



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΚΗΣ

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΟΜΑΔΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ
ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΒΛΑΒΩΝ ΣΤΟ DNA ΛΟΓΩ
ΣΥΣΤΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΤΗΣ ΙΟΝΤΙΖΟΥΣΑΣ
ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ

Διπλωματική εργασία

Νταργαράς Α. Ανδρέας

Επιβλέπων: Δρ. Αλέξανδρος Γ. Γεωργακίλας, Αν. Καθηγητής Ε.Μ.Π

Αθήνα , 2018

Copyright © - All rights reserved Νταργαρας Α. Ανδρέας.

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 το συγγραφέα.

.....
Νταργαρας Α. Ανδρέας

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

© 2018 – All rights reserved

Στην οικογένεια μου

Περιεχόμενα

Περίληψη	vii
Abstract	viii
Ευχαριστίες	ix
Κεφάλαιο 1^ο ΧΑΡΑΚΗΡΙΣΤΙΚΑ ΙΟΝΤΙΖΟΥΣΩΝ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΩΝ	1
1.1 Εισαγωγή	1
1.2 Είδη ιοντιζουσών ακτινοβολιών	2
1.2.1 Ακτινοβολία άμεσου ιοντισμού	2
1.2.1.1 Ακτινοβολία α	2
1.2.1.2 Ακτινοβολία β	2
1.2.2 Ακτινοβολία έμμεσου ιοντισμού.....	3
1.2.2.1 Ακτινοβολία φωτονίων.....	3
1.2.2.2 Ακτινοβολία νετρονίων.....	3
1.2.3 Άλλα είδη ακτινοβολιών φορτισμένων σωματιδίων	3
1.2.3.1 Ακτινοβολία πρωτονίων	3
1.2.3.2 Ακτινοβολία ιόντων άνθρακα.....	3
1.3 Πηγές ιοντιζουσών ακτινοβολιών	4
1.3.1 Ραδιοϊσότοπα φάρμακα.....	4
1.3.2 Επιταχυντικές Διατάξεις	4
1.3.2.1 Γραμμικοί επιταχυντές	4
1.3.2.2 Κύκλοτρα	5
1.3.2.3 Συγχροτρόνια.....	5
Κεφάλαιο 2^ο ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ	6
2.1 Εισαγωγή	6
2.2 Κυτταρική Δομή	6
2.3 Το γενετικό υλικό	8
2.3.1 Εισαγωγικά	8
2.3.2 Δομή DNA	8
2.4 Κυτταρικός κύκλος	10
2.4.1 Γενικά στοιχεία	10
2.4.2. Τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου	11
Κεφάλαιο 3^ο ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΙΟΝΤΙΖΟΥΣΑΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΜΕ ΤΗΝ ΥΛΗ	12
3.1 Εισαγωγή	12

3.2 Τρόποι αλληλεπίδρασης των ακτίνων-Χ με την ύλη.....	12
3.2.1 Χαρακτηριστικά μεγέθη δοσιμετρίας της ακτινοβολίας.....	14
3.2.2 Στάδια βιολογικής δράσης	16
3.2.3 Τροποποιητικοί μηχανισμοί.....	17
3.3 Αποτελέσματα σε μοριακό επίπεδο.....	18
3.3.1 Άμεση και έμμεση δράση.....	18
3.3.2 Βλάβες στο γενετικό υλικό.....	20
3.3.3 Αναγνώριση και απόκριση-επιδιόρθωση βλαβών.....	22
3.3.4 Πιθανά προβλήματα στην επιδιόρθωση	23
3.4 Αποτελέσματα σε κυτταρικό επίπεδο.....	24
3.4.1 Γονιδιακές μεταλλάξεις.....	24
3.4.1 Χρωμοσωματικές αλλοιώσεις.....	25
3.4.3 Κυτταρικός θάνατος.....	25
3.5 Αποτελέσματα σε ιστούς.....	26
3.5.1 Καθορισμένα αποτελέσματα.....	27
3.5.2 Στοχαστικά αποτελέσματα.....	27
3.6 Συστημικά αποτελέσματα.....	28
3.6.1 Μη στοχευμένες επιδράσεις.....	28
3.6.1.1 Επιδράσεις σε παρακείμενα κύτταρα (bystander effects).....	29
3.6.1.2 Επιδράσεις σε απομακρυσμένους ιστούς (abscopal effects)	30
3.6.1.3 Προσαρμοσμένη απόκριση (adaptive response)	31
3.6.1.4 Γονιδιωματική αστάθεια (genomic instability)	31
3.6.2 Μηχανισμοί επαγωγής ΜΣΕ.....	32
3.6.2.1 Οξειδωτικό στρες.....	32
3.6.2.2 Δραστικές μορφές οξυγόνου/αζώτου (ROS/RNS).....	33
3.6.2.3 Οξειδωμένο εξωπυρηνικό DNA.....	34
3.6.2.4 Σύνδεση βλαβών με το ανοσοποιητικό σύστημα	35
3.6.2.5 Ανοσοποιητικό σύστημα και φλεγμονώδεις αποκρίσεις.....	36
3.6.2.6 Κυτοκίνες	37
3.6.2.7 Μακροφάγα και άλλα ανοσοκύτταρα.....	38
Κεφάλαιο 4^ο ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΒΛΑΒΩΝ DNA ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ	40
4.1 Εισαγωγή.....	40
4.2 Ο ρόλος των ενζύμων του μηχανισμού BER.....	41
4.2.1 Η λειτουργία της γλυκοσυλάσης hOGG1.....	41
4.3 Μέθοδος ανίχνευσης των βλαβών.....	42

4.3.1 Επώαση του DNA με το ένζυμο και δημιουργία των DSBs	42
4.3.2 Απεικόνιση των αποτελεσμάτων	43
4.4 Μέθοδος ποσοτικοποίησης των βλαβών	45
Κεφάλαιο 5^ο ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ	47
5.1 Σκοπός – Εισαγωγικά στοιχεία.....	47
5.2 Υλικά και Μέθοδοι	48
5.2.1 Οργανολογικός εξοπλισμός.....	48
5.2.2 Αντιδραστήρια – Διαλύματα	48
5.2.3 Ποντίκια και διαδικασία ακτινοβολήσης	49
5.2.4 Απομόνωση δειγμάτων DNA.....	50
5.2.5 hOGG1	51
5.2.6 Ηλεκτροφόρηση	51
5.3 Πρωτόκολλα	52
5.3.1 Πρωτόκολλο πειραματικής διαδικασίας.....	52
5.3.2 Πρωτόκολλο επεξεργασίας των εικόνων πηκτώματος αγαρόζης	55
5.3.3 Πρωτόκολλο επεξεργασίας των δεδομένων για τον υπολογισμό των βλαβών	55
Κεφάλαιο 6^ο ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	57
6.1 Εισαγωγή	57
6.2 Mann-Whitney U-test.....	58
6.3 Ανάλυση διακύμανσης (Analysis of Variance - Anova)	59
6.4 Ομαδοποιήσεις τιμών και γραφήματα	62
6.4.1 Εξάρτηση από την δόση	62
6.4.2 Εξάρτηση από το χρόνο απομόνωσης.....	63
6.4.3 Εξάρτηση από την τεχνική ακτινοβολήσης	64
6.4.4 Εξάρτηση από δόση και χρόνο απομόνωσης	65
6.4.5 Εξάρτηση από χρόνο απομόνωσης και τεχνική ακτινοβολήσης.....	66
6.4.6 Εξάρτηση από δόση και τεχνική ακτινοβολήσης	67
6.4.7 Εξάρτηση από δόση, τεχνική και χρόνο.....	68
6.4.8 Συμπεράσματα	70
6.5 Συμπληρωματικές στατιστικές μελέτες.....	71
6.5.1 Συντελεστής συσχέτισης Pearson (Pearson correlation coefficient - PCC)	71
6.5.2 Στατιστική μέθοδος πρόβλεψης	72
6.6 Συμπεράσματα	73
Βιβλιογραφία	76
Παράρτημα.....	83

Περίληψη

Μια από τις βασικές αρχές της ραδιοβιολογίας, το γεγονός ότι τα αποτελέσματα της ιοντίζουσας ακτινοβολίας περιορίζονται στα κύτταρα της ακτινοβολημένης περιοχής, αποτελεί το αντικείμενο έντονων συζητήσεων και αντιπαραθέσεων τις τελευταίες δεκαετίες. Οι σοβαρές βλάβες που προκαλούνται στην περιοχή ακτινοβολήσης από υψηλές δόσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας, παρόμοιες με εκείνες που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση του καρκίνου στις διάφορες μεθόδους ακτινοθεραπείας, έχουν μελετηθεί εκτενώς κατά την πάροδο των χρόνων και είναι πλέον γνωστές. Ωστόσο, οι ακριβείς επιπτώσεις σε συστημικό επίπεδο δεν έχουν καθοριστεί ακόμα πλήρως.

Σε μια προσπάθεια να αξιολογήσουμε τις επιπτώσεις αυτές σχεδιάσαμε ένα πείραμα για την εκτίμηση των επιπέδων των ομαδοποιημένων βλαβών του DNA σε απομακρυσμένους από την αρχική περιοχή ακτινοβολήσης ιστούς. Με τον όρο «ομαδοποιημένες βλάβες» εννοούμε δύο ή περισσότερες απλές βλάβες του DNA, όπως τα αβασικά ή τα οξειδωμένα σημεία, τα οποία βρίσκονται σε απόσταση ενός με δέκα ζευγών βάσεων ανάμεσα στους απέναντι κλώνους του DNA. Οι βλάβες αυτές επιλέχθηκαν προς μελέτη καθώς, όπως οι περισσότερες ομαδοποιημένες βλάβες, είναι δύσκολα επιδιορθώσιμες λόγω της παρακώλυσης που προκαλούν στον επιδιορθωτικό μηχανισμό του κυττάρου και άρα ιδιαίτερα μεταλλαξογόνες.

Για τις ανάγκες του πειράματος διενεργήθηκαν αρχικά ακτινοβολήσεις ποντικών στο πόδι, χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικές τεχνικές ακτινοβολήσης. Η πρώτη ήταν η τεχνική μικροδεσμών και η δεύτερη η τεχνική ευρείας-δέσμης, οι οποίες είναι από τις πιο συνηθισμένες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ακτινοθεραπεία. Οι δόσεις που χρησιμοποιήθηκαν είχαν ενέργεια 10 ή 40 Gy. Μετά την πάροδο 24 και 96 ωρών από την διαδικασία ακτινοβολήσης εξήχθησαν ιστοί από την γλώσσα και το έντερο του ποντικίου, ώστε να απομονωθεί το DNA αυτών. Επεξεργαστήκαμε τα δείγματα που προέκυψαν επωάζοντάς τα με τη DNA γλυκοσυλάση hOGG1, ενώ στη συνέχεια διενεργήσαμε ηλεκτροφόρηση με χρωστική ουσία ώστε να διαχωριστούν οι ζώνες των μορίων του DNA ανάλογα με το μοριακό τους βάρος και να μπορέσουμε να απεικονίσουμε τα αποτελέσματα. Τέλος, χρησιμοποιήσαμε λογισμικό πυκνομετρικής ανάλυσης ώστε να μετρηθεί με ακρίβεια η μετατόπιση των ζωνών και έτσι να μπορέσουμε να εκτιμήσουμε τον τελικό αριθμό των βλαβών που προέκυψαν από την ενδογενή μεταφορά του στρες στους ιστούς του οργανισμού λόγω των ακτινοβολήσεων. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν και θα συζητηθούν σε αυτή τη διπλωματική αναδεικνύουν μια επιμένουσα επαγωγή συστημικών αποκρίσεων του οργανισμού με ιδιαίτερη βιολογική σημασία που θα μπορούσαν να ληφθούν υπόψιν για την καλύτερη σχεδίαση των ακτινοθεραπειών.

Σε αυτό το σημείο, είναι ωφέλιμο να αναφέρουμε ότι τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται σε αυτή τη διπλωματική αποτέλεσαν κομμάτι ευρύτερης μελέτης, η οποία δημοσιεύτηκε με τον τίτλο «Localized Synchrotron Irradiation of Mouse Skin Induces Persistent Systemic Genotoxic and Immune Responses» στο περιοδικό Cancer Research στις 7 Νοεμβρίου 2017.

Abstract

One of the fundamental principles of radiobiology, the fact that ionizing radiation effects are limited only to the cells in the irradiated area, has been the subject of intense discussion and controversy for the last two decades. The severe damages caused to the cells in the irradiated area by high doses of ionizing radiation, similar to those used for radiation therapy, have been thoroughly investigated over the years and are well known. However, the exact implications at a systemic level have yet to be fully determined.

In an attempt to assess the induction of any systemic effects we devised a method for estimating the levels of clustered DNA lesions, i.e. Double Strand Breaks (DSBs) and non-DSB lesions, in distant tissues from the original irradiated area. By the term «clustered DNA lesions» are implied two or more simple DNA lesions, such as abasic or oxidized sites, which are within 1-10 base pairs in distance between the opposing DNA strands. These lesions were examined because, as most clustered lesions, they are repair-resistant due to their hampering of the repair machinery of the cell and thus highly mutagenic.

For the needs of this experiment there was conducted an initial irradiation of mice on the leg, using two different beam setups. The setups chosen were the micro-beam and the broad-beam, which are two of the most common beam setups used in radiation therapy. The yielding doses used were set at 10 or 40 Gy for each setup. After 24 and 96 hours have passed from the irradiation process, tissues from the tongue and the colon of the mice were extracted and their DNA isolated. We treated the DNA samples with the DNA glycosylase hOGG1 enzyme and then put them through a constant field electrophoresis with fluorescent substance in order to separate the different mass molecules and successfully visualize the results. For the final part of the process we used a densitometry software to measure the migration of the DNA molecules which led to the final determination of the size of the lesions that resulted from the endogenous transport of stress from the irradiation in the different tissues of the organism. The obtained results that will be discussed during this thesis indicate a persistent induction of systemic responses with great biological significance which could be considered for future irradiation treatment planning.

This is a good time to mention that the results shown in this thesis were a part of a bigger study which was published under the title “Localized Synchrotron Irradiation of Mouse Skin Induces Persistent Systemic Genotoxic and Immune Responses” in *Cancer Research* on November 7th 2017.

Ευχαριστίες

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Δρ. Αλέξανδρο Γεωργακίλα. Αρχικά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου αυτό το απαιτητικό εγχείρημα. Ακόμα τον ευχαριστώ για τη συνεχή και αδιάκοπη υποστήριξή του σε ό,τι αφορούσε την παρούσα διπλωματική καθώς και για την άριστη συνεργασία μας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υπεύθυνη του εργαστηρίου Υγειοφυσικής του Ινστιτούτου Πυρηνικών και Ραδιολογικών Επιστημών και Τεχνολογίας, Ενέργειας και Ασφάλειας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» Δρ. Γεωργία Τερζούδη για το χώρο και την υλικοτεχνική υποστήριξη που μας παρείχε από την αρχή των συγκεκριμένων πειραμάτων. Η συμβολή της ήταν καθοριστικής σημασίας για την επιτυχή διεξαγωγή τους.

Θα πρέπει να ευχαριστήσω και τη Dr Olga Martin από το Peter Mc Callum Institute και την ομάδα της για τα δείγματα DNA Που μας παρείχανε και την συμβολή τους στο θεωρητικό υπόβαθρο των πειραμάτων.

Πολύ σημαντική ήταν και η συμβολή της Δρ. Αγγελικής Δαράκη για την εξοικείωση με τις μεθόδους που ακολουθήθηκαν στην πειραματική διαδικασία καθώς και με τον τρόπο λειτουργίας όλων των απαραίτητων για τη διεξαγωγή των πειραμάτων συσκευών του εργαστηρίου.

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ και στην οικογένεια μου για την κατανόηση και την αμέριστη στήριξη, ηθική και υλική, που μου παρέχει όλα αυτά τα χρόνια.

Κεφάλαιο 1^ο

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΙΟΝΤΙΖΟΥΣΩΝ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΩΝ

1.1 Εισαγωγή

Με τον όρο ακτινοβολία αναφερόμαστε στην ενέργεια εκείνη, η οποία εκπέμπεται ή μεταδίδεται με τη μορφή κυμάτων ή σωματιδίων είτε στο κενό είτε σε κάποιο υλικό φορέα. Η ύπαρξη των ακτινοβολιών χρονολογείται τόσο παλαιά όσο και η αρχή του σύμπαντος. Απόδειξη αυτού αποτελεί το Κοσμικό Μικροκυματικό Υπόβαθρο (Cosmic Microwave Background), το οποίο δημιουργήθηκε λίγο μετά τη Μεγάλη Έκρηξη (γνωστή και ως «Big Bang») και παραμένει ανιχνεύσιμο μέχρι και σήμερα. Ωστόσο, παρόλο που οι ακτινοβολίες υπάρχουν τόσο καιρό, ο άνθρωπος άργησε πολύ να αποκτήσει τα εργαλεία που θα του επέτρεπαν να τις μελετήσει διεξοδικά. Μόλις τον 17^ο αι. μ.Χ. κατάφερε ο Νεύτωνας να γίνει ο πρώτος άνθρωπος που με τη βοήθεια ενός πρίσματος ανέλυσε το ορατό φως σε ένα φάσμα, το οποίο αρχίζει από το ερυθρό και τελειώνει στο ιώδες χρώμα. Αρκετοί αιώνες ακόμα (19^{ος} αι. μ.Χ.) χρειάστηκαν μέχρι ο άνθρωπος να ανακαλύψει ότι υπάρχουν και άλλες, «αόρατες», ακτινοβολίες εκατέρωθεν του ορατού φάσματος [1]. Στις μέρες μας, έχει εγκαθιδρυθεί πλέον ένα ηλεκτρομαγνητικό φάσμα, το οποίο αποτυπώνει όλο το εύρος των συχνοτήτων που καλύπτουν οι ακτινοβολίες οι οποίες έχουν ανακαλυφθεί. Η χαμηλότερη ακτινοβολία του φάσματος έχει συχνότητα μόλις 3 Hz και ενέργεια 12.4 feV ενώ η υψηλότερη, δηλαδή οι ακτίνες γ, έχει συχνότητα 300 EHz και ενέργεια 1.24 MeV [2].

Για τις ανάγκες αυτής της διπλωματικής θα χωρίσουμε το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα των ακτινοβολιών σε δύο ξεχωριστές και ευδιάκριτες μεγάλες κατηγορίες, τις μη-ιοντίζουσες ακτινοβολίες (μη-Ι.Α.) και τις ιοντίζουσες ακτινοβολίες (Ι.Α.). Η πρώτη κατηγορία χαρακτηρίζεται από αρκετά χαμηλή ενέργεια (≤ 33 eV το οποίο είναι το κατώφλι ενέργειας που απαιτείται για τον ιοντισμό του νερού), τέτοια ώστε να μην είναι ικανή να δημιουργήσει ιόντα κατά τη διέλευσή της από υλικό φορέα. Στον αντίποδα, η δεύτερη κατηγορία χαρακτηρίζεται από αρκετά υψηλή ενέργεια (> 33 eV), η οποία είναι ικανή να διώξει ατομικά ηλεκτρόνια καθώς διέρχεται από υλικό φορέα δημιουργώντας ιόντα [3]. Για να τεθεί πιο παραστατικά το όριο των μη-Ι.Α από τις Ι.Α., θα μπορούσε να οραματιστεί κανείς ένα χαμηλό σημείο συχνοτήτων της υπεριώδους ακτινοβολίας όπως αυτό αποτυπώνεται στο ηλεκτρομαγνητικό φάσμα των ακτινοβολιών. Παρόλο που στις μη-Ι.Α. περιλαμβάνονται ακτινοβολίες με πληθώρα σημαντικών εφαρμογών στην καθημερινότητα (ορατό φως, υπέρυθρη, ραδιοκύματα, μικροκύματα) αυτές που θα μας απασχολήσουν στην παρούσα εργασία είναι οι Ι.Α., λόγω της σημαντικής επιρροής αλλά και εφαρμογών που έχουν στον τομέα της υγείας (βλέπε ακτινοθεραπεία με ακτίνες Χ/γ, πρωτονίων).

Στη συνέχεια του κεφαλαίου αυτού θα αναπτυχθούν αναλυτικά όλα τα διαφορετικά είδη των ιοντίζουσών ακτινοβολιών που χρησιμοποιούνται στην αντιμετώπιση του καρκίνου και μη. Επίσης θα αναφερθούν οι πηγές από τις οποίες προκύπτει η κάθε ακτινοβολία.

1.2 Είδη ιοντιζουσών ακτινοβολιών

Από τις ακτίνες-Χ μέχρι τις νετρονικές, η κατηγορία των ιοντιζουσών ακτινοβολιών περιέχει πολλά διαφορετικά είδη. Τα είδη αυτά μπορούν να κατηγοριοποιηθούν από τις ιδιότητες των σωματιδίων ή των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων που δημιουργούν το φαινόμενο του ιοντισμού. Αυτό οδηγεί τελικά σε δύο ομάδες με διαφορετικούς μηχανισμούς για τη διαδικασία του ιοντισμού, την ακτινοβολία άμεσου και έμμεσου ιοντισμού. Η ακτινοβολία άμεσου ιοντισμού αφορά φορτισμένα σωματίδια, τα οποία έχουν αρκετή κινητική ενέργεια ώστε να ιοντίσουν τα άτομα μέσω θεμελιώδους αλληλεπίδρασης λόγω της δύναμης Coulomb. Τέτοια σωματίδια είναι για παράδειγμα τα σωματίδια α , τα σωματίδια β , τα λεπτόνια, φορτισμένα νουκλεόνια ακόμα και φορτισμένοι ατομικοί πυρήνες. Αντίθετα, η ακτινοβολία έμμεσου ιοντισμού αφορά σωματίδια ουδέτερου φορτίου, όπως για παράδειγμα τα νετρόνια, τα οποία δεν έχουν την απαραίτητη ενέργεια να αλληλεπιδράσουν ισχυρά με την ύλη οπότε ο ιοντισμός γίνεται λόγω δευτερευόντων ακτινοβολιών που προκύπτουν.

1.2.1 Ακτινοβολία άμεσου ιοντισμού

1.2.1.1 Ακτινοβολία α

Η ακτινοβολία α προέρχεται από σωματίδια α , τα οποία αποτελούνται από δύο πρωτόνια (p) και δύο νετρόνια (n) που είναι συνδεδεμένα μεταξύ τους. Το σύμβολό τους είναι ένα απλό α ή ένα α^{2+} , το οποίο καταδεικνύει και την θετική τους φόρτιση. Συχνά παρομοιάζονται και με πυρήνες Ηλίου-4 (${}^4_2\text{He}^{2+}$), καθώς το στοιχείο αυτό έχει παρόμοια δομή. Η αλληλεπίδραση που έχουν με την ύλη είναι εξαιρετικά ισχυρή. Ωστόσο, ανάλογα με την προέλευσή τους από διάσπαση άλφα ή τριμερή σχάση, έχουν συνήθως πολύ μικρή διεισδυτικότητα με αποτέλεσμα να απορροφώνται από τον αέρα ή το εξωτερικό στρώμα των νεκρών δερματικών κυττάρων χωρίς την ανάγκη περαιτέρω θωράκισης. Αν όμως εισέλθουν με κάποιο τρόπο στον οργανισμό, π.χ. με αερομεταφερόμενο ή βρώσιμο τρόπο, τότε η έκθεση των ζωντανών ιστών σε αυτή την ακτινοβολία θα επιφέρει πολύ σοβαρά αποτελέσματα. Η τυπική ενέργεια της ακτινοβολίας αυτής είναι της τάξης των 3-7 MeV.

1.2.1.2 Ακτινοβολία β

Η ακτινοβολία β προέρχεται από τα σωματίδια β , τα οποία είναι είτε ηλεκτρόνια (β^-) είτε ποζιτρόνια (β^+). Συνήθως έχουν υψηλή ενέργεια και ταχύτητα, ανάλογα με τις οποίες καθορίζεται και η διεισδυτικότητά της ακτινοβολίας. Παρόλο που έχει μεγαλύτερη ικανότητα διείσδυσης από τα σωματίδια α , η ικανότητα διείσδυσης σε βαθύτερους ιστούς και όργανα του σώματος είναι περιορισμένη. Για αυτό το λόγο μια λεπτή στρώση πλαστικού ή γυαλιού ή μετάλλου είναι ικανή να λειτουργήσει σαν ασπίδα απορροφώντας τα πριν φτάσουν σε ζωντανό ιστό. Και αυτή η ακτινοβολία έχει τυπική ενέργεια της τάξεως των 0.2-3 MeV.

1.2.2 Ακτινοβολία έμμεσου ιοντισμού

1.2.2.1 Ακτινοβολία φωτονίων

Με τον όρο ακτινοβολία φωτονίων αναφερόμαστε είτε στην ακτινοβολία γ , όταν προέρχεται από αντιδράσεις εντός του πυρήνα, είτε στην ακτινοβολία X , όταν προέρχεται από αντιδράσεις εκτός του πυρήνα. Οι ακτίνες X έχουν συνήθως μικρότερη ενέργεια από τις ακτίνες γ , με τις μεν να είναι της τάξεως των eV και τις δε της τάξεως των keV. Οι νέες τεχνολογίες ωστόσο επιτρέπουν την παραγωγή ακτίνων- X με ενέργεια πολύ κοντά σε αυτή των ακτίνων- γ . Η διεισδυτικότητα των ακτινοβολιών αυτών είναι ακόμα μεγαλύτερη από τις ακτίνες α και β , γι αυτό χρειάζεται ικανοποιητική ποσότητα υλικών θωράκισης για την προστασία των ιστών από αυτές. Οι ακτινοβολίες αυτού του τύπου αποτελούν την ευρύτερα χρησιμοποιούμενη γραμμή θεραπείας κατά των βαθιά εδραιωμένων όγκων.

1.2.2.2 Ακτινοβολία νετρονίων

Η ακτινοβολία νετρονίων αποτελείται από ελευθέρα νετρόνια. Τα ταχέα νετρόνια αλληλοεπιδρούν με τα πρωτόνια του υδρογόνου προκαλώντας μέσω του μηχανισμού αυτού τον ιοντισμό των ατόμων. Τα νετρόνια είναι εξαιρετικά διεισδυτικά και απαιτούν θωράκιση υψηλής περιεκτικότητας σε υδρογόνο, όπως το νερό ή το τσιμέντο. Η τυπική ενέργεια που έχουν τα νετρόνια που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του καρκίνου είναι της τάξης των 50-70 MeV. Η πιο ευρέα διαδεδομένη μέθοδος ακτινοθεραπείας με νετρόνια είναι η BNCT (Boron Neutron Capture Theory).

1.2.3 Άλλα είδη ακτινοβολιών φορτισμένων σωματιδίων.

1.2.3.1 Ακτινοβολία πρωτονίων

Η ακτινοβολία πρωτονίων αποτελείται από σωματίδια τα οποία παρομοιάζονται με πυρήνες υδρογόνου, μάζας 1 και θετικού φορτίου (^1H). Έχουν αρκετά υψηλή διεισδυτικότητα, ωστόσο μετά από κάποιο βάθος χάνουν το μεγαλύτερο μέρος της ενέργειάς τους. Αυτό βέβαια όπως θα δούμε και σε επόμενο κεφάλαιο αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα στη χρήση αυτής της ακτινοβολίας σε σχέση με άλλες. Η τυπική ενέργεια ακτινοβολιών αυτού του είδους κυμαίνεται από 70 έως 250-350 MeV. Η ενδεδειγμένη τους χρήση στην ακτινοθεραπεία είναι για επιφανειακού τύπου όγκους.

1.2.3.2 Ακτινοβολία ιόντων άνθρακα

Οι τεράστιες τεχνολογικές εξελίξεις στις μεθόδους αποδόσεως δεσμών, έχουν επιτρέψει και τη χρήση μιας ακόμα ανερχόμενης μεθόδου για τη θεραπεία του καρκίνου. Οι δέσμες βαριών ιόντων άνθρακα έχουν πολύ καλύτερα βιολογικά αποτελέσματα ακόμα και από τις δέσμες πρωτονίων, ενώ οι τυπικές ενέργειες τους κυμαίνονται στα ίδια υψηλά επίπεδα με αυτές.

1.3 Πηγές ιοντίζουσών ακτινοβολιών

Ο άνθρωπος δέχεται στην καθημερινότητά του πληθώρα ιοντίζουσών ακτινοβολιών. Ευτυχώς η ποσότητα που δέχεται είναι τόσο μικρή, ειδικά από τις μη ανθρωπίνης προελεύσεως πηγές ακτινοβολίας, ώστε τελικά το σώμα του μπορεί να επιδιορθώσει τις όποιες βλάβες προκύπτουν ως συνέπεια. Τέτοιου είδους πηγές αποτελούν η κοσμική ακτινοβολία η οποία προέρχεται από το διάστημα και περιλαμβάνει διάφορα είδη ιοντίζουσας ακτινοβολίας, τα ραδιονουκλεΐδια προερχόμενα από τη γη όπως το ^{40}K στο χώμα ή το Rn στον αέρα ή ακόμα και ραδιενέργεια από τα δομικά υλικά των κτηρίων ή τις τροφές. Οι σημαντικές για αυτή την εργασία πηγές είναι οι ανθρωπίνης προελεύσεως και δη εκείνες που χρησιμοποιούνται για ιατρικές χρήσεις, καθώς είναι υπεύθυνες για το μεγαλύτερο ποσοστό ιοντίζουσας ακτινοβολίας που δέχεται ο άνθρωπος ετησίως.

1.3.1 Ραδιοϊσότοπα φάρμακα

Τα ραδιοϊσότοπα χρησιμοποιούνται αρκετές φορές στην ιατρική κατά κύριο λόγο για την διάγνωση και τη θεραπεία διαφόρων ιατρικών παθήσεων. Γενικά, αυτή τη στιγμή χρησιμοποιούνται περίπου 200 ισότοπα σε τακτική βάση, τα περισσότερα από τα οποία πρέπει να κατασκευαστούν τεχνητά. Οι πιο διαδεδομένες μέθοδοι για τη δημιουργία ραδιοϊσοτόπων είναι δύο, μέσω εμπλουτισμού νετρονίων από πυρηνικό αντιδραστήρα και μέσω εμπλουτισμού πρωτονίων από κύκλοτρο. Κατά τη ραδιενεργό διάσπαση των ραδιοϊσοτόπων εκλύονται τόσο σωματίδια α/β όσο και ακτίνες γ . Αυτές οι τρεις ιοντίζουσες ακτινοβολίες είναι ο τρόπος με τον οποίο αλληλοεπιδρούν τα ισότοπα με την ύλη. Όσο αφορά την ενέργεια που αποδίδουν στον οργανισμό, για διαγνωστικούς λόγους η δόση είναι 4.6 mGy/φορά ενώ για ραδιοθεραπεία η δόση είναι 20-60 Gy/φορά.

1.3.2 Επιταχυντικές Διατάξεις

Τα οφέλη από τη χρήση των επιταχυντικών διατάξεων σε ιατρικές εφαρμογές έγιναν εμφανείς σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα από την ανακάλυψη των ακτίνων-X από τον Roentgen το 1895. Παρόλα αυτά χρειάστηκαν πάνω από πενήντα χρόνια εξέλιξης της τεχνολογίας τους για να πάμε από τους σωλήνες ακτίνων-X και τις γεννήτριες Van der Graaf στις επιταχυντικές διατάξεις των γραμμικών επιταχυντών, των κύκλοτρων και των συγχροτρόνιων που χρησιμοποιούνται μέχρι και σήμερα για τη θεραπεία των κακοηθειών.

1.3.2.1 Γραμμικοί επιταχυντές

Οι γραμμικοί επιταχυντές (Linear accelerators ή Linacs) αποτελούν ένα από τα σημαντικότερα εργαλεία της ακτινοφυσικής για την καταπολέμηση κακοηθειών. Χρησιμοποιούνται μόνοι τους, για να κατευθύνουν ακτίνες φωτονίων ή ηλεκτρονίων απευθείας σε καρκινικούς όγκους, είτε σε συνδυασμό με άλλους επιταχυντές, στους οποίους θα εισάγουν τα σωματίδια για περαιτέρω

επιτάχυνση. Αποτελούνται από την αρχική πηγή των σωματιδίων που θα επιταχυνθούν, μια πηγή υψηλής τάσης που εισάγει τα σωματίδια στον επιταχυντή, έναν κυλινδρικό θάλαμο κενού με κυμαινόμενο μήκος ανάλογα τη χρήση του γραμμικού επιταχυντή (από μερικά μέτρα μήκος όταν χρησιμοποιούνται μόνοι σε δεκάδες και χιλιάδες μέτρα μήκος όταν χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με άλλους επιταχυντές ή για πυρηνικές έρευνες αντίστοιχα) και εξαρτήματα όπως πηγές ραδιοσυχνότητας, μαγνήτες και ηλεκτρόδια για την επιτάχυνση και την εστίαση των σωματιδίων. Όσο αφορά την λειτουργία τους οι γραμμικοί επιταχυντές λειτουργούν σε συχνότητες περίπου στα 2.8 GHz ώστε να δώσουν ακτίνες ηλεκτρονίων με ένταση 20 – 150 μA και ενέργεια 6 – 25 MeV, ανάλογα με το βάθος που θέλουμε να ακτινοβοληθεί.

1.3.2.2 Κύκλωτρα

Τα κύκλωτρα αποτέλεσαν την πρώτη επιτυχημένη προσπάθεια να επιταχυνθούν σωματίδια σε πολύ μεγάλες ενέργειες τόσο για ερευνητικούς όσο και για θεραπευτικούς σκοπούς. Αντίθετα με τους γραμμικούς επιταχυντές, τα κύκλωτρα, χρησιμοποιούν μαγνήτες για να κρατούν τα σωματίδια σε μια συνεχή κυκλική τροχιά. Αυτό οδηγεί τα σωματίδια σε επαναλαμβανόμενη επιτάχυνση λόγω του ρεύματος υψηλής εναλλασσόμενης τάσης και συχνότητας. Λόγο της διαφοράς αυτής επιτρέπεται στα κύκλωτρα να επιτυγχάνουν δέσμες με ενέργεια πολύ μεγαλύτερη από εκείνες των γραμμικών επιταχυντών. Έτσι, ανάλογα με το είδος και τη θέση της κακοήθειας τα κύκλωτρα είναι ικανά να αποδώσουν ακτινοβολία έντασης 10 – 20 nA και ενέργεια κυμαινόμενη στα 60 – 250 MeV. Όπως παρατηρούμε η ένταση είναι κατά πολύ μικρότερη των γραμμικών επιταχυντών και αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα σωματίδια επιταχύνονται πολλές φορές και άρα δεν παίζει το μέγεθος της έντασης. Εκτός από την εξοικονόμηση ενέργειας, άλλα προτερήματα των κύκλωτρων είναι το μέγεθός τους και το γεγονός ότι μπορούν να αποδώσουν συνεχή ακτινοβολία στον στόχο.

1.3.2.3 Συγχροτρόνια

Τα συγχροτρόνια είναι απόγονοι των κύκλωτρων, καθώς μοιράζονται πολλά όμοια χαρακτηριστικά και η λειτουργία τους βασίζεται στο ίδιο θεωρητικό υπόβαθρο. Η ειδοποιός διαφορά του συγχροτρονίου είναι ότι, αντίθετα με το κύκλωτρο, έχει μεταβαλλόμενο μαγνητικό πεδίο για την σταθεροποίηση και κατεύθυνση της δέσμης λαμβάνοντας έτσι υπόψιν την μεταβολή στη μάζα των σωματιδίων λόγω σχετικιστικών φαινομένων. Αυτή η διαφορά επιτρέπει επίσης και την αύξηση του μεγέθους του επιταχυντή, το οποίο με τη σειρά του οδηγεί στην ικανότητα για επίτευξη πολύ μεγαλύτερων ενεργειών. Αυτό άνοιξε το δρόμο στην αδρονική θεραπεία των κακοηθειών, η οποία χρησιμοποιεί σωματίδια με πολύ καλύτερες ιδιότητες αλληλεπίδρασης με την ύλη από αυτές των ηλεκτρονίων και των φωτονίων.

Κεφάλαιο 2^ο

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

2.1 Εισαγωγή

Το κύτταρο αναγνωρίζεται ως το θεμελιώδες δομικό στοιχείο σε όλους τους έμβιους οργανισμούς. Θα μπορούσαμε να το ορίσουμε ως ένα σύστημα μορίων τα οποία οργανώνονται με δυνατότητα για δυναμική αλληλεπίδραση μεταξύ τους [1]. Κάθε έμβιος οργανισμός αποτελείται από ένα ή περισσότερα κύτταρα (μονοκύτταροι ή πολυκύτταροι οργανισμοί). Όλα τα κύτταρα ενός οργανισμού έχουν παρόμοια χημική σύσταση, ενώ μπορούν να αποθηκεύουν και να μεταφράζουν πληροφορίες. Η ειδοποιός διαφορά μεταξύ τους έγκειται στο ποιες είναι οι πληροφορίες αυτές και πως μεταφράζονται από το γενετικό υλικό. Επίσης, κάθε κύτταρο προκύπτει μέσω διαίρεσης και η τελική λειτουργία του οργανισμού καθορίζεται από το σύνολο της λειτουργίας κάθε κυττάρου και της μεταξύ τους αλληλεπίδρασης. Τέλος μπορούμε να πούμε ότι όλη η ζωτική ενέργεια ενός οργανισμού προέρχεται από τις μεταβολικές και βιοχημικές διαδικασίες που συμβαίνουν εντός του κυττάρου[2].

