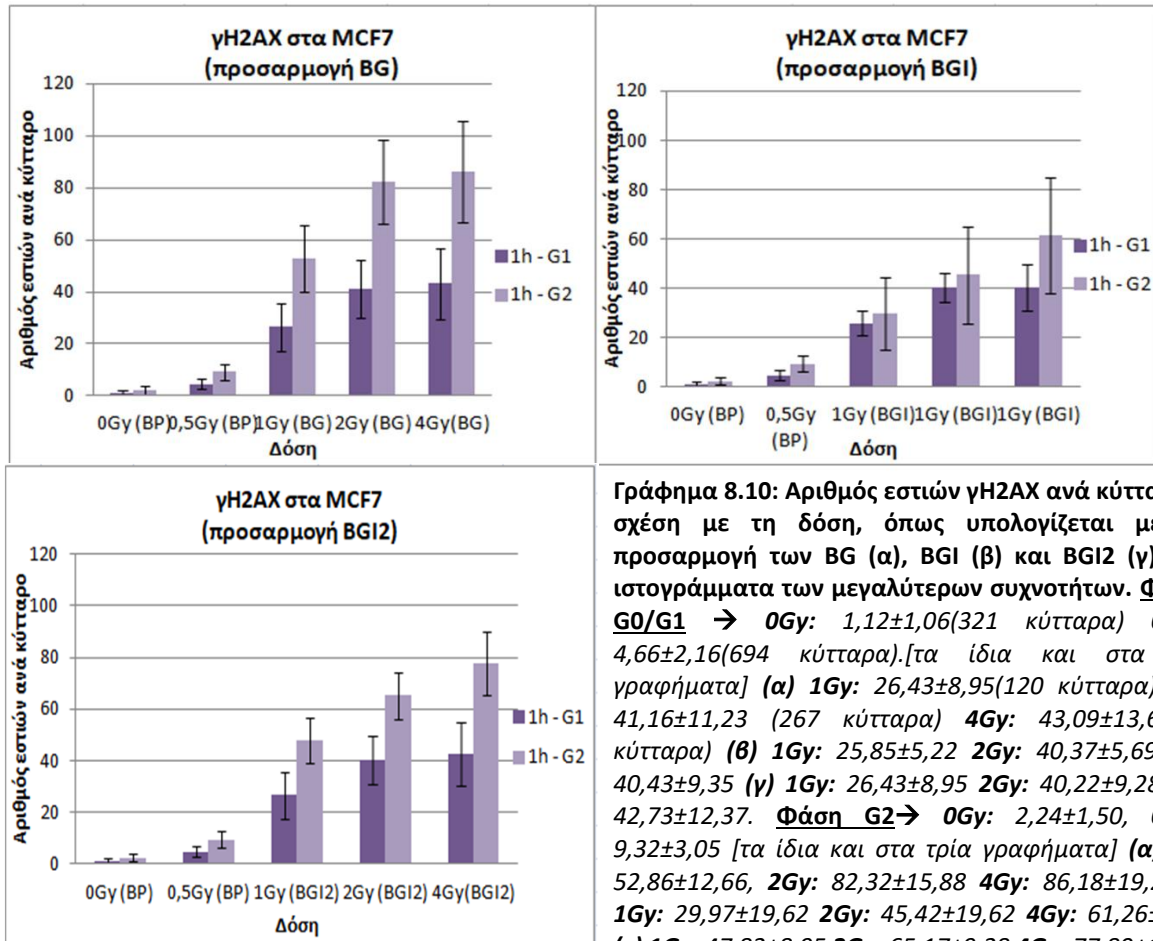
Γράφημα 8.8: Ο αριθμός των εστιών γH2AX ανά κύτταρο μία ώρα μετά την ακτινοβόληση ως προς τη δόση. Προσαρμογή με τις κατανομές BP και BG. 0Gy: $1,12 \pm 0,05$ (321 κύτταρα), 0,5Gy: $4,66 \pm 0,09$ (694 κύτταρα), 1Gy: $26,43 \pm 0,71$ (120 κύτταρα), 2Gy: $41,16 \pm 0,63$ (267 κύτταρα), 4Gy: $43,09 \pm 0,7$ (298 κύτταρα).



Γραφήματα 8.9: Προσαρμογή διαφορετικών κατανομών στο ιστογράμμα της συνθήκης 4Gy – 1h. (α) Η διπλή Gauss: Η δεύτερη κορυφή στο διπλάσιο αριθμό εστιών ανά κύτταρο και τα εύρη ίδια. (β) Η ανεξάρτητη διπλή Gauss: Η θέση κάθε κορυφής και το εύρος τους δεν συσχετίζονται. (γ) Ημι-ανεξάρτητη διπλή Gauss: Οι δύο κορυφές δεν εξαρτώνται μεταξύ τους αλλά τα εύρη των κατανομών είναι ίδια.

Παρατηρείται πως όλες προσεγγίζουν αρκετά καλά τα δεδομένα, αλλά η BG12 (Γράφημα 8.9(γ)) φαίνεται να είναι η καλύτερη στον εντοπισμό των κορυφών.

Χρησιμοποιούνται και οι δύο κατανομές και λαμβάνονται τα αποτελέσματα σχετικά με τις βλάβες στις φάσεις G0/G1 και G2 στα Γραφήματα 8.10 (α)-(γ).



Παρατηρούνται ορισμένες χαρακτηριστικές διαφορές. Για αρχή, οι δόσεις 0Gy και 0,5Gy είναι οι ίδιες και στα τρία διαγράμματα, αφού προσαρμόζεται σε αυτές η Bimodal Poisson. Στις μεγαλύτερες δόσεις είναι που φαίνεται πως τα διαγράμματα αποκλίνουν. Συγκεκριμένα στα 2Gy για τις φάσεις G0/G1 όλα δείχνουν πως υπάρχουν 40 βλάβες ανά κύτταρο (έναντι των 46 που προκύπτουν από την απλή ανάλυση). Η φάση G2 όμως δεν είναι σαφής. Όταν αφήνουμε τις κορυφές ανεξάρτητες από την πρώτη τα αποτελέσματα διαφέρουν πολύ μεταξύ τους. Το ίδιο και για τα 4Gy, οι φάσεις G0/G1 έχουν παρόμοια αποτελέσματα (αρκετά χαμηλότερα από την απλή στατιστική ανάλυση που είναι περίπου 60 εστιες ανά κύτταρο).

Η παρούσα εργασία εστιάζει άλλωστε στις φάσεις G0/G1, στις οποίες είναι τα περισσότερα κύτταρα της καλλιέργειας και επηρεάζουν περισσότερο την προσαρμογή των κατανομών, όπως φαίνεται και από τα ιστογράμματα. Για αυτό τα επόμενα πειράματα αναλύθηκαν μόνο για αυτές. Ακόμη δεν πρέπει να λησμονείται πως σε υψηλότερες δόσεις, όπως τα 4Gy, λόγω της αλληλοεπικάλυψης εστιών, η ανάλυση υποτιμά τον αριθμό των εστιών ανά κύτταρο.

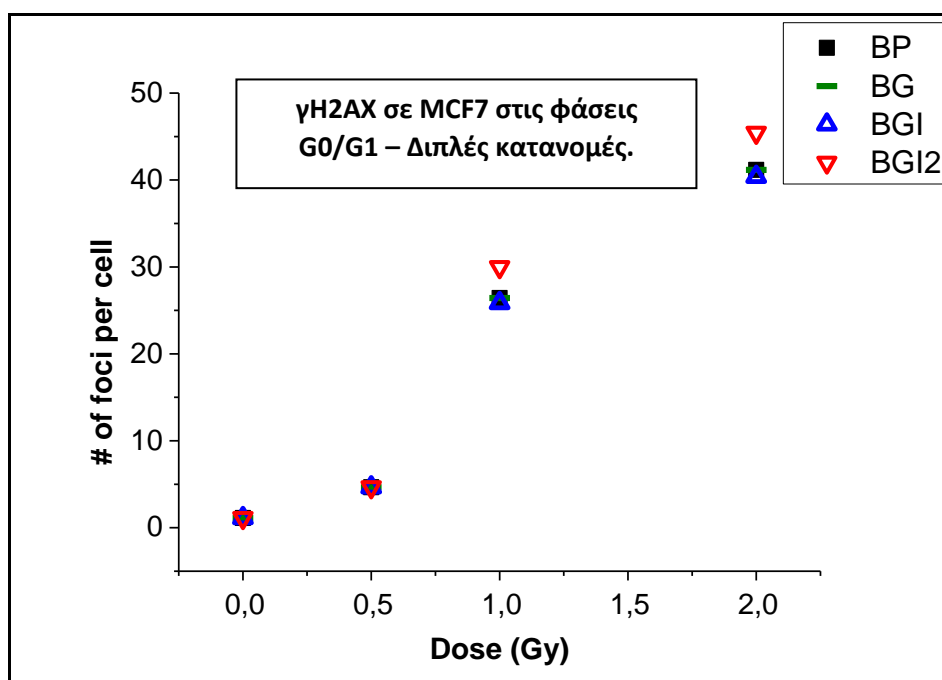
Στο υποκεφάλαιο K8.4, με την αφορμή που δίνει μία κυτταρική γραμμή που έχει κύτταρα σε όλα τα στάδια του κυτταρικού κύκλου κατά το πείραμα, δόθηκαν μερικές διαφορετικές

επιλογές για την ανάλυση των αποτελεσμάτων που προκύπτουν. Η ανωτερότητα κάποιας από αυτές εις βάρος των υπολοίπων δεν ερευνήθηκε περαιτέρω στο πλαίσιο της εργασίας, αφήνεται στο χρήστη να εκτιμήσει ποια ταιριάζει περισσότερο στα πειραματικά δεδομένα. Άλλωστε, κάθε παραδοχή είναι τόσο ισχυρή όσο τα αποτελέσματα που την προασπίζουν. Ακολουθώντας όλες τις κατανομές Gauss που κατασκευάστηκαν λαμβάνονται τα αποτελέσματα του **Γραφήματος 8.10**. Αρχίζοντας να αφαιρούμε τις δεσμεύσεις των παραδοχών, συζητώντας γύρω από αυτές και αναζητώντας την καλύτερη κατανομή που προσεγγίζει τα δεδομένα, οδηγούμαστε στις υπόλοιπες επιλογές.