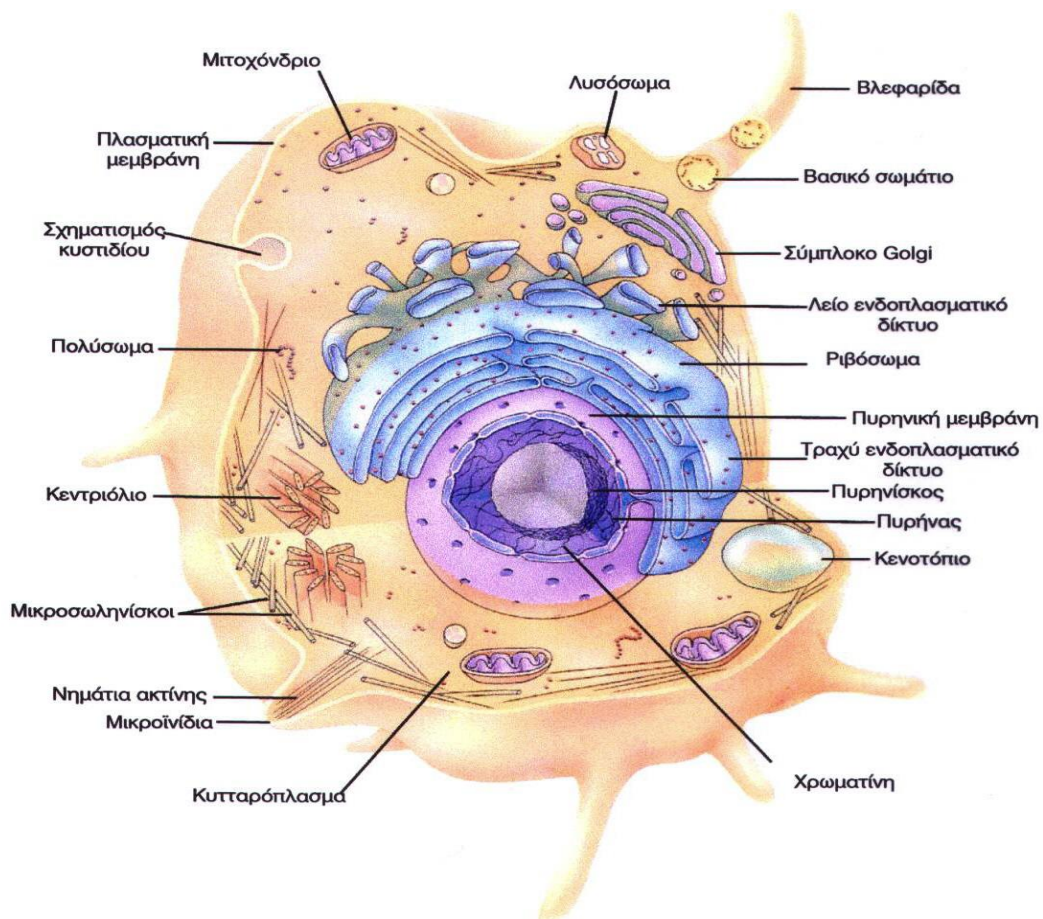
2.2 Κυτταρική Δομή

Οι δύο βασικές κατηγορίες που χωρίζονται τα κύτταρα, ανάλογα με την μορφολογία του εσωτερικού τους, είναι τα προκαρυωτικά και τα ευκαρυωτικά. Βασική διαφορά μεταξύ των δύο αποτελεί η ύπαρξη συγκροτημένου πυρήνα στα ευκαρυωτικά κύτταρα με τη μορφή πυρηνικής μεμβράνης που περικλείει το γενετικό υλικό [3].

Όλα τα κύτταρα παρουσιάζουν παρόμοια χημική σύσταση, η οποία στο περίπου είναι: νερό 75-85%, πρωτεΐνες 10-20%, λιπίδια 2-3%, υδατάνθρακες 1% και ανόργανα υλικά (οξέα, βάσεις, άλατα) 1%. Παρόλο που τα ανόργανα υλικά βρίσκονται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις συνεισφέρουν σημαντικά στην ομαλή λειτουργία του κυττάρου [3].

Εμείς θα εστιάσουμε στα ευκαρυωτικά κύτταρα, βασικό στοιχείο των οποίων είναι η υψηλή διαμερισματοποίηση που επιτυγχάνεται με τη χρήση μεμβρανών. Αυτό, τους επιτρέπει και τη διενέργεια πιο σύνθετων κυτταρικών λειτουργιών που απαιτούν μεγάλο βαθμό οργάνωσης για την επίτευξή τους (π.χ. μεταφορά συστατικών διαμέσου μοριακών και πρωτεϊνικών μονοπατιών). Η βασική διαμερισματοποίηση διακρίνει τρεις ξεχωριστές περιοχές στο κύτταρο: τον πυρήνα, το κυτταρόπλασμα και την κυτταρική μεμβράνη [4].

Στην περιοχή του πυρήνα συναντάμε τον πυρηνίσκο, όπου περιέχονται τα χρωμοσώματα, και το πυρηνόπλασμα, ένα διάλυμα με πρωτεΐνες και RNA που εξυπηρετεί τις λειτουργίες του πυρήνα [3]. Όλα αυτά περικλείονται από μια διπλομεμβρανική δομή, γνωστή και ως πυρηνικό περίβλημα, η οποία έχει πάνω τις δίκτυα πρωτεϊνικών ινιδίων που βοηθούν στη στήριξη του πυρήνα. Στη δεύτερη περιοχή, του κυτταροπλάσματος, συναντάμε μικροσκοπικές δομές οργανιδίων όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο, το σύστημα Golgi, το ριβόσωμα, το κεντροσωμάτιο, τα μιτοχόνδρια, τα λυσοσώματα, το κενοτόπιο και άλλα κυστίδια. Ακόμα, στο κυτταρόπλασμα υπάρχει και ο κυτταρικός σκελετός, ο οποίος αποτελείται από ένα σύστημα ινιδίων και είναι υπεύθυνος για το σχήμα, την μεταφορά ουσιών και την κίνηση του κυττάρου [3]. Τέλος η κυτταρική μεμβράνη χωρίζει το κύτταρο από το εξωτερικό περιβάλλον, ωστόσο του επιτρέπει να επικοινωνεί με αυτό είτε εισάγοντας (εσωκύττωση) είτε εξάγοντας (εξωκύττωση) υλικά.



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

2.3 Το γενετικό υλικό

2.3.1 Εισαγωγικά

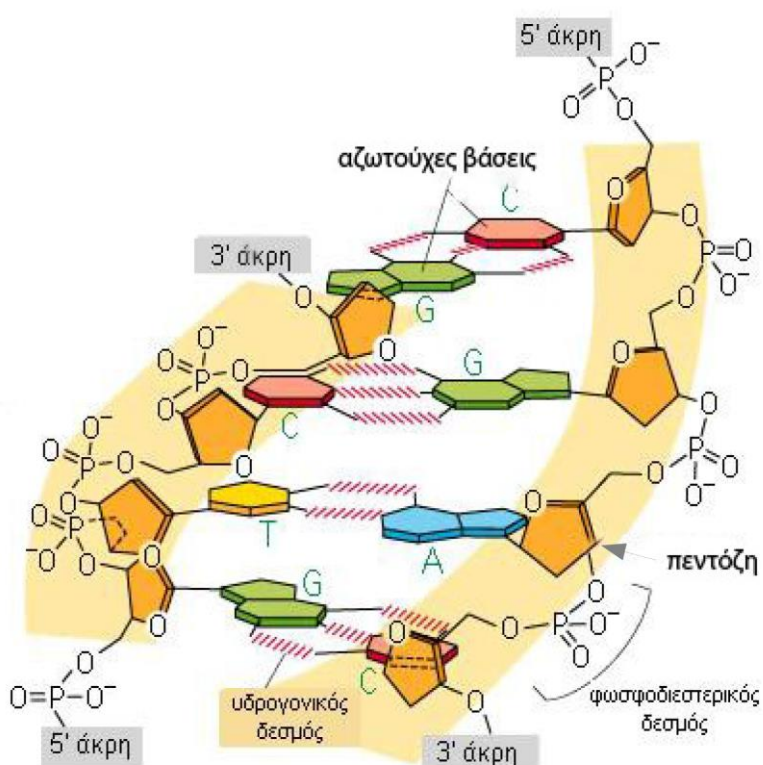
Το γενετικό υλικό αποτελεί την αποθήκη πληροφοριών ενός κυττάρου και χωρίζεται σε δύο είδη, το δεσοξυριβοζονουκλεϊκό οξύ - DNA και το ριβοζονουκλεϊκό οξύ - RNA (το οποίο χωρίζεται σε τρεις νέες υποκατηγορίες: tRNA, rRNA, mRNA) [4]. Πρόκειται για μακρά βιοπολυμερή που απαρτίζονται από επαναλαμβανόμενες υπομονάδες γνωστές ως νουκλεοτίδια. Τα νουκλεοτίδια αποτελούνται από ένα σάκχαρο πέντε ατόμων άνθρακα, την πεντόζη, πάνω στην οποία συνδέεται ο αζωτούχος δακτύλιος της βάσης και μία ή περισσότερες φωσφορικές ομάδες. Το σάκχαρο του DNA είναι η δεσοξυριβόζη και οι βάσεις του η αδενίνη (A), η θυμίνη (T), η γουανίνη (G) και η κυτοσίνη (C). Αντίστοιχα το σάκχαρο του RNA είναι η ριβόζη και οι βάσεις του η αδενίνη (A), η ουρακίλη (U), η γουανίνη (G) και η κυτοσίνη (C). Από τη σειρά που έχουν τα νουκλεοτίδια και κατ' επέκταση οι βάσεις στα μακρομόρια του DNA προκύπτουν οι πληροφορίες που καθορίζουν την ανάπτυξη και τις λειτουργίες του κυττάρου. Αυτός είναι ο τρόπος κωδικοποίησης της γενετικής πληροφορίας και τα συγκεκριμένα κομμάτια του DNA που περιέχουν τις πληροφορίες αυτές ονομάζονται γονίδια [3,4].

2.3.2 Δομή DNA

Η απεικόνιση της δομής του DNA επιτεύχθηκε για πρώτη φορά με τη χρήση κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ. Βασιζόμενοι στα δεδομένα των απεικονίσεων των Franklin και Wilkins, οι Watson και Crick θεμελίωσαν το 1953 το μοντέλο της διπλής έλικας του DNA που πλέον όλοι γνωρίζουμε [6]. Σύμφωνα με αυτό, το μόριο του DNA αποτελείται από δύο αντιπαράλληλους κλώνους πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων που σχηματίζουν μια δεξιόστροφη έλικα. Ο άξονας κάθε κλώνου σχηματίζεται από τις πεντόζες των νουκλεοτιδίων, ενώ οι αζωτούχες βάσεις είναι κάθετες ως προς τον άξονα αυτό και έχουν φορά προς το εσωτερικό της συστροφής [2,3].

Για τη δημιουργία του άξονα τα νουκλεοτίδια ενώνονται μεταξύ τους με ένα 3'-5' φωσφοδιεστερικό δεσμό. Αυτό σημαίνει ότι σχηματίζεται δεσμός μεταξύ του υδροξυλίου του άνθρακα στη θέση 3' της πεντόζης του πρώτου νουκλεοτιδίου και της φωσφορικής ομάδας του άνθρακα 5' της πεντόζης του επόμενου νουκλεοτιδίου. Ο προσανατολισμός των αλυσίδων είναι 5' ->3', δηλαδή το πρώτο νουκλεοτίδιο έχει ελεύθερη τη φωσφορική ομάδα του άνθρακα 5' της πεντόζης του ενώ το τελευταίο νουκλεοτίδιο έχει ελεύθερο το υδροξύλιο του άνθρακα 3' της πεντόζης του [4]. Επίσης λόγω της αντιπαράλληλότητας των δύο κλώνων η άκρη 5' της μιας βρίσκεται απέναντι από την άκρη 3' της άλλης. Με παρόμοιο τρόπο οι βάσεις, και τελικά οι κλώνοι, ενώνονται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου. Τα ζεύγη βάσεων είναι συγκεκριμένα μεταξύ τους, με την αδενίνη να ενώνεται με δύο δεσμούς υδρογόνου με τη θυμίνη και τη γουανίνη να ενώνεται με τρεις δεσμούς υδρογόνου με την κυτοσίνη. Αυτό το χαρακτηριστικό του DNA ονομάζεται συμπληρωματικότητα και έχει ιδιαίτερη σημασία στον αυτοδιπλασιασμό του διατηρώντας και μεταβιβάζοντας τις γενετικές πληροφορίες.

Το μόριο του DNA συναντάται σε δίκλωνη μορφή (double stranded) λόγω της μεγαλύτερης στιβαρότητας που παρουσιάζει σε υδατικό περιβάλλον σε σχέση με ένα μονόκλωνο μόριο (single stranded), ενώ στον αντίποδα το μόριο του RNA που πρέπει να είναι πιο ευέλικτο αποτελείται από ένα κλώνο. Στην αποσυμπυκνωμένη του μορφή το δίκλωνο μόριο DNA έχει διάμετρο 2 nm, ενώ κάθε περιστροφή της έλικας περιέχει γύρω στα 10 ζεύγη βάσεων (ζ/β) αφού μια πλήρης περιστροφή της σχηματίζεται κάθε 3.4 nm και η απόσταση μεταξύ δύο διαδοχικών βάσεων είναι 0.34 nm [3]. Ωστόσο, για να χωρέσει στον πυρήνα του κυττάρου το DNA χρειάζεται να πακεταρισθεί. Έτσι, το μόριο του DNA τυλίγεται ανά 146 ζ/β γύρω από οκταμερή πρωτεϊνών, τις ιστόνες, και δημιουργούνται τα νουκλεοσώματα. Τα συμπλέγματα νουκλεοσωμάτων συμπύσσονται σχηματίζοντας με τη σειρά τους ινίδια χρωματίνης, τα οποία μετά από περαιτέρω αναδίπλωση με τη βοήθεια μη-ιστονών πρωτεϊνών σχηματίζουν την πλέον συμπυκνωμένη μορφή των χρωμοσωμάτων [1,3]. Το σύνολο των πληροφοριών που βρίσκεται αποθηκευμένο στα χρωμοσώματα ενός κυττάρου αποτελεί το γονιδίωμά του. Το ανθρώπινο γονιδίωμα περιέχει 3×10^9 ζεύγη νουκλεοτιδίων, τα οποία είναι οργανωμένα σε 24 χρωμοσώματα (22 αυτοσωματικά και 2 φυλετικά).



Εικόνα 2.2: Η δομή του δίκλωνου μορίου DNA και οι δεσμοί που αναπτύσσονται μεταξύ των νουκλεοτιδίων

2.4 Κυτταρικός κύκλος

2.4.1 Γενικά στοιχεία

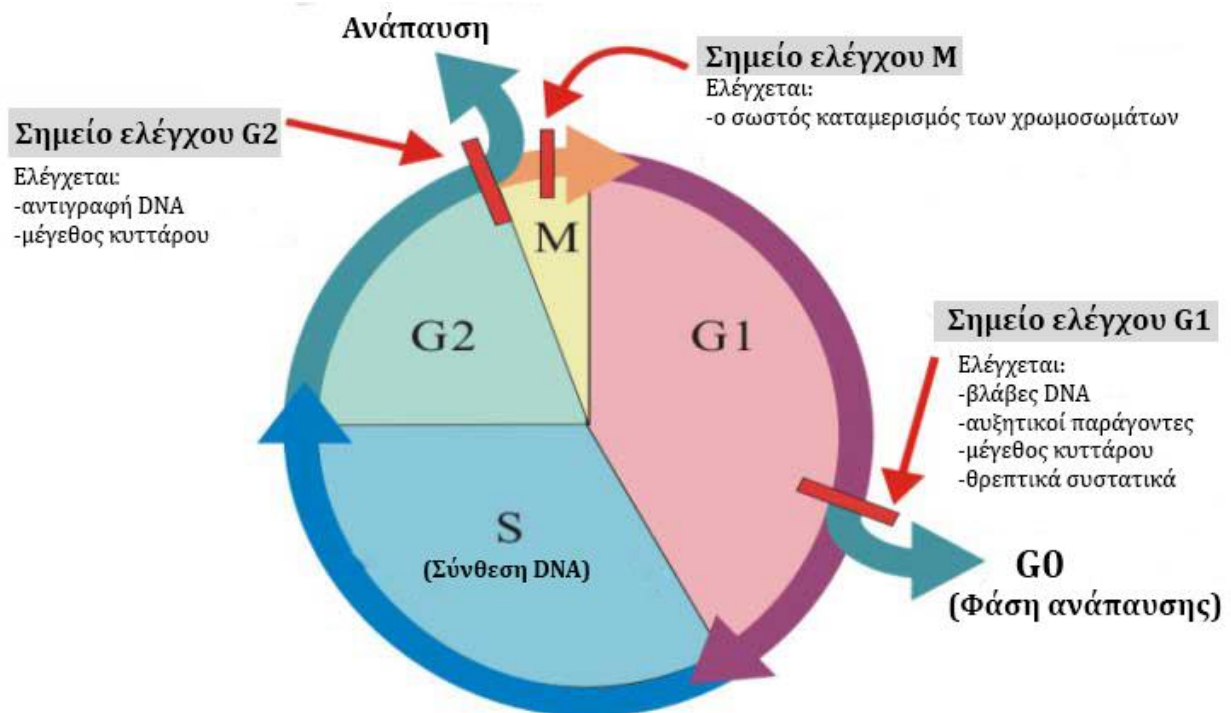
Η σωστή ροή των γενετικών πληροφοριών που υπάρχουν στο ανθρώπινο γονιδίωμα είναι απαραίτητη για την εύρυθμη λειτουργία του οργανισμού και αποτελούν τη βάση της μοριακής βιολογίας, της βιοχημείας και της γενετικής. Το κεντρικό δόγμα αυτής της βάσης συνοψίζεται σε τρεις λέξεις κλειδιά: Αντιγραφή, Μεταγραφή, Μετάφραση. Η πρώτη διαδικασία, αυτή της αντιγραφής του DNA κατά τη διαίρεση του κυττάρου, είναι η πιο σημαντική από τις τρεις καθώς αν δεν γίνει με επιτυχία το κύτταρο δε θα μπορεί να επιτελεί πλέον το ρόλο του. Για το λόγο αυτό η διαδικασία διπλασιασμού του DNA γίνεται σε ένα αυστηρά προγραμματισμένο πλαίσιο με διαδοχικά στάδια που ονομάζεται κυτταρικός κύκλος.

Ο κύκλος της ζωής ενός κυττάρου ξεκινά τη στιγμή της δημιουργίας του και τελειώνει με τον πλήρη διπλασιασμό του ή τον θάνατό του (απόπτωση). Κατά τη διάρκεια αυτού του κύκλου υπάρχουν δύο ξεχωριστές καταστάσεις στις οποίες μπορεί να βρίσκεται το κύτταρο, αυτή της μη διαίρεσης (μεσόφαση) και αυτή της διαίρεσης (μίτωση για σωματικά και μείωση για γαμετικά κύτταρα). Η μετάβαση από τη μια κατάσταση στην άλλη ρυθμίζεται από ένα πλήθος γενετικών και βιοχημικών παραγόντων, με τις κυκλίνες και τις κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (cyclin-dependent kinases - CDKs) να έχουν βασικό ρόλο [7]. Ο κύκλος αυτός επαναλαμβάνεται συνέχεια για κάθε κύτταρο, ωστόσο ο χρόνος που θα διαρκέσει διαφέρει ανάλογα με το είδος του κυττάρου. Αυτή η λεπτομέρεια είναι πολύ σημαντική καθώς ο ρυθμός της διαίρεσης ενός κυττάρου επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την ευαισθησία του σε έκθεση ιοντίζουσας ακτινοβολίας.

Η μεσόφαση είναι η κατάσταση στην οποία το κύτταρο περνάει το μεγαλύτερο μέρος του κύκλου του και διακρίνεται σε τρεις διαδοχικές φάσεις: την G1, την S (Synthesis) και την G2 [8]. Στη φάση G1, το κύτταρο αναπτύσσεται πραγματοποιώντας διάφορες βιοχημικές διεργασίες, όπως η σύνθεση πρωτεϊνών, και επιλέγει αν θα συνεχίσει στη φάση S ή θα περάσει στη φάση G0. Η φάση G0 είναι μια ξεχωριστή κατάσταση, εκτός κύκλου, μεταξύ των φάσεων S και G1, κατά την οποία το κύτταρο διανύει μια περίοδο ηρεμίας όπου είναι ενεργό αλλά παραμένει εκτός κύκλου και περιμένει το κατάλληλο σήμα για να συνεχίσει τον κύκλο του. Εφόσον περιέλθει στη φάση S το κύτταρο, διενεργείται πλήρης αντιγραφή του γενετικού υλικού. Κατόπιν εισέρχεται στη φάση G2 όπου το κύτταρο προετοιμάζεται για να διαιρεθεί. Αν όλα αυτά πάνε καλά το κύτταρο ξεκινά τη διαδικασία της μίτωσης, η οποία τα περιλαμβάνει τα στάδια της πρόφασης, της προμετάφασης, της μετάφασης, της ανάφασης και της τελόφασης. Μετά το πέρας της κατάστασης αυτής, τα χρωμοσώματα του πυρήνα έχουν διπλασιαστεί πλήρως και με το χωρισμό όλων των άλλων οργανιδίων και μεμβρανών του κυττάρου δημιουργούνται δύο νέα, αυτόνομα και λειτουργικά κύτταρα [4,8].

2.4.2. Τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου

Όπως είναι εμφανές από τα παραπάνω η διαίρεση του κυττάρου είναι μια ιδιαίτερα σύνθετη διαδικασία με πολλά στάδια κατά την οποία μπορούν και συχνά προκύπτουν διάφορες βλάβες. Οι βλάβες αυτές μπορεί να οφείλονται τόσο σε ενδογενείς όσο και εξωγενείς παράγοντες, όπως για παράδειγμα η ιοντίζουσα ακτινοβολία. Καθώς το κύτταρο θα επιβαρυνθεί με επιπλέον βλάβες σε περίπτωση που θα μεταβεί από τη μία φάση στην επόμενη χωρίς να πληρούνται οι κατάλληλες προϋποθέσεις, με αποτέλεσμα να προκληθεί γονιδιωματική αστάθεια ή/και κυτταρικός θάνατος, ένα σύνολο πρωτεϊνών και σηματοδοτικών μονοπατιών δρουν σε συγκεκριμένα σημεία του κύκλου ώστε να εξασφαλίζουν την ομαλή ολοκλήρωση της διαδικασίας. Τα σημεία αυτά είναι ανάμεσα στις φάσεις G1/S, S/G2 και στη φάση M. Ένα παράδειγμα μηχανισμού ελέγχου είναι ο μηχανισμός της ομοιόστασης, ο οποίος κρατά το κύτταρο στη φάση G0 μέχρις ότου ωριμάσουν οι συνθήκες για την αβλαβή αντιγραφή του DNA και τον διπλασιασμό του κυττάρου.



Εικόνα 2.3: Οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου, τα σημεία ελέγχου καθώς και οι διαδικασίες που ελέγχονται στην εκάστοτε φάση.

Κεφάλαιο 3^ο

ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΙΟΝΤΙΖΟΥΣΑΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΜΕ ΤΗΝ ΥΛΗ

3.1 Εισαγωγή

Όπως αναφέραμε και στο πρώτο κεφάλαιο της παρούσας εργασίας, η ιοντίζουσα ακτινοβολία ορίζεται ως η ακτινοβολία εκείνη που έχει αρκετά υψηλή ενέργεια ώστε να διώξει ατομικά ηλεκτρόνια καθώς διέρχεται από υλικό φορέα, δημιουργώντας έτσι ένα ιόν. Αν αυτός ο υλικός φορέας είναι η έμβια ύλη, τότε η ενέργεια που εναποτίθεται μπορεί να επιφέρει σοβαρές βλάβες στον οργανισμό. Στο κεφάλαιο αυτό, θα προσπαθήσουμε να αναλύσουμε τους τρόπους με τους οποίους συμβαίνει αυτή η αλληλεπίδραση και τα δυνητικά αποτελέσματα που επιφέρει στον οργανισμό.

3.2 Τρόποι αλληλεπίδρασης των ακτίνων-Χ με την ύλη

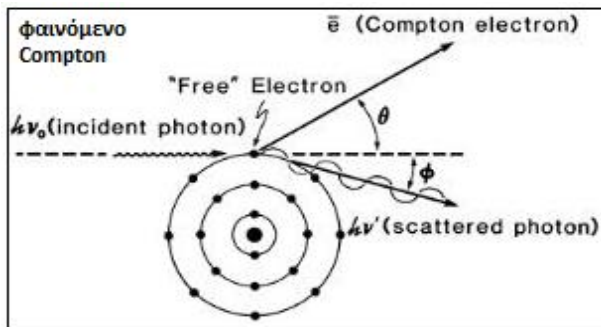
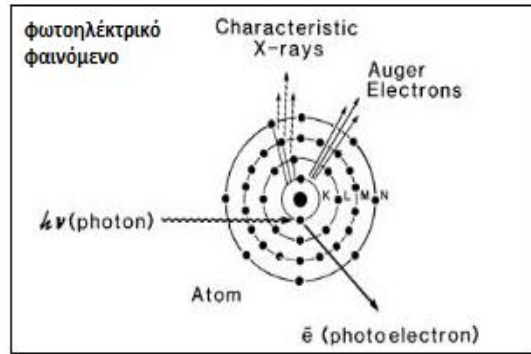
Οι ακτίνες-Χ συνιστούν την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μορφή ακτινοβολιών για θεραπευτικούς σκοπούς. Για το λόγο αυτό θα επικεντρωθούμε σε αυτού του τύπου τις ακτινοβολίες και την αλληλεπίδρασή που έχουν με την έμβια ύλη.

Οι ακτινοβολίες αυτές μεταφέρονται σε μορφή κβάντων ενέργειας που ονομάζονται φωτόνια και η ενέργεια κάθε φωτονίου θα υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση του Planck:

$$E = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda}$$

όπου h είναι η σταθερά του Planck ($6,63 \times 10^{-34}$ J·s), ν η συχνότητα του φωτονίου, c η ταχύτητα του φωτός (3×10^8 m/s) και λ το μήκος κύματος. Η απορρόφηση αυτής της ενέργειας των ακτίνων-Χ/γ δεν εξαρτάται από τη διάταξη των ατόμων στο μόριο αλλά από τον ατομικό αριθμό του υλικού. Αυτός είναι, για παράδειγμα, και ο λόγος που μετά την ακτινοβολήση με ακτίνες-Χ παρατηρούμε ίδιο ποσοστό απορρόφησης ενέργειας τόσο στις πρωτεΐνες όσο και στα νουκλεϊκά οξέα ενός κυττάρου [10,11]. Αξίζει να σημειωθεί ότι το μεγαλύτερο μέρος της ενέργειας ενός φωτονίου που απορροφάται ή περιθλάται από τα άτομα ιστών ενός οργανισμού μετατρέπεται σε θερμότητα χωρίς να προκαλέσει κάποιο βιολογικό αποτέλεσμα. Ανάλογα με την ενέργεια που έχουν, η αλληλεπίδραση των φωτονίων με την ύλη θα περιγράφεται πιο αναλυτικά από βάση τριών μηχανισμών: (i) το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο, (ii) το φαινόμενο Compton και (iii) τη δίδυμη γένεση.

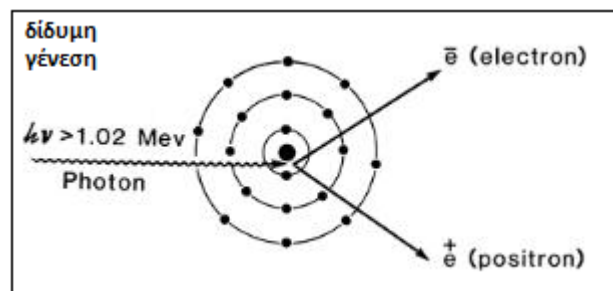
Το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο συνιστά την εκπομπή ενός τροχιακού ηλεκτρονίου μετά την απορρόφηση φωτονίου από άτομο ενός ιστού. Πιο συγκεκριμένα, ολόκληρη η ενέργεια του φωτονίου θα απορροφηθεί αρχικά κατά τη διαδικασία από το άτομο και στη συνέχεια θα μεταφερθεί αυτούσια σε ένα δέσμιο ηλεκτρόνιο του. Αν η ενέργεια αυτή είναι μεγαλύτερη της ενέργειας σύνδεσης του ηλεκτρονίου, τότε θα γίνει η εκπομπή του και η διαφορά στις ενέργειες θα είναι η νεοαποκτηθείσα κινητική του ενέργεια. Το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο παραμένει ο κυρίαρχος μηχανισμός αλληλεπίδρασης για ακτινοβολίες ενέργειας μέχρι 50 KeV, ενώ η πλειοψηφία των τροχιακών ηλεκτρονίων που επηρεάζονται βρίσκονται στην K στοιβάδα. Ένας σημαντικός παράγοντας από τον οποίο εξαρτάται το φαινόμενο αυτό είναι ο ατομικός αριθμός του υλικού [11,12].

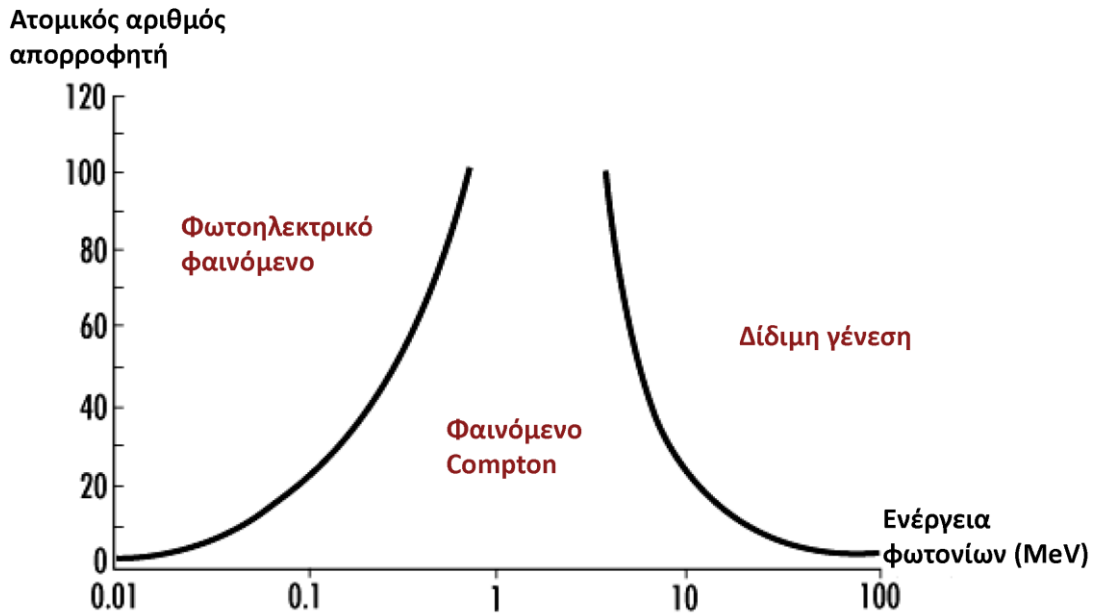


Το φαινόμενο Compton αναφέρεται στην ανελαστική σκέδαση μεταξύ ενός φωτονίου και ενός ελεύθερου ηλεκτρονίου ή ασθενώς δέσμιου ηλεκτρονίου. Θα είναι ο κυρίαρχος μηχανισμός αλληλεπίδρασης με την ύλη για φωτόνια ενέργειας από 100 KeV έως 10 MeV, το οποίο είναι το ενεργειακό εύρος που χρησιμοποιείται στις θεραπευτικές μεθόδους [11,12]. Κατά την

είσοδό του σε ένα υλικό, το φωτόνιο θα αλληλεπιδράσει με ένα ελεύθερο ηλεκτρόνιο, μεταφέροντας του μέρος της ενέργειάς του και μετά θα σκεδαστεί σε γωνία 0°-180° συνεχίζοντας μέχρι να συναντήσει άλλο ηλεκτρόνιο και να επαναλάβει αυτή τη διαδικασία. Οι ανελαστικές σκεδάσεις θα συνεχιστούν έως ότου το φωτόνιο χάσει αρκετή ενέργεια για να αλληλεπιδράσει με το μηχανισμό του φωτοηλεκτρικού φαινομένου και να δώσει όλη την εναπομένουσα ενέργειά του στο δέσμιο ηλεκτρόνιο ή έως ότου εξέλθει τελικά από το υλικό.

Ο τρίτος μηχανισμός είναι εκείνος της δίδυμης γένεσης. Παρατηρείται όταν το φωτόνιο έχει τουλάχιστον 1,02 MeV ενέργεια, ίση με τη μάζα ηρεμίας του ζεύγους ηλεκτρόνιο-ποζιτρόνιο, και εισέλθει σε πεδίο Coulomb, όπως αυτό στον πυρήνα του ατόμου. Στην περίπτωση αυτή το φωτόνιο μετατρέπεται σε ένα ζεύγος $e^- - e^+$ με το καθένα να κινείται προς άλλη κατεύθυνση για τη διατήρηση της ορμής του συστήματος. Όταν το ποζιτρόνιο συναντήσει κάποιο άλλο ηλεκτρόνιο, τότε θα εξαυλωθεί και θα εκπέμψει ακτινοβολία γ, αρκεί το ποζιτρόνιο να χάσει όλη του την ενέργεια κατά τη σύγκρουση. Και αυτός ο μηχανισμός εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον ατομικό αριθμό του υλικού μέσου.





Εικόνα 3.1: Οι περιοχές κυριαρχίας κάθε μηχανισμού αλληλεπίδρασης των φωτονίων με την ύλη ανάλογα με τον ατομικό αριθμό και την ενέργεια.

3.2.1 Χαρακτηριστικά μεγέθη δοσιμετρίας της ακτινοβολίας

Στο σημείο αυτό, καλό θα είναι να αναφέρουμε τα μεγέθη εκείνα που χαρακτηρίζουν τις φωτονικές ακτινοβολίες. Το πιο βασικό μέγεθος που μπορεί να χαρακτηρίσει μια φωτονική δέσμη είναι η ροή, η οποία ορίζεται ως το πηλίκο του συνόλου των φωτονίων dN που περνούν από ένα κομμάτι όγκου da . Έτσι η σχέση που θα μας δώσει την τιμή της ροής είναι η ακόλουθη:

$$\Phi = dN/da$$

Βάση αυτής της σχέσης μπορούμε να υπολογίσουμε την ένταση της δέσμης των φωτονίων. Αν υποθέσουμε ότι το υλικό μέσο έχει πάχος dx τότε ο αριθμός των φωτονίων που αφήνει να το διαπεράσουν είναι ίσο με:

$$dN = -\mu N dx$$

όπου N είναι ο αριθμός των αρχικών φωτονίων και μ συντελεστής εξασθένησης. Γράφοντας την παραπάνω σχέση με όρους έντασης έχουμε τελικά:

$$dI = -\mu I dx \rightarrow \frac{dI}{I} = -\mu dx \rightarrow I(x) = I_0 e^{-\mu x}$$

Η τελευταία σχέση ονομάζεται εκθετικός νόμος εξασθένησης.

Το πάχος ενός υλικού μέσου που χρειάζεται για να μειώσει μια δέσμη στο μισό της αρχικής της τιμής είναι γνωστό ως στρώμα ημίσειας τιμής (half-value-layer HVL) και δίνεται αν στην παραπάνω σχέση θέσουμε για $I(x)$ το $I_0/2$, δηλαδή $HVL = \ln 2 / \mu$.