Στο συγκεκριμένο πείραμα προτάθηκε η αντιστοιχία:

Συνθήκη	0Gy 1h	0,5Gy 1h	1Gy 1h	2Gy 1h	4Gy 1h
Κατανομή	BP	BP	BGI	BGI2	BGI2
αριθμός εστιών γΗ2ΑΧ	1,12±1,06	4,66±2,16	25,85±5,22	40,22±9,28	42,73±12,37

Για να συγκρίνουμε τις προσεγγίσεις αυτού του κεφαλαίου φτιάχνουμε ένα τελευταίο γράφημα στο OriginPro9, το **Γράφημα 8.11** χωρίς να υπολογίσουμε τις ευθείες. Υπόψη ότι οι δύο πρώτες τιμές είναι ίδιες και προκύπτουν από την Bimodal Poisson.



Γράφημα 8.11: Αριθμός εστιών γΗ2ΑΧ σε MCF7 στις φάσεις G0/G1. Αποτελέσματα ανάλυσης με διαφορετικές κατανομές.

Παρατηρείται πως μόνο η BGI2 ξεφεύγει από τις κατανομές που χρησιμοποιήθηκαν.

8.4 Πείραμα 5: Πείραμα επιδιόρθωσης σε κύτταρα A549 ακτινοβολημένα με ακτίνες-Χ

Το πείραμα που αναλύεται είναι ένα πείραμα επιδιόρθωσης επιθηλιακών κυττάρων καρκινώματος του πνεύμονα της κυτταρικής σειράς A549. Χρησιμοποιήθηκαν δόσεις 0Gy, 1Gy και 2Gy ακτίνων-Χ και τα κύτταρα μελετήθηκαν 15 λεπτά, 1, 2, 4, 8 και 24 ώρες μετά την ακτινοβολήση.

8.4.1 Σκοπός πειράματος

Μελετάται η επίδραση διαφορετικών δόσεων ακτίνων-Χ στα κύτταρα όσον αφορά στην πρόκληση δίκλωνων θραύσεων με την μελέτη των εστιών γΗ2ΑΧ. Ακόμη αξιολογείται η ικανότητά τους να επιδιορθώνονται στη συνέχεια σε σχέση με το χρόνο. Οι συνθήκες για τις οποίες υπάρχουν διαθέσιμα αποτελέσματα είναι οι ακόλουθες:

	0Gy	1Gy	2Gy
15min	A1	A2	X
1h	B1	B2	B3
2h	Γ1	Γ2	Γ3
4h	Δ1	Δ2	Δ3
8h	E1	E2	E3
24h	Z1	Z1	X

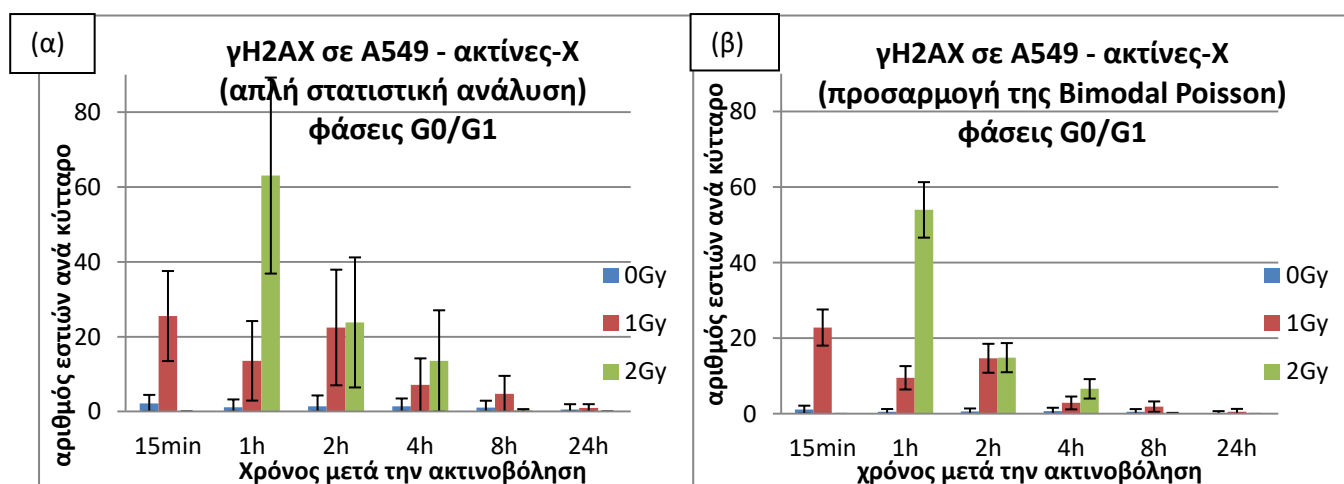
Η ανάλυση έγινε και εδώ όπως στο προηγούμενο πείραμα. Κατασκευάστηκαν τα ιστογράμματα συχνοτήτων των εστιών γΗ2ΑΧ και προσαρμόστηκαν πάνω τους οι διπλές κατανομές.

Για μέση τιμή μικρότερη από 0,5 εστίες ανά κύτταρο επιλέχθηκε η απλή κατανομή Poisson, γιατί οι δύο κορυφές είναι πολύ κοντά και το OriginPro9 βγάζει μεγάλο σφάλμα στις δύο κορυφές. Πρακτικά, για τόσο μικρές τιμές βλαβών, θεωρούμε πως οι δύο κορυφές είναι τόσο κοντά που συμπίπτουν.

Για αρχή, θα γίνει η ανάλυση με τους δύο βασικούς τρόπους. Με την απλή ανάλυση που αναλύθηκε και με την εφαρμογή της Bimodal Poisson (ή της απλής Poisson όπως αναφέρθηκε προηγουμένως) που προτείνεται στη βιβλιογραφία.

Στο δεύτερο μέρος της ανάλυσης θα γίνει επιλογή ανάμεσα στις διαφορετικές διπλές κατανομές, εξαρτημένες ή ανεξάρτητες, ανάλογα με το ποια προσαρμόζεται καλύτερα στα αποτελέσματα.