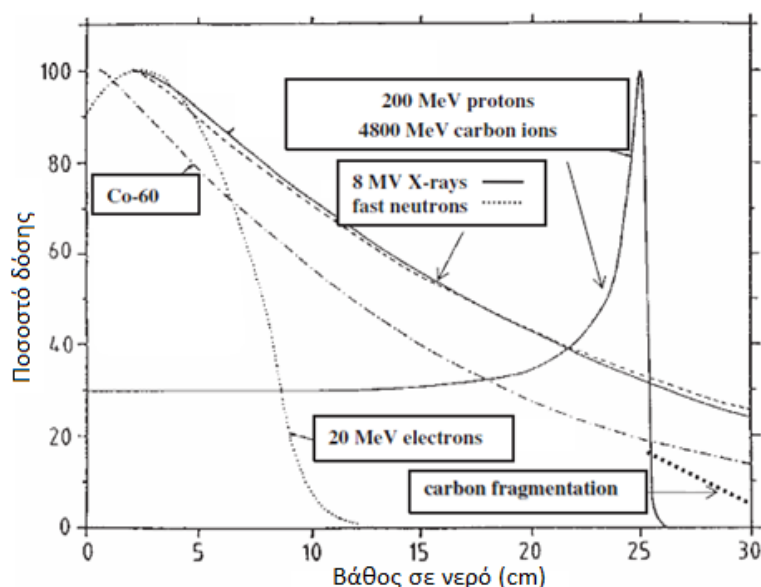
Όσο αφορά τη μέτρηση της ενέργειας μιας ακτινοβολίας μας ενδιαφέρει η μέτρησή της ως προς το μέσο που θα διαπεράσει. Για το λόγο αυτό θα χρησιμοποιήσουμε την έννοια της απορροφούμενης δόσης D , η οποία εξαρτάται από τον όγκο και την πυκνότητα του μέσου [12]:

$$D = dE/pdV$$

Επειδή όμως θα πρέπει πάντα να λαμβάνουμε υπόψιν μας και τον τύπο του βιολογικού μέσου που δέχεται την ιοντίζουσα ακτινοβολία, χρησιμοποιούμε την έννοια της ισοδύναμης δόσης:

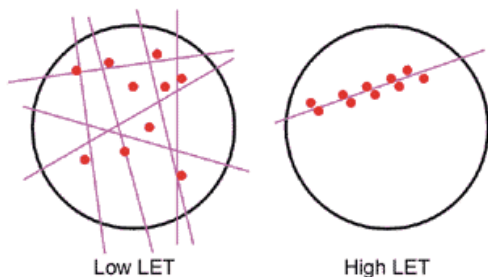
$$H_T = D \times W_R$$

όπου W_R είναι ένας παράγοντας βάρους. Η απορροφούμενη δόση μετριέται σε Gray (Gy) ενώ η ισοδύναμη δόση σε Sievert (Sv) [12]. Στο διάγραμμα που ακολουθεί μπορούμε να δούμε ανάλογα με το είδος της ακτινοβολίας το ποσοστό δόσης που απορροφάται σε διαφορετικά βάθη υδάτινου μέσου, το οποίο είναι πολύ καλό ανάλογο για τους βιολογικούς ιστούς (αποτελούνται από 80% νερό).



Εικόνα 3.2: Καμπύλη Bragg του ποσοστού δόσης-βάθους διεισδύσεως (percentage dose – depth PDD)

Τέλος ένα πολύ σημαντικό μέγεθος χαρακτηρισμού των ιοντίζουσών ακτινοβολιών είναι η γραμμική μεταβίβαση ενέργειας (linear energy transfer – LET). Η ποσότητα αυτή περιγράφει τη μέση ενέργεια που εναποτίθεται ανά μονάδα μήκους της τροχιάς της ιοντίζουσας ακτινοβολίας στο υλικό μέσο και καθορίζει σε μεγάλο βαθμό τα βιολογικά αποτελέσματα της ακτινοβολίας αυτής. Έτσι ακτινοβολίες που προκαλούν υψηλό αριθμό ιοντισμών κατά μήκος της τροχιάς τους έχουν υψηλή LET, ενώ ακτινοβολίες που προκαλούν μικρό αριθμό ιοντισμών θα λέμε ότι έχουν χαμηλή LET. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν ακτινοβολίες όπως τα σωματίδια-α, τα πρωτόνια και τα βαρέα ιόντα, ενώ στη δεύτερη ανήκουν ακτινοβολίες όπως οι φωτονικές.



Εικόνα 3.3: Οπτική αναπαράσταση της σημασίας της γραμμικής μεταβίβασης ενέργειας **LET**. Σε κάθε περίπτωση, παράγεται ο ίδιος αριθμός ιοντισμών, αναπαριστώντας έτσι την ίδια δόση, με διαφορετικά ωστόσο αποτελέσματα.

3.2.2 Στάδια βιολογικής δράσης

Τα στάδια της δράσης της ιοντίζουσας ακτινοβολίας θα είναι κατά σειρά εξέλιξης:

Φυσικό στάδιο (as – fs): Σε αυτό το στάδιο μεταφέρεται ενέργεια στα άτομα της βιολογικής ύλης. Η κατανομή της εξαρτάται από το είδος και την ενέργεια της ακτινοβολίας. Για ακτινοβολίες με χαμηλό LET παρατηρούνται λιγότεροι ιοντισμοί και διεγέρσεις κατά μήκος της τροχιάς της δέσμης ενώ για ακτινοβολίες με υψηλό LET υπάρχει μεγαλύτερη πυκνότητα ιοντισμών ανά μονάδα μήκους της διαδρομής. Επειδή στις ακτινοβολίες με χαμηλό LET η διασπορά των ιοντισμών είναι μεγάλη σε σχέση με τις διαστάσεις ενός βιομορίου, όπως το DNA, συνήθως τα φωτόνια περνούν χωρίς να απορροφηθεί μεγάλη ποσότητα ενέργειας από τα βιομόρια [9,10,13].

Φυσικοχημικό στάδιο (fs – ns): Κατά το στάδιο αυτό τα διεγερμένα και ιοντισμένα άτομα ή μόρια αντιδρούν, σπάνε τους χημικούς τους δεσμούς και δημιουργούν νέα. Αυτά τα μόρια και άτομα ονομάζονται ελεύθερες ρίζες και είναι ιδιαίτερα ασταθή και βραχύβια (με εμβέλεια μικρότερη από 100Angstrom), ηλεκτρικά ουδέτερα με ίσους αριθμούς πρωτονίων και ηλεκτρονίων αλλά με ένα ηλεκτρόνιο της εξωτερικής στιβάδας να είναι ασύζευκτο [9,10,13].

Χημικό στάδιο (ns - ms): Τώρα, οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν μεταξύ τους ή με παρακείμενα μόρια σχηματίζοντας «άτυπα» μόρια, δηλαδή μόρια διαφορετικά από τα φυσιολογικά. Έτσι προκύπτουν βλάβες των βιολογικών μακρομορίων και δραστικές βιολογικές ελεύθερες ρίζες [9,10,13].

Βιολογικό στάδιο (ms - έτη): Το στάδιο αυτό διακρίνεται στο βιοχημικό, το κυτταρικό και το συστημικό επίπεδο. Κατά το βιοχημικό (διάρκειας ms-ώρες), η προσβολή σημαντικών βιομορίων για τον μεταβολισμό του κυττάρου οδηγεί σε φαινόμενα όπως η αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης ενώ μέσω διαφόρων ενζύμων ξεκινάει η διαδικασία αναγνώρισης και επιδιόρθωσης των βλαβών που έχουν δημιουργηθεί. Στο κυτταρικό επίπεδο (διαρκεί ώρες-μήνες), παρατηρείται αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης και δημιουργία βλαβών στους ιστούς. Οι βλάβες που δεν επιδιορθώνονται οδηγούν σε μεταλλάξεις ή σε κυτταρικό θάνατο. Οι παραπάνω βλάβες επάγουν σε συστημικό επίπεδο (διαρκεί έτη) την πρόκληση σημαντικών λειτουργικών βλαβών, ανοσολογικών αποκρίσεων, ορμονικών, καρκινογένεση, έως και θάνατο του οργανισμού [9,10,13].

3.2.3 Τροποποιητικοί μηχανισμοί

Υπάρχουν πολλών ειδών παράγοντες που θα επηρεάσουν τα τελικά αποτελέσματα στους βιολογικούς ιστούς όπως οι φυσικοί, οι βιολογικοί και οι χημικοί παράγοντες.

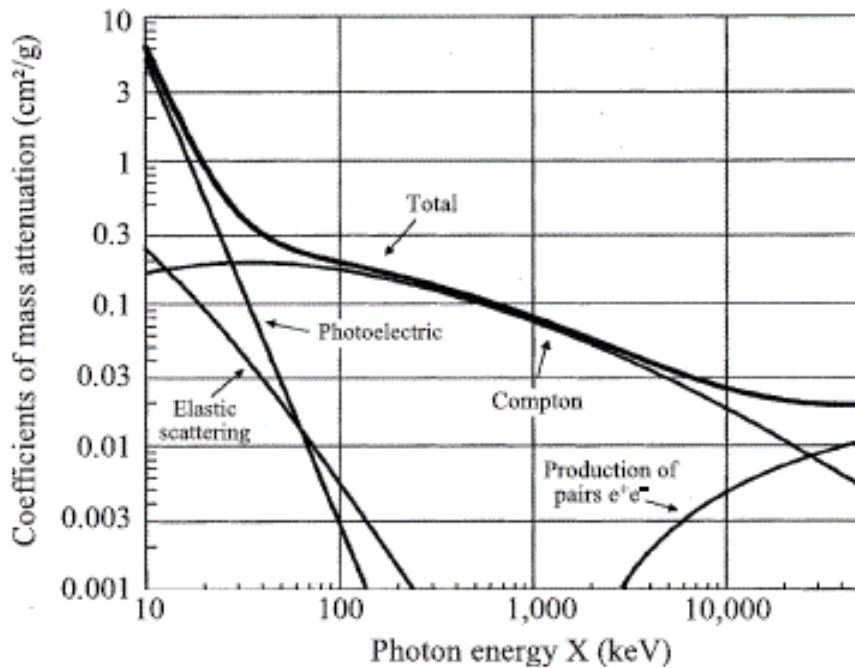
Οι φυσικοί παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται η δράση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας είναι το είδος της ακτινοβολίας, η κατάκτηση της δόσης στον ιστό για την δεδομένη ακτινοβολία καθώς και ο ρυθμός δόσης. Το είδος της ακτινοβολίας αναφέρεται κυρίως στη LET. Ακτινοβολία με μεγάλη LET (π.χ. ακτινοβολία-α) έχει μεγαλύτερη πιθανότητα να προκαλέσει διπλή θραύση στους κλώνους του DNA. Έτσι ορίζουμε ένα μέγεθος το οποίο θα μας δίνει αυτή την ένδειξη. Αυτό το μέγεθος είναι η σχετική βιολογική αποτελεσματικότητα (Relative Biological Effectiveness - RBE) και θα ορίζεται ως το πηλίκο της δόσης μιας ακτινοβολίας αναφοράς (συνήθως δέσμης ακτίνων-X) προς τη δόση της υπό εξέταση ακτινοβολίας που χρειάζεται για να επαχθεί το ίδιο βιολογικό αποτέλεσμα:

$$RBE = \frac{D (\text{reference radiation})}{D (\text{examined radiation})}$$

Από άποψη βιολογικού αποτελέσματος, επίσης σημαντικό ρόλο παίζει και ο τρόπος χορήγησης της δόσης μιας δεδομένης ακτινοβολίας. Η κλασματική χορήγηση μιας δόσης έχει μικρότερο βιολογικό αποτέλεσμα από την εφάπαξ χορήγησή της, καθώς δίνεται χρόνος να δράσουν οι επανορθωτικοί μηχανισμοί. Η αύξηση του ρυθμού δόσης σχετίζεται επίσης με τον περιορισμό της αποτελεσματικότητας διάφορων κυτταρικών επιδιορθωτικών μηχανισμών και κυρίως με αύξηση της πιθανότητας διπλής ρήξης (θραύση) στους κλώνους του DNA λόγω πολλαπλών ιονισμών.

Οι βιολογικοί παράγοντες που δύναται να επηρεάσουν τη δράση της ιοντίζουσας ακτινοβολία είναι τόσο η φάση του κυτταρικού κύκλου στην οποία θα βρίσκεται το κύτταρο την στιγμή της ακτινοβολήσης όσο και το είδος των κυττάρων. Αν και το κύτταρο έχει ακτινοβοληθεί από ιοντίζουσα ακτινοβολία σε όλες τις φάσεις του κύκλου του, η ευαισθησία των κυττάρων ποικίλλει από φάση σε φάση. Οι φάσεις με την μεγαλύτερη ευαισθησία είναι το τέλος της G2 και η μίτωση (M), ενώ η φάση της σύνθεσης (S) είναι η λιγότερο ευαίσθητη απ' όλες. Αυτό οφείλεται και στο γεγονός ότι οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί του κυττάρου, παρόλο που λειτουργούν σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου είναι αποδεδειγμένα αποδοτικότεροι στη φάση S.

Ένας άλλος βιολογικός παράγοντας που επηρεάζει τον τρόπο με τον οποίο θα αλληλεπιδράσει η ακτινοβολία με την ύλη είναι ο συντελεστής εξασθένησης μάζας ενός υλικού. Ο συντελεστής αυτός θα δίνεται από τη σχέση μ/ρ , καθώς ο συντελεστής εξασθένησης μ και η πυκνότητα ενός μέσου είναι άρρηκτα συνδεδεμένα μεταξύ τους.



Εικόνα 3.4: Η επιρροή του συντελεστή εξασθένισης μάζας στον τρόπο λειτουργίας των μηχανισμών αλληλεπίδρασης ακτινοβολίας-ύλης.

Τέλος διάφοροι χημικοί παράγοντες φαίνεται να μπορούν να ενισχύσουν ή να εμποδίσουν τη βιολογική επίδραση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Οι κυριότεροι από αυτούς είναι η ενίσχυση των βλαβών λόγω της παρουσίας οξυγόνου στο κύτταρο (oxygen enhancement effect) και οι διάφοροι δεσμευτές των δραστικών ελευθέρων ριζών, όπως οι αντιοξειδωτικές βιταμίνες.

3.3 Αποτελέσματα σε μοριακό επίπεδο

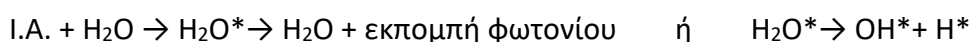
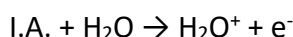
3.3.1 Άμεση και έμμεση δράση

Κατά την αλληλεπίδραση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας με τη βιολογική ύλη θα αποθηκεύεται ενέργεια στα βιομόρια αλλάζοντας τη δομή ή τη σύσταση τους. Η αλλαγή αυτή συμβαίνει είτε με άμεση αποθήκευση ενέργειας στο μόριο είτε έμμεσα μέσω αλυσιδωτών αντιδράσεων. Για ακτινοβολίες με υψηλό LET (νετρόνια, σωματίδια α: LET>20 keV/μm) η άμεση δράση είναι ο κυρίαρχος μηχανισμός επίδρασης στα κύτταρα ενώ αντίθετα για ακτινοβολίες με χαμηλό LET η έμμεση δράση είναι σημαντικότερη. Για παράδειγμα οι βιολογικές συνέπειες από την έμμεση δράση των ακτίνων-X είναι κάτι παραπάνω από τα 2/3 του συνόλου της επίδρασης αυτών στην ύλη [5,11].

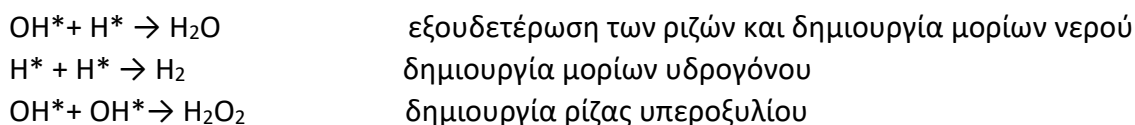
Όπως είπαμε, η άμεση δράση παρατηρείται όταν προκαλείται απευθείας από την ακτινοβολία διέγερση ή ιοντισμός σε κάποιο βιομόριο, με αποτέλεσμα αυτό να υποστεί κάποια βιοχημική μεταβολή. Τα βιομόρια αυτά μπορεί να είναι από ένζυμα μέχρι πρωτεΐνες ή ακόμα και τα νουκλεϊκά οξέα των κυττάρων. Οι τρόποι έκφρασης της άμεσης δράσης είναι δύο. Ο πρώτος

περιλαμβάνει την απώλεια ατόμων υδρογόνου ή μεθυλίων και το σχηματισμό μακρομοριακών ριζών, οι οποίες στη συνέχεια μπορεί να ενωθούν και μεταξύ τους σχηματίζοντας ένα νέο μακρομόριο με διαφορετικές φυσικές και βιοχημικές ιδιότητες από το αρχικό [9,11]. Ο δεύτερος περιλαμβάνει διάσπαση του μακρομορίου σε δύο ξεχωριστά και σταθερά μόρια με διαφορετικές φυσικές και βιοχημικές ιδιότητες από το αρχικό όπως και στον πρώτο. Στα πρωτεϊνικά οξέα η άμεση δράση έχει ως αποτέλεσμα συνήθως την ρήξη των πεπτιδικών δεσμών και τη δημιουργία μικρότερων πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Από την άλλη στις νουκλεοπρωτεΐνες προκαλείται διαχωρισμός της ιστόνης από τα νουκλεϊκά οξέα ή θραύσεις (δίκλωνες ή μονόκλωνες) και δημιουργία ξεχωριστών τμημάτων [9,5].

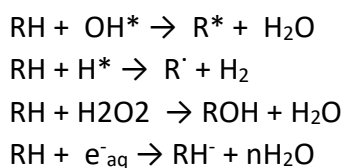
Η έμμεση δράση της ακτινοβολίας προκύπτει όταν σε κάποιο βιομόριο προκληθεί αλλαγή μέσω διαδοχικών αντιδράσεων με μόρια που έχουν διεγερθεί ή ιοντιστεί. Οι βασικοί φορείς της έμμεσης δράσης είναι οι ελεύθερες ρίζες που έχουν δημιουργηθεί από τη ραδιόλυση του νερού. Το νερό παίζει το ρόλο του μέσου διασποράς της ενέργειας των ιοντιζουσών ακτινοβολιών λόγω της αφθονίας του στα κύτταρα. Οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται είναι τόσο δραστικές που αν προκαλέσουν κάποια βλάβη στα βιομόρια αυτό θα γίνει σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα από τη δημιουργία τους (10⁻⁵ sec) [5,11]. Μερικοί από τους φορείς της έμμεσης δράσης, που δημιουργούνται χάρη σε κατιόντα (H₂O⁺)/διεγερμένα (H₂O*) μόρια νερού ή ελεύθερα ηλεκτρόνια (e⁻), είναι οι ελεύθερες ρίζες υδρογόνου (H[·])/υδροξυλίου (OH[·]) και τα λεγόμενα ενυδατωμένα ηλεκτρόνια (e⁻_{aq}). [5,9,11,13]. Με μια πιο αναλυτική ματιά οι αντιδράσεις που οδηγούν στην κάθε μορφή ελεύθερης ρίζας είναι οι ακόλουθες:



Τα προϊόντα των παραπάνω βιοχημικών αντιδράσεων θα αντιδράσουν μεταξύ τους με τους εξής τρόπους:



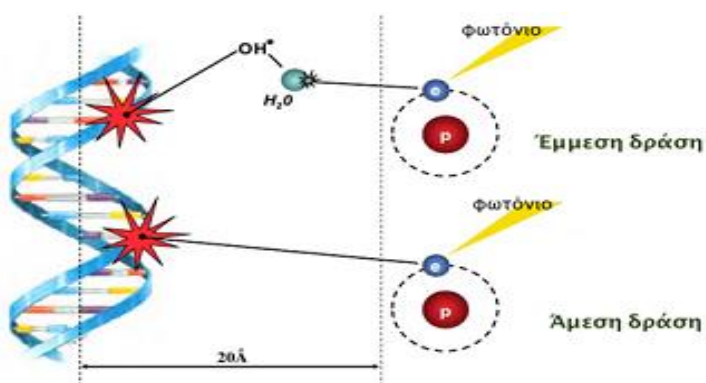
Αντίστοιχα, αν τα προϊόντα αντιδράσουν με οργανικό μόριο RH (όπως το DNA), το οποίο θα βρίσκεται στην εμβέλεια απόσταση αλληλεπίδρασής τους, αυτό θα γίνεται με τις ακόλουθες αντιδράσεις:



Τελικά, ανάλογα με τις αντιδράσεις που θα γίνουν, θα έχουμε τη δημιουργία οργανικών ελεύθερων ριζών R* οι οποίες λόγω της αστάθειας και της υψηλής ενέργειας που έχουν θα

αντιδράσουν/μετασχηματιστούν αμέσως με αποτέλεσμα την πρόκληση αλλοιώσεων με σοβαρές βιοχημικές συνέπειες. Το συνολικό ποσοστό δημιουργίας κάθε ελεύθερης ρίζας είναι μια συνάρτηση του pH του υλικού μέσου και της LET της ακτινοβολίας και αντιπροσωπεύεται από το μέγεθος G. Επίσης η κινητικότητα των προϊόντων ραδιόλυσης στο μέσο δίνεται από τη σταθερά διάχυσης D (diffusion constant) [5,14]. Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζεται η παραγωγή ελευθέρων ριζών ανά 100eV απορροφούμενης δόσης G και η διάχυση D των βασικών φορέων της έμμεσης δράσης.

	H*	OH*	H ₂ O ₂	e ⁻ _{aq}
G	0.55	2.72	1.13	2.63
D (10 ⁻⁵ cm ² /s)	8	2	2.3	5



Εικόνα 3.5: Η έμμεση και άμεση δράση της ΙΑ. Στην εικόνα απεικονίζεται το πως επάγεται η βλάβη στο DNA μέσω του υδροξυλίου, της πιο δραστηκής ελεύθερης ρίζας, όπως και το εύρος της δραστηκότητας της. Φαίνεται, ακόμη ο άμεσος ιονισμός των φωτονίων στο μόριο του DNA.

3.3.2 Βλάβες στο γενετικό υλικό

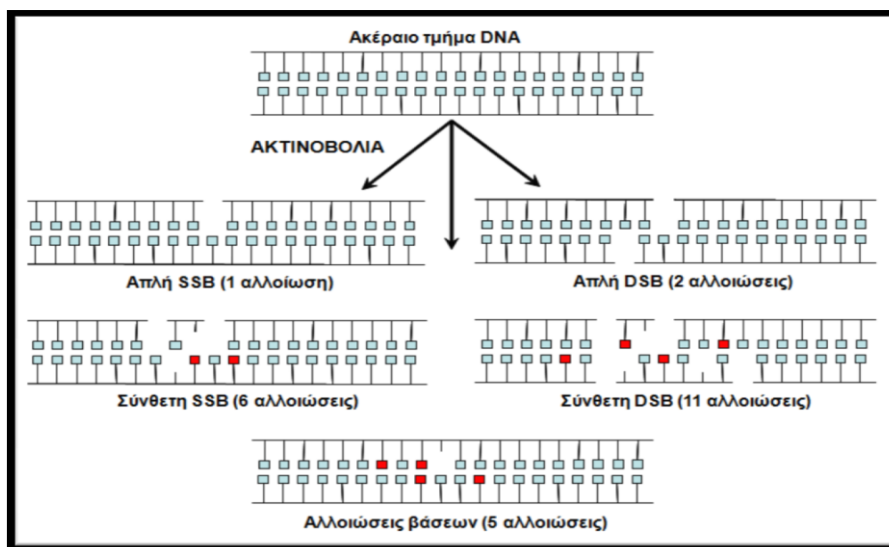
Το γενετικό υλικό των κυττάρων είναι αρκετά καλά προστατευμένο από εξωγενείς παράγοντες αποσταθεροποίησης χάρη στην πυρηνική μεμβράνη. Ωστόσο κατά την κυτταρική διαίρεση όπου η μεμβράνη διαλύεται και ο πυρήνας του κυττάρου διπλασιάζεται, το DNA είναι πιθανότερο να υποστεί αλλοιώσεις λόγω άμεσης ή έμμεσης δράσης της ακτινοβολίας. Οι αλλοιώσεις αυτές θα πάρουν κάποια από τις παρακάτω μορφές: α) αποσύνθεση του μορίου DNA, β) θραύση του ενός ή και των δύο κλώνων (Single Strand Break - SSB και Double Strand Break - DSB), γ) αλλοιώσεις βάσεων (οξειδωση, απαμίνωση, αλκυλίωση ή μεθυλίωση), δ) απώλεια βάσης (αβασικά σημεία – AP sites), ε) ενδοκλωνική, διακλωνική ή και διαμοριακή σύνδεση (με άλλα μόρια DNA ή πρωτεϊνών)

Μεγάλες δόσεις ΙΑ προκαλούν κατά βάση θραύσεις στους κλώνους του DNA, δημιουργώντας ρήξη του φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ του μορίου της δεσοξυριβόζης και της φωσφορικής ομάδας. Ανάλογα με το που παρατηρείται το φαινόμενο, δηλαδή στον ένα ή και στους δύο κλώνους, τότε θα μιλάμε για SSB ή DSB αντίστοιχα. Στον αντίποδα, οι μικρές δόσεις ΙΑ προκαλούν κατά βάση αλλοίωση ή απώλεια βάσης. Τόσο οι SSB/DSB, όσο και η απώλεια/αλλοίωση βάσης (πχ. αβασικά σημεία/οξειδωτικές βλάβες) αποτελούν δύσκολα επιδιορθώσιμες περιπτώσεις βλαβών του DNA, με τις DSBs και τις οξειδωτικές βλάβες συγκεκριμένα να είναι οι πιο μεταλλαξογόνες, και δημιουργούνται σε μεγάλο βαθμό ακόμα και από ακτινοβολίες χαμηλής LET. Για παράδειγμα, απορροφούμενη δόση 1 Gy ακτινοβολίας χαμηλής LET οδηγεί στη δημιουργία περίπου 500-1000

SSBs, 20-30 DSBs και 1000-2000 βλάβες βάσεων στο DNA λόγο άμεσης και έμμεσης δράσης. Παρόλα αυτά, μόνο ένα μικρό ποσοστό αυτών έχει κάποια βιολογική σημασία και μπορεί να οδηγήσει μέχρι και στον κυτταρικό θάνατο [11,15].

Οι βλάβες με τη μεγάλη αυτή βιολογική σημασία, που δημιουργούνται ακόμα και για ακτινοβολίες χαμηλής LET, είναι οι επονομαζόμενες ομαδοποιημένες/σύνθετες βλάβες του DNA (Clustered/Complex DNA lesions). Ως ομαδοποιημένες θα εννοούμε δύο ή περισσότερες βλάβες που βρίσκονται σε κοντινή απόσταση, δηλαδή μέσα σε 1 ή 2 περιστροφές της έλικας του DNA [21]. Αν οι βλάβες αυτές περιλαμβάνουν και διαφορετικού τύπου αλλοιώσεις τότε μιλάμε για σύνθετες ομαδοποιημένες βλάβες. Οι ομαδοποιημένες βλάβες μπορούν να χωριστούν στις DSBs και στις μη-DSBs οξειδωτικές ομαδοποιημένες βλάβες DNA (Oxidative Clustered DNA Lesions – OCDLs). Οι OCDLs περιλαμβάνουν διάφορης συνθετότητας SSBs, οξειδωμένες πουρίνες και πυριμιδίνες ή/ και οξειδωμένα αβασικά σημεία που θα κατανέμονται ακαθόριστα στο μόριο του DNA σε απόσταση 1-10 ζεύγη βάσεων [21]. Ιδιαίτερα σημαντικά και εξαιρετικά επικίνδυνα θεωρούνται τα συμπλέγματα όπου οι βλάβες τους βρίσκονται σε απέναντι κλώνους του DNA (bistranded clusters), καθώς στην περίπτωση της μη επιδιόρθωσής τους μπορεί να οδηγήσουν σε DSBs, χρωμοσωματικές βλάβες, αυξημένη πιθανότητα μεταλλάξεων και γονιδιακή αστάθεια [15].

Όπως αναφέραμε, οι ομαδοποιημένες βλάβες θα έχουν ιδιαιτέρως πιο σημαντικές βιολογικές συνέπειες από τις επιμέρους βλάβες που τις απαρτίζουν. Μερικοί παράγοντες που επηρεάζουν τις συνέπειες αυτές είναι ο αριθμός, η φύση, η θέση και η απόσταση των επιμέρους βλαβών αυτών. Επίσης όσο αυξάνεται η LET θα αυξάνεται και ο μέσος όρος των βλαβών σε κάθε σύμπλεγμα, οπότε οι ομαδοποιημένες βλάβες θα είναι τελικά πιο σύνθετες. Τέλος, το πλήθος και το είδος των βλαβών αλλά και η αναλογία μεταξύ SSB και DSB θα καθορίζεται από το ποσοστό οξυγόνου που υπάρχει στο κύτταρο. Έχει παρατηρηθεί πως σε αερόβιες συνθήκες (υψηλή ποσότητα O₂) το κλάσμα SSB/DSB μειώνεται ενώ παράλληλα αυξάνεται ο αριθμός βλαβών ανά σύμπλεγμα καθιστώντας τις βλάβες πιο σύνθετες [15]. Η αυξημένη συνθετότητα των βλαβών αυτών τις καθιστά πιο ανθεκτικές στους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς οδηγώντας σε χρόνιες επιπτώσεις για τον οργανισμό [14].



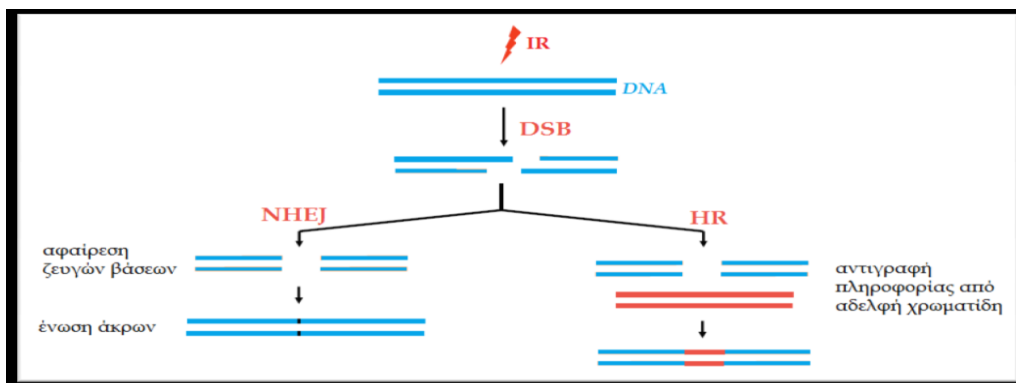
Εικόνα 3.6: Σχηματική αναπαράσταση των σημαντικότερων βλαβών του DNA.

3.3.3 Αναγνώριση και απόκριση-επιδιόρθωση βλαβών

Η ύπαρξη βλαβών στο DNA δημιούργησε την ανάγκη για την δημιουργία έγκυρου συστήματος αναγνώρισής και αντιμετώπισής τους από το κύτταρο. Η αναγνώριση των βλαβών θα γίνεται από ένα σύνολο πρωτεϊνών που ανταποκρίνονται σε αυτές πυροδοτώντας σηματοδοτικά μονοπάτια, πολλές φορές αλληλεπικαλυπτόμενα, τα οποία ανάλογα με το είδος και την έκταση τους οδηγούν το κύτταρο σε μία εκ τριών πιθανών διαδικασιών: 1) προσωρινή ή μόνιμη αναστολή του κυτταρικού κύκλου, 2) κυτταρικό θάνατο μέσω της απόπτωσης ή 3) ενεργοποίηση των επιδιορθωτικών μηχανισμών του κυττάρου.

Πιο συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν και διενεργούν τις παραπάνω διαδικασίες είναι οι κινάσες. Οι κινάσες είναι ένζυμα, τα οποία φωσφορυλιώνοντας το υπόστρωμά τους ενεργοποιούν χρήσιμες διαδικασίες για την αντιμετώπιση των βλαβών που υπάρχουν στο DNA. Για παράδειγμα το σύμπλεγμα Mre11–Rad50–Nbs1 (MRN) και το ataxia-telangiectasia and Rad3-related (ATR) [23] είναι πρωτεΐνες που ανιχνεύουν DSBs και SSBs αντίστοιχα κάνοντας πρόσδεση στα σημεία των θραύσεων. Από τη φωσφορυλίωσή τους ενεργοποιούνται στη συνέχεια κινάσες των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, όπως οι CHK1 και CHK2, οι οποίες σηματοδοτούν τη μείωση ή την ολοκληρωτική στάση του κύκλου για να διορθωθεί η βλάβη [11,24,26]. Οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί ενεργοποιούνται και αυτοί από την φωσφορυλίωση κινασών ως ο τελευταίος κρίκος της αλυσιδωτής αυτής διαδικασίας αναγνώρισης και απόκρισης στις βλάβες. Αυτοί οι μηχανισμοί αποτελούν την τελευταία προσπάθεια του κυττάρου να επαναφέρει το DNA του στην κανονικότητα πριν ενεργοποιηθεί η διαδικασία της απόπτωσης. Ανάλογα με τις κινάσες που φωσφορυλιώνονται θα σηματοδοτούνται διαφορετικοί μηχανισμοί επιδιόρθωσης (πχ η CHK2 σηματοδοτεί το μηχανισμό BER ενώ η CHK1 σηματοδοτεί το μηχανισμό NHEJ).

Για την επιδιόρθωση DSBs επιστρατεύεται η μη-ομόλογη ένωση άκρων (Non-homologous End-joining NHEJ) ή ο ομόλογος ανασυνδυασμός HR (Homologous Recombination). Στην περίπτωση της NHEJ οι DNA πολυμεράσες και νουκλεάσες καθαρίζουν και διαμορφώνουν κατάλληλα τα άκρα έτσι ώστε να γίνει η απολίνωση των δύο μερών. Η NHEJ είναι επιρρεπής στα λάθη ,λειτουργεί σε όλη την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου αλλά κυριαρχεί στην G1 και S φάση [11,28]. Αντίθετα, ο HR είναι ένας πιο αργός αλλά άκρως αξιόπιστος μηχανισμός επιδιόρθωσης που είναι ενεργός στο τέλος της φάσης S και κατά την G2 [11,29]. Λειτουργεί μεταφέροντας την πληροφορία από την ομόλογη ακολουθία και συνθέτοντας τα κατάλληλα νουκλεοτίδια.



Εικόνα 3.7: Οι τρόποι δράσης των δύο μηχανισμών επιδιόρθωσης DSBs.

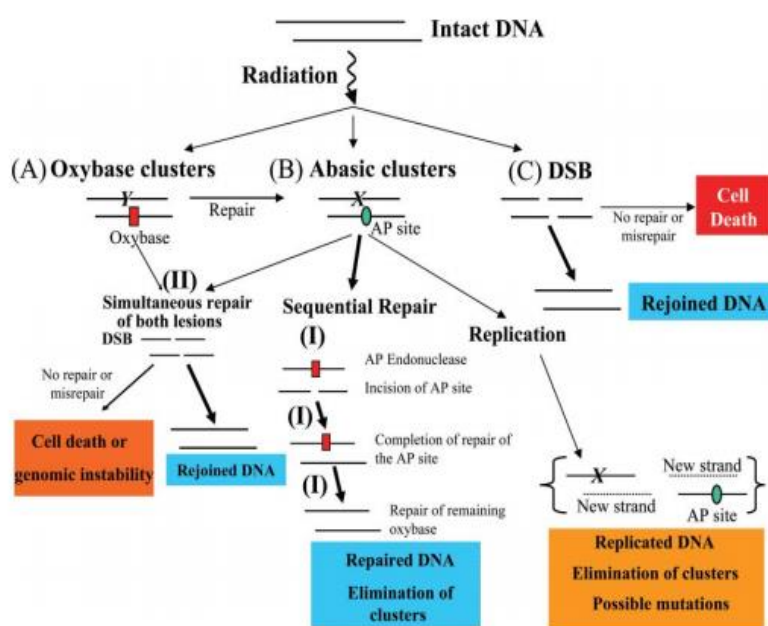
Η επιδιόρθωση των μονόκλωνων βλαβών διενεργείται μέσω του μηχανισμού επιδιόρθωσης αταίριαστου ζεύγους βάσεων (Mismatch Repair - MMR), του μηχανισμού επιδιόρθωσης εκτομής νουκλεοτιδίου (Nucleotide Excision Repair - NER) ή του μηχανισμού επιδιόρθωσης εκτομής βάσης (Base Excision Repair - BER). Στην MMR πραγματοποιείται επιδιόρθωση της προσθήκης ή απαλοιφής 1-4 βάσεων ή της εισαγωγής μη-συμπληρωματικής βάσης και ενεργοποιείται στη φάση αντιγραφής του DNA [30]. Στην NER έχουμε την επιδιόρθωση της παραμόρφωσης του σχήματος της διπλής έλικας του DNA, η οποία οφείλεται σε σχηματισμό διμερών πυριμιδινών (pyrimidine dimers) ή σε ομοιοπολική πρόσδεση ογκωδών χημικών ομάδων [31]. Τέλος ο μηχανισμός BER επιδιορθώνει τις διάφορες αλλοιώσεις ή την απώλεια μίας βάσης (οξειδωση, μεθυλίωση, αποπουρίνωση, αποπυριμιδίνωση ή απαμίνωση) [32].

Οι συγκεκριμένες βλάβες που ενεργοποιούν το μηχανισμό BER προκαλούνται κατά βάση από ακτινοβολίες χαμηλής LET, ωστόσο είναι ιδιαίτερα μεταλλαξογόνες και στην περίπτωση των ομαδοποιημένων βλαβών σε αντίθετους κλώνους μπορεί να εξελιχθούν σε DSBs. Η αρχή της λειτουργίας του μηχανισμού γίνεται με ένα ένζυμο από την ομάδα των DNA γλυκοσυλασών. Τα συγκεκριμένα ένζυμα (11 γνωστά ανθρώπινα ένζυμα) διαβάζουν την αλληλουχία των βάσεων προκειμένου να εντοπίσουν πιθανές βλάβες. Οι μονολειτουργικές γλυκοσυλάσες υδρολύουν τον γλυκοζιδικό δεσμό μέσω ενός μορίου νερού δημιουργώντας μία αβασική θέση, ενώ οι πολυλειτουργικές προκαλούν εκτός από τη ρήξη του γλυκοζιδικού δεσμού μέσω μιας πυρηνόφιλης αμινομάδας τους και τη ρήξη του φωσφοδιεστερικού δεσμού μέσω της δημιουργίας μιας Schiff βάσης στη θέση 3 της δεσοξυριβόζης του αβασικού σημείου επάγοντας έτσι ρήξη του κλώνου στη θέση αυτή [32]. Στη συνέχεια, θα δράσει μια AP ενδονουκλεάση τύπου 1 (APE1) η οποία θα προκαλέσει ρήξη του φωσφοδιεστερικού δεσμού με τη χρήση του ιόντος Mg^{2+} ακριβώς πάνω από τη φωσφορική ομάδα της αβασικής θέσης δημιουργώντας έτσι της απολήξεις 3'-OH και 5'-δεσοξυριβόζη φωσφορικό άλας (dRP) [32]. Τέλος, μια πολυμεράση β (polβ) θα προσδέσει ένα μόνο νουκλεοτίδιο στο αβασικό σημείο και μια DNA λυάση θα καταλύσει τη δημιουργία ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ της απόληξης 3'-OH του νέου νουκλεοτιδίου και της απόληξης 5'-φωσφορικό άλας του γειτονικού [32].

3.3.4 Πιθανά προβλήματα στην επιδιόρθωση

Υπάρχουν δύο είδη προβλημάτων που μπορεί να προκύψουν από τη μη σωστή λειτουργία των επιδιορθωτικών μηχανισμών. Το πρώτο είναι η ελλιπής ανταπόκριση και αφορά στην αδυναμία των μηχανισμών επιδιόρθωσης να δράσουν σωστά. Πιο συγκεκριμένα στον μηχανισμό BER, μπορεί να προκύψει ανεπάρκεια λειτουργίας από τη μη σωστή έκφραση των ενζύμων που μετέχουν στο μηχανισμό αυτό. Για παράδειγμα μετάλλαξη του γονιδίου OGG1, του γονιδίου MUTHYH ή πολυμορφισμοί του γονιδίου της APE1 οδηγούν σε διάφορες μορφές καρκινογένεσεων [32,34,35]. Το δεύτερο πρόβλημα που μπορεί να προκύψει είναι η προβληματική λειτουργία, όπου ο επιδιορθωτικός μηχανισμός μπορεί όχι μόνο να μην διορθώσει τη βλάβη αλλά να συμβάλει και στη δημιουργία περαιτέρω βλαβών. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η περίπτωση επιδιόρθωσης, μέσω του BER, της 8οξυ-γουουανίνης στην αλληλουχία CAG/CTG του γονιδίου Huntington. Στην περίπτωση αυτή, η προβληματική αλληλουχία επεκτείνεται δημιουργώντας περισσότερες 8οξυ-γουουανίνες και η συσσώρευση αυτών καθιστά δυσκολότερη την επιδιόρθωση από την

γλυκοσυλάση OGG1 [36]. Η επανάληψη της αλληλουχίας CAG στο γονίδιο αυτό πάνω από 40 φορές (η συσσώρευση αυτή ενισχύεται με τη πάροδο του χρόνου) οδηγεί στην εμφάνιση της γνωστής νευροεκφυλιστικής νόσου του Χάντινγκτον. Το φαινόμενο της ελλιπούς επιδιόρθωσης των διαφόρων βλαβών DNA εμφανίζεται ιδιαίτερα συχνά στην περίπτωση των OCDL όπου λόγω της συσσώρευσης βλαβών ανά τμήματα καθυστερεί η επιδιόρθωση τους για αρκετή ώρα (μπορεί να παραμείνουν 24h – 72h μετά την ακτινοβολήση) καθιστώντας δυνατό το επικίνδυνο ενδεχόμενο να υπάρχουν ακόμα και κατά την είσοδο στη διαδικασία κυτταρικής διαίρεσης [14]. Ένας επιπλέον παράγοντας που συντελεί στην αδυναμία πλήρους επιδιόρθωσης αποτελεί το γεγονός πως σε αυτές τις περιπτώσεις απουσιάζει η πλήρης “εικόνα” της σωστής αλληλουχίας των βάσεων κάνοντας δύσκολη την ανίχνευση της κάθε βλάβης και την σωστή επιδιόρθωση αφού λείπει το κατάλληλο πλαίσιο αντιστοίχισης.



Εικόνα 3.9: Μοντέλο κατηγοριοποίησης βλαβών DNA που δείχνει τα πιθανά μονοπάτια με τα οποία οι βλάβες αυτές επιδιορθώνονται ή μετατρέπονται σε βιολογικά επικίνδυνες.

3.4 Αποτελέσματα σε κυτταρικό επίπεδο

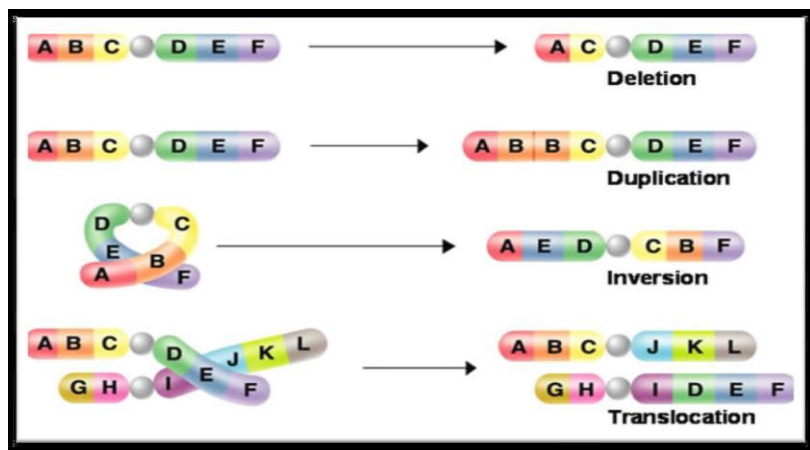
3.4.1 Γονιδιακές μεταλλάξεις

Ως γονιδιακή μετάλλαξη ορίζουμε την μόνιμη αλλαγή της αλληλουχίας των βάσεων ενός γονιδίου. Η μετάλλαξη προκύπτει από μη επιδιορθωμένες δίκλωνες θραύσεις όπου λόγω ελλείμματος βάσης τμήμα του DNA δεν θα επανασυνδεθεί μέσω κάποιου μηχανισμού επιδιόρθωσης και θα παραμείνει ελεύθερο. Ωστόσο ακόμα κι αν υπάρχει η βάση, πιθανή αλλοίωσή της μπορεί επίσης να οδηγήσει σε μετάλλαξη. Ένα παράδειγμα αποτελεί η περίπτωση της οξειδωμένη γουανίνης 8-Oxoguanine, η οποία λόγω δομής δημιουργεί 2 δεσμούς υδρογόνου με την αδενίνη αντί της θυμίνης και στη συνέχεια κατά το διπλασιασμό του DNA αλλάζει την σειρά βάσεων του γονιδίου αντικαθιστώντας την γουανίνη με θυμίνη και την κυτοσίνη με αδενίνη.

3.4.1 Χρωμοσωματικές αλλοιώσεις

Οι χρωμοσωματικές αλλοιώσεις είναι εμφανείς μόνο στη φάση της μετάφασης μετά τη διενέργεια καρυοτύπου και προκύπτουν από μη επιδιορθωμένες DSB βλάβες. Οι αλλοιώσεις αυτές προκύπτουν από διάφορους επιβλαβείς για το DNA παράγοντες, όπως η ΙΑ, ακόμη και για χαμηλές δόσεις (<1 Gy) [11]. Οι χρωμοσωματικές ανωμαλίες αφορούν ανταλλαγές των κομματιών διαφορετικών χρωμοσωμάτων μεταξύ τους, μεταξύ των χρωματίνων του ίδιου χρωμοσώματος ή ακόμα και μεταξύ περιοχών της ίδιας χρωματίδας (χρωματιδικές ανωμαλίες) [3]. Οι χρωμοσωματικές εκτροπές προκύπτουν όταν τα άκρα ενός θραύσματος ενώνονται με ένα άλλο δημιουργώντας δακτυλιοειδή, διακεντρικά, ακεντρικά και άλλα αναδιατεταγμένα χρωμοσώματα. Οι δομικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες που μπορεί να προκύψουν διακρίνονται σε ισοζυγισμένες και μη ισοζυγισμένες ανάλογα με την ποσότητα γενετικού υλικού στο σύνολο των χρωμοσωμάτων. Στις ισοζυγισμένες, το σύνολό θα περιέχει τη σωστή ποσότητα γενετικού υλικού, με αποτέλεσμα να μην έχουν συνήθως επιπτώσεις στο φαινότυπο, αλλά να είναι επικίνδυνες όταν κληρονομηθούν. Στις ισοζυγισμένες αναδιατάξεις ανήκουν οι αναστροφές, οι μεταθέσεις, οι αμοιβαίες μεταθέσεις, οι μεταθέσεις κατά Robertson και οι ενθέσεις. Στις μη ισοζυγισμένες αναδιατάξεις, υπάρχει περισσότερο ή λιγότερο γενετικό υλικό από το φυσιολογικό, με αποτέλεσμα ο φαινότυπος να είναι σίγουρα παθολογικός. Στις μη ισοζυγισμένες αναδιατάξεις ανήκουν τα ελλείμματα ή ελλείψεις, οι διπλασιασμοί, τα χρωμοσώματα δείκτες, τα δακτυλιοειδή χρωμοσώματα, τα ισοχρωμοσώματα και τα δικεντρικά χρωμοσώματα [3,11]. Ορισμένες αναδιατάξεις είναι σταθερές και μπορούν να μεταβιβάζονται αναλλοίωτες στις επόμενες γενιές κατά τη μείωση και τη μίτωση, ενώ άλλες είναι ασταθείς. Το μέγεθος της βλάβης στα χρωμοσώματα εξαρτάται περισσότερο από τη διάρκεια της έκθεσης παρά από τη συνολική δόση ΙΑ. Έχει παρατηρηθεί γενικά πως η αύξηση του ρυθμού της δόσης αυξάνει τον αριθμό των χρωμοσωματικών θραύσεων [9].

Εικόνα 3.8: Σχηματική απεικόνιση των χρωμοσωματικών μεταλλάξεων. Παρουσιάζονται η αλληλοεπικάλυψη, η διαγραφή, η αντιστροφή και η μετατόπιση των χρωμοσωμάτων.



3.4.3 Κυτταρικός θάνατος

Ένα κύτταρο θεωρείται βιολογικά νεκρό όταν έχει χάσει την πλήρη αναπαραγωγική του ικανότητα. Διάφορα γνωστά είδη κυτταρικού θανάτου είναι η απόπτωση, η νέκρωση και η μιτωτική καταστροφή.

Η απόπτωση είναι μια προγραμματισμένη διαδικασία κυτταρικού θανάτου που πραγματοποιείται από συγκεκριμένα είδη κυττάρων και παίζει σημαντικό ρόλο στην εμβρυακή εξέλιξη και στην ελεγχόμενη αποβολή προβληματικών κυττάρων ενός οργανισμού. Η διαδικασία της απόπτωσης ενεργοποιείται και ρυθμίζεται μέσω των αποπτωτικών σημάτων συγκεκριμένων πρωτεϊνών. Κατά την εξέλιξη της διαδικασίας παρουσιάζεται συρρίκνωση της χρωματίνης και του πυρήνα συνολικά, η μιτοχονδριακή μεμβράνη διαρρηγνύεται και το κύτταρο γενικά αποδομείται. Τα αποπτωτικά σώματα που σχηματίζονται θα αντιμετωπιστούν από τα φαγοκύτταρα, αποφεύγοντας τη δημιουργία φλεγμονής. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται ακριβώς μετά από ανεπιτυχή κυτταρική διαίρεση λόγω ακτινοβόλησης κυρίως χαμηλών δόσεων και όταν συμβαίνει σε φυσιολογικό βαθμό έχει θετικές επιπτώσεις στον οργανισμό με την αποφυγή μεταλλάξεων και καρκινογένεσης [3,5,11,40].

Στον αντίποδα, η νέκρωση αποτελεί μια μη-ελεγχόμενη διαδικασία πρόωρου κυτταρικού θανάτου. Τα κύτταρα, τα οποία πεθαίνουν με τη διαδικασία αυτή δεν ακολουθούν το σηματοδοτικό μονοπάτι της απόπτωσης καθώς υπάρχει εμπλοκή συγκεκριμένων υποδοχέων που ενεργοποιούνται από την απώλεια της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης. Αυτό σημαίνει ότι ακολουθεί ανεξέλεγκτη απελευθέρωση των προϊόντων του κυτταρικού θανάτου στον ενδοκυττάριο χώρο λόγω της ρήξης της κυτταρικής μεμβράνης, της διακοπής του μεταβολισμού και της ακόλουθης φλεγμονώδους αντίδραση [11,41]. Η νέκρωση είναι μια διαδικασία που επέρχεται ως επί τω πλείστω μετά την ακτινοβόληση με ΙΑ υψηλών δόσεων, προκαλώντας γενικευμένες βλάβες με επιβλαβείς συνέπειες για τους ιστούς και τον οργανισμό.

Η μιτωτική καταστροφή, πραγματοποιείται μετά από λίγες κυτταρικές διαιρέσεις σε περίπτωση ύπαρξης βλάβης ανεπίδεκτης επιδιόρθωσης και οδηγεί στον αναπαραγωγικό κυτταρικό θάνατο. Συντελείται μέσω καθυστερημένης νέκρωσης ή απόπτωσης και η πιθανότητα να συμβεί αυξάνεται στις μεγαλύτερες δόσεις.

3.5 Αποτελέσματα σε ιστούς

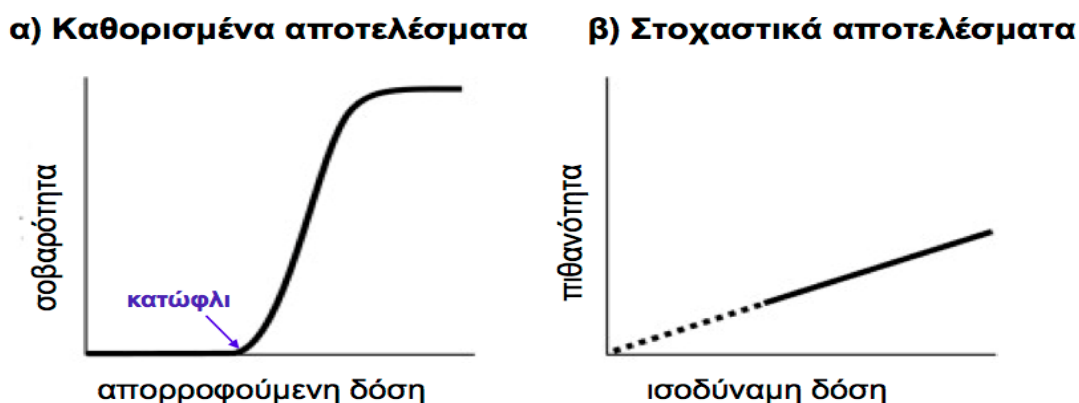
Εκτός από τις πιο εξειδικευμένες επιπτώσεις που έχει η ακτινοβολία στα κύτταρα, επηρεάζει γενικά και τους ιστούς και τα όργανα ενός οργανισμού. Οι παράγοντες που θα καθορίσουν την επιρροή αυτή είναι πολλοί με τους κυριότερους να είναι το είδος της βλάβης στο DNA, το μέγεθος και ο ρυθμός δόσης της ΙΑ, το είδος των κυττάρων, τα επίπεδα οξυγόνου και αντιοξειδωτικών όπως επίσης η ηλικία και ο τρόπος ζωής του οργανισμού μαζί με πολλούς ακόμη περιβαλλοντικούς παράγοντες. Ο συνδυασμός των παραπάνω στοιχείων ορίζουν ένα παθολογικό υπόβαθρο, με ένα πολύ ή λιγότερο αυστηρά καθορισμένο πλαίσιο ενδεχόμενων αποτελεσμάτων. Ο μεγάλος αριθμός των εμπλεκόμενων παραγόντων στην επίδραση της ακτινοβολίας οδηγεί τα αποτελέσματα να υπόκεινται σε στατιστικούς νόμους. Έτσι θα διακρίνονται σε καθορισμένα και στοχαστικά αποτελέσματα.

3.5.1 Καθορισμένα αποτελέσματα

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

3.5.2 Στοχαστικά αποτελέσματα

Τα στοχαστικά αποτελέσματα δεν παρουσιάζουν κατώφλι εμφάνισης και η πιθανότητα εμφάνισής τους ξεκινά από πολύ χαμηλές δόσεις. Οφείλονται σε μεταλλάξεις, που συνήθως συσσωρεύονται σε μεγάλο βαθμό στα κύτταρα, και οι βλάβες που προκαλούν γίνονται ορατές μετά από αρκετά χρόνια στον οργανισμό ή στους απογόνους του (εξαίρεση αποτελεί η εμφάνιση λευχαιμίας). Η αύξηση της δόσης αυξάνει γραμμικά την πιθανότητα εμφάνισης κάποιας βλάβης, σύμφωνα με το γραμμικό πρότυπο χωρίς κατώφλι (Linear Non-Threshold model - LNT), ενώ η σοβαρότητά της είναι ανεξάρτητη της δόσης [12]. Ο καρκίνος ο οποίος είναι το σημαντικότερο στοχαστικό αποτέλεσμα μπορεί να επέλθει λόγω πολυάριθμων εκθέσεων σε ΙΑ. Για το λόγο αυτό η εκτίμηση κινδύνου εμφάνισής του οφείλει να εξετάζει τα δεδομένα συσσωρευτικά και σε βάθος χρόνου.



Εικόνα 3.10: Διαγράμματα για τα καθορισμένα και στοχαστικά αποτελέσματα της ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Στο (α) διάγραμμα παρουσιάζεται η σοβαρότητα των καθορισμένων αποτελεσμάτων σε σχέση με την δόση και το κατώφλι εμφάνισης. Στο (β) διάγραμμα φαίνεται η πιθανότητα εμφάνισης των στοχαστικών αποτελεσμάτων συναρτήσει της δόσης όπου η διακεκομμένη γραμμή σημαίνει πως στο τμήμα αυτό οι επιπτώσεις δεν είναι απόλυτα μετρήσιμες.

3.6 Συστημικά αποτελέσματα

3.6.1 Μη στοχευμένες επιδράσεις

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

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

Οι μη στοχευμένες επιδράσεις (ΜΣΕ) μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε παρακείμενα αποτελέσματα (*bystander effects*), απόκριση απομακρυσμένων ιστών (*abscopal effects*), προσαρμοσμένη απόκριση στην ΙΑ (*adaptive response*) και γονιδιακή αστάθεια (*genomic instability*) [47,49]. Η κατηγοριοποίηση αυτή που θα υιοθετήσουμε στο πλαίσιο αυτής της εργασίας προκύπτει κυρίως από μια φαινομενολογική προσέγγιση ως προς τις συνέπειες και τη διασπορά των αποτελεσμάτων αυτών και λιγότερο από τους μηχανισμούς που τα προκαλούν καθώς αυτοί

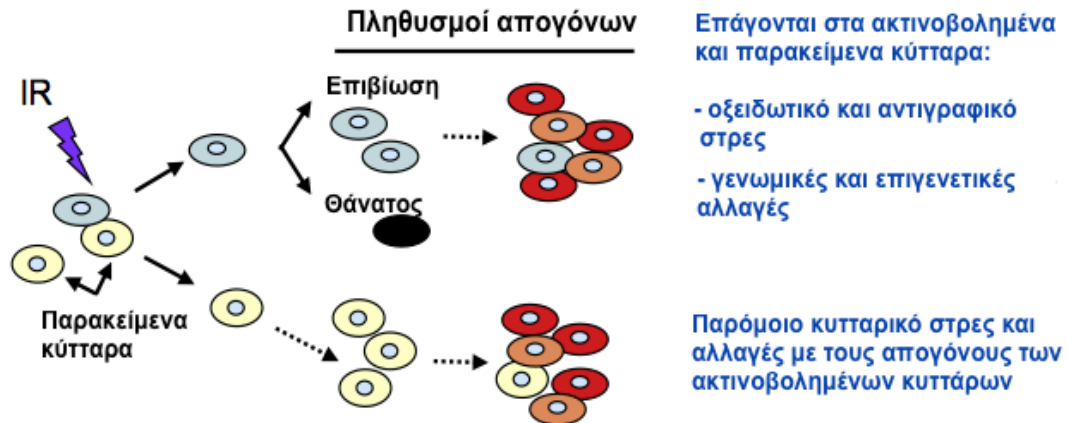
μπορεί να διαφέρουν σε κάποιες περιπτώσεις και σε άλλες να αλληλοεπικαλύπτονται. Υπάρχουν αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία στις οποίες η γονιδιακή αστάθεια θεωρείται διακριτή κατηγορία των ΜΣΕ, επεκτείνοντας την έννοια των μη στοχευμένων αποτελεσμάτων λαμβάνοντας υπόψη τη διάσταση του χρόνου καθώς και κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που αυτή παρουσιάζει (όπως η ετερογενής μη κλωνική εμφάνιση διαφόρων αποτελεσμάτων, γεγονός που δεν προβλέπεται από τη θεωρία στόχου) [38,50].

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

3.6.1.1 Επιδράσεις σε παρακείμενα κύτταρα (bystander effects)

Τα αποτελέσματα σε παρακείμενα κύτταρα λόγω ακτινοβολήσης ορίζονται ως οι συνέπειες που επάγονται σε κύτταρα που βρίσκονται γειτονικά ή σε επαφή με εκείνα της ακτινοβολημένης περιοχής. Πολλά πειράματα, κυρίως *in vitro*, έχουν πραγματοποιηθεί υπό διάφορες συνθήκες (διαφορετικά είδη ακτινοβολίας, ενέργειες, δόσεις, ώρες έκθεσης, κυτταρικά είδη κ.α.) και χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές παρέχοντας σημαντικές γνώσεις [46]. Η πειραματική τεκμηρίωση του φαινομένου αυτού ήρθε πρώτη φορά με το πείραμα των Nagasawa και Little κατά το οποίο σε μια κυτταρική καλλιέργεια όπου ακτινοβολήθηκε το 1% των κυττάρων με σωματίδια α, το 30% του κυτταρικού πληθυσμού παρουσίασε αυξημένο αριθμό ανταλλαγών αδερφών χρωματίδων [54]. Σε άλλα πειράματα έκτοτε χρησιμοποιήθηκε η μεταφορά του μέσου καλλιέργειας από τα ακτινοβολημένα στα μη ακτινοβολημένα κύτταρα αποδεικνύοντας την ύπαρξη παραγόντων που εκλύονται στο μέσο και προκαλούν αντιδράσεις στα μη ακτινοβολημένα κύτταρα. Άλλη ένδειξη επικοινωνίας και επαγωγής γονιδιωματικής αστάθειας μεταξύ επαπτόμενων κυττάρων φαίνεται να υπάρχει μέσω των χασμοσυνδέσεων (gap junctions) της κυτταρική μεμβράνης όπου φαίνεται να εμπλέκεται το σηματοδοτικό μονοπάτι της σφιγκομυελίνης [55]. Πειράματα ακόμη με μικροδέσμες ιοντίζουσας ακτινοβολίας φάνηκαν ιδιαίτερα χρήσιμα για την υποστήριξη της υπόθεσης ύπαρξης επιπτώσεων σε παρακείμενα κύτταρα [56]. Η ικανότητα στόχευσης μεγάλης ακρίβειας εκμηδένισε τις πιθανότητες για τυχόν

διασπορά της ακτινοβολίας και αύξησε τις τεχνικές δυνατότητες για την εκτέλεση σχετικών πειραμάτων. Με τη βοήθεια, τέλος, υπολογιστικών μοντέλων για την 3D αναπαράσταση συστημάτων ανθρώπινου ιστού υπάρχουν πλέον αρκετές αξιόπιστες μέθοδοι για την διερεύνηση των παρακείμενων αποτελεσμάτων.



Εικόνα 3.11: Τα αποτελέσματα της ΙΑ στους πληθυσμούς των ακτινοβολημένων και παρακείμενων κυττάρων

3.6.1.2 Επιδράσεις σε απομακρυσμένους ιστούς (abscopal effects)

Ως απόκριση απομακρυσμένου ιστού (AAI) θεωρούνται οι διάφορες αποκρίσεις στην ιοντίζουσα ακτινοβολία διαφορετικών ή όμοιων ιστών σε απομακρυσμένες θέσεις από την περιοχή της άμεσης ακτινοβολήσης. Ο όρος προέρχεται από τον αγγλικό όρο abscopal effect που έχει ρίζα ετυμολογικά το λατινικό ab που σημαίνει «μακριά από» και την λέξη scopus (σκοπός) που έχει προέλευση από τα αρχαία ελληνικά και σημαίνει στόχος. Η εισαγωγή του όρου προήλθε από τον Moile (1953) ως περιγραφή του γεγονότος της ακτινοθεραπείας όπου παρουσιάστηκε περιορισμός καρκινικών όγκων σε σημεία μακριά από την περιοχή στόχευσης [59]. Τα επόμενα χρόνια παρατηρήθηκαν και άλλα αποτελέσματα σε απομακρυσμένους φυσιολογικούς ιστούς όπως γονιδιωματική αστάθεια, κυτταρικός θάνατος, βλάβες στο DNA και κακοήθης μετασχηματισμός.

Η AAI θεωρείται από αρκετούς ως μέρος των παρακείμενων αποτελεσμάτων και υφίσταται ως διακριτή ΜΣΕ. Σε άλλες προσεγγίσεις εντάσσεται αποκλειστικά στο πλαίσιο της ακτινοθεραπείας και υποστηρίζεται παράλληλα πως η δόση της ακτινοβολίας είναι τόσο μεγάλη που δεν απορροφάται όλη στη στοχευμένη περιοχή. Καθώς παρουσιάζονται διάφορα φαινόμενα εξωτερικής και εσωτερικής διασποράς τέτοια φαινόμενα θεωρείται πως οφείλονται σε χαμηλή έκθεση στην ακτινοβολία ολόκληρου του σώματος [53]. Ωστόσο πειράματα με μικροδέσμες όπου η διασπορά είναι από πολύ μικρή έως μηδαμινή και δυσανάλογη σε κάθε περίπτωση των αποτελεσμάτων, όπως και άλλες ενδείξεις ως προς την εκδήλωση των αποτελεσμάτων και τους μηχανισμούς μετάδοσής τους φαίνεται να αντικρούουν την παραπάνω υπόθεση. Πρέπει εντούτοις να σημειώσουμε εδώ πως η διάκριση μεταξύ των "κοντινών" και "μακρινών" αποτελεσμάτων δεν είναι απόλυτα ξεκάθαρη καθώς και οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην επαγωγή τους δεν έχουν αποκρυσταλλωθεί ακόμα πλήρως.

Συνοψίζοντας, η ΑΑΙ θεωρούμε πως ορίζεται ως ένα μακρινό "εκτός πεδίου στόχευσης" αποτέλεσμα, αναφέρεται σε *in vivo* συνθήκες και μπορεί να έχει είτε θετικές είτε αρνητικές συνέπειες στους ιστούς όπου εμφανίζεται. Εκτός από την ΙΑ όμως και άλλοι στρεσογόνοι παράγοντες και ιδιαίτερα η ύπαρξη καρκινικών κυττάρων φαίνεται να επάγουν επίσης αντιδράσεις σε απομακρυσμένα σημεία. Ένας μεγάλος αριθμός κλινικών δεδομένων και διάφορων εργαστηριακών πειραμάτων αποδεικνύουν την ύπαρξη, το εύρος, την ποσότητα και την ποιότητα των παραπάνω απομακρυσμένων αποτελεσμάτων. Από την άλλη, σχετικά πρόσφατα γίνεται προσπάθεια να αποκρυπτογραφηθεί ο ακριβής τρόπος και οι παράγοντες που διαμεσολαβούν την επαγωγή τους. Τα έως τώρα ευρήματα υποδεικνύουν τη συμβολή και σημαντική παρουσία οξειδωτικού και αντιγραφικού στρες συνοδευόμενο από τοπικές και συστημικές φλεγμονώδεις αποκρίσεις, όπως θα δούμε και στη συνέχεια αναλυτικά.

3.6.1.3 Προσαρμοσμένη απόκριση (adaptive response)

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

3.6.1.4 Γονιδιωματική αστάθεια (genomic instability)

Η προκαλούμενη από ακτινοβολία γονιδιακή αστάθεια στα κύτταρα είναι μια διαδικασία που χαρακτηρίζεται από αυξημένο ρυθμό κυτταρογενετικών ανωμαλιών, μεταλλάξεις, ενισχύσεις

γονιδίων και κυτταρικό θάνατο στους απογόνους των ακτινοβολημένων κυττάρων αρκετές γενεές μετά την αρχική ακτινοβολήση. Οι περισσότερες μελέτες δεν έχουν εντοπίσει μια συμβατική δόση-απόκριση καθώς η απόκριση σε χαμηλότερες δόσεις που εξετάστηκαν, έδειξαν ότι δεν υπάρχει αύξηση του φαινομένου σε μεγαλύτερη δόση. Παρουσιάζεται σε κύτταρα της ακτινοβολημένης περιοχής όπως και σε εκείνα που βρίσκονται σε απομακρυσμένες περιοχές. Η σημασία της γονιδιακής αστάθειας αποτελεί βασικό ενισχυτικό παράγοντα διατάραξης της ομοιόστασης των κυττάρων. Η διαταραχή αυτή συνήθως οδηγεί σε παρατεταμένες φλεγμονώδεις αποκρίσεις του οργανισμού, δημιουργία οξειδωτικού ή αντιγραφικού στρες και περαιτέρω βλάβες του γονιδιώματος όπως ο κακοήθης μετασχηματισμός και οι σύνθετες ομαδοποιημένες βλάβες. Τέλος, με την παρατήρηση διαφόρων καταληκτικών σημείων (αλλά κυρίως των χρωμοσωματικών ανωμαλιών) έχουν διαπιστωθεί αρκετές διαφορές στην έκφραση της γονιδιακής αστάθειας οφείλονται στον γενότυπο και σε άλλους παράγοντες δημιουργώντας ένα μη ξεκάθαρο τοπίο ακόμη έτσι ώστε να μπορούμε να βγάλουμε ασφαλή συμπεράσματα [120].

3.6.2 Μηχανισμοί επαγωγής ΜΣΕ

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

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

3.6.2.1 Οξειδωτικό στρες

Η έντονη και παρατεταμένη παρουσία οξειδωτικού στρες, η διαταραχή δηλαδή της ισορροπίας μεταξύ των δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species - ROS) και αζώτου (Reactive Nitrogen Species – RNS) και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών των κυττάρων, σχετίζεται άμεσα με την εμφάνιση ΜΣΕ σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου

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

3.6.2.2 Δραστικές μορφές οξυγόνου/αζώτου (ROS/RNS)

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου μπορούν είτε να δημιουργηθούν άμεσα στα ακτινοβολημένα κύτταρα είτε μέσω σηματοδοτικών μονοπατιών να προκληθεί η παραγωγή τους σε παρακείμενα ή απομακρυσμένα κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα, οι ROS εκτός από την πρόκληση οξειδωτικού στρες τοπικά μπορούν να μεταφέρουν διακυτταρικά, ανάλογα με την εμβέλεια τους, και να λειτουργήσουν ως μεταδότες του στρες σε άλλες περιοχές. Αφού δημιουργηθούν ως προϊόντα της ραδιόλυσης ή έμμεσα από φλεγμονώδεις αντιδράσεις στη συνέχεια μεταφέρονται μέσω των χασμοσυνδέσεων στα κύτταρα που είναι σε επαφή ή μέσω διάχυσης στο μέσο σε παρακείμενα κύτταρα [83]. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου περιλαμβάνουν ελεύθερες ρίζες, όπως η υδροξυλική ρίζα, ιόντα όπως το υποχλωριώδες ανιόν (ClO^-), συνδυασμούς ελευθέρων ριζών και ιόντων, όπως το ανιόν υπεροξειδίου ($\cdot\text{O}_2^-$) και μόρια όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) [5]. Από αυτές ή μόνη που δεν είναι πολύ δραστική είναι το H_2O_2 καθώς οι υπόλοιπες αντιδρούν αφού διανύσουν σε λίγα νανόμετρα προκαλώντας αλλοιώσεις σε διάφορα βιομόρια. Η μεγαλύτερη διάρκεια ζωής της H_2O_2 (έχοντας σταθερά διάχυσης $2.3 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$) της δίνει τη δυνατότητα να κινηθεί στον οργανισμό μέσω του πλάσματος και να προκαλέσει βλάβες σε μακρινές θέσεις. Παραγωγή H_2O_2 έχουμε και από ένζυμα όπως η NAD(P)H οξειδάση που είναι προσδεσμένη στην κυτταρική μεμβράνη και φαίνεται να παίζει ρόλο στην αύξηση των ROS σε ακτινοβολημένα αλλά και παρακείμενα κύτταρα [83]. Ακόμη, η ενεργοποίηση του ενζύμου COX-2 που συμμετέχει στην δημιουργία προσταγλανδινών από προφλεγμονώδεις κυτοκίνες οδηγεί σε μεγάλη παραγωγή ROS στο εσωτερικό των κυττάρων [50].

Η σημασία των δραστικών μορφών αζώτου, τόσο ως μέσο διάδοσης όσο και ως αιτία επαγωγής οξειδωτικού στρες, έχει αποδειχτεί σε πολλές περιπτώσεις και ειδικά μέσω πειραμάτων με χρήση συγκεκριμένων αντιοξειδωτικών ουσιών [85]. Ο ρόλος του νιτρικού οξειδίου (Nitric Oxide - NO) έχει μελετηθεί ιδιαίτερα καθώς φαίνεται να παίζει τον σημαντικότερο ρόλο. Το NO^* είναι ένα μικρό λιποφιλικό μόριο που διαχέεται σε σχετικά μεγάλες αποστάσεις ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά. Το ίδιο συνήθως δεν μπορεί να προκαλέσει σοβαρές βλάβες καθώς δεν αντιδρά με τα περισσότερα

βιολογικά συστατικά των κυττάρων (εκτός της αίμης). Εντούτοις, αντιδρώντας με το $\cdot\text{O}_2^-$ δημιουργεί το περοξυνιτρικό ανιόν (ONOO^-) το οποίο είναι ιδιαίτερα δραστικό όπως η υδροξυλική ρίζα [5]. Αυξημένα επίπεδα NO^* προκαλούν βλάβες σε λιπίδια, θειόλες και στις βάσεις του DNA (μέσω απαμίνωσης) που μπορούν να οδηγήσουν, αν δεν επιδιορθωθούν σε μεταλλάξεις, μονόκλωνες ή δίκλωνες θραύσεις. Μπορούν, επίσης, να προκληθούν βλάβες στις πρωτεΐνες των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA (ή σε άλλες πρωτεΐνες) ή μέσω λιπιδικής περοξειδωσης και ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού του αρδονικού οξέος να παραχθούν φλεγμονώδεις παράγοντες, επιβλαβείς για το DNA [83]. Σε άλλα πειράματα φαίνεται πως το NO^* που εκλύεται από ακτινοβολημένα κύτταρα προκαλεί αυξημένη έκφραση των p53 και hsp72 σε παρακείμενα μη ακτινοβολημένα κύτταρα γλοιοβλαστώματος (wild type) μέσω της διακυτταρικής μεταφοράς τους στο μέσο καλλιέργειας [57]. Τέλος, αυξημένη παραγωγή NO^* μπορεί να επάγεται ενδοκρινικά και παρακρινικά μέσω της αυξορύθμισης της έκφρασης των γονιδίων iNOS και NOX μετά από ακτινοβολήση, φαινόμενο που συνοδεύεται από προβληματική λειτουργία των μιτοχονδρίων [84].