8.4.2 Αποτελέσματα απλής ανάλυσης και προσαρμογής της Bimodal Poisson

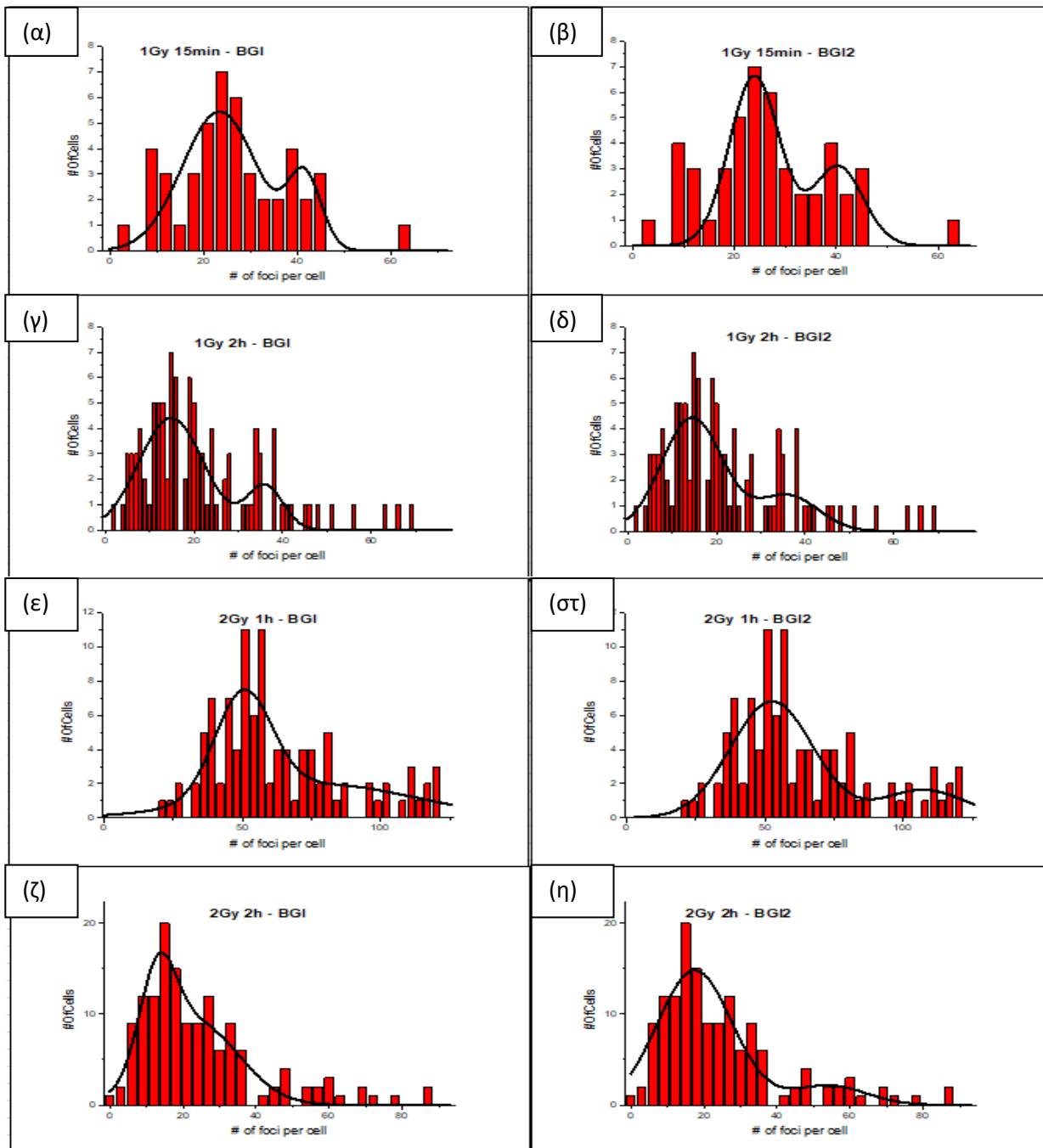


Γραφήματα 8.12: Αριθμός εστιών γΗ2ΑΧ ανά κύτταρο για 0Gy, 1Gy και 2Gy ακτίνων-Χ σε σχέση με το χρόνο σε κύτταρα A549. (α) απλή στατιστική ανάλυση. 0Gy → 15min: 2,18±2,30(88), 1h: 1,18±2,09(141), 2h: 1,45±2,89(158), 4h: 1,42±2,11(202), 8h: 1,04±1,89(167), 24h: 0,54±1,45(215). 1Gy → 15min: ±25,54±12,03(47), 1h: 13,58±10,62(150), 2h: 22,49±15,45(104), 4h: 7,12±8,39(205), 8h: 4,78±5,39(123), 24h: 1,00±1,27(207). 2Gy → 1h: 63,07±26,19(103), 2h: 23,84±17,37(143), 4h: 13,54±15,56(183), 8h: 0,34±1,62(130). (β) Προσαρμογή της Bimodal Poisson. Μέση τιμή και τυπική απόκλιση. 0Gy → 15min: 1,12±1,06, 1h: 0,55±0,74, 2h: 0,64±0,8, 4h: 0,76±0,87, 8h: 0,54±0,73, 24h: 0,24±0,49 1Gy → 15min: 22,86±4,78, 1h: 9,56±3,09, 2h: 14,72±3,83, 4h: 2,90±1,70, 8h: 1,92±1,39, 24h: 0,57±0,75. 2Gy → 1h: 54,00±7,35, 2h: 14,89±3,86, 4h: 6,63±2,57, 8h: 0,05±0,22. Οι παρενθέσεις είναι ο αριθμός των κυττάρων.

Συγκρίνοντας τα δύο διαγράμματα, παρατηρείται πως η Bimodal Poisson δίνει ίδιας ποιότητας αποτελέσματα σε χαμηλότερα όμως επίπεδα. Φαίνεται, λοιπόν, να κάνει την δουλειά που θέλουμε αρκετά αποτελεσματικά, αφού τα κύτταρα στις φάσεις G0/G1 θα έχουν λιγότερες βλάβες.

8.4.3 Σύγκριση προσαρμογής των ανεξάρτητων διπλών κατανομών

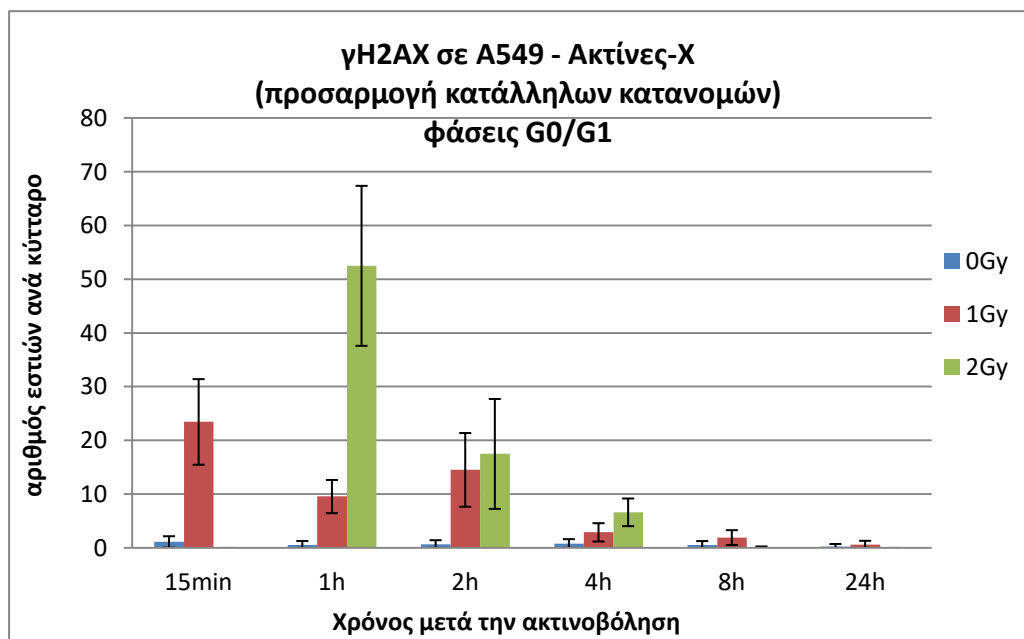
Οι BGI αξιοποιούνται μόνο στην περίπτωση που η μέση τιμή υπερβαίνει τις 20 εστίες ανά κύτταρο, δηλαδή στις καταστάσεις 1Gy 15min και 2Gy 1h. Δοκιμαστικά θα χρησιμοποιηθούν. Παρατηρείται ότι οι δύο κατανομές διαφέρουν ελάχιστα ως προς την πρώτη κορυφή. Μάλιστα φαίνεται πως η BGI αστοχεί όταν η δεύτερη κορυφή δε διακρίνεται αρκετά καλά, ενώ η BG12



Γραφήματα 8.13: Ιστογράμματα αριθμού εστιών γH2AX ανά κύτταρο. Συγκρίνονται οι δύο ανεξάρτητες διπλές κατανομές Gauss. (αριστερά): BGI, (δεξιά): BG12

μπορεί να την αναγνωρίσει (Γραφήματα 8.13(ε),(ζ)). Η BGI είναι καταλληλότερη για την προσέγγιση των δεδομένων, αλλά στην περίπτωση που η δεύτερη κορυφή είναι πολύ χαμηλή και πλατιά δεν την αναγνωρίζει. Τότε η BGI2 μπορεί να δώσει καλύτερα αποτελέσματα.

8.4.4 Συνολικά αποτελέσματα για το πείραμα



Γράφημα 8.14: Αριθμός εστιών γH2AX ανά κύτταρο για 0Gy, 1Gy και 2Gy ακτίνων-Χ σε σχέση με το χρόνο σε κύτταρα A549 που ακτινοβολήθηκαν με ακτίνες-Χ. Τα ιστογράμματα προσεγγίστηκαν με την καταλληλότερη κατανομή. 0Gy → 15min: 1,12±1,06(BP), 1h: 0,55±0,74(P), 2h: 0,64±0,8(P), 4h: 0,76±0,87(P), 8h: 0,54±0,73(P), 24h: 0,24±0,49(P) 1Gy → 15min: 23,47±7,97(BGI), 1h: 9,56±3,09(BP), 2h: 14,53±6,86(BGI), 4h: 2,90±1,70(BP), 8h: 1,92±1,39(BP), 24h: 0,57±0,75(BP). 2Gy → 1h: 52,52±14,89(BGI2), 2h: 17,50±10,23(BGI2), 4h: 6,63±2,57(BP), 8h: 0,05±0,22(BP). Στις παρενθέσεις είναι οι κατανομές που προσαρμόστηκαν στο ιστόγραμμα.

8.5 Συμπεράσματα

Τα ιστογράμματα του αριθμού εστιών γH2AX ανά κύτταρο σε μεγάλες ομάδες κυττάρων που πολλαπλασιάζονται, όπως είναι οι καρκινικές σειρές κυττάρων, μπορούν να χρησιμεύσουν για την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τον κυτταρικό κύκλο. Αναπτύχθηκαν σε αυτό το κεφάλαιο μέθοδοι για τον υπολογισμό του αριθμού εστιών ανά κύτταρο, κάνοντας διαχωρισμούς στις δύο βασικές κατηγορίες φάσεων, τις φάσεις G0/G1 και τη φάση G2.

Λόγω της βαρύτητας των φάσεων G0/G1 μπορούμε να έχουμε μεγαλύτερη βεβαιότητα για την ακρίβεια στην πρώτη κορυφή που αντιπροσωπεύει αυτές. Η δεύτερη, αν και σε όσα ιστογράμματα αναλύθηκαν φαινόταν πως υπάρχει, μπορεί να είναι πολύ ασθενής ή να έχει μεγάλο εύρος και να μην γίνεται να υπολογιστεί με ακρίβεια η θέση της. Γι αυτό η εργασία επικεντρώθηκε στον υπολογισμό της πρώτης κορυφής.

Ενώ είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί μία αμιγής ανάλυση, είτε με μέση τιμή και τυπική απόκλιση, είτε με την προσαρμογή μίας συγκεκριμένης κατανομής, πιθανά κάποιος συνδυασμός τους να είναι πιο αποτελεσματικός. Αν επιλεγθεί μία μόνο κατανομή θα πρέπει να είναι η Bimodal Poisson, η οποία δίνει καλά αποτελέσματα ακόμη και όταν υπάρχουν πολύ

λίγες εστίες ανά κύτταρο. Στο κεφάλαιο αυτό προτάθηκε να εκτιμάται η επιλογή με τα εξής κριτήρια:

1. Όταν η μέση τιμή είναι μικρότερη από 0,5 εστίες ανά κύτταρο, επιλέχθηκε η απλή κατανομή Poisson γιατί η Bimodal Poisson έχει μεγάλο σφάλμα κορυφής (Standard Error) όταν προσεγγίζει τέτοια δείγματα.
2. Όταν η μέση τιμή είναι από 0,5 ως 25 επιλέχθηκε η Bimodal Poisson. Να δίνεται προσοχή στο γεγονός πως το στοιχείο που μπορεί να μας αποτρέψει από τη χρήση της Poisson δεν είναι η θέση της καμπύλης απαραίτητα, αλλά το εύρος της. Εκεί φαίνεται η Poisson να αστοχεί σε κάποιες συνθήκες.
3. Από μέση τιμή 25 και πάνω επιλέχθηκε η Bimodal Gauss.
4. Αν η Bimodal Gauss αστοχεί λόγω θέσεων των κορυφών επιλέχθηκε ή η Bimodal Gauss Independent (ανεξάρτητα εύρη) ή η Bimodal Gauss Independent 2 (ίδιο εύρος). Η BGI είναι η πιο αξιόπιστη, οπότε προτιμήθηκε, αλλά όταν αστοχούσε επιλεγόταν η BGI2.

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων δείχνουν την ίδια συμπεριφορά με τα αρχικά, αλλά με διαφορετικές τιμές, όπως αναμένεται.