3.6.2.3 Οξειδωμένο εξωπυρηνικό DNA

Το αλλοιωμένο ή οξειδωμένο DNA λειτουργώντας ως DAMP υποδεικνύεται από αρκετές έρευνες ως σημαντικό σήμα στρες για ολόκληρο τον οργανισμό, επάγωντας προσαρμοσμένη απόκριση, παραγωγή ROS και άλλες ΜΣΕ σε μακρινές περιοχές. Για το λόγο αυτό θα εξετάσουμε το ρόλο του, τα ιδιαίτερα ποιοτικά του χαρακτηριστικά και τα αποτελέσματα που προκαλεί σε αυτή την παράγραφο διακριτά. Όπως είδαμε, ακτινοβολημένα κύτταρα, καρκινικά κύτταρα ή γενικότερα κύτταρα που έχουν υποστεί έντονο στρες όταν πεθαίνουν απελευθερώνουν στο περιβάλλον το λεγόμενο εξωπυρηνικό DNA (extracellular DNA – ecDNA ή αλλιώς cell free DNA). Τα κύτταρα αυτά υφιστάμενα σοβαρές οξειδωτικές βλάβες και DSBs εκκινούν την αποπτωτική διαδικασία και εκλύουν πυρηνικό DNA που έχει υποστεί εκτεταμένες αλλοιώσεις [83,92]. Εκείνο, στην συνέχεια, όπως είδαμε ανιχνεύεται από τους ειδικούς αισθητήρες που βρίσκονται στην επιφάνεια ή στο εσωτερικό άλλων κυττάρων που έχουν την ικανότητα βιοχημικής αναγνώρισης της δομής του. Η διάκριση που κάνουν οι αισθητήρες PRR, όπως σημειώσαμε προηγουμένως, αφορά όχι μόνο στο ξένο-ενδογενές αλλά και στο αλλοιωμένο-ακέραιο DNA [90]. Οι αλλαγές που το μετατρέπουν σε σήμα κινδύνου πιθανότατα είναι η έκταση των οξειδωτικών βλαβών (κυρίως της 8-oxodG) και ο αυξημένος αριθμός ζευγών GC σε σχέση με τα AT. Υπάρχουν ενδείξεις πως CG-rich ολιγονουκεοτίδια αναγνωρίζονται καλύτερα τον υποδοχέα TLR9. Ακόμη, η πρωτεΐνη HMGB1 που ως σύμπλεγμα με τμήματα DNA ενεργοποιεί έντονα τον TLR9 φαίνεται να προσδένεται περισσότερο σε DNA πλούσιο σε αλλοιωμένες βάσεις. Στις παραπάνω περιπτώσεις παρατηρείται, διαμέσου του μονοπατιού TLR9-Myd88, ενεργοποίηση των ρυθμιστικών παραγόντων NF-κB και IRF7 (IFN-regulatory factor 7) και ακόλουθη σύνθεση ROS και RNS ή παραγωγή των κυτοκίνων TNFα, IL-1, IL-6 και IFN τύπου 1. Πολλοί ακόμη υποδοχείς PRRs αναγνωρίζουν το dsDNA/ecDNA όπως ο STING, ο AIM2, ο IFI16, ο Ku-70, ο DAI και ο RIG-1 επάγοντας στην συνέχεια απόπτωση ή παραγωγή προφλεγμονώδων ή αντιφλεγμονώδων κυτοκίνων ανάλογα με τον ενεργοποιημένο υποδοχέα [84,90,92].

Ιδιαίτερη αναφορά αξίζει να κάνουμε στην απόκριση των ενδοθηλιακών κυττάρων στο ecDNA/dsDNA καθώς ως λειτουργικός και ανατομικός φραγμός μεταξύ του κυκλοφορικού

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

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

3.6.2.4 Σύνδεση βλαβών με το ανοσοποιητικό σύστημα

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

Τέλος, η αναγνώριση αλλοιωμένου πυρηνικού DNA με τη διαμεσολάβηση των παραπάνω αισθητήρων λόγω της σύνθετης λειτουργίας τους όπως είδαμε, στέλνει σήματα κινδύνου από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα ενεργοποιώντας το ανοσοποιητικό σύστημα. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει την ενεργοποίηση ρυθμιστικών πυρηνικών παραγόντων, ρίζες κυτταρικής

επιφάνειας (όπως οι MICA, MICB, ULBP1-6) και ενδοκυτταρικά προσκολλητικά μόρια [91]. Η έντονη παρουσία βλαβών DNA και η συνεχής ενεργοποίηση του DDR με την έκλυση φλεγμονώδων παραγόντων και την επαγωγή οξειδωτικού στρες προκαλεί μια αυτοενισχυόμενη διαδικασία ανοσολογικής αντίδρασης οδηγώντας στην παρουσία χρόνιας φλεγμονής η οποία μπορεί να οδηγήσει σε εκφυλισμό, καρκινογενέσεις ή θάνατο των κυττάρων τόσο τοπικά όσο και συστημικό επίπεδο.

3.6.2.5 Ανοσοποιητικό σύστημα και φλεγμονώδεις αποκρίσεις

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

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

Κατά την επιδιόρθωση ή την αντιγραφή του DNA δημιουργούνται διάφορα παραπροϊόντα όπως τμήματα RNA και DNA που αν δεν αποσυντεθούν, λειτουργούν δυνητικά ως ρίζες που ενεργοποιούν τους υποδοχείς PRRs. Για το λόγο αυτά ειδικά ένζυμα (DNAάσες) αποδομούν τα παραπάνω μόρια για να μην αναγνωριστούν ως ξένα από αισθητήρες του κυτταροπλάσματος στο

ίδιο κύτταρο ή από αισθητήρες άλλων αν εκλυθούν στο περιβάλλον. Ωστόσο, υπό συνθήκες κυτταρικού στρες ή έλλειψης των DNAασών τα μόρια αυτά εκλαμβάνονται ως σήματα κινδύνου και εμφανίζονται αυτοάνοσες αντιδράσεις [91].

3.6.2.6 Κυτοκίνες

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

Μέχρι αυτό το σημείο έχουμε δει πολλές κυτοκίνες να συνοδεύουν την εμφάνιση διάφορων ΜΣΕ. Μερικές βασικές κυτοκίνες και ο τρόπος με τον οποίο εμπλέκονται στην επαγωγή ΜΣΕ θα μελετήσουμε στην συνέχεια. Κυτοκίνες όπως η TNF-α, η IL-1β, η IL-33 και η PDGF επάγουν μέσω της ενεργοποίησης του παράγοντα NF-κβ, που ρυθμίζει την έκφραση των COX-2 και iNOS, την αυξημένη παραγωγή ROS και RNS αντίστοιχα [47,97]. Η TNF-α, ακόμα, μπορεί να ενεργοποιήσει τα σηματοδοτικά μονοπάτια της οικογένειας κινασών MAPK που περιλαμβάνουν τις: ERK (extracellular signal-related kinase), JNK (c-Jun N-terminal kinase) και p38 οι οποίες μέσω της ενεργοποίησης της ρυθμιστικής πρωτεΐνης AP-1 (activation protein-1) αυξάνουν επίσης την έκφραση των COX-2 και iNOS [83]. Οι TGF-β, IGF, IL-1 και IL-8 οδηγούν επίσης στην παραγωγή ROS και RNS μέσω της έκφρασης του COX-2 στα ίδια ή σε παρακείμενα κύτταρα μέσω του μονοπατιού των MAPK και ειδικότερα των κινασών MEK1/2 και MKK3/6 και p38 [84]. Για την επιβεβαίωση του προηγούμενου μηχανισμού πραγματοποιήθηκε πείραμα όπου χρησιμοποιήθηκε αναστολέας της δράσης της MEK1 και στο οποίο εμφανίστηκε μειωμένη επίπτωση στα παρακείμενα κύτταρα [98]. Ο TGF-β1, επίσης, όταν εκλύεται από ακτινοβολημένα κύτταρα επάγει την παραγωγή ROS ενεργοποιώντας την οξειδάση NAD(P)H στην επιφάνεια άλλων κυττάρων. Η IL-6, από την άλλη, όταν προσδεθεί σε κάποιο παρακείμενο κύτταρο ενεργοποιεί την κινάση JAK2 (janus-kinase 2) και το μονοπάτι του STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) που οδηγεί στη συνέχεια στην ενεργοποίηση του παράγοντα NF-κβ [82]. Σε μεγάλο βαθμό, από όσα γνωρίζουμε ως τώρα, τα παραπάνω σηματοδοτικά μονοπάτια αποκρίνονται και μετά την ενεργοποίηση των υποδοχέων PRR [84,90].

Η χρήση αναστολέων της δράσης των κυτοκίνων έχουν δείξει αρκετά πειράματα πως μειώνει τις ΜΣΕ όπως την αύξηση των ROS και την μικροπυρήνωση [99]. Ωστόσο, η σηματοδότηση μέσω των κυτοκίνων και αυξητικών παραγόντων, όπως ο TGF-β1, συνδέεται και με την εμφάνιση θετικών πλευρών των ΜΣΕ σε περιπτώσεις καταστολής του καρκίνου και ανάπτυξης ίνωσης [46,47]. Τέλος, έρευνες έχουν δείξει πως φλεγμονώδεις αντιδράσεις διαμέσου κυτοκίνων, λόγω κυτταροτοξικού

περιβάλλοντος, οδηγούν στην αυξημένη έκφραση του προσκολλητικού μορίου ICAM-1 σε παρακείμενα κύτταρα μέσω του NF-κΒ και της ενεργοποίησης της p53 (wild type) [100]. Η αυξημένη έκφραση κυτοκίνων και προσκολλητικών μορίων έχει ως αποτέλεσμα την επιστράτευση των ανοσοκυττάρων στην περιοχή.

3.6.2.7 Μακροφάγα και άλλα ανοσοκύτταρα

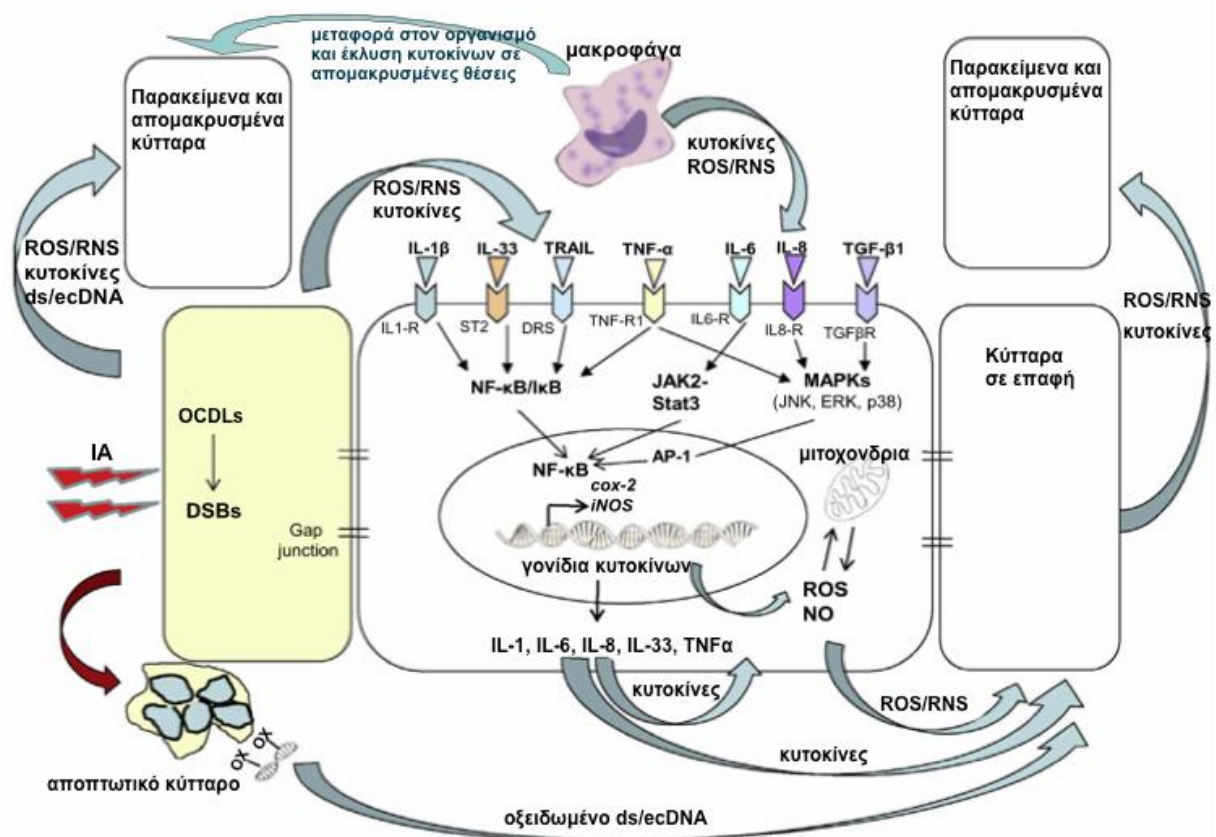
Τα μακροφάγα είναι κύτταρα που χρησιμοποιούνται τόσο από το εγγενές όσο και από το επίκτητο ανοσοποιητικό σύστημα και επιστρατεύονται στα σημεία της φλεγμονής εκλύοντας ένα σύνολο κυτοκίνων, ROS και RNS. Ακτινοβολημένα ή προσβεβλημένα κύτταρα απελευθερώνουν παράγοντες (όπως οι κυτοκίνες) που διαφοροποιούν τα μονοκύτταρα σε μακροφάγα τα οποία στη συνέχεια προσελκύονται στα σημεία αυτά μαζί με άλλα ανοσοκύτταρα όπως είναι τα ουδετερόφιλα, τα Τ-λεμφοκύτταρα και τα δενδρικά κύτταρα [101]. Ωστόσο, ανάλογα με τον τρόπο ενεργοποίησης τους τα μακροφάγα παρουσιάζουν διαφορετικούς φαινότυπους.

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

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

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

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



Εικόνα 3.12: Οι ενδοκυτταρικές και διακυτταρικές αποκρίσεις που επάγονται μετά από την ακτινοβόληση των κυττάρων. Παρουσιάζονται τα κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται αυτοκρινικά και παρακρινικά από κυτοκίνες και ROS/RNS, βασικές κυτοκίνες που εκκρίνονται από ανοσοκύτταρα ή άλλα κύτταρα και η διαμεσολάβηση του οξειδωμένου εξωκυτταρικού DNA (ds/ecDNA) και των μακροφάγων στις αποκρίσεις παρακείμενων και απομακρυσμένων κυττάρων [47,83,84].

Κεφάλαιο 4^ο

ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΒΛΑΒΩΝ DNA ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ

4.1 Εισαγωγή

Όπως είδαμε και στο προηγούμενο κεφάλαιο η ΙΑ επιφέρει μια σειρά από βλάβες στο DNA των κυττάρων ενός οργανισμού. Εκτός από τις εξωγενείς αυτές βλάβες που θα μπορούσαν να οφείλονται και σε άλλους φυσικούς ή χημικούς παράγοντες (πχ. κυτταροτοξικά φάρμακα) υπάρχουν και οι ενδογενείς βλάβες που εντοπίζονται στο κύτταρο λόγω εσωτερικών παραγόντων (πχ. οξειδωτικές βλάβες, επιδιόρθωση εκτομής, απόπτωση). Από το σύνολο των βλαβών που μπορεί να προκληθούν οι πιο θανατηφόρες και άρα σημαντικές για την εξαγωγή χρήσιμων συμπερασμάτων είναι οι ομαδοποιημένες και σύνθετες βλάβες στο DNA. Για το λόγο αυτό τα DSBs και οι OCDLs αποτελούν γενικά, και ειδικά για τη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, αντικείμενο ιδιαίτερου ερευνητικού ενδιαφέροντος καθώς επιτρέπουν την πρόβλεψη της τοξικότητας στα κύτταρα ή και το θάνατό τους.

Για την ανίχνευση των DSBs και των OCDLs μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε μια πληθώρα μεθόδων. Μερικές από αυτές είναι η comet assay, η liquid chromatography with mass spectrometry (LC/MS) ή η μέθοδος εστιών γ-H2AX. Η μέθοδος ωστόσο που επιλέξαμε εμείς είναι εκείνη της αριθμητικής ανάλυσης μέσου μήκους (Number Average Length Analysis – NALA) σε εικόνες πηκτώματος αгарόζης, η οποία αποτελεί μια ιδιαίτερης ακριβείας τεχνική που είναι ιδανική για εντοπισμό βλαβών σε κοντινή σχετικά μεταξύ τους απόσταση σε απέναντι κλώνους. Ένα από τα πλεονέκτημα της συγκεκριμένης τεχνικής σε σχέση με τις άλλες είναι ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό των βλαβών ακριβώς μετά την αρχική ακτινοβολήση, πριν ξεκινήσουν οποιεσδήποτε βιολογικές ή βιοχημικές διαδικασίες. Επίσης με την τεχνική αυτή μας δίνεται η δυνατότητα να μετρήσουμε και βλάβες οι οποίες είναι στον ένα κλώνο, χρησιμοποιώντας κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα που συμμετέχουν σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA (BER) για να τις μετατρέψουμε σε δίκλωνες. Με τον τρόπο αυτό κρατείται άθικτη η γεωμετρία των ομαδοποιημένων βλαβών, πράγμα που είναι αδύνατο με τις συμβατικές μεθόδους [108].

Ωστόσο και αυτή η τεχνική, όπως όλες, έχει μερικά σημεία που χρήζουν προσοχής. Για παράδειγμα, η δράση των ενζύμων ενδέχεται να διαφέρει στις περιπτώσεις όπου η βλάβη που θα κληθούν να αναγνωρίσουν βρίσκεται σε μια απομονωμένη θέση αλλοίωσης ολιγονουκλεοτιδίου και όχι ανάμεσα σε μια συστάδα θέσεων αλλοίωσης που βρίσκονται σε ακτινοβολημένο DNA. Επίσης όταν αυτές οι συστάδες θέσεων αλλοίωσης περιέχουν πολλές βλάβες μαζεμένες (συμπλέγματα υψηλής πυκνότητας – high density clusters) ή έχουν συγκεκριμένη σύνθεση και διαμόρφωση ενδέχεται τα ένζυμα να έχουν μη βέλτιστη δράση. Παρόλα αυτά τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται, αλλά και η μέθοδος αυτή εν γένει, είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για την αναγνώριση και ποσοτικοποίηση μιας ευρείας κατηγορίας βλαβών [108,109].

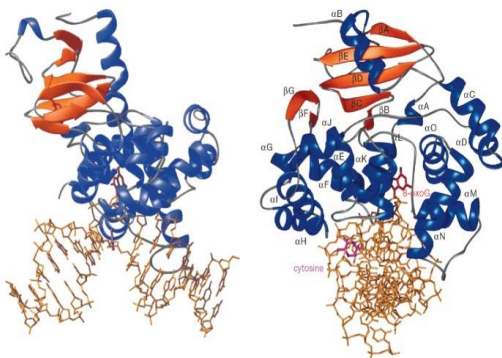
4.2 Ο ρόλος των ενζύμων του μηχανισμού BER

4.2.1 Η λειτουργία της γλυκοσυλάσης hOGG1

Τα ένζυμα που συμμετέχουν στον μηχανισμό BER αποτελούν τον καλύτερο φυσικό ανιχνευτή πληθώρας αλλοιώσεων του DNA, μεταξύ των οποίων είναι και οι OCDLs. Από την εύρυθμη λειτουργία τους εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό η διατήρηση της ακεραιότητας του γενετικού υλικού και τελικά η επιβίωση του κυττάρου. Τον πιο σημαντικό ρόλο σε αυτή τη διαδικασία παίζουν οι DNA γλυκοσυλάσες, καθώς είναι υπεύθυνες για την αρχική αναγνώριση και εκτομή των αλλοιωμένων βάσεων.

Η hOGG1 είναι μια διλειτουργική DNA γλυκοσυλάση, η οποία είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση και την αφαίρεση γενοτοξικών αλλοιώσεων που προκαλούνται από οξειδωτικό στρες λόγω ROS. Είναι μονομερές που ανήκει σε μια υπερ-οικογένεια ενζύμων επιδιόρθωσης DNA, τα οποία μοιράζονται μια προστατευμένη πτυχή διπλού πεδίου που περιέχει ένα μοτίβο για τη δέσμευση DNA (έλικα-φουρκέτα-έλικα), ακολουθούμενη από έκταση πλούσια σε γλυκίνη/προλίνη και ένα αμετάβλητο ασπαρτικό οξύ [121]. Το συγκεκριμένο μοτίβο είναι απαραίτητο για την αλληλεπίδραση του ενζύμου με το DNA, ώστε να αναγνωρίσει και να καταλύσει το υπόστρωμα [122]. Επίσης, η hOGG1, συνδέεται με δύο ιόντα ασβεστίου τα οποία βοηθούν στη σταθεροποίηση της παραμορφωμένης έλικας του DNA στο σημείο της εκτομής [2]. Όντας μια από τις λίγες διλειτουργικές γλυκοσυλάσες (μαζί με την hNTH1 και την hNEIL1) μπορεί να συμπεριφέρεται όχι μόνο ως N-γλυκοσυλάση εξαγοντας την βάση που έχει υποστεί βλάβη, αλλά και ως AP-λυάση κόβοντας την αλυσίδα του DNA στο σημείο της αλλοίωσης.

Πιο συγκεκριμένα η hOGG1 αναγνωρίζει και επιδιορθώνει τη βάση 7,8-διυδρο-8-οξογουανίνη (8-οξογουανίνη/ 8-οχοG, GO), η οποία μπορεί να κάνει δεσμό με αδενίνη δημιουργώντας μεταστροφή από G:C σε T:A. Ο τρόπος που λειτουργεί είναι με το να προσδέεται στο DNA και να βάζει τις βάσεις στα ενεργά του πεδία με σκοπό να αναγνωρίσει τυχόν αλλοιώσεις (Εικόνα 4.1). Εφόσον αναγνωρίσει μια τέτοια βάση η hOGG1 έχει δυνατότητα να σπάσει τον N-γλυκοσυλικό δεσμό μεταξύ της βάσης αυτής και της δεσοξυριβόζης, αφήνοντας πίσω ένα απουρινικό-απουριμιδικό (AP) σημείο. Στη συνέχεια κόβει το 3' άκρο του AP σημείου αφήνοντας ελεύθερα το 5' και το 3'-φωσφο-α, β-ακόρεστη αλδεΐδη [1].



Εικόνα 4.1: 3D απεικόνιση της hOGG1 (μπλε, α-έλικες; πορτοκαλί, β-φύλλα; γκρι, στοιχεία χωρίς δευτερεύουσα δομή) και του τρόπου που προσδέεται πάνω ένα ολιγονουκλεοτίδιο DNA 15-ζευγών βάσεων (χρυσό). Με κόκκινο και μωβ έχουμε την οξογουανίνη και την απέναντι βάση της αντίστοιχα. Η οξογουανίνη βρίσκεται εκτός έλικας μέσα στο ενεργό πεδίο του ενζύμου, ενώ η κυτοσίνη εντός. Το DNA έχει καμφθεί κατά ~70° στο σημείο εκείνο. (Bruner S.D., Norman D.P.G., Verdine G.L. (2000) Nature. 403. 859–866, copyright 2000)

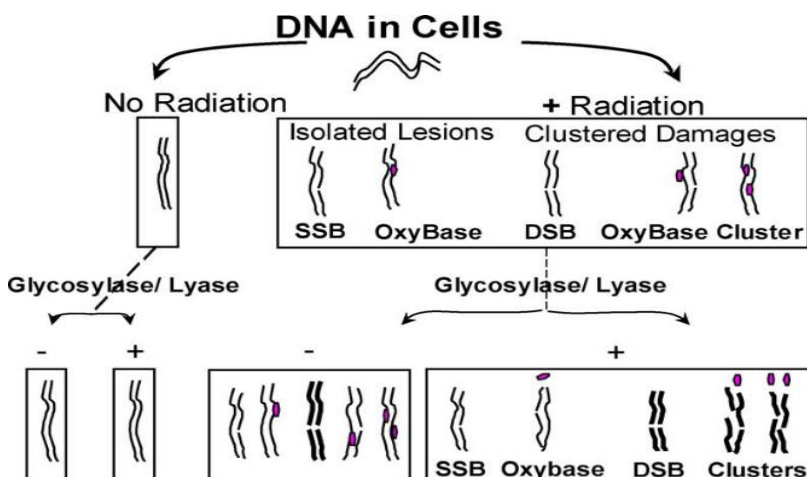
4.3 Μέθοδος ανίχνευσης των βλαβών

4.3.1 Επώαση του DNA με το ένζυμο και δημιουργία των DSBs

Η επώαση του DNA είναι μια διαδικασία κατά την οποία προσπαθούμε, *ex vivo*, να δημιουργήσουμε τις κατάλληλες συνθήκες για τη λειτουργία των ενζύμων. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι θα πρέπει να δημιουργήσουμε ένα τέτοιο περιβάλλον μέσα στο δείγμα, το οποίο θα βοηθήσει το ένζυμο να ενεργοποιηθεί και να κάνει την δουλειά που κάνει στο φυσικό του περιβάλλον μέσα στον πυρήνα του κυττάρου.

Το DNA που θα μελετηθεί μπορεί να προέρχεται είτε από πειραματόζωα είτε από κυτταροκαλλιέργειες που έχουν ακτινοβοληθεί. Καθώς θέλουμε να μελετήσουμε την απόκριση του οργανισμού στην ΙΑ σε συστημικό επίπεδο θα προτιμήσουμε DNA απομονωμένο από ιστούς πειραματόζωου. Θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη σημασία στον τρόπο με τον οποίο θα εξαχθεί το DNA, επειδή θα πρέπει να έχει το μέγιστο δυνατό μήκος και να αποφευχθούν μονόκλωνες ή δίκλωνες ρήξεις.

Όπως ξέρουμε τα ένζυμα λειτουργούν διαφορετικά σε συμπλέγματα βλαβών απ' ότι θα δρούσαν σε μεμονωμένες βλάβες, ενώ ανάλογα με τη μορφή του συμπλέγματος έχουν και διαφορετική αποτελεσματικότητα. Παρόλα αυτά υπάρχουν μια σειρά από παράγοντες που βοηθούν τη διαδικασία να εξελιχθεί ομαλά αποφεύγοντας άλλες επενέργειες. Ο πρώτος και ίσως σημαντικότερος παράγοντας είναι η θερμοκρασία. Θα πρέπει να χρησιμοποιήσουμε ειδικό μηχανήμα πέψης το οποίο θα μπορέσει να ανεβάσει τη θερμοκρασία των δειγμάτων, κοντά στη θερμοκρασία του σώματος (~37 °C), και να τη διατηρήσει εκεί για όση ώρα χρειάζεται το ένζυμο για να δουλέψει. Ένας δεύτερος παράγοντας που επηρεάζει τη διαδικασία είναι η ύπαρξη κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος. Τόσο η συγκέντρωση του όσο και το κατάλληλο pH παίζουν σημαντικό ρόλο στην σωστή ενεργοποίηση του ενζύμου. Ακόμα, ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δοθεί ώστε η συγκέντρωση του ενζύμου να είναι όση χρειάζεται, ανάλογα με εκείνη του δείγματος DNA. Τέλος, όλα τα ένζυμα απαιτούν την ύπαρξη συμπαραγόντων (πχ. Mn^{2+} ,) στο ρυθμιστικό διάλυμα για να ρυθμίζεται έτσι η ιοντική ισχύς του διαλύματος. Μετά το πέρας της επώασης χορηγείται στα δείγματα ειδικό stopping solution για να απενεργοποιήσει το ένζυμο και να το αποδεσμεύσει από το DNA.



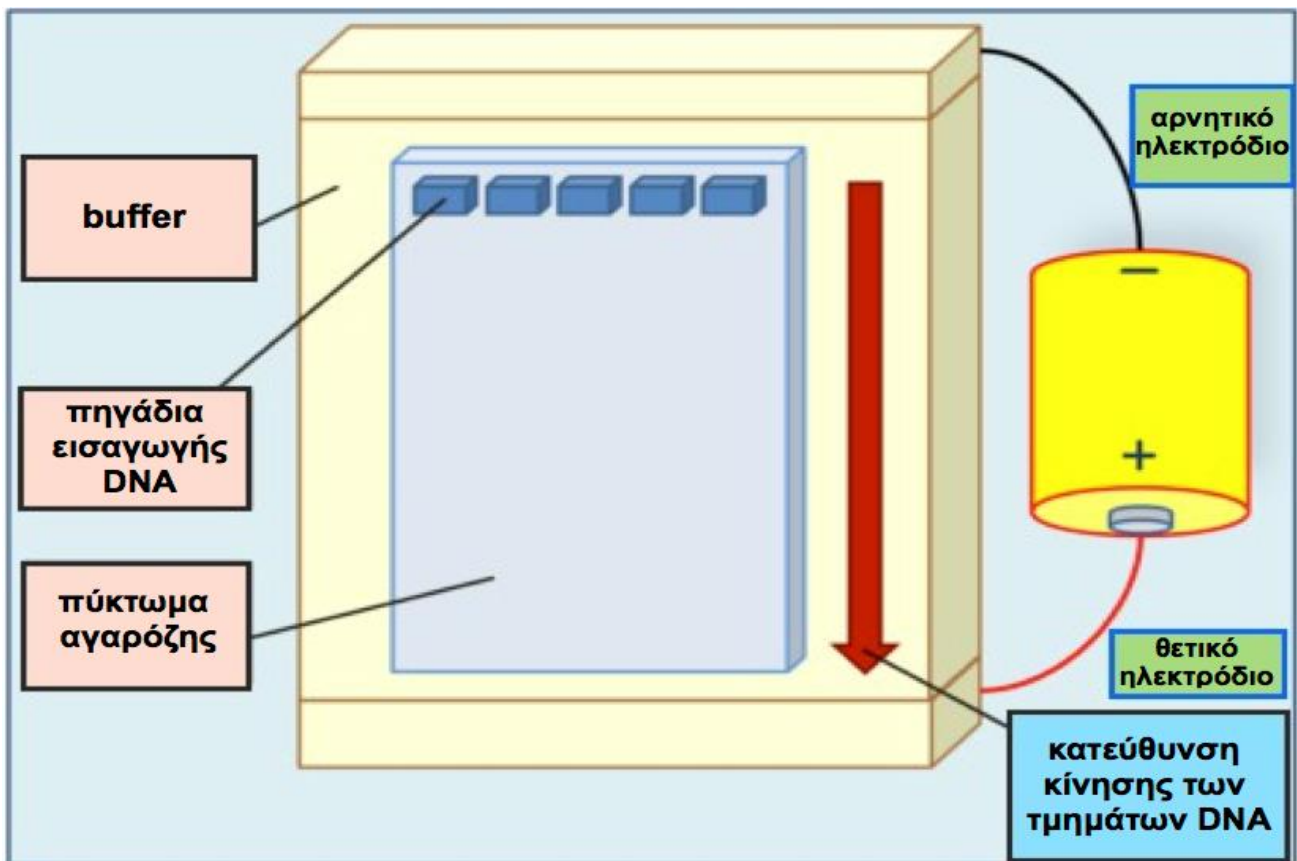
Εικόνα 4.2: Απεικόνιση του τρόπου δημιουργίας των θραύσεων μετά την επώαση του DNA με τα περιοριστικά ένζυμα.

4.3.2 Απεικόνιση των αποτελεσμάτων

Αφού λειτουργήσει το ένζυμο στα δείγματα DNA και δημιουργηθούν τα DSBs στα σημεία που υπάρχουν OCDLs χρειαζόμαστε μια μέθοδο για να απεικονίσουμε τα αποτελέσματα. Το πρώτο βήμα προς αυτή την κατεύθυνση θα γίνει με τον διαχωρισμό των τετμημένων μορίων του DNA που προέκυψαν. Για τον διαχωρισμό φορτισμένων μορίων υπάρχουν δύο μέθοδοι που μπορούν να χρησιμοποιηθούν, η χρωματογραφία (ιδανική για μικρά μόρια) και η ηλεκτροφόρηση (ιδανική για πρωτεΐνες και άλλα παρόμοια μόρια). Καθώς εμείς θέλουμε να διαχωρίσουμε μόρια DNA θα προτιμήσουμε την τεχνική της ηλεκτροφόρησης, η οποία είναι μια τεχνική όπου το αρνητικά φορτισμένο DNA διαχωρίζεται με τη χρήση ηλεκτρικού πεδίου προερχόμενο από δύο ηλεκτρόδια. Πιο συγκεκριμένα, η έλξη που δημιουργείται στα μόρια διαφορετικών μεγεθών του DNA προς το αντίθετα φορτισμένο ηλεκτρόδιο λόγω της δύναμης Coulomb, θα τα κάνει να «τρέχουν» σε ένα μέσο με διαφορετικές ταχύτητες διαχωρίζοντάς τα.

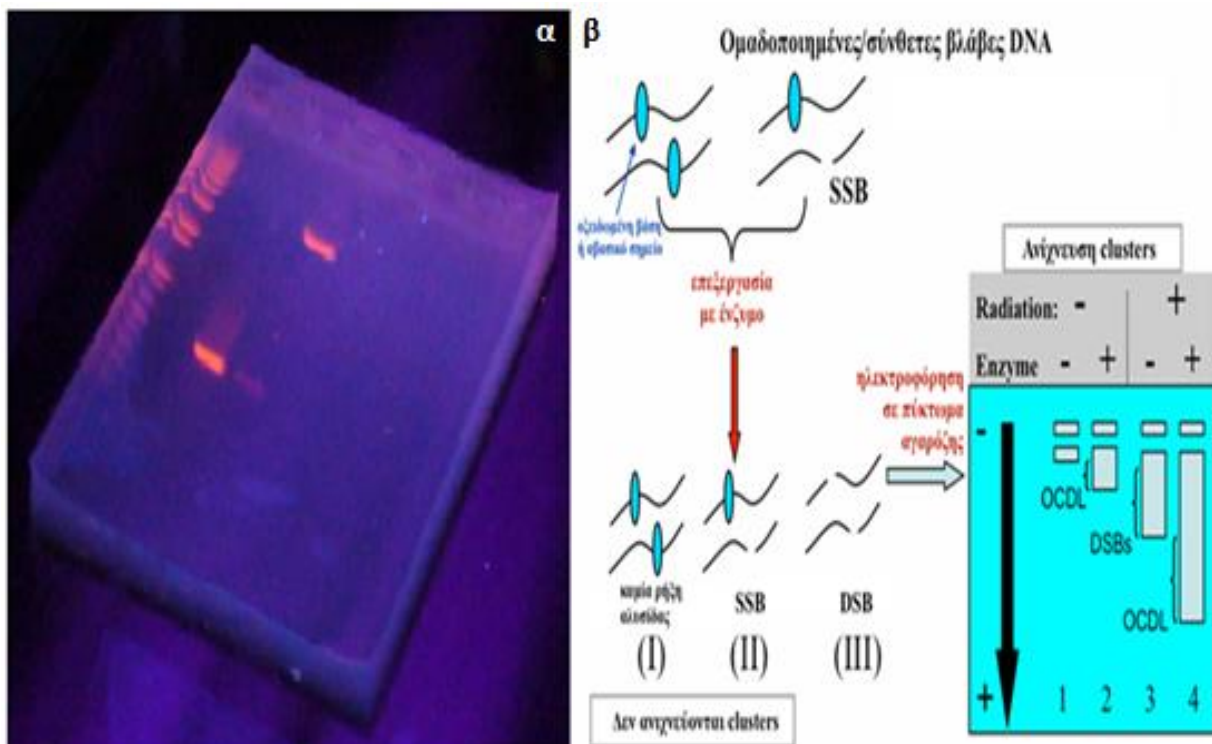
Υπάρχουν δύο είδη ηλεκτροφόρησης, η ηλεκτροφόρηση ελεύθερου διαλύματος (γνωστή και ως τριχοειδής ηλεκτροφόρηση) και η ηλεκτροφόρηση υποστηρικτικού μέσου (χαρτί, φιλμ, πήκτωμα). Για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας είναι καλύτερο να χρησιμοποιήσουμε ηλεκτροφόρηση πηκτώματος, το οποίο θα έχει μορφή πλάκας (αντί για σωληνοειδές) και διαχωρίζει τα μόρια εισάγοντας μια δράση κοσκινίσματος. Ανάλογα με τα μεγέθη στα οποία θα βασιστεί, υπάρχουν τρεις τρόποι για να γίνει ο διαχωρισμός των μορίων. Εμείς θα προτιμήσουμε τον εγγενή διαχωρισμό έναντι αυτού της μετουσίωσης ή άλλων (IEF, 2-D) που διαχωρίζει τα μόρια με βάση το μέγεθος αλλά και το φορτίο. Πιο συγκεκριμένα θα βασιστούμε σε ένα συνεχές σύστημα όπου το ρυθμιστικό διάλυμα είναι ίδιο τόσο για το πήκτωμα όσο και για τη δεξαμενή και το πήκτωμα θα είναι μονοφασικού τύπου (αγαρόζης).