Κεφάλαιο 9: Μέθοδος διαχωρισμού των φάσεων G0/G1 από τις G2 σε εικόνες ανοσοφθορισμού με βάση το DAPI

9.1 Σκοπός ανάλυσης

Σε αυτό το κεφάλαιο εξηγείται μία άλλη μέθοδος για να ληφθούν αποτελέσματα μόνο για τις φάσεις G0/G1 από εικόνες ανοσοφθορισμού σε καλλιέργειες που έχουν κύτταρα σε όλες τις φάσεις. Απομονώνονται με κριτήριο την ένταση στο DAPI τα κύτταρα που είναι στις φάσεις G0/G1 και γίνεται σε αυτά η στατιστική ανάλυση για να συγκριθούν με τα αποτελέσματα των διαφορετικών τρόπων ανάλυσης. Σκοπός της μεθόδου είναι να αυξήσει την ακρίβεια των αποτελεσμάτων επιτρέποντας τον διαχωρισμό των φάσεων σε σχέση με τη χρωστική DAPI.

9.2 Το πείραμα 5 με νέα μέθοδο: Πείραμα επιδιόρθωσης σε κύτταρα A549 ακτινοβολημένα με ακτίνες-X

Το πείραμα περιγράφεται στο Κ8.4.

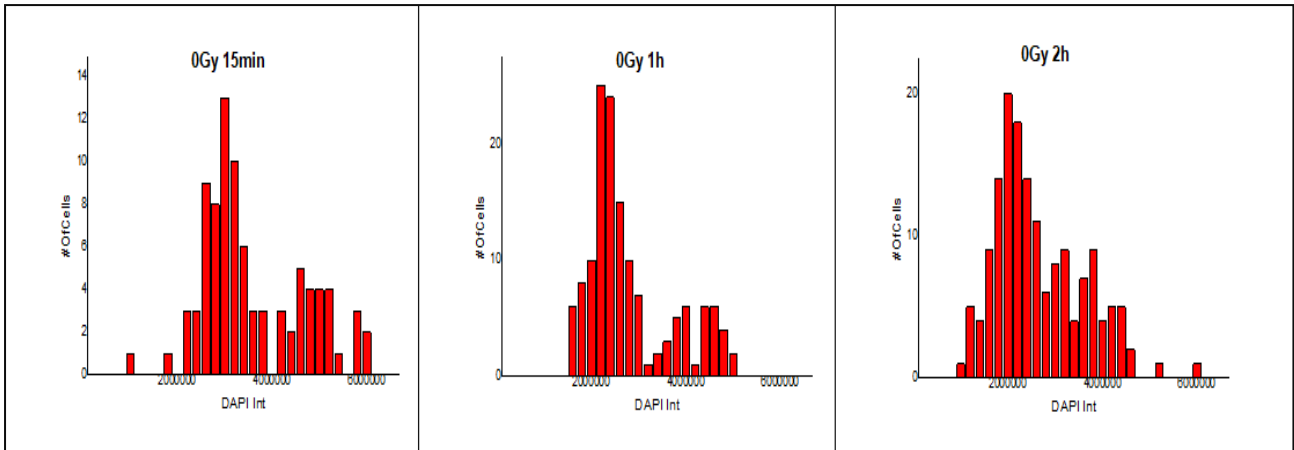
9.2.1 Εισαγωγή

Και αυτό το κεφάλαιο ξεκινάει κάποιες παραδοχές:

1. Τα κύτταρα στις φάσεις G0/G1 έχουν περίπου σταθερή ποσότητα DNA. Το ίδιο και τα κύτταρα στη φάση G2.
2. Ένα κύτταρο στη φάση G2 έχει ακριβώς το διπλάσιο DNA από ένα κύτταρο στη φάση G1.
3. Ο αριθμός των βλαβών που προκαλούνται από την ιοντίζουσα ακτινοβολία είναι ανάλογος της ποσότητας DNA στον πυρήνα. Προκύπτει, λοιπόν, η παραδοχή πως οι πυρήνες με διπλάσιο DNA έχουν διπλάσιο αριθμό βλαβών.
4. Η προσδεσιμότητα του DAPI στο DNA ενός πυρήνα γίνεται κατά προσέγγιση γραμμικά. Το DAPI είναι μικρό μόριο που προσδέεται σε περιοχές DNA με ζεύγη Αδενίνης-Θυμίνης. Η συγκεκριμένη παραδοχή λέει πως η ποσότητα του DAPI, και άρα η έντασή του, εξαρτάται από την ποσότητα των ζευγών αυτών, αν οι άλλοι παράγοντες προσδεσιμότητας (αλληλουχία, διαμόρφωση χρωματίνης) δεν είναι τόσο σημαντικοί.

Αυτές οι παραδοχές οδηγούν σε μία διπλή κατανομή που προσαρμόζεται στα ιστογράμματα της ολικής έντασης DAPI στον πυρήνα. Αν ισχύουν, τότε θα υπάρχουν δύο κορυφές, μια για κάθε κυτταρική φάση. Η διασπορά γύρω από την εκάστοτε κορυφή μπορεί να οφείλεται στη διαφορετική ποσότητα DNA στους πυρήνες, αλλά μπορεί να παίζουν ρόλο πολλοί παράγοντες. Κυρίως, όμως, η επιλεκτικότητα πρόσδεσης του DAPI και οι παράγοντες που ενδέχεται να την επηρεάζουν, η αλληλουχία βάσεων και το περιβάλλον. Μπορεί, λοιπόν, η παραδοχή να αποκλίνει από τη γραμμική παραδοχή που κάναμε, χωρίς, όμως, να βλάπτει την γενική ιδέα. Αν η ισχύς της παραδοχής 4 δεν είναι απόλυτη, αλλά σχετική, αλλάζει απλά το εύρος της κατανομής που προσαρμόζεται.

Στα ιστογράμματα συχνότητων της έντασης στο DAPI (βλ. Παράρτημα) μπορούν να παρατηρηθούν οι διπλές κορυφές.

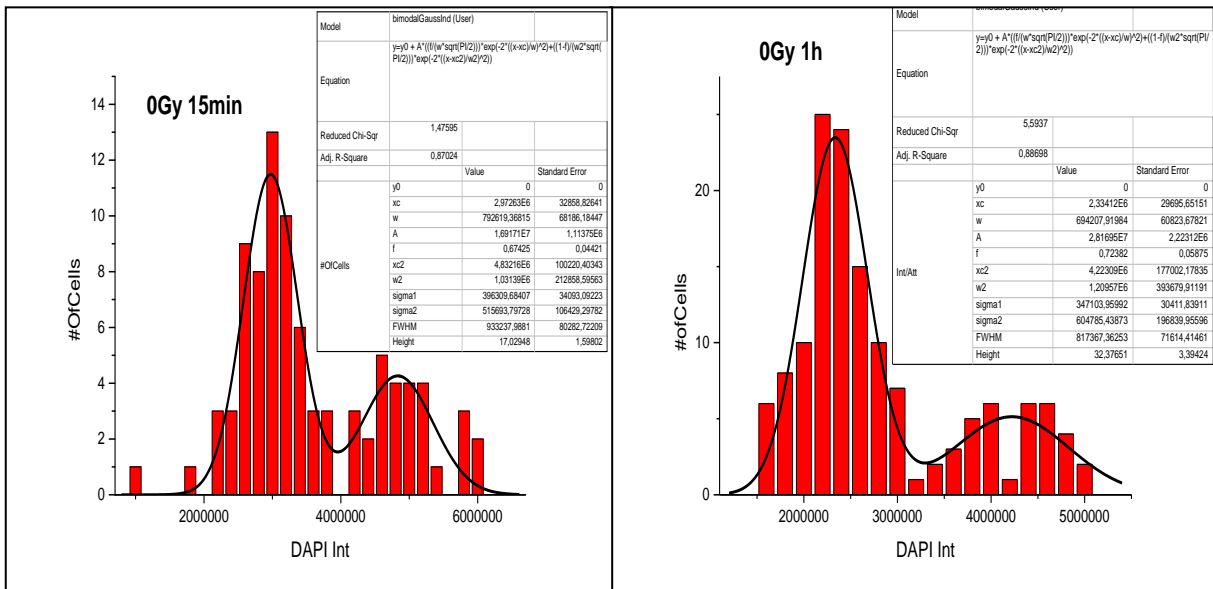


Γραφήματα 9.1: Ιστογράμματα συχνοτήτων για την συνολική ένταση του DAPI στον πυρήνα για διαφορετικές συνθήκες.

9.2.2 Εφαρμογή της κατανομής Bimodal Gauss Independent για τον εντοπισμό των δύο κορυφών.

Χρειάζεται κάποια διπλή κατανομή Gauss, εφόσον τα ιστογράμματα έχουν δύο κορυφές και η Poisson είναι ακατάλληλη για τόσο μεγάλες τιμές. Επιλέχθηκε ανάμεσά τους η Bimodal Gauss Independent.

Στο Παράρτημα υπάρχουν όλες οι προσαρμογές της BGI στα ιστογράμματα του πειράματος. Παρουσιάζονται χαρακτηριστικά δύο στα **Γραφήματα 9.2:**



Γραφήματα 9.2: Εφαρμογή της BGI σε ιστογράμματα συχνοτήτων για τις δύο πρώτες συνθήκες.

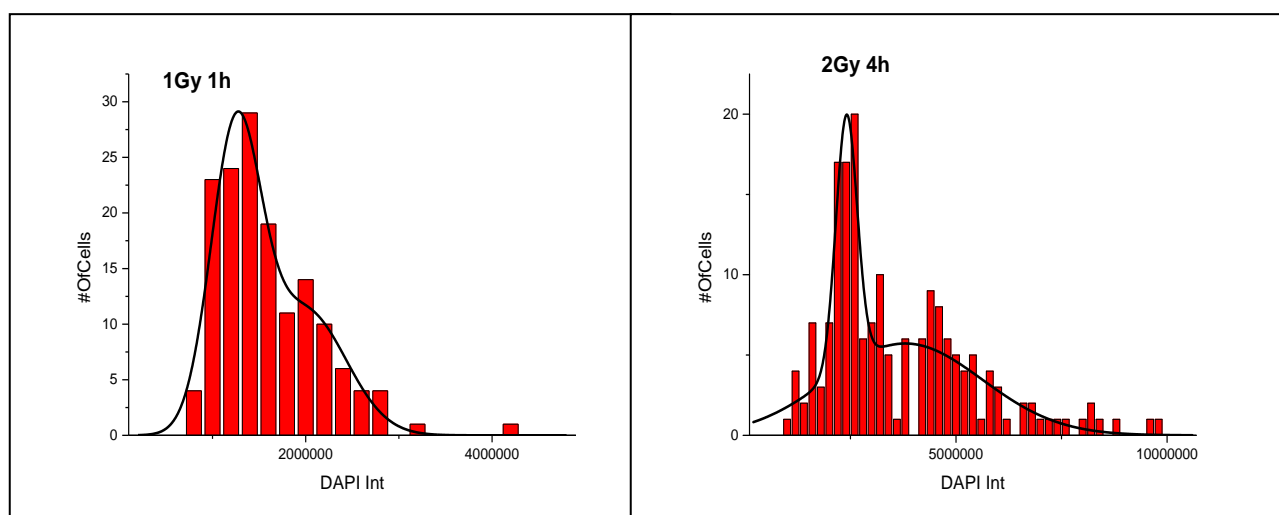
Οι πρώτες κορυφές είναι για τις φάσεις G0/G1. Για κάθε κορυφή λαμβάνεται η θέση της με την τυπική απόκλισή της.

Ο στόχος είναι να βρεθούν δύο όρια στην ένταση του DAPI, ένα κατώτατο και ένα ανώτερο, εντός των οποίων μπορούμε να είμαστε πολύ σίγουροι πως οι πυρήνες βρίσκονται στις φάσεις G0/G1 και G2. Μετά γίνεται η ανάλυση μόνο σε αυτό το δείγμα. Η επιλογή των ορίων, όμως, δεν εξαρτάται μόνο από την κορυφή και από την τυπική απόκλιση. Υπάρχουν περιπτώσεις που οι δύο καμπύλες αλληλοεπικαλύπτονται σε μεγάλο βαθμό και αυτό επηρεάζει την επιλογή, γιατί στις ενδιάμεσες εντάσεις δεν γίνεται να είμαστε σίγουροι ποια κύτταρα είναι σε ποια φάση.

Σε αυτές τις περιπτώσεις δύο είναι οι επιλογές. Ή θα ληφθούν διαστήματα από τις εξωτερικές περιοχές του γραφήματος (από το $x_c - \sigma$ ως το x_c για την πρώτη κορυφή και από το x_c2 ως το $x_c2 + \sigma$ για την δεύτερη), ή θα απορριφθούν, εφόσον δεν υπάρχει κάποια καλή επιλογή.

Ακόμη αφήνεται στην επιλογή του ερευνητή να επιλέξει το εύρος που μπορεί να λάβει. Μία ασφαλής επιλογή είναι να θέσει κανείς το όριο στα $(x_c - \sigma, x_c + \sigma)$. Όμως, όταν είναι αρκετά ξεκάθαρες επιλογές, τα όρια μπορούν να επεκταθούν. Και όταν δεν είναι πρέπει να μειωθούν, όπως σχολιάστηκε προηγουμένως.

Η φάση G2 καταλήγει πάντα να έχει πολύ λίγα κύτταρα οπότε δεν αφήνει περιθώρια για στατιστική ανάλυση. Παρατηρείται πως σε όταν έχουν περάσει πολλές ώρες η δεύτερη καμπύλη είναι σημαντικά χαμηλότερη και πιο πλατιά, κάτι που μπορεί να αποτελεί ένδειξη πως τα κύτταρα έχουν πιάσει πλατώ και δεν πολλαπλασιάζονται άλλο. Έτσι η G2 είναι πολύ δυσδιάκριτη, αλλά επίσης το μεγάλο εύρος της δεν αφήνει να επιλεγούν κύτταρα που να ανήκουν με κάποια βεβαιότητα στις φάσεις G0/G1 (**Γράφημα 9.3(β)**).



Γραφήματα 9.3: Ιστογράμματα με αλληλοεπικαλυπτόμενες κατανομές Gauss. (α) Μέτρια αλληλοεπικάλυψη. (β) Σημαντική αλληλοεπικάλυψη.

Από την 9.3(α) δεν γίνεται να ληφθούν ελεύθερα τα όρια γύρω από την καμπύλη. Για τις φάσεις G0/G1 επιλέγεται το όριο $x_{c-1,5\sigma}$ από τα αριστερά, αλλά $x_{c+0,5\sigma}$ από τα δεξιά.

Στο **Γράφημα 9.3 (β)**, ωστόσο, όλη η πρώτη καμπύλη καλύπτεται από τη δεύτερη σε σημαντικό βαθμό, οπότε η κατάσταση 2Gy 4h απορρίπτεται από την ανάλυση.

Με αυτήν τη διαδικασία λαμβάνονται τα ακόλουθα όρια για το DAPI(Πίνακας 9.1). Το μπλε χρώμα υποδηλώνει τις καταστάσεις που είχαν μέτρια αλληλοεπικάλυψη. Συνθήκες με σημαντική αλληλοεπικάλυψη δεν εμφανίζονται στον πίνακα.

Συνθήκη	μέση τιμή	τυπική απόκλιση	Min DAPI Int	Max DAPI Int
0Gy 15m	2972630	396310	2378165	3368940
0Gy 1h	2334120	347103	1813465,5	2681223
0Gy 2h	2059860	405941	1450948,5	2972630
0Gy 4h	2492320	298708	2044258	2791028
0Gy 8h	1883380	282363	1459835,5	2165743
1Gy 15m	2174850	539334	1365849	2714184
1Gy 1h	1247460	269634	843009	1445615
1Gy 2h	2463270	224304	2126814	2463270
1Gy 4h	1725170	849172	451412	2149756
2Gy 1h	2311290	305136	1853586	2387574
2Gy 2h	2391030	331743	1893415,5	2722773

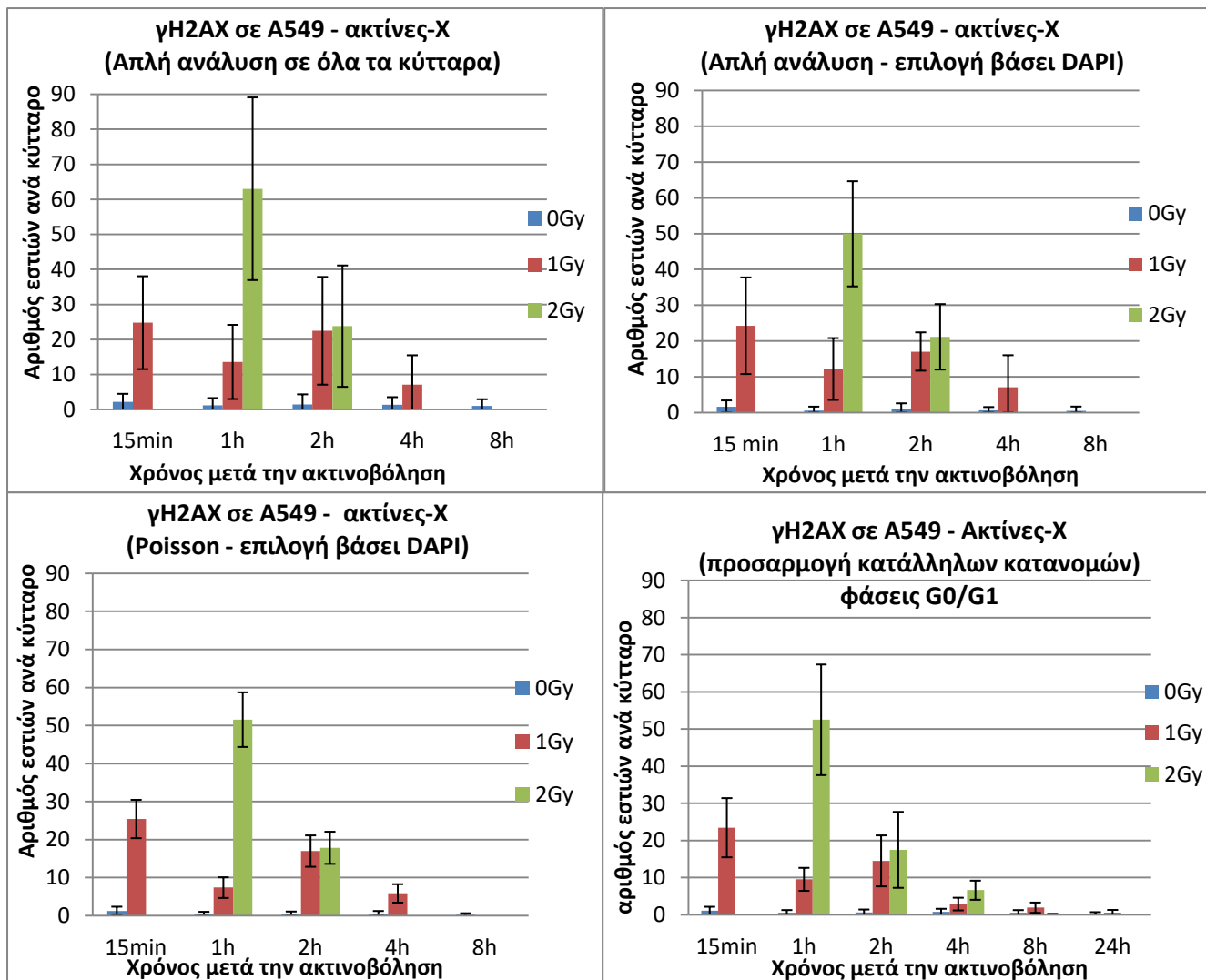
Πίνακας 9.1: Ο πίνακας επιλογής των ορίων για την συνολική ένταση του DAPI για την απομόνωση των κυττάρων που βρίσκονται στις φάσεις G0/G1.

9.2.3 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Το επόμενο βήμα είναι να επιλεγθούν στο Excel τα κύτταρα που έχουν συνολική ένταση πυρήνα ανάμεσα σε αυτά τα δύο όρια και να αναλυθούν τα δεδομένα μόνο από αυτούς.