Όσο αφορά τις παραμέτρους που μπορούν δυνητικά να επηρεάσουν το διαχωρισμό των μορίων, αυτές θα είναι τα χαρακτηριστικά του πηκτώματος, τα χαρακτηριστικά του ρυθμιστικού διαλύματος, η θερμοκρασία και το είδος των δειγμάτων. Από τα χαρακτηριστικά του πηκτώματος, εκείνα που μπορούν να καθορίσουν την ταχύτητα διαχωρισμού των μορίων είναι το ιξώδες, η πυκνότητα και το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος. Στα ρυθμιστικά διαλύματα σημαντικό ρόλο παίζουν η σύνθεση των επί μέρους διαλυμάτων που τα απαρτίζουν, η ιοντική τους ισχύς, η αγωγιμότητα και η συγκέντρωση αυτών. Ακόμα, η διαχείριση της θερμοκρασίας είναι ζωτικής σημασίας για την επίτευξη καλών αποτελεσμάτων. Στην περίπτωσή μας λόγω χάριν, δηλαδή του διαχωρισμού DNA, είναι απαραίτητη η διατήρηση χαμηλής θερμοκρασίας ώστε να αποφύγουμε την αποδόμηση των μορίων ή του πηκτώματος αλλά και για την αποφυγή βαθμιδώσεων. Τέλος ανάλογα με το είδος του μορίου χρειαζόμαστε διαφορετική προσέγγιση (πχ. εγγενή διαχωρισμό για δίκλινα μόρια, μετουσίωση για μονόκλινα).



Εικόνα 4.3: Διάταξη ηλεκτροφόρησης όπου φαίνονται τα πηγάδια εισόδου των μορίων DNA στο πήκτωμα αγαρόζης, το οποίο είναι βυθισμένο σε κατάλληλο buffer, και η κατεύθυνση κίνησης του DNA προς τον θετικό πόλο των ηλεκτροδίων λόγω του αρνητικού τους φορτίου. Η ταχύτητα της κίνησης των μορίων DNA είναι ανάλογη του μοριακού τους βάρους και με βάση αυτό μπορούν να διακριθούν μεταξύ τους.

Το δεύτερο βήμα για την επιτυχή απεικόνιση των αποτελεσμάτων είναι η χρήση κατάλληλης χρωστικής ουσίας, η οποία θα μας επιτρέψει τη φωτογράφιση των τετμημένων μορίων για περαιτέρω επεξεργασία. Υπάρχουν διάφορες ουσίες που χρησιμοποιούνται για το σκοπό αυτό, ωστόσο η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη για τη χρώση DNA είναι το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr). Το EtBr είναι ένα παρεμβαλλόμενο μέσο το οποίο προσδένεται στο DNA και έχει μέγιστη απορρόφηση 210-285 nm σε υδατικό περιβάλλον που αντιστοιχούν σε UV ακτινοβολία. Η ικανότητα φθορισμού του οφείλεται στο υδροφοβικό περιβάλλον ανάμεσα στα ζεύγη βάσεων και όχι στη χαρακτηριστική ομάδα φαινυλίου. Κινούμενο προς αυτό το υδροφοβικό περιβάλλον απομακρύνεται από το διαλύτη και αναγκάζεται αν αποβάλει μόρια νερού, τα οποία ως γνωστόν εμποδίζουν το φθορισμό. Αποτέλεσμα αυτής της διεργασίας είναι το EtBr να εκπέμπει κατόπιν διεγέρσεως από UV ακτινοβολία πορτοκαλί φως με μήκος κύματος 605 nm. Χρησιμοποιώντας λοιπόν κάμερα με κατάλληλη λάμπα UV, η οποία θα φωτίσει ομοιόμορφα και με κατάλληλη διασπορά το πήκτωμα, και οπτικό σύστημα CCD, το οποίο θα καταγράψει το φθορισμό του αιθιδίου, πετυχαίνουμε υψηλής ανάλυσης ψηφιακή απεικόνιση του διαχωρισμού των μορίων DNA.



Εικόνα 4.4: (α) Απεικόνιση του φθορισμού που διενεργεί το EtBr όταν εκτίθεται σε UV ακτινοβολία. Παρατηρούμε το χαρακτηριστικό πορτοκαλί χρώμα. (β) Οι αρχές και η μέθοδος ανίχνευσης ομαδοποιημένων οξειδωτικών βλαβών DNA σε απέναντι κλώνους μέσω ηλεκτροφόρησης πηκτώματος αγαρόζης. Προϋπόθεση για την ανίχνευση των βλαβών είναι το ένζυμο με περιοριστική δράση με το οποίο θα επωαστούν τα δείγματα DNA να προκαλέσει ρήξη των κλώνων DNA στα σημεία όπου βρίσκονται οι βλάβες έτσι ώστε να προκύψουν DSBs και ως εκ τούτου μικρότερα μόρια DNA [110].

4.4 Μέθοδος ποσοτικοποίησης των βλαβών

Ήδη, με την ολοκλήρωση της προηγούμενης μεθόδου έχουμε εξασφαλισμένη μια ποιοτική απάντηση στην ερώτηση που θέσαμε για την ύπαρξη βλαβών στο DNA. Ωστόσο, αν θέλουμε να έχουμε τη δυνατότητα όχι μόνο να εξάγουμε σημαντικά συμπεράσματα ως προς την ποιότητα των βλαβών αλλά και να προσπαθήσουμε να εγκαθιδρύσουμε πιθανό μοντέλο πρόβλεψης της εμφάνισης αυτών θα πρέπει να επεκταθούμε περαιτέρω δίνοντας τελικά μια πιο ικανοποιητική ποσοτική απάντηση. Η μέθοδος πάνω στις αρχές τις οποίας θα βασιστούμε για να το καταφέρουμε αυτό είναι η «Ανάλυση Μέσου Μοριακού Βάρους» (Number Average Length Analysis – NALA). Όπως υπονοείται και από το όνομά της η NALA μπορεί, μέσω του υπολογισμού του μέσου μήκους ετερογενών πληθυσμών DNA [108,109], να μας δώσει αριθμητική τιμή των βλαβών τα οποία εντοπίζονται σε μόρια DNA που έχουν κοπεί σε μικρότερα τμήματα και διακριθεί μέσω ηλεκτροφόρησης. Η μέθοδος αυτή έχει ιδιαίτερη σημασία επειδή, μέχρι και τη στιγμή της εκπόνησης αυτής εδώ της διπλωματικής εργασίας, δεν υπάρχει θεωρητικό μοντέλο πρόβλεψης της ακριβής διασποράς των ομαδοποιημένων βλαβών στο μόριο του DNA.

Έστω ότι έχουμε έναν αρχικό πληθυσμό N_a άθραυστων δίκλωνων μορίων DNA όπου το i -οστό μόριο έχει L_i ζεύγη βάσεων. Το μέσο μήκος των μορίων του πληθυσμού θα ορίζεται σύμφωνα με τον τύπο:

$$\bar{L}_a = \frac{\sum_{i=1}^{N_a} L_i}{N_a} \quad (4.1)$$

όπου ο δείκτης «α» υποδηλώνει τα άθραυστα μόρια και το SUM του αριθμητή είναι το σύνολο των ζ.β. όλων των μορίων του πληθυσμού N_{bp} . Από την επώαση αυτού του πληθυσμού με τη γλυκοσυλάση OGG1, θα προκύψουν συνολικά M σπασμένα μόρια με τις θραύσεις να θεωρούνται DSBs. Έτσι, ο νέος πληθυσμός θα είναι $N_\varepsilon = N_a + M$ (4.2) και το μέσο μήκος των μορίων του πληθυσμού αυτού θα δίνεται από τη σχέση:

$$\bar{L}_\varepsilon = \frac{\sum_{i=1}^{N_\varepsilon} L_i}{N_\varepsilon} \quad (4.3)$$

όπου ο δείκτης «ε» υποδηλώνει τα επεξεργασμένα μόρια. Μπορεί ο αριθμός των μορίων να αλλάζει με την ύπαρξη θραύσεων, ωστόσο ο αριθμός των ζ.β. παραμένει ίδιος στον πληθυσμό, δηλαδή ισχύει ότι

$$\sum_{i=1}^{N_a} L_i = \sum_{i=1}^{N_\varepsilon} L_i = N_{bp} \quad (4.4)$$

Τελικά διαιρώντας τη σχέση (2) με N_{bp} προκύπτει

$$\Phi = \frac{M}{N_{bp}} = \frac{N_\varepsilon}{N_{bp}} - \frac{N_a}{N_{bp}}$$

Η παραπάνω σχέση λόγο των (1), (3) και (4) τελικά μας δίνει ότι:

$$\Phi = \frac{1}{\bar{L}_\varepsilon} - \frac{1}{\bar{L}_a} \quad (4.5)$$

Από την τελευταία αυτή σχέση παίρνουμε την τιμή του μεγέθους Φ . Το μέγεθος αυτό μας δείχνει τη συχνότητα επαγωγής DSBs μετρημένο σε ζεύγη βάσεων. Επειδή όμως χρησιμοποιήσαμε το μήκος των μορίων DNA για να το υπολογίσουμε και το ένζυμο μας κόβει αυτά τα μόρια στα οξειδωτικά σημεία βλαβών, έχουμε τελικά μια αρκετά ακριβή ποσοτική εκτίμηση των βλαβών αυτών [108]. Τέλος θα πρέπει να προσέξουμε να υπολογίσουμε τις βλάβες όχι μόνο σε ακτινοβολημένους ιστούς αλλά και σε μη ακτινοβολημένους, ώστε να εγκαθιδρύσουμε ένα καλό υπόβαθρο για τις ενδογενείς βλάβες του DNA και με γνώμονα αυτό να μπορέσουμε να δούμε τελικά την επίδραση της ΙΑ στην εμφάνιση των βλαβών.

5.1 Σκοπός – Εισαγωγικά στοιχεία

Στα πλαίσια της συνεχούς βελτίωσης των παρεχόμενων υπηρεσιών υγείας διεξάγονται διαρκώς τόσο κλινικές μελέτες όσο και εργαστηριακές έρευνες για τις επιπτώσεις τις ιοντίζουσας ακτινοβολίας σε παρακείμενους και απομακρυσμένους ιστούς. Τα μέχρι τώρα συσσωρευμένα δεδομένα έχουν επιφέρει σημαντικό επαναπροσδιορισμό στην ανάπτυξη των πλάνων ακτινοθεραπείας καθώς και σοβαρές τροποποιήσεις στην εκτίμηση της ραδιοευαισθησίας του οργανισμού. Η επαρκής αξιοποίηση και αξιολόγηση των δεδομένων αυτών περιλαμβάνει όχι μόνο την ανάλυση των μηχανισμών επαγωγής των διαφόρων ΜΣΕ της ΙΑ αλλά και την ακριβή μέτρηση και ταυτοποίηση των βλαβών αυτών. Συνεπώς, μια ποιοτική και ποσοτική εξακρίβωση των βλαβών DNA θα μπορούσε να δώσει σημαντικά δεδομένα που θα οδηγήσουν στην εξαγωγή εξέχουσας σημασίας συμπερασμάτων.

Σε αυτό το πλαίσιο, βάση της μεθόδου που αναπτύχθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, διεξήχθη μια πειραματική μελέτη με αντικείμενό της να αποτελούν τα συμπλέγματα βλαβών DNA. Οι συγκεκριμένες βλάβες προτιμήθηκαν για μελέτη καθώς παρουσιάζουν ιδιαίτερη ανθεκτικότητα στους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς, οπότε μπορούν δυνητικά να επηρεάσουν το DNA σε μεγαλύτερο βαθμό και να εντοπιστούν πιο εύκολα. Πιο συγκεκριμένα στην παρούσα εργασία θα προσπαθήσουμε να κάνουμε μια εκτίμηση ομαδοποιημένων και σύνθετων βλαβών λόγω έλλειψης βάσης σε απέναντι κοντινές θέσεις (1-10 ζ.β.) στους κλώνους του DNA. Για το σκοπό αυτό θα χρησιμοποιήσουμε την μέθοδο NALA, σε ιστούς υποβεβλημένους σε επεξεργασία με ένα περιοριστικό ένζυμο, τη γλυκοσυλάση hOGG1.

Στην προσπάθεια μας να έχουμε όσο το δυνατόν πληρέστερη εικόνα του τρόπου και της φύσης της απόκρισης του οργανισμού στην ΙΑ, σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο, χρησιμοποιήσαμε ειδικά αναθρεμμένα ποντίκια σε *in vivo* και *ex vivo* πειραματικές διαδικασίες. Μελετήσαμε λοιπόν τις συνέπειες που προέκυψαν σε δύο ξεχωριστά είδη ιστών των ποντικών αυτών, για διαφορετικές δόσεις ακτινοβολίας σε διάφορες στιγμές μετά την αρχική ακτινοβόληση. Παράλληλα θέλοντας να διερευνήσουμε τα πλεονεκτήματα μιας νέας και πολλά υποσχόμενης τεχνικής ακτινοβόλησης (ακτινοθεραπεία μικροδεσμών) κατά την εφαρμογή της στο πλαίσιο της ακτινοθεραπείας, μελετήσαμε το DNA ιστών που είχαν υποστεί έκθεση στην ΙΑ τόσο με την κλασική όσο και με την νέα αυτή μέθοδο.

5.2 Υλικά και Μέθοδοι

5.2.1 Οργανολογικός εξοπλισμός

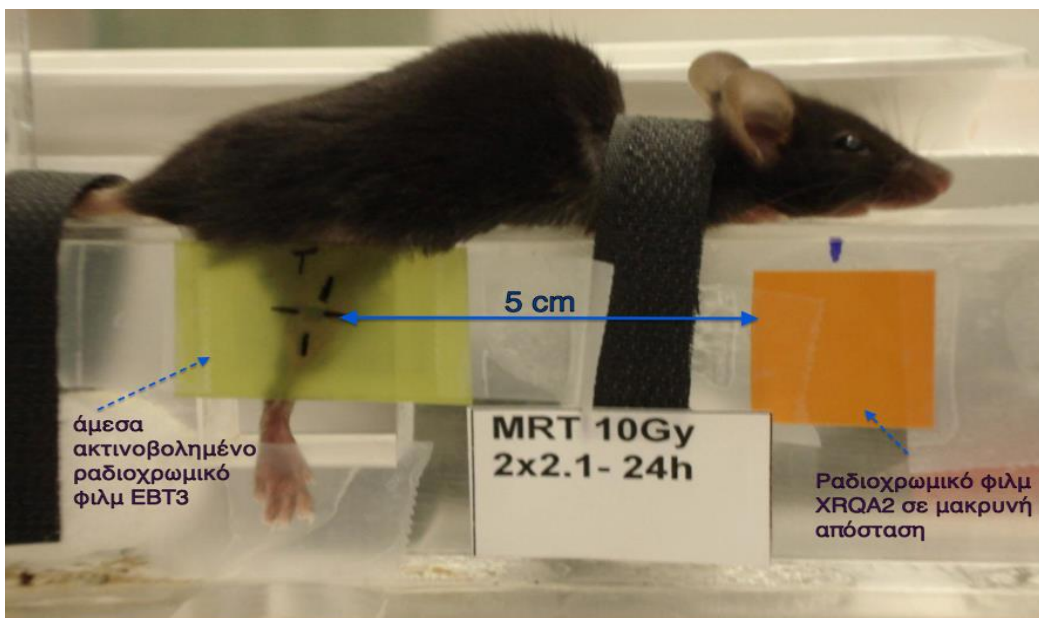
1. Επιταχυντική διάταξη Australian Synchrotron (AS) – Imaging and Medical Beamline (IMBL), Melbourne
2. Επωαστικός κλίβανος CO₂ (37 °C, 5% CO₂)
3. Υδατόλουτρο
4. Συσκευή ηλεκτροφόρησης 2314 Horizontal Electrophoresis Device, Continental Lab Products
5. CCD/UV κάμερα MiniBIS PRO, DNR Bio-Imaging Systems
6. Λογισμικό χειρισμού της κάμερας Live off Gel Capture
7. Λογισμικό ανάλυσης της εικόνας του πηκτώματος αγαρόζης ImageJ, National Institute of Health
8. Λογισμικό επεξεργασίας δεδομένων Origin Pro 8

5.2.2 Αντιδραστήρια – Διαλύματα

1. High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche, Indianapolis
2. Διάλυμα Tris 1000 µg/ml, Molecular Biology Grade, A 2264, Applichem
3. Διάλυμα Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (0.5M, pH 8), Sigma – Aldrich
4. Acetic Acid (CH₃COOH MW=60.05g/mol), J.T. Baker
5. Διάλυμα λύσεως πρωτεΐνάσης K (5 mg/ml K σε ρυθμιστικό διάλυμα 4 M ουρία, 200 Mm EDTA, 200 Mm Tris, 20 mM NaCl, Ph 7.4)
6. Πρότυπο διάλυμα TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.5)
7. Διάλυμα ενζύμου hOGG1: # MO241L ,1600 U/ml , Amt: 0.25 ml ,Lot : 0031512 , New England Biolabs
8. Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου hOGG1: NEBuffer 2 ,10X concentration, (1XBuffer components: 50mM NaCl,10mM Tris-HCl,10mM MgCl₂,1mM DTT, pH 7.9 στους 25 °C), Amt: 1.25ml, Lot: 0171507 New England Biolabs
9. Ρυθμιστικό διάλυμα TAE (Tris-acetate-EDTA) 10x (20 ml EDTA 0.5M pH=8.0, 11.4 ml acetic acid, 48.44 g Tris, dH₂O till 1L is reached)
10. Certified™ Molecular Biology Agarose 125g, cat. #161-3101, Bio-Rad Laboratories
11. Gel Loading Dye,Blue(6X): #B7021S, 4 ml , Lot:0101508, New England Biolabs
12. DNA-Ladder Lambda DNA-Hind III Digest:500 µg/ml, Amt: 0.75 ml, Lot: 1731209, New England Biolabs
13. Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) C:1%, A1152, Applichem

5.2.3 Ποντίκια και διαδικασία ακτινοβολήσης

Για να έχουμε επιθυμητά και αξιόπιστα αποτελέσματα χρειαζόμασταν ένα πειραματόζωο το οποίο θα έχει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά που να το καθιστούν ιδανικό για της ανάγκες της παρούσας μελέτης. Για το λόγο αυτό, κατάλληλα για χρήση κρίθηκαν υγιή θηλυκά ποντίκια του γένους C57BL/6J (BJ6) από την Ozgene (Perth, Αυστραλία), τα οποία δεν είναι επιρρεπή στην ανάπτυξη όγκου. Κατά την ακτινοβολήση του, κάθε ποντίκι τοποθετήθηκε με τη δεξιά πλευρά του εκτεθειμένη προς τη δέσμη με τελικό στόχο το πίσω δεξιά του πόδι. Καθώς θέλαμε να μελετήσουμε την διάδοση των βλαβών DNA αποκλειστικά από ενδογενείς παράγοντες, ειδικά μέτρα (αναισθητοποίηση – πρόσδεση - προστατευτικό κάλυμμα σώματος, ελήφθησαν για την αποφυγή φαινομένων διασποράς της δέσμης. Για επιβεβαίωση τοποθετήθηκαν ραδιοχρωμικά φιλμ, τα οποία θα μετρούσαν την ένταση της ΙΑ στο σημείο ακτινοβολήσης όσο και σε μακρινό από αυτό σημείο για τον εντοπισμό τυχόν διάχυσης της ΙΑ στο χώρο. Μια αναπαράσταση της πειραματικής διάταξης που περιγράψαμε φαίνεται και στην ακόλουθη φωτογραφία (Εικόνα 5.1).



Εικόνα 5.1: Πειραματική διάταξη ακτινοβολήσης των ποντικιών και τα ραδιοχρωμικά φιλμ για τη μέτρηση της απορρόφησης και της διασποράς ακτινοβολίας.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, για την ακτινοβολήση χρησιμοποιήθηκε η διάταξη IMBL μέρος του επιταχυντή AS. Η συγκεκριμένη διάταξη είναι ικανή για ακτίνες-X υψηλού ρυθμού δόσης, στα 49.3 Gy/sec, με χαμηλή ωστόσο ενέργεια φωτονίων περί τα 30-120 keV [123]. Αυτά, σε συνδυασμό με τη δυνατότητα κάλυψης του σημείου ακτινοβολήσης από παράλληλες, χαμηλής απόκλισης, δέσμες επέτρεψαν την ελαχιστοποίηση της διασποράς της ακτινοβολίας σε σχέση με άλλες συμβατικές μεθόδους θεραπευτικής ακτινοβολήσης με ενέργεια στο εύρος των MeV.

Η διάταξη IMBL έχει δυνατότητα ακτινοβολήσης διαφόρων διαστάσεων μικρών επιφανειών με δυο ξεχωριστούς τρόπους. Ο πρώτος τρόπος είναι η συμβατική τεχνική ακτινοθεραπείας με ευρεία δέσμη (broad beam – BB), ενώ ο δεύτερος τρόπος είναι μια νέα και πολλά υποσχόμενη τεχνική

γνωστή ως ακτινοθεραπεία μικροδεσμών (Microbeam Radiation Therapy – MRT). Στην περίπτωση της BB χρησιμοποιήθηκε ενιαία δέσμη με διαστάσεις 2x2 mm², 8x8 mm² και 8x1 mm² στο σημείο ακτινοβολήσης, ενώ στην MRT χρησιμοποιήθηκαν μικροδέσμες πάχους 25 μm σε απόσταση 200 μm μεταξύ των κέντρων καθεμίας με αποτέλεσμα να καλυφθούν επιφάνειες διαστάσεων 2x2 mm² και 8x8 mm² [123]. Αξίζει να σημειωθεί ότι και οι δύο τεχνικές ακτινοβολήσης, παρά τη χαμηλή ενέργεια και τη φύση τους παρουσιάζουν ιδιαίτερα υψηλή διεισδυτικότητα.

Ένας σημαντικός παράγοντας που θελήσαμε να μελετήσουμε ως προς το αποτέλεσμα που έχει στην τελική απόκριση του οργανισμού ήταν η απορροφούμενη δόση της ΙΑ που αποδίδεται σε αυτόν. Οι τυπικές τιμές δόσης είναι από 45 μέχρι 60 Gy για επιθηλιακούς όγκους και από 20 μέχρι 40 Gy για λεμφώματα. Βάση αυτών των δεδομένων αποφασίστηκε ότι η μία τιμή δόσεως που θα μελετήσουμε είναι τα 40 Gy. Η δεύτερη τιμή δόσεως που μελετήθηκε ήταν τα 10 Gy, καθώς θεωρείται ως το χαμηλότερο κατώφλι δόσης που έχει παρατηρηθεί σε in vivo μελέτες να μπορεί να δώσει ΜΣΕ. Στην τεχνική BB η απορροφούμενη δόση υπολογίστηκε βάση της διάρκειας του διαστήματος έκθεσης ενώ στην τεχνική MRT η μέση τιμή της δόσης υπολογιζόταν από το σύνολο των δόσεων κάθε δέσμης που υπολογίστηκε περίπου στα 5.72 Gy/s[123].

Τέλος, για να εξακριβώσουμε αν τα οποιαδήποτε αποτελέσματα προκύψουν ανήκουν σε αρχική/ενδιάμεση απόκριση ή σε επιμένουσα/καθυστερημένη απόκριση, εξετάσαμε δείγματα DNA τα οποία απομονώθηκαν από ποντίκια 24 και 96 ώρες μετά την αρχική τους ακτινοβολήση. Για να υπάρχει μέτρο σύγκρισης και να μπορέσουμε να υπολογίσουμε τα αποτελέσματα, μια ομάδα ποντικών χρησιμοποιήθηκε ως συγκριτικό δείγμα ελέγχου. Αυτό σήμαινε ότι περνούσε όλα τα στάδια προετοιμασίας όπως οι άλλες ομάδες ποντικών με μόνη διαφορά ότι δε δέχθηκε ποτέ ΙΑ κατά το κομμάτι της ακτινοβολήσης (sham irradiated). Όστε τελικά, οι ομάδες που προέκυψαν σύμφωνα με κάθε πιθανό συνδυασμό των παραπάνω παραμέτρων που μελετήθηκαν φαίνονται στον ακόλουθο πίνακα 5.1.

Δέσμη	# Ποντικών	Απομόνωση	Δόσεις	Στόχος	Σύνολο
Broad Beam	5	24h	10Gy	2x2mm 8x1mm	60
		96h	40Gy	8x8mm	
MRT	5	24h	10Gy	2x2mm	40
		96h	40Gy	8x8mm	
Control	5	24h	-	-	5

Πίνακας 5.1: Στοιχεία για τους διάφορους συνδυασμούς ακτινοβολήσης των ποντικών. Με αυτό τον τρόπο προέκυψαν 20 ομάδες ακτινοβολημένων ποντικών και μια control, που περιλάμβαναν 5 ποντίκια η κάθε μια για στατιστικούς λόγους.

5.2.4 Απομόνωση δειγμάτων DNA

Το DNA το οποίο επιλέξαμε να εξετάσουμε για ΜΣΕ ανήκε στους ιστούς της γλώσσας και του παχέος εντέρου. Οι δύο αυτοί ιστοί αποτελούσαν ιδανική επιλογή για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης, καθώς ο ένας βρίσκεται μακριά και ο άλλος κοντά στο αρχικό σημείο ακτινοβολήσης.

Η διαδικασία της απομόνωσης του DNA έγινε ακολουθώντας τις οδηγίες που δίνονται στο High Pure PCR Template Preparation Kit. Σύμφωνα με αυτές ομογενή τμήματα των ιστών γύρω στα 50 mg, που διατηρούνταν κατεψυγμένα, αποψύχονται και κατόπιν τοποθετούνται σε διάλυμα λύσης πρωτεΐνάσης K υψηλής αντιοξειδωτικής δράσης. Στη συνέχεια επωάζονται στους 37 °C για 3-12h ώστε να προχωρήσουμε στην απομόνωση του DNA. Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε στο σημείο αυτό τόσο στην παρασκευή φρέσκων αυτόκαυστων διαλυμάτων αλλά και στη διατήρηση της θερμοκρασίας στους 60 °C αντί για τους 70 °C που συνιστούσε ο κατασκευαστής. Το τελικό προϊόν φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στα 5000 g και τοποθετείται σε eppendorfs που περιέχουν πρότυπο διάλυμα TE ώστε να αποθηκευτούν στους -20 °C. Για λόγους ομοιογένειας και ορθής λειτουργίας του πειραματικού πρωτοκόλλου όλα τα αρχικά δείγματα υπέστησαν αραιώση με τη χρήση αποσταγμένου νερού (dH₂O) ώστε να δημιουργήσουμε διαλύματα εργασίας (working solutions) με συγκέντρωση DNA 20ng/μl.

5.2.5 hOGG1

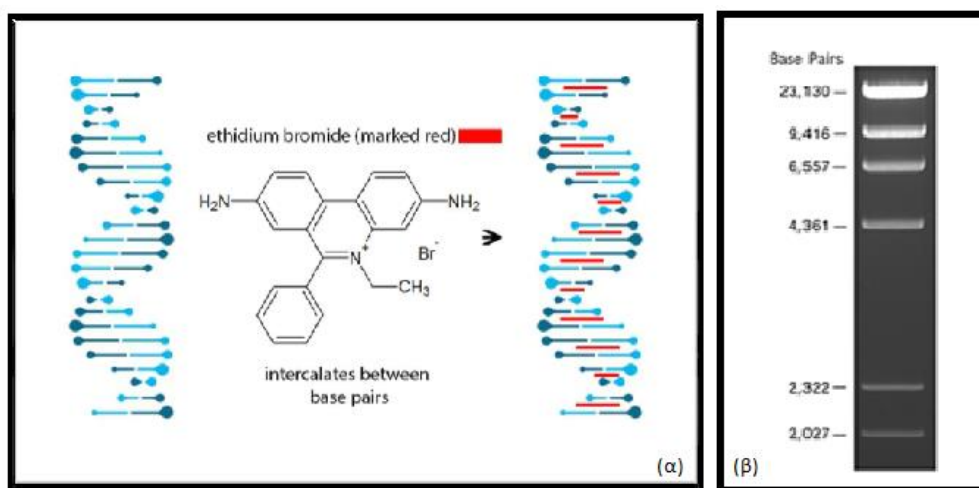
Το ένζυμο που χρησιμοποιήσαμε για την εύρεση βλαβών στα δείγματα DNA ήταν η γλυκοσυλάση hOGG1 από την New England Biolabs. Σύμφωνα με τον κατασκευαστή, η συγκέντρωση του ενζύμου στο διάλυμα είναι 1600 units/ml. Σαν μονάδα ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την τομή 1 pmol 34-μερούς διπλού ολιγονουκλεϊδίου που περιέχει μια βάση 8-οξογουανίνης ζευγαρωμένη με κυτοσίνη μετά από επώαση σε ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα για 1 ώρα στους 37 °C σε ειδικό μηχάνημα. Το ρυθμιστικό διάλυμα σε συνάρτηση με την θερμοκρασία δημιουργούν τις κατάλληλες συνθήκες για την ενεργοποίηση της δράσης του ενζύμου στα μόρια DNA. Για να εξακριβώσουμε την κατάλληλη ποσότητα ενζύμου που απαιτείται ώστε να έχει τη βέλτιστη απόδοση στην εύρεση βλαβών διενεργήθηκε μια διαδικασία γνωστή ως ογκομετρική ανάλυση (titration). Κατά τη διαδικασία αυτή 40 ng DNA υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με 1, 1.5 και 2 μl ενζύμου και χαράχθηκε μια προσαρμοσμένη καμπύλη των αποτελεσμάτων. Από τη διαδικασία αυτή καταλήξαμε στο γεγονός ότι 1.6 μl παρουσιάζουν ικανοποιητική δράση εκτομής βάσεων κατά την επώαση 40ng DNA σε διάλυμα συνολικού όγκου αντίδρασης 7 μl.

5.2.6 Ηλεκτροφόρηση

Η συσκευή ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή του συγκεκριμένου πειράματος είχε δεξαμενή χωρητικότητας 1000 ml, τα οποία πληρώθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα TAE. Ακόμα περιλάμβανε ειδικό δίσκο και χτένια για τη δημιουργία πηκτώματος αγαρόζης με διαφορετικό συνολικό αριθμό και διαστάσεις πηγαδιών, ανάλογα με τις ανάγκες του κάθε πειράματος. Το πήκτωμα παρασκευάζεται από διάλυμα TAE με αγαρόζη. Η ποσότητας της αγαρόζης και ο όγκος του διαλύματος καθορίζονται από την τελική συγκέντρωση που θέλουμε να έχουμε στο πήκτωμα και τη χωρητικότητα των πηγαδιών ανάλογα και με το πάχος των δοντιών στα χτένια.

Για να απεικονίσουμε τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης, χρησιμοποιήσαμε μια χημική ουσία σήμανσης νουκλεϊκών οξέων ονόματι βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr). Οι δύο πολύ σημαντικές ιδιότητες τις οποίες διαθέτει η ουσία αυτή και θα εκμεταλλευτούμε είναι η δυνατότητά του να παρεμβάλλεται και να προσδέεται στο μόριο του DNA (βλέπε εικόνα 5.2α) και η ικανότητά του να φθορίζει υπό την έκθεση σε πηγή υπεριώδους ακτινοβολίας. Έτσι χρησιμοποιώντας μια κάμερα UV μπορούμε εύκολα να απεικονίσουμε την τελική θέση κάθε μορίου DNA στο πήκτωμα. Για την ενδιάμεση ανίχνευση της πορείας του DNA στο πήκτωμα, καθώς δεν είναι πρακτικό να το βγάσουμε από την δεξαμενή συνέχεια για παρακολούθηση, χρησιμοποιούμε μπλε χρωστική Gel loading dye που μας επιτρέπει την εύκολη την ανίχνευση της πορείας των μορίων DNA στο πήκτωμα.

Τέλος, για να έχουμε ένα τρόπο εύρεσης του μοριακού βάρους κάθε μορίου DNA που ηλεκτροφορήσαμε, είναι απαραίτητη η χρήση διαλύματος DNA με προκαθορισμένα μεγέθη σύμφωνα με τα οποία θα μπορεί να γίνεται η αντιστοίχιση των αγνώστων δικών μας μεγεθών. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήσαμε κατάλληλο δείκτη μοριακού βάρους, γνωστό και ως DNA ladder, ο οποίος κάλυπτε πλήρως το απαιτούμενο εύρος ζευγών βάσεων που έχουν τα δικά μας μόρια DNA (εικόνα 5.2β)



Εικόνα 5.2:
(α) Αναπαράσταση πρόσδεσης του EtBr στο DNA
(β) Αριθμός ζευγών βάσεων κάθε μπάντας του DNA ladder

5.3 Πρωτόκολλα

5.3.1 Πρωτόκολλο πειραματικής διαδικασίας

Η αρχή της διεξαγωγής του πειράματος γίνεται βγάζοντας τα working solutions, δηλαδή τα αραιωμένα διαλύματα συγκέντρωσης 20ng/μl, καθώς και το ρυθμιστικό διάλυμα του hOGG1 από την κατάψυξη (-20 °C) όπου διατηρούνται. Αφήνουμε τα διαλύματα μερικά λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να επανέλθουν σε μια πιο υγρή κατάσταση και στη συνέχεια τα τοποθετούμε σε ξηρό πάγο ώστε να αποφευχθεί η υπερβολική άνοδος της θερμοκρασίας τους και καταστραφούν. Όσο περιμένουμε να ξεπαγώσουν τα δείγματα, αραιώνουμε το ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου μαζί με αποσταγμένο νερό σε αναλογία 1(ρ/δ) : 3(dH₂O), δημιουργώντας ένα νέο διάλυμα σε δοκιμαστικό σωληνάριο για περαιτέρω χρήση. Η ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος που θα αραιώσουμε υπολογίζεται βάση των δειγμάτων που επεξεργαζόμαστε στο εκάστοτε πείραμα και

είναι 2μl για κάθε δείγμα, οπότε έχουμε αντίστοιχα 6μl dH₂O. Πάντα υπολογίζουμε λίγη παραπάνω ποσότητα, καθώς υπάρχει κίνδυνος η πιπέτα να ρουφήξει παραπάνω υγρό από αυτό που θέλουμε (κακό κούμπωμα tip, λάθος γωνία εισχώρησης της πιπέτας, πάτημα της κεφαλής πιο κάτω από την πρώτη σκάλα) με αποτέλεσμα το διάλυμα να τελειώσει πριν βάλουμε σε όλα τα δείγματα. Αφού αναδεύσουμε καλά το νέο διάλυμα με τη διαδικασία του pipetting βάζουμε 4μl από αυτό σε PCR tubes, εις διπλούν για κάθε δείγμα. Στη συνέχεια, αναδεύουμε τα διαλύματα των δειγμάτων DNA με pipetting για ομογενοποίηση και προσθέτουμε στα tubes 2 μl και πάλι εις διπλούν. Στο τέλος αυτής της διαδικασίας έχουμε συνήθως 8x12 PCR tubes με 48 δείγματα διπλά και τα τοποθετούμε στον ξηρό πάγο για προεπώαση 30 λεπτών. Στο σημείο αυτό επιστρέφουμε τα working solutions και το ρυθμιστικό διάλυμα στον καταψύκτη αφού δεν θα τα χρειαστούμε άλλο.

Ο λόγος που βάλουμε το κάθε δείγμα εις διπλούν ήταν επειδή στο ένα διάλυμα θα προσθέσουμε το ένζυμο και θα είναι το επεξεργασμένο διάλυμα, γνωστό και ως (+) δείγμα, ενώ στο άλλο θα βάλουμε ίδια ποσότητα dH₂O και θα λειτουργήσει ως δείγμα αναφοράς, γνωστό και ως (-) δείγμα. Έτσι, μετά την μετά την πάροδο των 30 λεπτών προσθέτουμε στα (+) δείγματα 1μl του διαλύματος του hOGG1 και στα (-) δείγματα 1 μl dH₂O, κάνοντας παράλληλα pipetting με την κάθε προσθήκη. Στο τέλος αυτού του βήματος βάζουμε και πάλι όλα τα διαλύματα στον πάγο για 15 λεπτά.

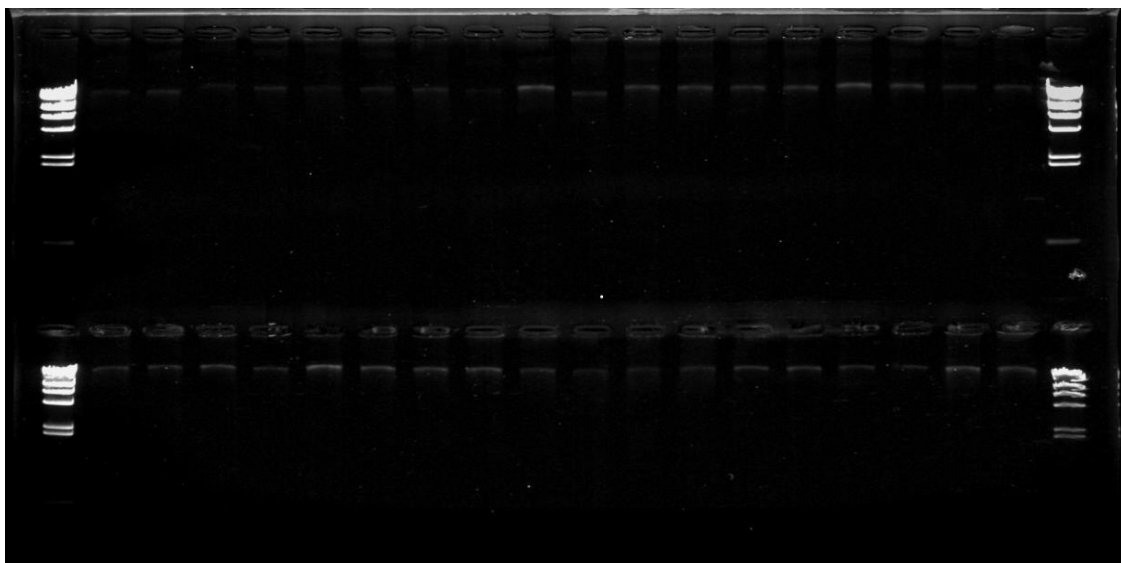
Στη συνέχεια βγάζουμε τα PCR tubes από τον πάγο και αφού βεβαιωθούμε ότι τα καπάκια είναι κλεισμένα καλά τα τοποθετούμε στην συσκευή επώασης για ακριβώς 1 ώρα στους 37 °C. Ο συνολικός όγκος αντίδρασης κάθε διαλύματος είναι 7 μl. Προς τα μέσα της διαδικασίας αυτής βγάζουμε από την κατάψυξη το loading dye και φτιάχνουμε ειδικό διάλυμα stopping solution με ανάμειξη του EDTA και του loading dye σε αναλογία 2:1. Και πάλι η ποσότητα καθορίζεται από τον αριθμό των δειγμάτων ενώ για τους ίδιους λόγους με πριν φτιάχνουμε λίγη παραπάνω ποσότητα από την αναγκαία. Μετά το τέλος της μιας ώρας προσθέτουμε σε όλα τα δείγματα (με προτεραιότητα στα (+) δείγματα) 3 μl από το διάλυμα αυτό, αναδεύουμε με pipetting και τα τοποθετούμε και πάλι στον πάγο για 30 λεπτά.

Αφού τελειώσουμε το προηγούμενο βήμα, ή και κατά τη διάρκεια της επώασης καθώς η διαδικασία αυτή παίρνει αρκετή ώρα, προχωράμε στην παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης συγκέντρωσης 1%. Επειδή το τελικό διάλυμα φόρτωσης έχει όγκο 10 μl, σύμφωνα με τις οδηγίες της ηλεκτροφόρησης για τα χτένια των 50 δοντιών θα χρειαστούμε 250 ml TAE 0.5x για να φτιάξουμε πηγάδια με βάθος 15 μl. Έτσι, θα τοποθετήσουμε 2.5 g σκόνης αγαρόζης σε διάλυμα 250 ml TAE σε κωνική φιάλη για να πετύχουμε συγκέντρωση 1% στο τελικό πήκτωμα. Για την πλήρη διάλυση της αγαρόζη στο διάλυμα θα χρησιμοποιήσουμε φούρνο μικροκυμάτων. Θα το ζεσταίνουμε μέχρι η αγαρόζη να λιώσει πλήρως και το υγρό να φαίνεται εντελώς διαυγές όταν το φέρνουμε στο ύψος των ματιών μας (χωρίς ανομοιογένειες), ενώ για να αποφύγουμε την εξάτμιση του τοποθετούμε στο πάνω μέρος της φιάλης διαφανές περίβλημα στο οποίο κάνουμε μικρές τρύπες. Όταν έχει λιώσει ικανοποιητικά η αγαρόζη προσθέτουμε 1 μl βρωμιούχου αιθιδίου και αναδεύουμε τη φιάλη κάτω από τρεχούμενη βρύση για να ρίξουμε τη θερμοκρασία του διαλύματος. Τέλος, εγχύουμε το διάλυμα στον ειδικό δίσκο της συσκευής ηλεκτροφόρησης, στον οποίο έχουμε τοποθετήσει ήδη τα χτένια για το σχηματισμό των πηγαδιών, και τον αφήνουμε σε μια επίπεδη επιφάνεια για να στερεοποιηθεί πλήρως. Προσέχουμε ιδιαίτερα στο σημείο αυτό να

καλύψουμε τον δίσκο κατάλληλα ώστε να προστατεύσουμε το πήκτωμα από τη σκόνη αλλά και από το φως καθώς εξατμίζει το αιθίδιο που είναι φωτοευαίσθητο.

Όταν το πήκτωμα είναι πλέον έτοιμο θα αφαιρέσουμε τα χτένια και θα το εμβαπτίσουμε στη δεξαμενή της ηλεκτροφόρησης, η οποία φροντίζουμε να είναι γεμάτη με ποσότητα TAE 1x ικανή να καλύπτει πλήρως όλο το πήκτωμα (περίπου 1-1.5l). Αν δεν καλύπτεται πλήρως το πήκτωμα η τελική εικόνα θα έχει σκοτεινά και θολά σημεία, οπότε υπάρχει κίνδυνος να μην μπορούμε να την επεξεργαστούμε σωστά. Στο σημείο αυτό ξεκινάμε να φορτώνουμε δείγματα στο πήκτωμα, προσέχοντας να μην χαλάσουμε τα πηγάδια. Για να αποφύγουμε την αύξηση της θερμοκρασίας στα διαλύματα τα βγάζουμε λίγα λίγα από τον πάγο και αφού τα τοποθετήσουμε τα αφήνουμε να ηρεμήσουν για δέκα περίπου λεπτά μέσα στα πηγάδια. Όταν συμπληρωθεί ολόκληρη η πρώτη σειρά πηγαδιών ενεργοποιούμε την ηλεκτροφόρηση για 15 περίπου λεπτά ώστε να μπουν τα δείγματα μέσα στο πήκτωμα και να αποφευχθεί η διάχυση. Επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία και για την δεύτερη σειρά πηγαδιών. Κατά το φόρτωμα προσέχουμε να βάλουμε με τη σωστή σειρά τα δείγματα, με το (-) να είναι πάντα πριν από το αντίστοιχο (+), ώστε να ξέρουμε κατά την επεξεργασία της εικόνας πιο δείγμα περιέχεται σε κάθε ζεύγος πηγαδιών. Επίσης, φορτώνουμε 1μl από το διάλυμα του DNA ladder που έχουμε παρασκευάσει στα τέσσερα ακριανά πηγάδια του πηκτώματος (2 στην πάνω και 2 στην κάτω σειρά). Ενεργοποιούμε και πάλι την ηλεκτροφόρηση με τάση 110 V και αφήνουμε τα δείγματα να «τρέξουν» για 80 λεπτά. Για την αποφυγή βαθμιδώσεων της θερμοκρασίας τοποθετείται πάγος περιμετρικά της δεξαμενής της ηλεκτροφόρησης έτσι ώστε τα δείγματα να ηλεκτροφορηθούν υπό τις ίδιες συνθήκες σε κάθε περιοχή του πηκτώματος.

Στο τελευταίο βήμα της πειραματικής διαδικασίας, μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης βγάζουμε το πήκτωμα από την δεξαμενή και το τοποθετούμε σε απεικονιστικό σύστημα που περιλαμβάνει κάμερα CCD και εκπομπέα UV ακτινοβολίας. Στη συνέχεια με τη χρήση ειδικού λογισμικού και ρυθμίζοντας τις τιμές των παραγόντων Exposure-Gain-Brightness παίρνουμε φωτογραφίες του πηκτώματος, στις οποίες θα πρέπει να απεικονίζονται ευδιάκριτα τα μόρια του DNA σε κάθε πηγάδι καθώς και ο ladder (Βλέπε εικόνα 5.3)

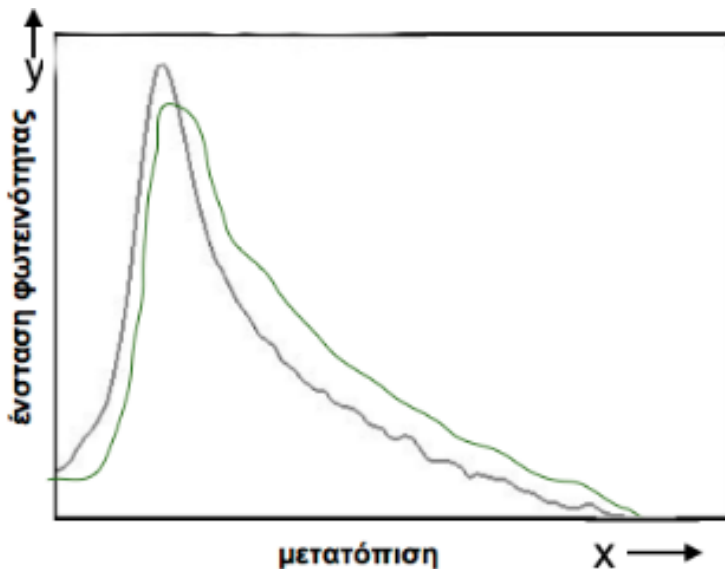


Εικόνα 5.3: Χαρακτηριστική εικόνα πηκτώματος αгарόζης μετά την ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας

5.3.2 Πρωτόκολλο επεξεργασίας των εικόνων πηκτώματος αγαρόζης

Για την ανάλυση της εικόνας χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα ImageJ, το οποίο είναι ένα διεθνώς αναγνωρισμένο ανοιχτό πρόγραμμα πυκνομετρικής οπτικής ανάλυσης. Για να ξεκινήσουμε τη διαδικασία επιλέγουμε αρχικά την πιο κατάλληλη εικόνα του πηκτώματος, στην οποία απεικονίζονται επαρκώς οι λωρίδες του DNA με την ελάχιστη δυνατή φωτεινότητα υποβάθρου. Στην περίπτωση που η φωτεινότητα υποβάθρου είναι ακόμα υψηλή, υπάρχει η δυνατότητα περαιτέρω μείωσης της μέσω κατάλληλης ρύθμισης εντός του προγράμματος.

Εφόσον βεβαιωθούμε ότι το πήκτωμα είναι σωστά ευθυγραμμισμένο στην εικόνα μας, ξεκινάμε να βρούμε για κάθε ζευγάρι λωρίδων DNA, (-) και (+) δείγμα, τις καμπύλες μετατόπισης λόγω της ηλεκτροφόρησης. Οι μετρήσεις γίνονται βάση της έντασης της φωτεινότητας κάθε λωρίδας κατά μήκος του άξονα μετατόπισης (εικόνα 5.4). Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να ληφθεί στο σημείο αυτό ώστε το παράθυρο απεικόνισης κάθε λωρίδας να ξεκινάει και να τελειώνει στο ίδιο σημείο όπως του ladder. Αυτό μας εξασφαλίζει ότι το x_{med} , το οποίο υπολογίζεται από το εμβαδόν που ορίζεται από την κάθε καμπύλη και τις τομές των αξόνων X,Y και αντιστοιχεί στη συντεταγμένη x του γεωμετρικού κέντρου του σχήματος, θα υπολογίζεται στο σωστό σημείο κι όχι σε διαφορετικό κάθε φορά. Έχοντας υπολογίσει τα x_{med} για τα δείγματα και τους ladder είμαστε έτοιμοι να προχωρήσουμε στο επόμενο βήμα της επεξεργασίας.



Εικόνα 5.4: Διαγράμμα φωτεινότητας κατά τον άξονα μετατόπισης στο πήκτωμα, η μαύρη καμπύλη αντιστοιχεί στο (-) δείγμα και η πράσινη στο αντίστοιχο (+) η οποία είναι μετατοπισμένη ελαφρώς δεξιότερα.

5.3.3 Πρωτόκολλο επεξεργασίας των δεδομένων για τον υπολογισμό των βλαβών

Το μόνο που έχει απομείνει πλέον είναι να αντιστοιχίσουμε τις τιμές x_{med} με το μέσο μέγεθος του συγκεκριμένου πληθυσμού μορίων DNA l_{med} (μετρημένο σε ζεύγη βάσεων). Αυτό το καταφέρνουμε φτιάχνοντας μια προσαρμοσμένη καμπύλη των x_{med} – ζευγών βάσεων (ζ.β.) του ladder πάνω στην οποία προβάλλουμε τα x_{med} των υπολοίπων δειγμάτων.

Για τη δημιουργία αυτής της καμπύλης παίρνουμε τις τιμές των x_{med} των 7 διακριτών μπαντών που φαίνονται στο πήκτωμα και τις αντιστοιχούμε στον αριθμό των ζευγών βάσεων, που ξέρουμε από τον κατασκευαστή του ladder ότι έχει η κάθε μπάντα. Έτσι προκύπτει μια καμπύλη διασποράς, η οποία έχει στους άξονες X-Y τις τιμές του x_{med} και των ζευγών βάσεων αντίστοιχα. Στη συνέχεια προσαρμόζουμε την καμπύλη που προκύπτει στην γραφική παράσταση της συνάρτησης ExpDec2 του προγράμματος OriginPro 8 με τύπο:

$$y=A_1e^{x/t_1} + A_2e^{x/t_2} + y_0$$

απ' όπου τελικά παίρνουμε τις τιμές των παραμέτρων που ορίζουν την καμπύλη και τις προσθέτουμε σε φύλο εργασίας του excel. Περνώντας στο φύλο εργασίας και τις τιμές των x_{med} των δειγμάτων προκύπτουν οι αντίστοιχες τιμές I_{med} για κάθε πληθυσμό βάσει της διασποράς που ορίζουν οι παραπάνω παράμετροι. Τέλος σύμφωνα με τον τύπο 4.5 του προηγούμενου κεφαλαίου, $\Phi = 1/\bar{L}_\varepsilon - 1/\bar{L}_\alpha$, υπολογίζουμε την τιμή της συχνότητας επαγωγής OCDL/Gbr αντικαθιστώντας το \bar{L}_ε και το \bar{L}_α με τις τιμές των I_{med} για το (+) και (-) δείγμα αντίστοιχα.

Κεφάλαιο 6^ο

ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

6.1 Εισαγωγή

Ακολουθώντας τη διαδικασία που περιγράψαμε στις παραπάνω παραγράφους, για την επεξεργασία των δειγμάτων DNA, προέκυψαν οι τιμές ομαδοποιημένων οξειδωτικών βλαβών. Οι τιμές αυτές αφορούν δείγματα προερχόμενα από ιστούς γλώσσας και ορθού ποντικών, τα κύρια χαρακτηριστικά των οποίων αναφέραμε αναλυτικότερα στην παράγραφο 5.2.3. Για λόγους εγκυρότητας αλλά και πληρότητας διεξήχθησαν δύο ανεξάρτητα μεταξύ τους πειράματα, ώστε τελικά οι τιμές των βλαβών που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ανάλυση να είναι ο μέσος όρος των τιμών που προέκυψαν από τα πειράματα αυτά. Καθώς ο πίνακας με τις τελικές τιμές βλαβών που υπολογίστηκαν είναι αρκετά μεγάλος (100 ακτινοβολημένα και 5 μη ακτινοβολημένα-control δείγματα ανά ομάδα επί 2 ομάδες επί 2 πειράματα), για λόγους καλύτερης παρουσίασης τα πλήρη αποτελέσματα φαίνονται στο Παράρτημα. Για κάθε τιμή έχει υπολογιστεί και το αντίστοιχο τυπικό σφάλμα (standard error) βάση της σχέσης:

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

όπου n είναι το πλήθος των δειγμάτων κάθε ομάδας.

Αρχικά διενεργήθηκε Mann-Whitney U-test, ώστε να εξεταστεί η σημαντικότητα των τιμών των βλαβών που υπολογίστηκαν σε σχέση με τα control δείγματα. Στη συνέχεια διεξήχθη μια ανάλυση διακύμανσης (ANOVA), με σκοπό να διερευνηθούν τυχόν εξαρτήσεις των τιμών από τις διάφορες παραμέτρους που μελετήσαμε (δόση, χρόνος απομόνωσης, τρόπος ακτινοβολήσης). Οι εξαρτήσεις αυτές διερευνήθηκαν περαιτέρω και οπτικά από ομαδοποιήσεις των δεδομένων που κάναμε ώστε να δημιουργηθούν γραφήματα για μελέτη. Τέλος, σαν συμπληρωματική στατιστική διερεύνηση, υπολογίστηκε ο συντελεστής συσχέτισης Pearson (Pearson correlation coefficient-PCC) ενώ ταυτόχρονα εξετάστηκε η αποδοτικότητα μιας στατιστικής μεθόδου πρόβλεψης για τη δημιουργία μοντέλου με βάση τα δεδομένα μας.

6.2 Mann-Whitney U-test

Η πρώτη στατιστική μελέτη που διενεργήσαμε ήταν ένα απλό Mann-Whitney U-test. Το U-test, όπως και το t-test, αποτελούν στατιστικά εργαλεία που χρησιμοποιούνται για έλεγχο υποθέσεων. Η διαφορά τους έγκειται στην ακρίβεια που δίνουν ανάλογα με το μέγεθος των δεδομένων αλλά και της κανονικότητας αυτών. Για την παρούσα μελέτη προτιμήθηκε το πρώτο καθώς θα έχει μεγαλύτερη ακρίβεια με βάση τα χαρακτηριστικά των δεδομένων μας.

Η υπόθεση την οποία θέσαμε προς έλεγχο αφορά την ύπαρξη ή μη σημαντικής στατιστικής διαφοράς μεταξύ των τιμών των βλαβών σε σχέση με τις τιμές control που υπολογίστηκαν. Για να θεωρηθεί στατιστικά σημαντική μια τιμή θα πρέπει να έχει p -value μικρότερη του 0,05, δηλαδή να βρίσκεται έξω από το διάστημα εμπιστοσύνης του ποσοστού 95%. Σε περίπτωση που το p -value είναι μεγαλύτερο, θα πρέπει να διερευνηθούν οι λόγοι που θα μπορούσαν να επηρεάσουν αρνητικά τη μέτρηση, όπως λόγου χάρη η ύπαρξη ακραίων τιμών. Αν συμβαίνει αυτό τότε, είτε θα πρέπει να αγνοηθούν οι τιμές αυτές είτε να διεξαχθούν περαιτέρω επαναλήψεις του πειράματος στους συγκεκριμένους ιστούς. Αυτό θα βοηθήσει σημαντικά στην ελαχιστοποίηση της πιθανότητας οι τιμές να είναι τεχνουργήματα λόγω σφάλματος κατά την πειραματική διαδικασία.

Για τους υπολογισμούς μας χρησιμοποιήσαμε το πρόγραμμα SPSS της IBM, το οποίο χρησιμεύει για στατιστικές αναλύσεις. Στους πίνακες 6.2.1 (α,β) που ακολουθούν δίνονται αναλυτικά οι τιμές των p -value για κάθε ομάδα των δύο ιστών που μελετήθηκαν.

Πίνακας 6.2.1 α			
Mann-Whitney U-test			
Αποτελέσματα			
colon			
αριθμός ομάδας	p -value	αριθμός ομάδας	p -value
1	0,014	11	0,014
2	0,014	12	0,014
3	0,009	13	0,014
4	0,009	14	0,014
5	0,014	15	0,009
6	0,009	16	0,025
7	0,009	17	0,009
8	0,014	18	0,028
9	0,009	19	0,009
10	0,009	20	0,014

Πίνακας 6.2.1 β			
Mann-Whitney U-test			
Αποτελέσματα			
tongue			
αριθμός ομάδας	p -value	αριθμός ομάδας	p -value
1	0,009	11	0,117
2	0,009	12	0,602
3	0,117	13	0,009
4	0,028	14	0,462
5	0,117	15	0,009
6	0,009	16	0,009
7	0,117	17	0,009
8	0,009	18	0,014
9	0,014	19	0,014
10	0,009	20	0,009

Οι τιμές που παρουσιάζονται στους πίνακες αφορούν τον υπολογισμό της ασυμπτωτικής σημαντικότητας (asymptotic significance) κάθε ομάδας. Χρησιμοποιήσαμε τις τιμές αυτές αντί για εκείνες της ακριβούς σημαντικότητας (exact significance), καθώς αυτές είναι το αποτέλεσμα αμφίπλευρου κι όχι μονόπλευρου ελέγχου. Ο αμφίπλευρος έλεγχος είναι καλύτερη επιλογή από τον μονόπλευρο για μικρού όγκου δεδομένα καθώς, στην περίπτωση του, τα σφάλματα από την προσεγγιστική κανονικοποίηση των δεδομένων τείνουν να αλληλοαναιρούνται. Αντίθετα στην περίπτωση του μονόπλευρου ελέγχου τα σφάλματα υποχωρούν ανάλογα με το μέγεθος του όγκου των δεδομένων.

Όπως φαίνεται στους παραπάνω πίνακες, τα περισσότερα αποτελέσματα που έχουμε επαληθεύουν την αρχική υπόθεση ως προς τη σημαντική στατιστική διαφορά των τιμών των βλαβών σε σχέση με τα control. Ειδικότερα στον πίνακα 6.2.1 α, όπου φαίνονται τα αποτελέσματα των ιστών του ορθού, παρατηρούμε ότι όλα τα p -value έχουν τιμές μικρότερες από 0,05 το οποίο είναι και το ζητούμενο. Ωστόσο, στις τιμές για τις ομάδες ιστών της γλώσσας στον πίνακα 6.2.1 β, παρατηρούμε ότι υπάρχει ένα ποσοστό 30% αυτών (6 στις 20) που είναι πάνω από το 0,05. Με μια γρήγορη ματιά στο παράρτημα είναι εμφανές ότι οι συγκεκριμένες ομάδες περιέχουν τιμές ιστών οι οποίες μπορούν να θεωρηθούν ακραίες. Άρα πιθανότατα αυτός είναι και ο λόγος που παρατηρούμε αυτή την απόκλιση. Ίσως ένας ακόμα μεγαλύτερος όγκος δεδομένων να κάλυπτε αυτές τις ακραίες τιμές καλύτερα και να μπορούσε να μας δώσει τιμές με μεγαλύτερη ακρίβεια.

6.3 Ανάλυση διακύμανσης (Analysis of Variance - Anova)

Αφού διαπιστώθηκε ότι τα δεδομένα μας είναι στατιστικά σημαντικά σε σχέση με τα control, προχωρήσαμε στην επόμενη στατιστική μελέτη που είναι η ανάλυση διακύμανσης. Αυτή η μέθοδος θα μας βοηθήσει να διαπιστώσουμε τυχόν εξαρτήσεις των βλαβών από τις τρεις διαφορετικές παραμέτρους (δόση, χρόνος απομόνωσης, τρόπος ακτινοβολήσης), ή τους πιθανούς συνδυασμούς αυτών, που μελετήθηκαν στα πλαίσια του συγκεκριμένου πειράματος. Πιο συγκεκριμένα θα συγκριθούν οι μέσες τιμές κάθε περίπτωσης μεταξύ τους και θα αποφανθούμε αν κάποια παράμετρος επηρεάζει τα δεδομένα μας περισσότερο.

Και αυτή η στατιστική μελέτη διενεργήθηκε με την βοήθεια του προγράμματος SPSS, θεωρώντας ως εξαρτημένη μεταβλητή τις τιμές των βλαβών και τις τρεις παραμέτρους ως σταθερούς παράγοντες. Επίσης, όπως και πριν θέλουμε η τιμή σημαντικότητας να είναι κάτω του 0,05 για να θεωρήσουμε ότι υπάρχει εξάρτηση. Στη συνέχεια ακολουθούν οι συγκεντρωτικοί πίνακες, για το ορθό και για τη γλώσσα, όπου παρουσιάζονται τα στατιστικά αποτελέσματα που υπολογίστηκαν.

Πίνακας 6.3.1 α -- Anova Colon Results

Dependent Variable: Average Clusters/Gbp

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1658004,298 ^a	7	236857,757	,763	,620
Intercept	780284484,200	1	780284484,200	2512,866	,000
Beam	283,163	1	283,163	,001	,976
Time	221606,723	1	221606,723	,714	,401
Dose	13596,270	1	13596,270	,044	,835
Beam * Time	20194,418	1	20194,418	,065	,799
Beam * Dose	80068,894	1	80068,894	,258	,613
Time * Dose	875102,193	1	875102,193	2,818	,097
Beam * Time * Dose	265416,104	1	265416,104	,855	,358
Error	25151777,690	81	310515,774		
Total	838528802,800	89			
Corrected Total	26809781,990	88			

a. R Squared = ,062 (Adjusted R Squared = -,019)

Πίνακας 6.3.1 β -- Anova Tongue Results

Dependent Variable: AverageCL

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1829235,178 ^a	7	261319,311	,490	,839
Intercept	614838338,300	1	614838338,300	1153,209	,000
Beam	3216,317	1	3216,317	,006	,938
Time	222571,376	1	222571,376	,417	,520
Dose	17259,398	1	17259,398	,032	,858
Beam * Time	80602,721	1	80602,721	,151	,698
Beam * Dose	604578,471	1	604578,471	1,134	,290
Time * Dose	498559,575	1	498559,575	,935	,336
Beam * Time * Dose	168428,812	1	168428,812	,316	,576
Error	46917588,890	88	533154,419		
Total	681565804,000	96			
Corrected Total	48746824,070	95			

a. R Squared = ,038 (Adjusted R Squared = -,039)

Η αρχική υπόθεση (null hypothesis), που θέσαμε προς έλεγχο με την ανάλυση διακύμανσης, ήταν ότι οι τιμές των βλαβών έχουν την ίδια εξάρτηση από όλες τις παραμέτρους που μελετήθηκαν. Τα αποτελέσματα, τα οποία θα μας επιβεβαιώσουν ή καταρρίψουν αυτή την υπόθεση φαίνονται στις δύο τελευταίες στήλες κάθε πίνακα. Στην πρώτη αναγράφονται οι τιμές για την μεταβλητή F κάθε ομάδας, η οποία υπολογίζεται από τη σχέση:

$$F = \frac{\text{διακύμανση μέσω των τιμών κάθε ομάδας από τη γενική μέση τιμή αυτών}}{\text{διακύμανση των τιμών στη συγκεκριμένη ομάδα από τη μέση τιμή αυτής}}$$

Ιδανικά θέλουμε οι τιμές του F να είναι αρκετά πάνω από 1 καθώς αυτό σημαίνει ότι οι μέσες τιμές των ομάδων διαφέρουν πολύ, άρα οι παράμετροι έχουν διαφορετική επιρροή πάνω τους, ενώ οι τιμές κάθε ομάδας είναι όλες παρόμοιες. Για να κρίνουμε όμως αν καταρρίπτεται η αρχική μας υπόθεση πρέπει να λάβουμε υπόψιν μας ακόμα μια συνθήκη. Αυτή η συνθήκη θα είναι η τιμή της σημαντικότητας (Significance/ P-value), που αναγράφεται στην τελευταία στήλη κάθε πίνακα. Οι τιμές αυτές μας δείχνουν την πιθανότητα που υπάρχει να εμφανιστεί η τιμή F υπό την προϋπόθεση ότι η αρχική υπόθεση είναι αληθής. Για να καταρριφθεί λοιπόν η αρχική συνθήκη θα πρέπει η πιθανότητα εμφάνισης της τιμής F που βρέθηκε να είναι πολύ μικρή (<0,05).

Όπως βλέπουμε από τους παραπάνω πίνακες, τόσο στα δείγματα του ορθού όσο και στα δείγματα της γλώσσας, καμία παράμετρος ή συνδυασμός αυτών δεν ασκεί στατιστικά σημαντικότερη επιρροή σε σχέση με τις υπόλοιπες στις τιμές των βλαβών που υπολογίστηκαν. Αυτό είναι εμφανές από το γεγονός ότι μόλις μια παράμετρος σε κάθε πίνακα έχει μεταβλητή F πάνω από 1 και συγκεκριμένα ο συνδυασμός δόσης-χρόνου για το ορθό και ακτινοβολήσης-δόσης για τη γλώσσα. Ωστόσο δεν έχουν την απαραίτητη τιμή σημαντικότητας για να θεωρηθούν ως πιο δραστικές πάνω στις τιμές των βλαβών, παρόλο που για το συνδυασμό δόσης-χρόνου του ορθού η τιμή είναι πολύ κοντά στο όριο που θέλουμε. Όσο αφορά τις υπόλοιπες τιμές των F, που δεν ξεπερνούν το 1, μια πιθανή εξήγηση είναι ότι οι μέσες τιμές κάθε ομάδας δε διαφέρουν σημαντικά από την μέση τιμή όλων των ομάδων. Ωστε τελικά θα μπορούσε να βγει το συμπέρασμα ότι οι τιμές εξαρτώνται περίπου το ίδιο, τόσο από τη δόση όσο και από τον χρόνο απομόνωσης ή το είδος ακτινοβολήσης, οπότε δεν είναι δυνατόν σε αυτό το σημείο να διαμορφώσουμε κάποιο μοντέλο πρόβλεψης για την εμφάνιση των βλαβών. Όπως και στην προηγούμενη περίπτωση του U-test έτσι και εδώ ένας μεγαλύτερος όγκος δεδομένων θα βοηθούσε περισσότερο στην στατιστική μελέτη.

Παρόλο που το αποτέλεσμα ήταν το αναμενόμενο, με βάση τα δεδομένα μας, έγιναν αντιληπτές κάποιες οριακές εξαρτήσεις στους παραπάνω πίνακες. Πριν λοιπόν προχωρήσουμε στην περαιτέρω διερεύνηση μέσω των γραφημάτων, για λόγους πληρότητας διενεργήθηκε στατιστική μελέτη (t-test) για όλους τους πιθανούς συνδυασμούς των μεταβλητών των παραμέτρων ξεχωριστά μέσα σε κάθε ομάδα παραμέτρου. Έτσι θα εξακριβωθεί ποια από τις μεταβλητές των παραμέτρων έχει μεγαλύτερη επιρροή στις τιμές σε σχέση με την άλλη, κάτι που δε φαινόταν παραπάνω λόγω ομαδοποίησης. Από αυτή τη διαδικασία που έγινε με το SPSS συμπληρωματικά της ανάλυσης διακύμανσης (επιλογή parameter estimates) προέκυψε τελικά ότι, για το ορθό, η δόση των 10 Gy σε συνδυασμό με την απομόνωση σε 24 h, έχουν αυξητική επιρροή στις τιμές των βλαβών καθώς έχουμε τιμή σημαντικότητας 0,044<0,05. Επίσης τιμές όπως η δόση των 10 Gy στο ορθό και ο χρόνος των 24 h και στους δύο ιστούς ήταν στο όριο της στατιστικά σημαντικής

επιρροής. Ένας παράγοντας που θα μπορούσε να βοηθήσει στην εύρεση πιο ολοκληρωμένης εικόνας από την παρούσα μέθοδο είναι η παρουσία περισσότερων control τιμών για κάθε παράμετρο ξεχωριστά. Με αυτό τον τρόπο θα μπορούσε να υπολογιστεί, εκτός από την σχετική επιρροή κάθε παραμέτρου σε σχέση με τις άλλες και η πραγματική εξάρτηση των βλαβών από κάθε παράμετρο.

6.4 Ομαδοποιήσεις τιμών και γραφήματα

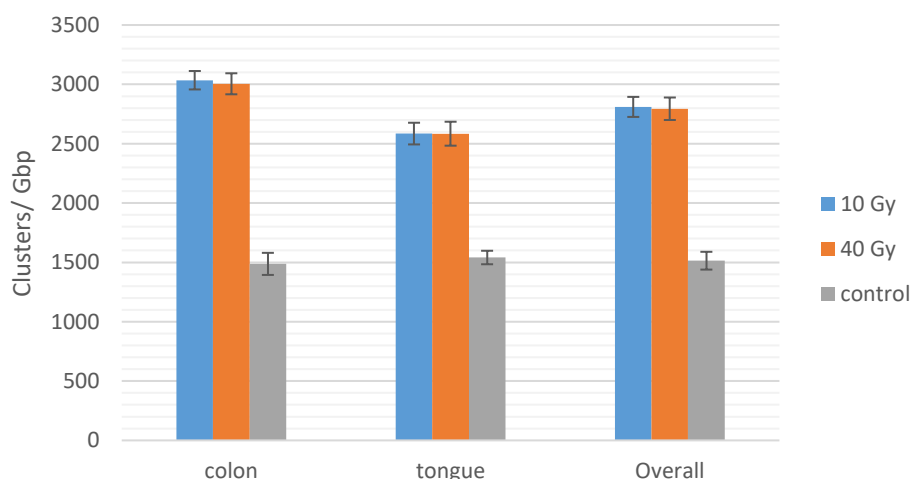
Καθώς οι στατιστικές μελέτες δεν έδωσαν ξεκάθαρα αποτελέσματα ως προς την εξάρτηση των τιμών από τις παραμέτρους, θεωρήθηκε αναγκαίο να γίνει μια προσπάθεια ομαδοποίησης των δεδομένων για τη δημιουργία γραφημάτων. Αυτή η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων θα μπορούσε να παίξει καταλυτικό ρόλο στον εντοπισμό τυχών μοτίβων και κατά συνέπεια μοντέλου πρόβλεψης βλαβών ανάλογα με τις παραμέτρους ακτινοβολήσης. Θα ξεκινήσουμε από τις μεγαλύτερες δυνατές ομαδοποιήσεις, παρουσιάζοντας γραφήματα όπου οι τιμές εξαρτώνται από μια μόνο μεταβλητή, και θα συνεχίσουμε με σταδιακή αναδιάταξη των αποτελεσμάτων ώστε να εξαρτώνται από δύο και τελικά τρεις μεταβλητές. Κάθε μεταβλητή είναι ένας από τους διαφορετικούς παράγοντες (η δόση, ο χρόνος απομόνωσης και η τεχνική ακτινοβολήσης) που μελετήθηκαν στα πλαίσια της ακτινοβολήσης.

6.4.1 Εξάρτηση από την δόση

Το πρώτο γράφημα που φτιάχτηκε θα ελέγξει την επιρροή της δόσης πάνω στις τιμές των βλαβών που υπολογίστηκαν για κάθε ιστό ξεχωριστά αλλά και για το σύνολό τους. Η παράμετρος αυτή έχει δύο πιθανές μεταβλητές, όπως γνωρίζουμε από την παράγραφο «Υλικά και Μέθοδοι», τις τιμές 10 και 40 Gy. Έτσι ομαδοποιήσαμε όλα τα δεδομένα που αφορούν τα 10 Gy μαζί, χωρίς να λάβουμε υπόψιν μας κάποια άλλη παράμετρο. Ακολουθεί ο πίνακας με 6.4.1, στον οποίο παρατίθενται οι τιμές των οξειδωτικών βλαβών καθώς και τα τυπικά σφάλματα αυτών (μετρημένα σε Clusters/Gbp), ενώ στη συνέχεια φαίνεται και το γράφημα που προκύπτει με βάση τα αποτελέσματα αυτά.

Πίνακας 6.4.1 -- Εξάρτηση από τη δόση				
Ιστός		10 Gy	40 Gy	control
colon	Τιμή	3035	3005	1487
	Σφάλμα	78	89	93
tongue	Τιμή	2585	2584	1541
	Σφάλμα	91	101	57
Overall	Τιμή	2810	2795	1514
	Σφάλμα	84	95	75

Εξάρτηση από τη δόση



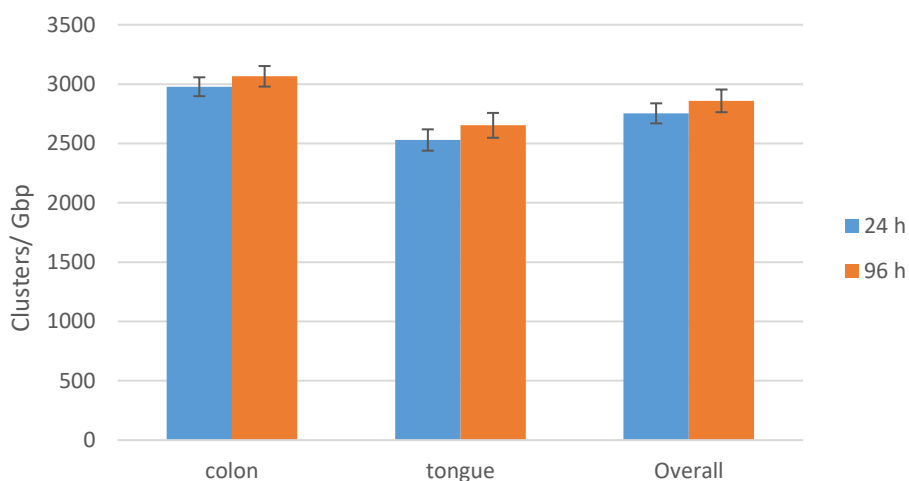
Όπως παρατηρούμε, τόσο από τον πίνακα όσο και από το γράφημα, οι τιμές για τα 10 Gy είναι παρόμοιες με εκείνες των 40 Gy. Παρόλο που υπάρχει μια ανεπαίσθητη τάση των 10 Gy να επηρεάζουν περισσότερο τις τιμές, οι διαφορές βρίσκονται μέσα τα όρια του σφάλματος και άρα δεν είναι σίγουρο ότι η εικόνα που βλέπουμε είναι σίγουρη. Ένας λόγος για την παρατήρηση του φαινομένου αυτού ίσως είναι ότι υπάρχει κάποιο κατώφλι δόσης, το οποίο βρίσκεται κάτω από τα 10 Gy και εφόσον ξεπεραστεί οι βλάβες παραμένουν σταθερές. Επίσης υπάρχει ενδεχόμενο τα 40 Gy να είναι τόσο υψηλή δόση, ώστε θα έχουμε πλήρη απόπτωση των κυττάρων του σημείου ακτινοβολήσης και γενικότερη δυσλειτουργία του οργανισμού. Όσο αφορά τις τιμές των control παρατηρούμε ότι είναι περίπου στο μισό των άλλων τιμών, πράγμα που σημαίνει ότι οι μισές οξειδωτικές βλάβες που ανιχνεύονται οφείλονται σε ενδογενείς παράγοντες.