Στα ιστογράμματα προσαρμόστηκε η κατανομή Poisson για τον υπολογισμό της μέσης τιμής με το OriginPro9 και λήφθηκαν τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο **Γράφημα 9.4 (α)**. Όπως και στο προηγούμενο πείραμα, θα συγκρίνουμε αυτά τα αποτελέσματα με την απλή στατιστική ανάλυση πάνω σε αυτά τα κύτταρα, που παρουσιάζεται στο **Γράφημα 9.4(β)** και με την απλή στατιστική ανάλυση πάνω σε όλα τα κύτταρα, που παρουσιάζεται στο **Γράφημα 9.4(γ)**.

Τέλος, τα αποτελέσματα μπορούν να συγκριθούν με αυτά που προέκυψαν με την ανάλυση των ιστογραμμάτων συχνοτήτων των εστιών γH2AX με τις διπλές κατανομές στο προηγούμενο κεφάλαιο.



Γραφήματα 9.4: Αριθμός εστιών γH2AX ανά κύτταρο με διαφορετικές αναλύσεις. (α) Απλή ανάλυση σε όλα τα κύτταρα. **0Gy** → 15min: $2,18 \pm 2,28$ (45 κύτταρα) 1h: $1,18 \pm 2,08$ (80 κύτταρα) 2h: $1,44 \pm 2,8$ (98 κύτταρα) 4h: $1,41 \pm 2,11$ (99 κύτταρα) 8h: $1,03 \pm 1,88$ (79 κύτταρα). **1Gy** → 15min: $24,78 \pm 13,26$ (78 κύτταρα) 1h: $13,57 \pm 10,59$ (76 κύτταρα) 2h: $22,45 \pm 15,38$ (28 κύτταρα) 4h: $7,08 \pm 8,38$ (100 κύτταρα) **2Gy** → 1h: $63,00 \pm 26,07$ (34 κύτταρα), 2h: $23,78 \pm 17,32$ (58 κύτταρα) (β) Απλή ανάλυση στα επιλεγμένα βάσει DAPI. **0Gy** → 15min: $1,60 \pm 1,76$, 1h: $0,58 \pm 1,04$, 2h: $0,85 \pm 1,70$, 4h: $0,62 \pm 0,89$, 8h: $0,42 \pm 1,22$. **1Gy** → 15min: $24,24 \pm 13,41$, 1h: $12,14 \pm 8,65$, 2h: $17,03 \pm 5,36$, 4h: $7,04 \pm 8,96$. **2Gy** → 1h: $49,94 \pm 14,70$, 2h: $21,14 \pm 9,15$. (γ) Προσαρμογή Poisson στα επιλεγμένα με DAPI. **0Gy** → 15min: $1,26 \pm 1,12$, 1h: $0,4 \pm 0,63$, 2h: $0,44 \pm 0,66$, 4h: $0,52 \pm 0,72$, 8h: $0,2 \pm 0,45$. **1Gy** → 15min: $25,44 \pm 15,04$, 1h: $7,39 \pm 2,72$, 2h: $17 \pm 4,12$, 4h: $5,87 \pm 2,42$. **2Gy** → 1h: $51,26 \pm 7,18$ 2h: $17,87 \pm 4,23$ (δ) **0Gy** → 15min: $1,12 \pm 1,06$ (BP), 1h: $0,55 \pm 0,74$ (P), 2h: $0,64 \pm 0,8$ (P), 4h: $0,76 \pm 0,87$ (P), 8h: $0,54 \pm 0,73$ (P), 24h: $0,24 \pm 0,49$ (P) **1Gy** → 15min: $23,47 \pm 7,97$ (BGI), 1h: $9,563,09$ (BP), 2h: $14,53 \pm 6,86$ (BGI), 4h: $2,90 \pm 1,70$ (BP), 8h: $1,92 \pm 1,39$ (BP), 24h: $0,57 \pm 0,75$ (BP). **2Gy** → 1h: $52,52 \pm 14,89$ (BGI2), 2h: $17,50 \pm 10,23$ (BGI2), 4h: $6,63 \pm 2,57$ (BP), 8h: $0,05 \pm 0,22$ (BP).

9.4 Συμπεράσματα

Το DAPI μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να διαχωριστούν σε έναν πληθυσμό κυττάρων αυτά που βρίσκονται στις φάσεις G0/G1 και αυτά που βρίσκονται στη φάση G2. Το ιστόγραμμα της συνολικής έντασης στο DAPI για τον πληθυσμό των κυττάρων εμφανίζει δύο κορυφές, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να καθοριστούν όρια έντασης, εντός των οποίων υπάρχουν κύτταρα αυτών των δύο ομάδων. Πρέπει να υπάρχει αρκετά μεγάλος αριθμός κυττάρων για να μπορεί να γίνει καλή στατιστική ανάλυση.

Όταν εντοπιστούν τα κύτταρα που βρίσκονται στην εκάστοτε φάση μπορεί να υπολογιστεί με συνήθη ανάλυση ο αριθμός των εστιών γΗ2ΑΧ. Είναι σημαντικό να είναι γνωστό σε ποια φάση βρίσκονται τα κύτταρα που αναλύονται γιατί υπάρχουν πολλοί παράγοντες που διαφέρουν ανάμεσα στα μεν και τα δε. Έτσι η μέθοδος με το DAPI μπορεί να έχει και εφαρμογές έξω από το πλαίσιο που χρησιμοποιήθηκε σε αυτήν την εργασία.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Λ.Χ.Μαργαρίτης, Β. Γ. (2004). Βιολογία Κυττάρου. Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας.
2. Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., Βασικές αρχές κυτταρικής βιολογίας, τομος 1. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.
3. Carnero A., (2006). Cell cycle and cell cycle checkpoints. Encyclopedia of respiratory medicine.
4. Shackelford R. et al. (1999). Cell cycle control, checkpoint mechanisms and genotoxic stress. Environmental Health perspectives, Vol 107.
5. Leist M., Ncotera P.. (1997) Cell Death: Apoptosis versus Necrosis. Primer on Cerebrovascular diseases, chapter 28.
6. Kinner A., Wu W., Staudt C., Iliakis G.. (2008). γ -H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. Nucleic acid research, Vol 36.
7. Fernandez-Capetillo O., Lee A., Nussenzweig M., Nussenzweig A.. (2004). H2AX: The histone guardian of the genome. DNA repair, vol 3.
8. Siddiqui M. S., Francois M., Fenech M. F., Leifert W. R.. (2015). Persistent γ H2AX: A promising molecular marker of DNA damage and aging. Mutation Research, vol 766.
9. Eisenberg J., Wallrath L.. (2003). Heterochromatin, position effects and genetic dissection of chromatin. Progress in nucleic acid research and molecular biology, Vol 74.
10. Bont R., van Larebeke N.. (2004). Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. Mutagenesis Vol, 19.
11. Mazouzi A., Velimezi G., Loizou J..(2014). DNA replication stress: Causes, resolution and disease. Experimental cell research, Vol 329.
12. Kryston T., Georgiev A., Pissis P., Georgakilas A.. (2011). Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. Mutation Research, Vol 711.
13. 2.6 Havaki S., Kotsinas A., Chronopoulos E., Kletsas D., Georgakilas A., Gorgoulis V.. (2015). The role of oxidative DNA damage in radiation induced bystander effect. Cancer Letters, Vol 356.
14. Cadet J., Wagner R.. (2014). Oxidatively generated base damage to cellular DNA by hydroxyl radical and one-electron oxidants: Similarities and differences. Archives of Biochemistry and Biophysics, Vol 557.
15. Sunder S.. (1998) Calculation of radiation dose rates in a water layer in contact with used CANDU UO₂ fuel. Nuclear Technology, vol 122.
16. Seltzer S. M., Fernandez-Varea J. M., Andreo P., Bergstrom Jr. P. M., Burns D. T., Krajcar Bronic I., Ross C. K., Salvat F.. (2014). Key Data for Ionizing-Radiation Dosimetry: Measurement standards and applications. Journal of the International Commission on Radiation Units and Measurements, vol 14.
17. Spothem-Maurizot M., Davidkova M.. (2011). Radiation damage to DNA in DNA-protein complexes. Mutation Research, vol 711.
18. Desouky O., Ding N., Zhou G.. (2015). Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation. Journal of Radiation Research and Applied Sciences, Vol 8
19. Le Caër S..(2011). Water Radiolysis: Influence of Oxide Surfaces on H₂ Production under Ionizing Radiation. Water, Vol 3.

20. 2.27 Buck E. C., Wittman R. S., Skormurski F. N., Cantrell K. J., McNamara B. K., Soderquist C. Z.. (2012). Radiolysis Process Modeling Results for Scenarios. Radiolysis Process Model, July 2012.
21. Dumont E., Monari A..(2015) Understanding DNA under oxidative stress and sensitization: the role of molecular modeling. *Frontiers in Chemistry*, vol 3.
22. Wu, Y., Mundy, C. J., Colvin, M. E., and Car, R. (2004). On the mechanisms of OH radical induced DNA-base damage: a comparative quantum chemical and CarParrinello molecular dynamics study. *J. Phys. Chem. A* 108
23. Abolfath, R. M., Biswas, P. K., Rajnarayanam, R., Brabec, T., Kodym, R., and Papiez, L. (2012). Multiscale QM/MM molecular dynamics study on the first steps of guanine damage by free hydroxyl radicals in solution. *J. Phys. Chem. A* 116
24. 19 Terzidis M.A., Ferreri C., Chatgililoglu C.. (2015). Radiation-induced formation of purine lesions in single and double stranded DNA: revised quantification. *Frontiers in Chemistry*, vol 3.
25. Quinones J.L., Demple B.. (2016). When DNA repair goes wrong: BER-generated DNA-protein crosslinks to oxidative lesions. *DNA repair*, vol 44.
26. Ravant J. L., Douki T..(2016) UV and ionizing radiations induced damage, differences and similarities. *Radiation Physics and Chemistry*, Vol 128.
27. Kinner A., Wu W., Staudt C., Iliakis G.. (2008). γ -H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Research*, vol 36.
28. Gorbunova V., Seluanov A.. (2016). DNA double strand break repair, aging and chromatin connection. *Mutation Research*, vol 788.
29. Nikitaki Z., Mavragani I. V., Laskaratou D. A., Gika V., Moskvina V. P., Theofilatos K., Vougas K., Stewart R. D., Georgakilas A. G.. (2016) Systemic mechanisms and effects of ionizing radiation: A new 'old' paradigm of how the bystanders and distant can become players. *Seminars in cancer biology*.
30. Robert T., Vrielynck N., Mezard C., de Massy B., Grelon M.. (2016). A new light on the meiotic DSB catalytic complex. *Seminars in cell and developmental biology*, vol 54.
31. Jung D., Alt F. W.. (2004). Unraveling V(D)J Recombination: Insights into Gene Regulation. *Cell* vol 116.
32. Giglia-Mari A., Zotter A., Vermeulen W.. (2010). DNA damage response. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, October 2010.
33. Price B. D., D'Andrea A. D.. (2013). Chromatin remodeling at DNA Double-Strand Breaks *Cell* Vol 152
34. Schuermann D., Weber A. R., Schar P.. (2016). Active DNA demethylation by DNA repair Facts and uncertainties. *DNA Repair* vol 44.
35. Gospdinov A., Herceg Z.. (2013). Chromatin structure in double strand break repair. *DNA Repair*, vol 12.
36. Hosfield D.J.. et al. (2001). DNA damage recognition and repair pathway coordination revealed by the structural biochemistry of DNA repair enzymes. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, Vol 68.
37. Liu Y., Li Y., Lu X.. (2016). Regulators in the DNA damage response. *Archives of Biochemistry and Biophysics*.
38. Wei H., Yu X.. (2016). Functions of PARylation in DNA Damage Repair Pathways. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, vol 14.

39. Maldenov E. Iliakis G.. (2011). Induction and Repair of double strand breaks: The increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. *Mutation Research*, vol 711.
40. Harper J.W., Elledge S. J.. (2007). The DNA damage response: 10 years after. *Molecular Cell*, Vol 28.
41. Geric M., Gajski G., Garaj-Vrhovac V.. (2014). gammaH2AX as a biomarker for DNA double-strand breaks in ecotoxicology. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol 105.
42. Dianov G.L. et al. (2001). Base excision repair in nuclear and mitochondrial DNA. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, Vol 68.
43. van Cuijk L., Vermeulen W., Marteijn J.A.. (2014) Ubiquitin at work: The ubiquitous regulation of the damage recognition step of NER. *Experimental Research*, Vol 329.
44. Li Z., Pearlman A. H., Hsieh P.. (2016). DNA mismatch repair and the DNA damage response. *DNA Repair*, vol 38.
45. Hsieh P., Yamane K.. (2008). DNA mismatch repair: Molecular mechanisms, cancer and ageing. *Mechanisms of ageing and development*, Vol 129.
46. Muro Y. et al. (2015). DNA mismatch repair engines: Genetic defects and autoimmunity. *Clinica Chimica Acta*, Vol 442.
47. Goodarzi A., Jeggo P..(2013). The repair and signaling responses to DNA double-strand breaks. *Advances in genetics*, Vol 82.
48. Zimmermann M., deLange T.. (2014). 53BP1: pro choice in DNA repair. *Trends in Cell Biology*, vol 24.
49. Fernandez-Capetillo O., Lee A., Nussenzweig M., Nussenzweig A.. (2004). H2AX: The histone guardian of the genome. *DNA repair*, vol 3.
50. Thomson L. H.. (2012). Recognition, signaling, and repair of DNA double-strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells: The molecular choreography. *Mutation Research*, vol 751.
51. Jeggo P. A., Downs J. A.. (2014). Roles of chromatin remodelers in DNA double strand break repair. *Experimental cell research*, vol 329.
52. Seeber A., Gasser S. M.. (2017). Chromatin organization and dynamics in double-strand break repair. *Current Opinion in Genetics & Development*, vol 43.
53. Mine-Hattab J., Rothstein R.. (2013). DNA in motion during double-strand break repair. *Trends in Cell Biology*, vol 23.
54. Seol J.M., Shim E. Y., Lee S. E.. (2017) Microhomology-Mediated End Joining: Good, Bad and Ugly. *Mutation Research*, In Press Accepted manuscript.
55. Nakamura A. J., Parekh P. R., Martin O. A., Bonner W. M., Redon C. E..(2012). Gamma-H2AX Formation and Chromatin Structure. *Advances in Genetics Research*, vol 7.
56. Valdiglesias V., Guinta S., Fenech M., Neri M., Bonassi S.. (2013). GammaH2AX as a marker of DNA double strand breaks and genomic instability in human population studies. *Mutation Research*, vol 753.
57. Weinfeld M.. (2001). Complexities of BER. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, vol 68.
58. Horn S., Brady D., Prise K.. (2015). Alpha particles induce pan-nuclear phosphorylation of H2AX in primary human lymphocytes mediated through ATM. *Biochimica et Biophysica Acta*, vol 1853.

59. Ivashkevich A., Redon C. E., Nakamura A. J., Martin R. F., Martin O. A.. (2012). Use of the γ -H2AX assay to monitor DNA damage and repair in translational cancer research. *Cancer Letters*, Vol 327.
60. Voytas D..(2000). Agarose gel electrophoresis. *Current Protocols in Molecular Biology*
61. Collins A. R.. (2014) Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. *Biochimica et Biophysica Acta*, vol 1840.
62. Olive P. L.. (2004). Detection of DNA Damage in Individual Cells by Analysis of Histone H2AX Phosphorylation. *Methods in cell biology*, vol 75.
63. Redon C. E. et al. (2012). GammaH2AX and other histone post-translational modifications in the clinic. *Biochimica et Biophysica Acta*, vol 1819.
64. Redon C. E., Nakamura A. J., Gouliava K., Rahman A., Blakely W. F., Bonner W. M.. (2010). The use of Gamma-H2AX as a Biodosimeter for Total-Body Radiation Exposure in Non-Human Primates. *Plos one*, vol 5
65. Brelje T. C., Wessendorf M. W., Sorenson R. L.. (1993). Multicolor Laser Scanning Confocal Immunofluorescence Microscopy: Practical Application and Limitations. *Methods in Cell Biology*, Vol 38.
66. Lin E., Rivefa-Baez L., Fouladdel S., Yoon H. J., Guthrie S., Wieger J., Deol Y., Keller E., Sahai V., Simeone D. M., Burness M. L., Azizi E., Wicha M. S., Nagrath S. N.. (2017). High-Throughput Microfluid Labyrinth for the Label-free Isolation of Circulating Tumor Cells. *Cell systems*, vol 5.
67. Simon S. L., Bouville A., Kleinerman R.. (2010). Current Use and Future Needs of Biodosimetry in Studies of Long-Term Health Risk following Radiation Exposure. *Health Physics*, vol 98.
68. Wrixon A. D.. (2008) New ICRP recommendations. *Journal of Radiological Protection*, vol 28.
69. Cornelissen B., Darbar S, Kersemans V., Allen D., Falzone N., Barbeau J., Smart S., Vallis K. A.. (2012). Amplification of DNA damage by a Γ 2 α χ -targeted radiopharmaceutical. *Nuclear Medicine and Biology*, vol 39.
70. Redon C. E., Dickey J. S., Bonner W. M., Sedelnikova O. A.. (2009). Γ 2 α χ as a biomarker of DNA damage induced by ionizing radiation in human peripheral blood lymphocytes and artificial skin. *Advances in Space Research*, vol 43.
71. Mandina T., Roch-Lefecre S. H., Voisin P., Gonzalez J. E., Lamadrid A. I., Romero I., Garcia O., Voisin P., Roy L.. (2011). Dose-response relationship of γ -H2AX foci induction in human lymphocytes after X-rays exposure. *Radiation Measurements*, vol 46.
72. Redon, Ch.E., Dickey, J.S., Bonner, W.M., Sedelnikova, O.A.. (2009). γ -H2AX as a biomarker of DNA damage induced by ionizing radiation in human peripheral blood lymphocytes and artificial skin. *Adv. Space Res*, vol. 43.
73. Rothkamm, K., Balroop, Sh., Shekhdar, J., Fernie, P., Goh, V.. (2007). Leukocyte DNA damage alter multi-detector row CT: a quantitative biomarker of low-level radiation exposure. *Radiology*, vol 242
74. Scherthan, H., Hieber, L., Braselmann, H., Meineke, V., Zitzelsberger, H.. (2008). Accumulation of DSBs in γ -H2AX domains fuel chromosomal aberrations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 371.

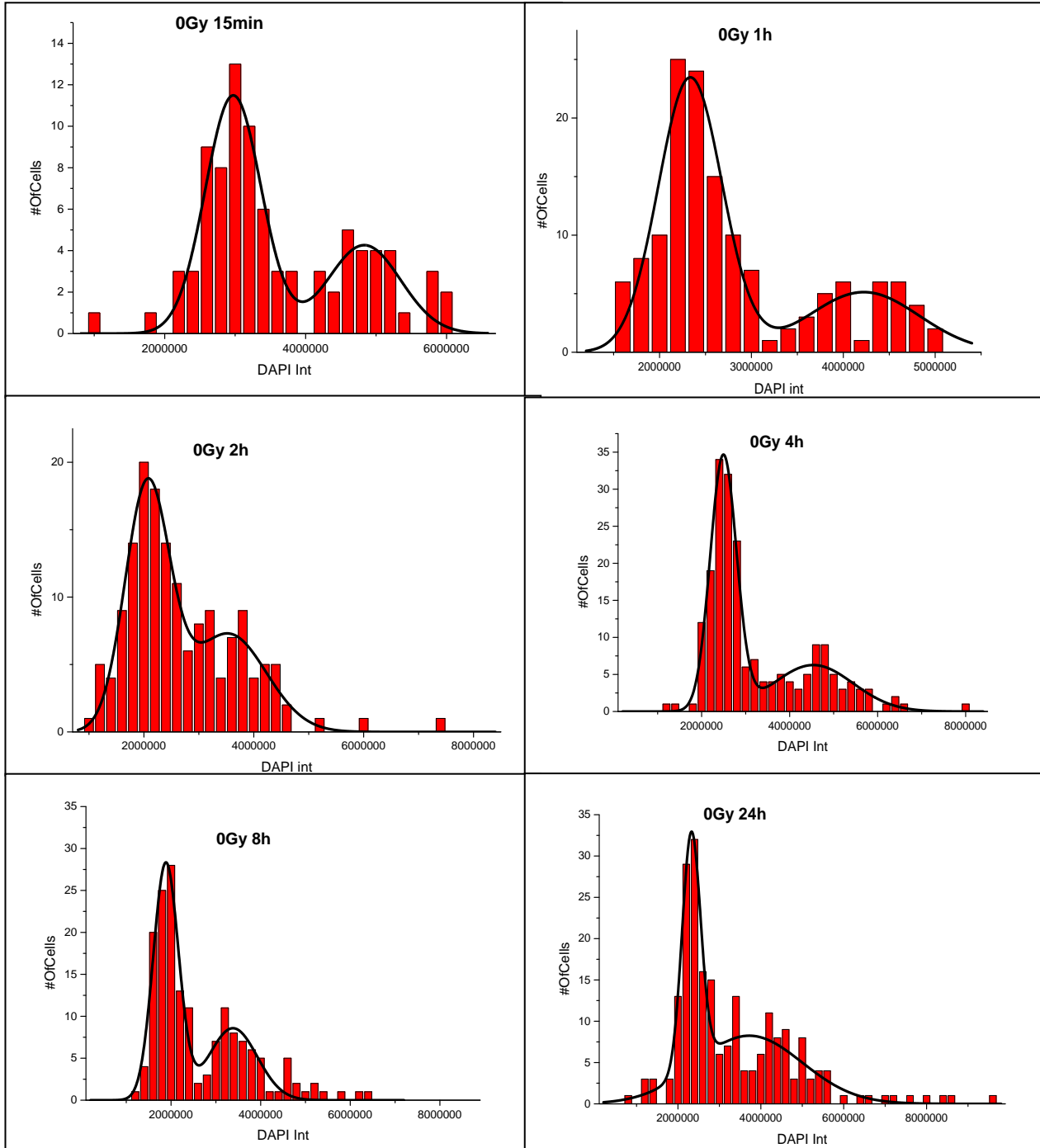
75. Redon C. E., Dickey J. S., Bonner W. M., Sedelnikova O. A.. (2009). Γη2αχ as a biomarker of DNA damage induced by ionizing radiation in human peripheral blood lymphocytes and artificial skin. *Advances in Space Research*, vol 43.
76. Martin O. A., Ivashkevich A., Choo S., Woodbine L., Jeggo P. A., Martin R. F., Lobachevsky P.. (2013). Statistical analysis of kinetics, distribution and co-localization of DNA repair foci in irradiated cells: Cell cycle effect and implications for prediction of radiosensitivity. *DNA Repair*, vol 12.
77. Nikitaki Z., Nikolov V., Mavragani I. V., Mladenov E., Mangelis A, Laskaratou D. A., Fragkoulis G. I., Hellweg C. E., Martin O. A., Emfietzoglou D., Hatzi V. I., Terzoudi G. I. , Iliakis G., Georgakilas A. G.. (2016). Measurement of complex DNA damage induction and repair in human cellular systems after exposure to ionizing radiations of varying linear energy transfer (LET). *Free Radical Research*.

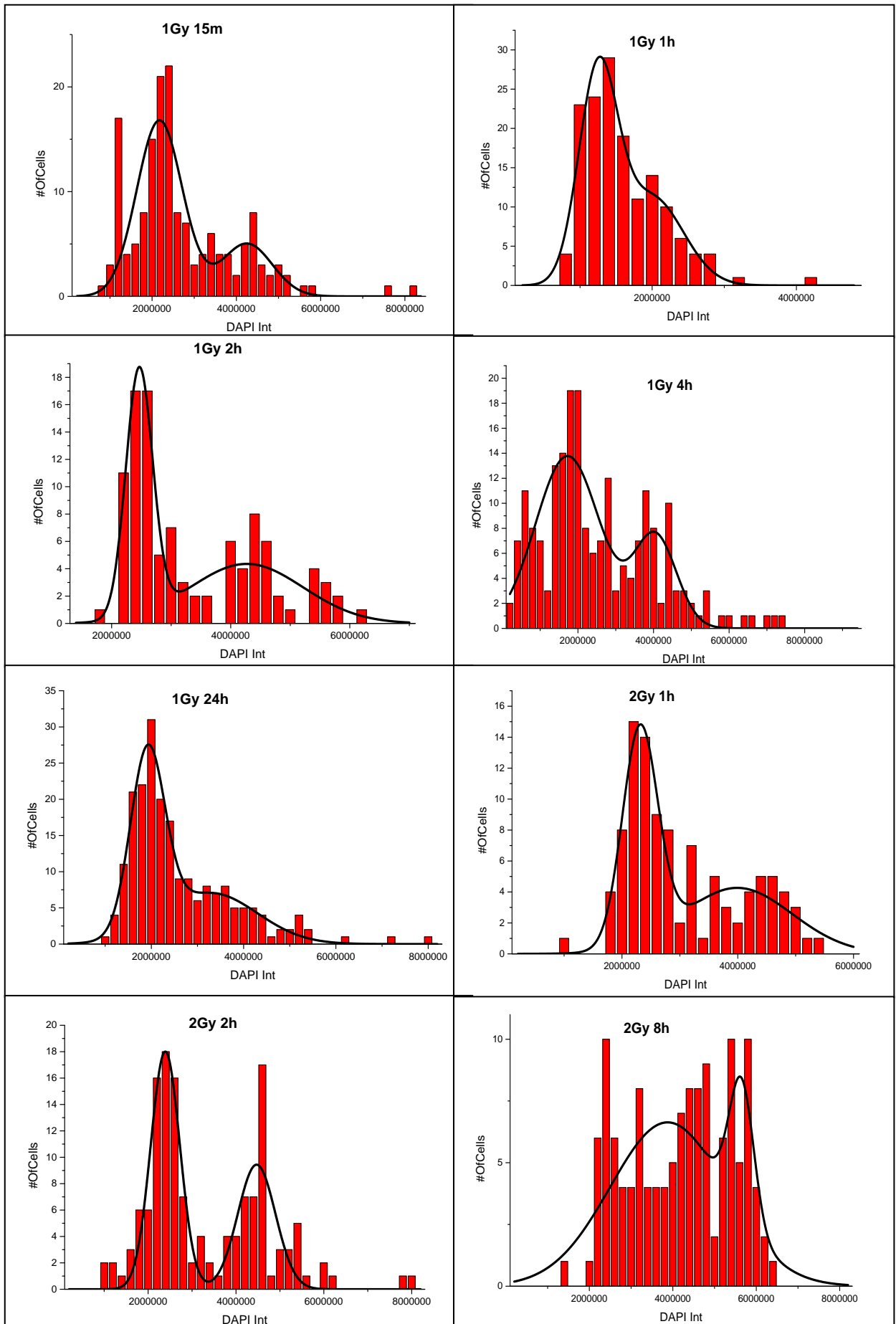
Διαδικτυακές αναφορές

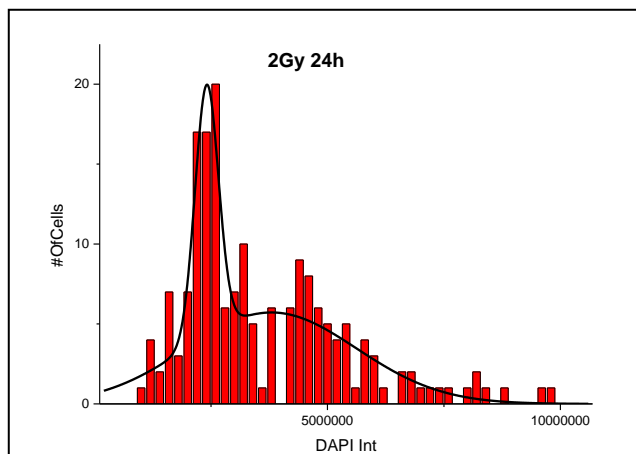
- i1 <http://www.teiath.gr/userfiles/akanellou/phys%201%20fylladio1%20kyttaro.pdf>
- i2 <http://www.radiologyinfo.org>
- i3 <http://www.wikipedia.com>
- i4 <http://www.scienceset.co.uk/portfolio>
- i5 <http://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/structure-and-function-of-dna>
- i6 <http://www.chimicare.org>
- i7 https://www.researchgate.net/figure/224830481_fig1_Fig-1-Schematic-representation-of-base-excision-repair-BER-mechanism-BER-consists-of
- i8 http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?sce03420
- i9 http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?sce03430
- i10 <https://www.semrock.com/flow-cytometry.aspx>
- i11 <https://www.biotek.com/resources/white-papers/development-of-the-optical-microscope/>
- i12 <http://uacc.arizona.edu/research/shared-resources/tacmasr/microscopy/confocal>
- i13 <https://radiopaedia.org/articles/equivalent-dose>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Προσαρμογή της BGI στα ιστογράμματα συχνοτήτων της συνολικής έντασης στο DAPI για το Πείραμα 5







Αποτελέσματα κορυφών

Παρουσιάζονται αφού απορριφθούν οι σημαντικά αλληλοεπικαλυπτόμενες καμπύλες.

Με μπλε σημειώνονται οι καμπύλες που έχουν μέτρια αλληλοεπικάλυψη.

	xc1	σ1	xc2	σ2
0Gy 15m	2972630	396310	4832160	515694
0Gy 1h	2334120	347103	4223090	604785
0Gy 2h	2059860	405941	3532340	694724
0Gy 4h	2492320	298708	4536970	906678
0Gy 8h	1883380	282363	3380820	542993
1Gy 15m	2174850	539334	4248320	603155
1Gy 1h	1247460	269634	1997440	437449
1Gy 2h	2463270	224304	4266280	548965
1Gy 4h	1725170	849172	4043370	560745
2Gy 1h	2311290	305136	3989920	949536
2Gy 2h	2391030	331743	4470100	428406