6.4.2 Εξάρτηση από το χρόνο απομόνωσης

Συνεχίζοντας τις ομαδοποιήσεις, αυτή τη φορά θα ελεγχθεί η παράμετρος του χρόνου απομονώσεως η οποία παίρνει τις τιμές 24 και 96 h. Ακολουθεί ο πίνακας με 6.4.2 όπου, όπως και πριν, παρατίθενται οι τιμές των οξειδωτικών βλαβών και τα τυπικά σφάλματα αυτών αλλά και το γράφημα που προκύπτει με βάση τις τιμές αυτές.

Πίνακας 6.4.2 -- Εξάρτηση από το χρόνο απομόνωσης				
Ιστός		24 h	96 h	control
colon	Τιμή	2978	3065	1487
	Σφάλμα	79	87	93
tongue	Τιμή	2529	2652	1541
	Σφάλμα	90	105	57
Overall	Τιμή	2753	2859	1514
	Σφάλμα	85	96	75

Εξάρτηση από το χρόνο απομόνωσης



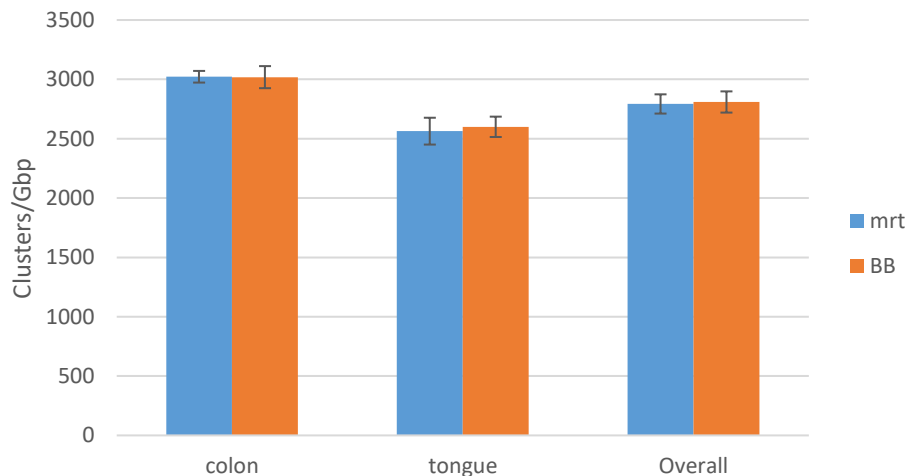
Παρατηρούμε ότι και σε αυτές τις τιμές δεν εντοπίζονται διακυμάνσεις που να ξεπερνούν τα όρια των σφαλμάτων. Ωστόσο στο γράφημα βλέπουμε να απεικονίζεται μια αύξηση στις τιμές των βλαβών για τις 96 h μετά την αρχική ακτινοβολήση σε σχέση με τις 24 h. Αυτό θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα της ύπαρξης παρατεταμένου στρες λόγω διαφόρων σημάτων κινδύνου, όπως για παράδειγμα οι ελεύθερες ρίζες ή τα κύτταρα της άμυνας του οργανισμού (μακροφάγα/ ουδετερόφιλα).

6.4.3 Εξάρτηση από την τεχνική ακτινοβολήσης

Στην τελευταία ομαδοποίηση, στην οποία οι τιμές θα εξαρτώνται από μια μόνο παράμετρο, θα εξεταστεί η επιρροή της τεχνικής ακτινοβολήσης στα δεδομένα που υπολογίστηκαν. Τα δεδομένα θα χωριστούν σε εκείνα που προέρχονται από ακτινοβολήση με την τεχνική MRT και εκείνα με την τεχνική BB, με τις τιμές να φαίνονται στον πίνακα 6.4.3 καθώς και στο γράφημα που ακολουθεί.

Ιστός		MRT	BB	control
colon	Τιμή	3022	3019	1487
	Σφάλμα	49	93	93
tongue	Τιμή	2564	2600	1541
	Σφάλμα	113	86	57
Overall	Τιμή	2793	2809	1514
	Σφάλμα	81	89	75

Εξάρτηση από την τεχνική ακτινοβολήσης



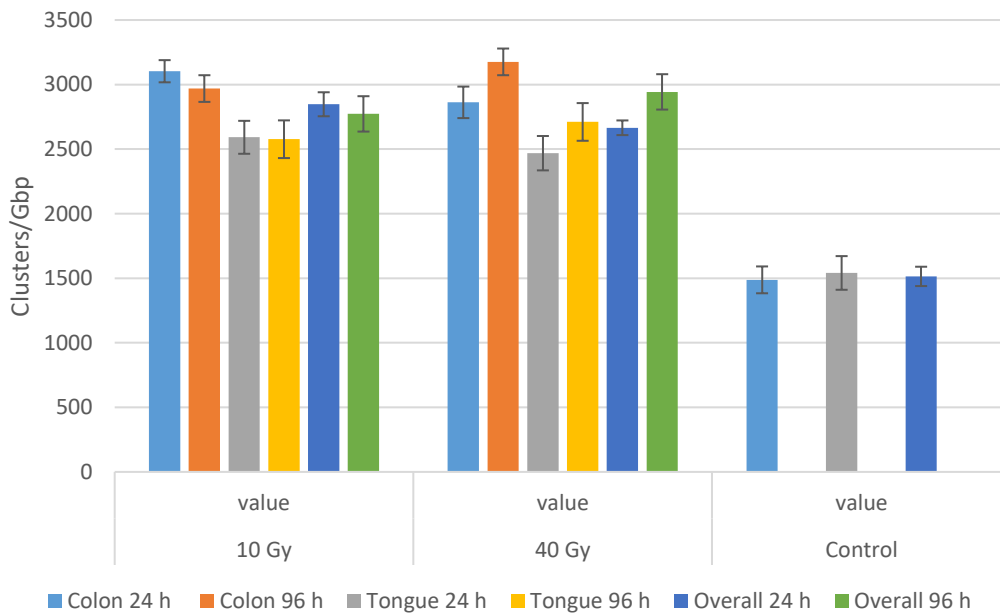
Όπως και στις δύο προηγούμενες περιπτώσεις έτσι κι εδώ δεν παρατηρούνται διακυμάνσεις που να ξεπερνούν τα όρια των σφαλμάτων. Αυτό σημαίνει ότι και το μοτίβο που φαίνεται να υπάρχει, με την τεχνική BB να έχει την τάση να δημιουργεί περισσότερες βλάβες, δεν είναι συναγόμενο με βεβαιότητα.

6.4.4 Εξάρτηση από δόση και χρόνο απομόνωσης

Αφού καταγράφηκε η εξάρτηση των δεδομένων από μια μόνο παράμετρο, προχωράμε στον συνδυασμό δύο παραμέτρων για να δούμε την πιθανή επιρροή που έχουν στις τιμές των βλαβών. Ο πρώτος συνδυασμός αφορά την αλληλεπίδραση δόσης-χρόνου, τα αποτελέσματα της οποίας παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα 6.4.5.

Δόση		Colon		Tongue		Overall	
		24 h	96 h	24 h	96 h	24 h	96 h
10 Gy	Τιμή	3103	2969	2592	2577	2848	2773
	Σφάλμα	86	128	122	142	104	135
40 Gy	Τιμή	2862	3176	2469	2711	2665	2943
	Σφάλμα	128	112	133	152	130	132
Control	Τιμή	1487		1541		1514	
	Σφάλμα	93		57		75	

Εξάρτηση από δόση x χρόνο



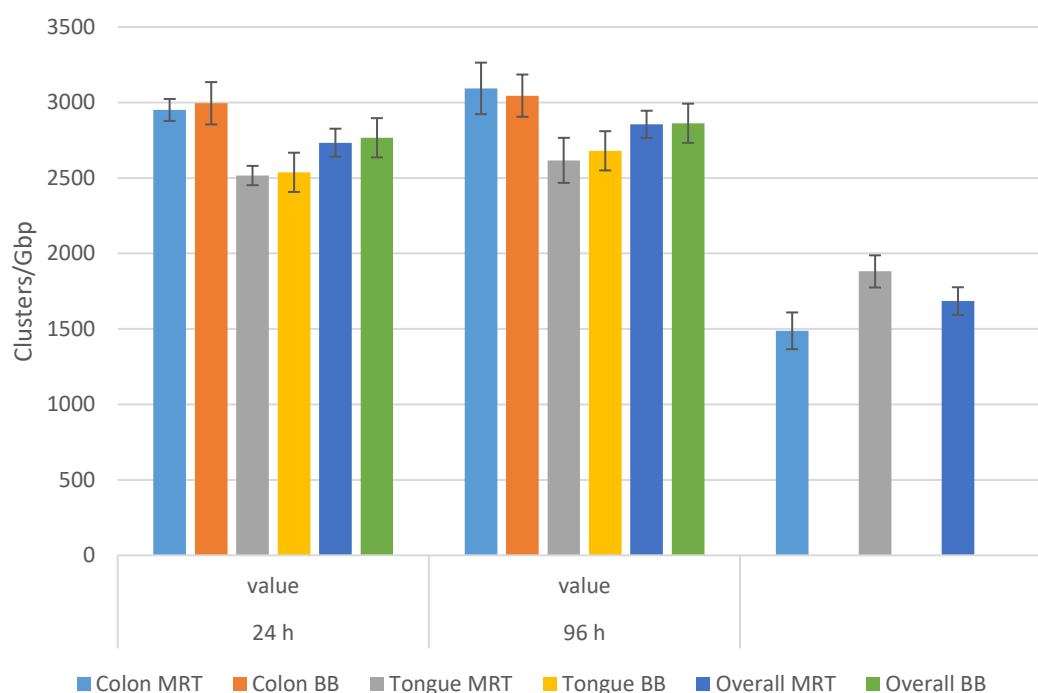
Ένα σημαντικό αποτέλεσμα εμφανίζεται στα 40 Gy για τις τιμές του ορθού, όπου η διακύμανση μεταξύ 24 και 96 ωρών ξεπερνάει τα όρια του σφάλματος. Αυτό το αποτέλεσμα είχε προβλεφθεί και από την στατιστική μελέτη της «Ανονα». Χρειάζονται βέβαια κι άλλα τέτοια δεδομένα για να μπορούμε να ισχυριστούμε εμφάνιση κάποιου μοτίβου. Παρόλα αυτά, φαίνεται πως με αύξηση της δόσης, εμφανίζονται περισσότερες βλάβες όσο περνάει ο χρόνος, πράγμα που μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη παρατεταμένου στρες.

6.4.5 Εξάρτηση από χρόνο απομόνωσης και τεχνική ακτινοβόλησης

Τα αποτελέσματα για το δεύτερο συνδυασμό παραμέτρων φαίνονται στον ακόλουθο πίνακα 6.4.6. Όπως πάντα έχουν υπολογισθεί και περιληφθεί και οι τιμές των σχετικών σφαλμάτων.

Πίνακας 6.4.6 — Εξάρτηση από χρόνο x τεχνική							
Χρόνος		Colon		Tongue		Overall	
		MRT	BB	MRT	BB	MRT	BB
24 h	Τιμή	2951	2995	2516	2537	2733	2766
	Σφάλμα	73	123	171	100	122	111
96 h	Τιμή	3093	3045	2617	2680	2855	2863
	Σφάλμα	64	143	149	149	107	146
Control	Τιμή	1487		1541		1514	
	Σφάλμα	93		57		75	

Εξάρτηση από χρόνο x τεχνική



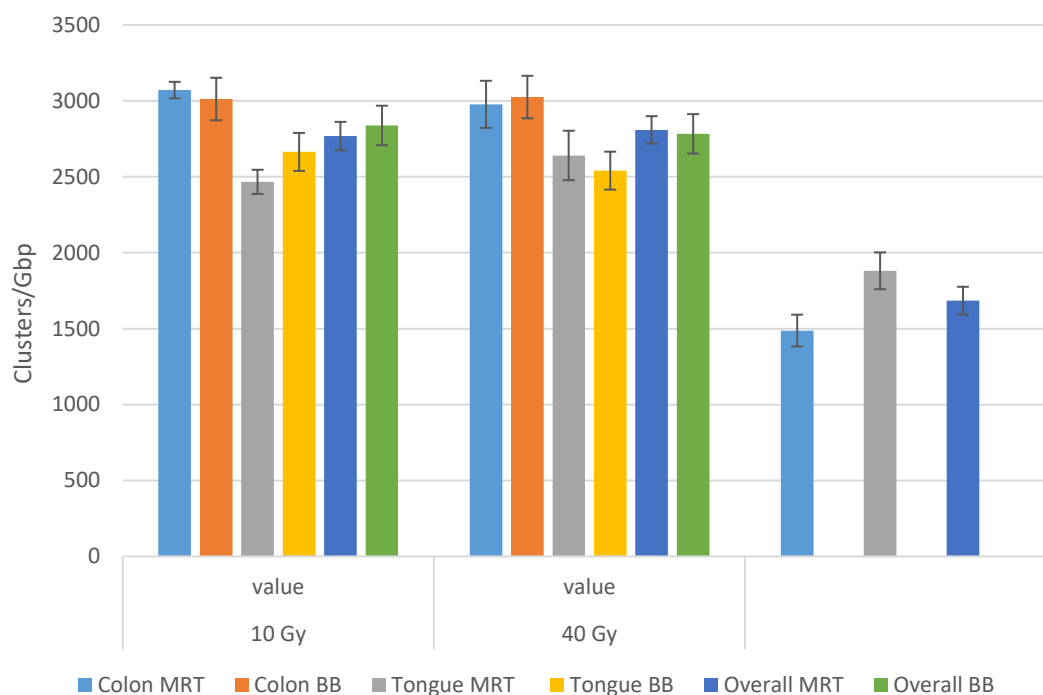
Από το παραπάνω γράφημα, φαίνεται πως τα αποτελέσματα είναι όπως πάντα παρόμοια και μέσα στα όρια των σφαλμάτων. Ενδιαφέρον ωστόσο παρουσιάζει το γεγονός, ότι για τη γλώσσα και τα συνολικά αποτελέσματα οι τιμές ακολουθούν το ίδιο μοτίβο τόσο για τις 24 όσο και για τις 96 ώρες αντί για κατοπτρικό όπως συνέβη στο προηγούμενο γράφημα. Αυτό εξηγείται επειδή, οι τιμές ακολουθούν το ίδιο μοτίβο και για τις δύο επιμέρους παραμέτρους, όπως είδαμε και στις παραγράφους 6.4.2 και 6.4.3. Άρα θα μπορούσαμε να πούμε ότι η τεχνική MRT είναι σταθερά καλύτερη από την BB με την πάροδο του χρόνου.

6.4.6 Εξάρτηση από δόση και τεχνική ακτινοβολήσης

Ο τρίτος και τελευταίος συνδυασμός παραμέτρων θα αφορά δόση και τεχνική. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν φαίνονται στον πίνακα 6.4.7 καθώς και στο αντίστοιχο γράφημα.

Πίνακας 6.4.7 — Εξάρτηση από δόση x τεχνική							
Δόση		Colon		Tongue		Overall	
		MRT	BB	MRT	BB	MRT	BB
10 Gy	Τιμή	3071	3013	2467	2664	2769	2838
	Σφάλμα	54	121	155	112	105	116
40 Gy	Τιμή	2978	3025	2641	2541	2809	2783
	Σφάλμα	80	145	163	130	121	137
Control	Τιμή	1487		1541		1514	
	Σφάλμα	93		57		75	

Εξάρτηση από δόση x τεχνική



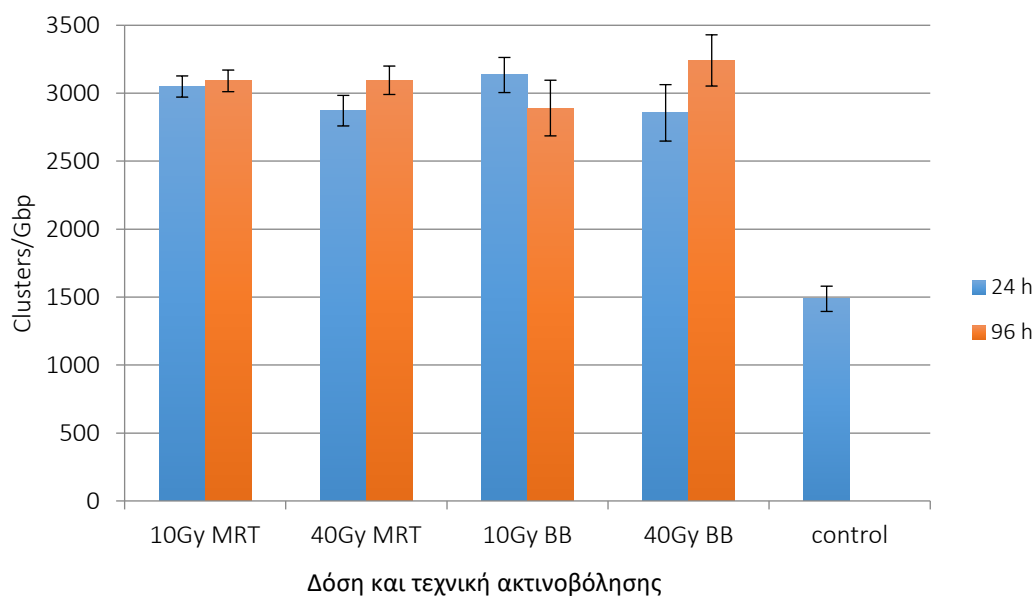
Από το γράφημα δεν μπορούμε να αποφανθούμε με σιγουριά ότι κάποια από τις δύο τεχνικές υπερέχει έναντι της άλλης, καθώς στα 10 Gy τα αποτελέσματα του ορθού μας δείχνουν την BB ενώ τα αποτελέσματα της γλώσσας την MRT. Σύμφωνα πάντως με τις τιμές για το σύνολο των βλαβών, η MRT παρουσιάζεται καλύτερη στη μικρότερη δόση και η BB στη μεγαλύτερη δόση, αλλά πάντα βρισκόμαστε μέσα στα όρια του σφάλματος.

6.4.7 Εξάρτηση από δόση, τεχνική και χρόνο

Αφού λοιπόν κάναμε όλες τις πιθανές ομαδοποιήσεις και είδαμε τις επιρροές που μπορεί να έχουν οι παράμετροι και οι συνδυασμοί αυτών στην εμφάνιση των οξειδωτικών βλαβών, στην παράγραφο αυτή θα παραθέσουμε τα αποτελέσματα με όλες τις παραμέτρους ξεχωριστές. Στους πίνακες 6.4.8 (α,β,γ) θα παρουσιάσουμε τα αποτελέσματα για το ορθό, τη γλώσσα και τελικά τα συνολικά. Όπως πάντα θα εμφανίζονται και τα τυπικά σφάλματα, ενώ στη συνέχεια θα γίνουν και γραφήματα με βάση τους πίνακες αυτούς.

Πίνακας 6.4.8 β – Αποτελέσματα ορθού					
Χρόνος	Δόση και τεχνική				
	10Gy MRT	40Gy MRT	10Gy BB	40Gy BB	control
24 h	3049	2872	3134	2855	1487
Τυπικό σφάλμα(±)	78	113	129	208	93
96 h	3091	3096	2891	3242	
Τυπικό σφάλμα(±)	80	105	205	188	

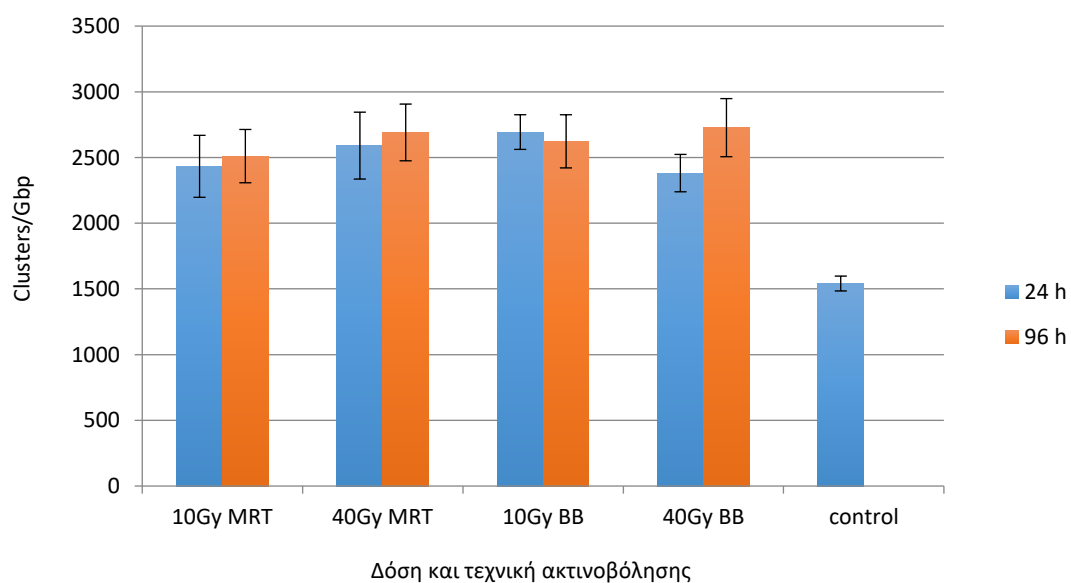
Βλάβες στο ορθό



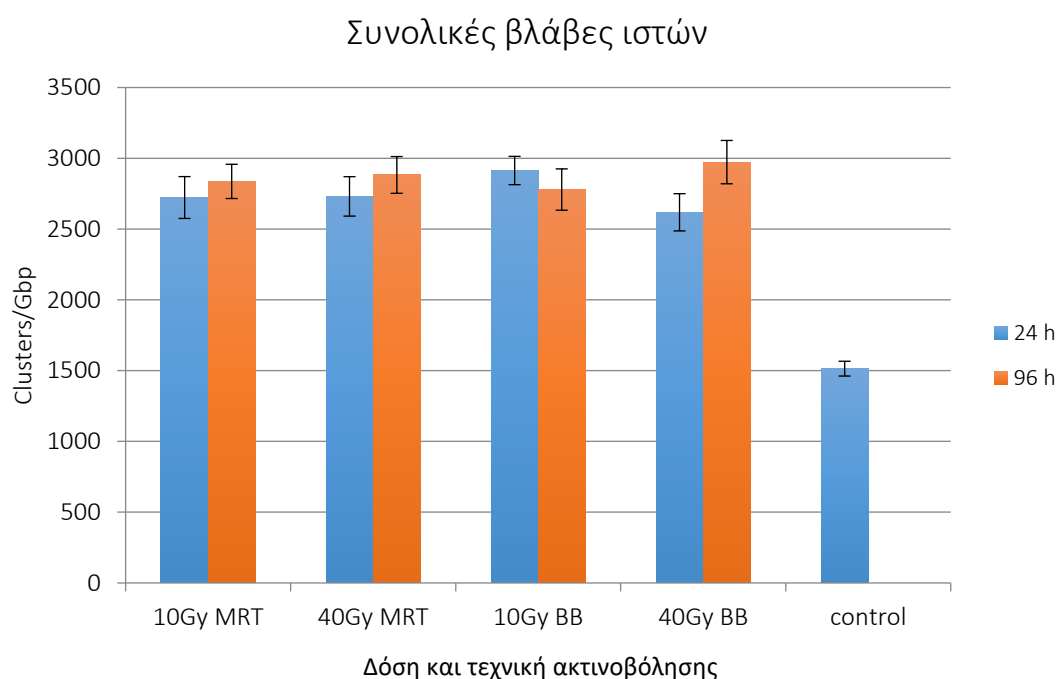
Πίνακας 6.4.8 β -- Αποτελέσματα γλώσσας

Πίνακας 6.4.8 β -- Αποτελέσματα γλώσσας					
Δόση και τεχνική					
Χρόνος	10Gy MRT	40Gy MRT	10Gy BB	40Gy BB	control
24 h	2433	2591	2694	2381	1541
Τυπικό σφάλμα(±)	236	255	132	142	57
96 h	2510	2691	2623	2727	
Τυπικό σφάλμα(±)	203	216	202	221	

Βλάβες στη γλώσσα



Πίνακας 6.4.8 γ -- Συνολικά αποτελέσματα					
	Δόση και τεχνική				
Χρόνος	10Gy MRT	40Gy MRT	10Gy BB	40Gy BB	control
24 h	2723	2731	2914	2618	1514
Τυπικό σφάλμα(±)	148	139	100	132	52
96 h	2837	2883	2779	2973	
Τυπικό σφάλμα(±)	121	130	146	153	



Από τα παραπάνω γραφήματα παρατηρείται μια ομοιογένεια στο μοτίβο που ακολουθούν οι τιμές των βλαβών. Ωστόσο οι βλάβες στη γλώσσα είναι σχετικά μικρότερες από εκείνες που υπολογίστηκαν στο ορθό. Ως επί το πλείστον, 24 ώρες μετά την ακτινοβολήση παρατηρήθηκαν λιγότερες βλάβες απ' ότι στις 96 ώρες. Επίσης η τεχνική MRT δημιουργεί μάλλον λιγότερες βλάβες από την τεχνική BB, ιδίως για τη μικρή δόση.

6.4.8 Συμπεράσματα

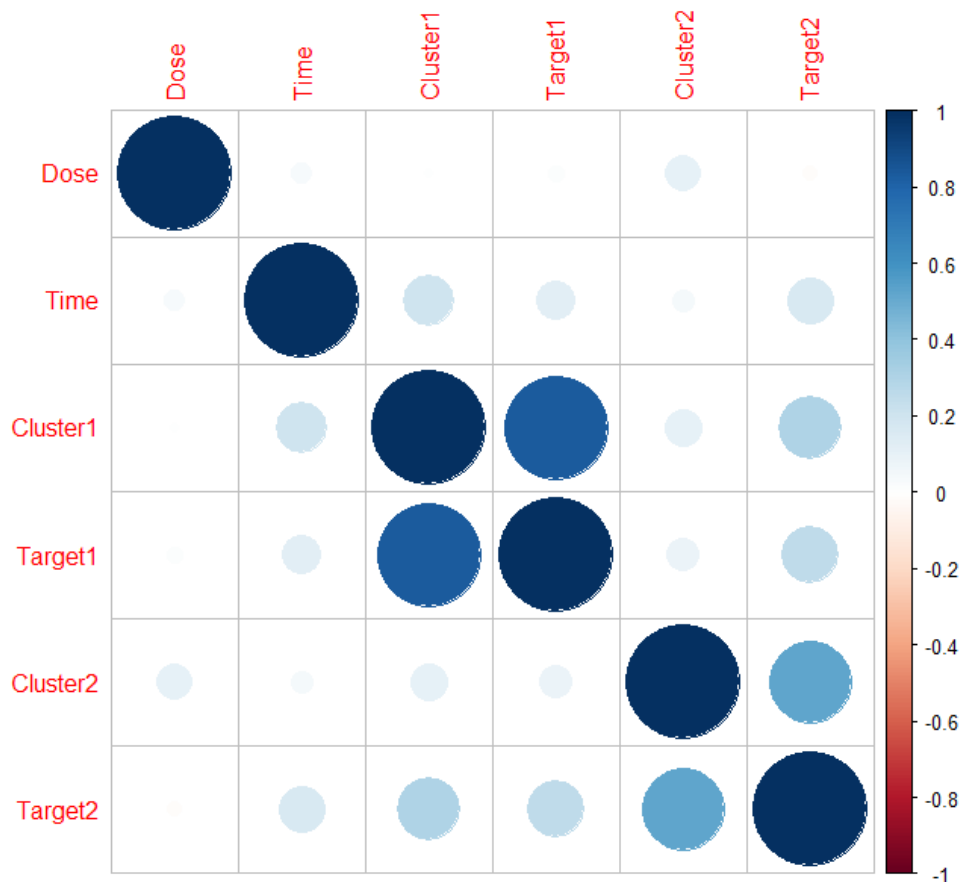
Στις παρούσες παραγράφους χρησιμοποιήσαμε ομαδοποιήσεις και γραφήματα για να οπτικοποιήσουμε τα αποτελέσματα των οξειδωτικών βλαβών που υπολογίσαμε. Παρόλες τις ενδείξεις που προέκυψαν για τις διάφορες τάσεις που ακολουθούν οι τιμές των βλαβών, κανένα μοτίβο δεν εμφανίζεται αρκετά ξεκάθαρα ώστε να μπορούμε να δημιουργήσουμε κάποιο μοντέλο

πρόβλεψης με αυτή τη διαδικασία . Αυτό οφείλεται κατά κύριο λόγο στο γεγονός ότι τα όρια των σφαλμάτων πάντα είναι μεγαλύτερα από τη διακύμανση των τιμών. Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός ότι οι διαφορές των μέσων τιμών των βλαβών για το ορθό, τη γλώσσα και τα συνολικά στοιχεία, σε σχέση με τα αντίστοιχα control είναι 50%, 40% και 46%. Αυτό μας επιβεβαιώνει, χωρίς αμφιβολία, την ύπαρξη βλαβών σε απομακρυσμένους ιστούς.

6.5 Συμπληρωματικές στατιστικές μελέτες

6.5.1 Συντελεστής συσχέτισης Pearson (Pearson correlation coefficient - PCC)

Εκτός από τις μεθόδους που δοκιμάσαμε παραπάνω, για να εξακριβώσουμε τη συσχέτιση των παραμέτρων με τις τιμές των βλαβών που εμφανίστηκαν, διενεργήσαμε για λόγους περαιτέρω διερεύνησης μια ακόμα στατιστική μελέτη στα δείγματα του ορθού. Ο συντελεστής συσχέτισης Pearson μπορεί να πάρει τιμές από το 1, όπου και θα έχουμε θετική συσχέτιση, μέχρι το -1, όπου θα παρατηρείται αρνητική συσχέτιση. Η μηδενική τιμή σημαίνει ότι δε θα έχουμε καθόλου συσχέτιση. Αυτό που κάνουμε ουσιαστικά είναι διερεύνηση για το κατά πόσο μπορούν τα δεδομένα μας να προσαρμοστούν σε μια ευθεία με θετική ή αρνητική κλίση. Ακολουθεί μια εικόνα με τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής, η οποία διενεργήθηκε με τη βοήθεια της στατιστικής προγραμματιστικής γλώσσας R.

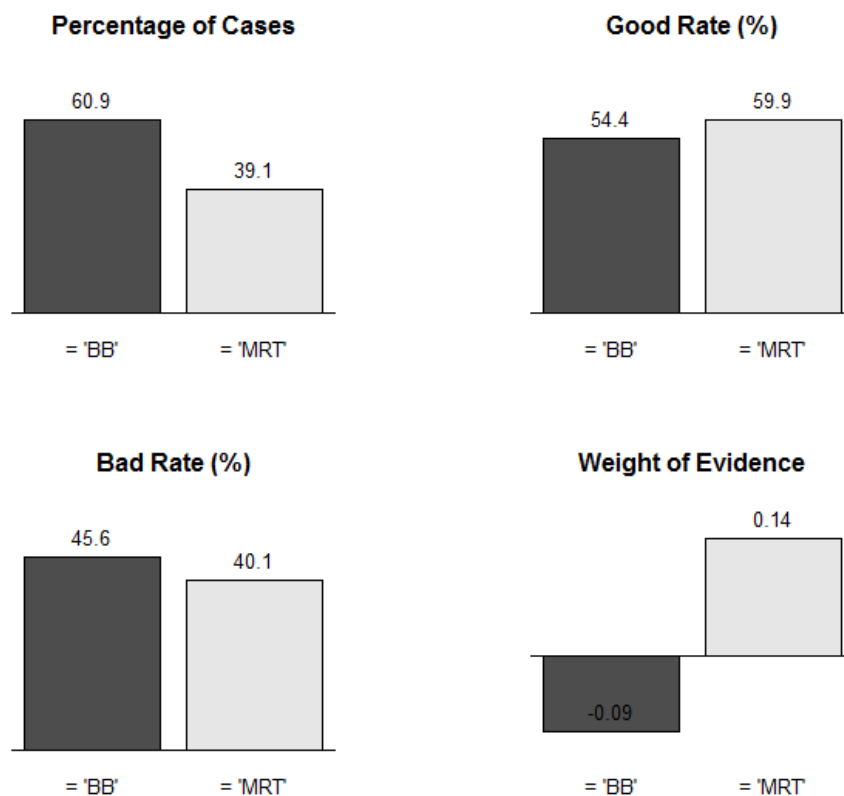


Ως Cluster 1 έχουμε ορίσει τις τιμές των βλαβών της πρώτης διεξαγωγής του πειράματος, ενώ σαν Target 1 βάλουμε την προϋπόθεση να ξεπερνούν τα 3000 Clusters/Gbp. Αντίστοιχα Cluster 2 είναι οι τιμές από τα επαναληπτικά πειράματα και Target 2 το ίδιο.

Από την εικόνα παρατηρούμε ότι αρκετά μεγάλη συσχέτιση μεταξύ παρόμοιων τιμών όπως τα Target 1, Target 2, Cluster 1, Cluster 2. Ωστόσο φαίνεται και μια σχετικά μικρή συσχέτιση του χρόνου με τις προϋποθέσεις που βάλουμε, αλλά και με τις τιμές του πρώτου πειράματος. Επίσης φαίνεται και μια συσχέτιση της δόσης με τις τιμές του επαναληπτικού πειράματος. Αυτά τα αποτελέσματα δεν είναι καινούρια, καθώς τα είχαμε παρατηρήσει και από την διεξαγωγή της Ανονα αλλά και από τα γραφήματα που κάναμε. Παρόλα αυτά αποτελούν μια παραπάνω επιβεβαίωση των συμπερασμάτων μας, η οποία είναι σημαντική καθώς όλα τα συμπεράσματα βασίζονται σε τιμές που είναι πολύ κοντά μεταξύ τους.

6.5.2 Στατιστική μέθοδος πρόβλεψης

Ως τελική στατιστική διερεύνηση διενεργήθηκε μια μελέτη υποθέσεων. Η υπόθεση την οποία ελέγξαμε ήταν η εμφάνιση σοβαρών βλαβών (Target), ανάλογα με την τεχνική ακτινοβολίας και με δεδομένο ότι όλες οι τιμές πάνω από 3000 Clusters/Gbp συμβάλουν θετικά στην υπόθεση αυτή. Και αυτή η μελέτη διενεργήθηκε μόνο στα δείγματα του ορθού, ενώ χρησιμοποιήθηκε η προγραμματιστική γλώσσα R. Στην εικόνα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της διαδικασίας αυτής.



Στο πάνω αριστερά διάγραμμα αντικατοπτρίζεται το ποσοστό των τιμών που έχει η κάθε τεχνική στο σύνολο των αποτελεσμάτων. Όπως απορρέει και από τα δεδομένα του παραρτήματος, τα BB είναι περισσότερα από τα MRT και άρα το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο. Τα διαγράμματα που βρίσκονται στη διαγώνιο μας δείχνουν την επίδραση που έχει κάθε τεχνική στην επίτευξη του Target, δηλαδή στην αύξηση (Good rate) ή στη μείωση (Bad Rate) των βλαβών. Όπως παρατηρούμε και οι δύο τεχνικές έχουν κοντινά ποσοστά, ωστόσο από τη συγκεκριμένη μελέτη, όπως και στο γράφημα της παραγράφου 6.4.3, φαίνεται ότι η τεχνική MRT ρέπει περισσότερο προς την δημιουργία βλαβών. Αυτό επιβεβαιώνεται και από το διάγραμμα του “Weight of Evidence”, το οποίο μας δείχνει ότι αν φτιάχναμε ένα μοντέλο πρόβλεψης η τεχνική MRT θα είχε κατά 0,14 θετική επιρροή στις τιμές ενώ η τεχνική BB κατά 0,09 αρνητική. Για να είχαν όμως κάποιο αποτέλεσμα σε μοντέλο τα στοιχεία θα έπρεπε η απόλυτη διαφορά των δύο τιμών να ήταν μεγαλύτερη. Τα συμπεράσματα που μπορούμε να εξάγουμε τελικά από αυτή τη στατιστική μελέτη είναι δύο. Το πρώτο είναι ότι από τα δεδομένα του ορθού η τεχνική MRT παρουσιάζεται πιο επιβλαβής από την τεχνική BB (αν και είναι πολύ κοντινές οι τιμές), πράγμα που θα μπορούσε να εξηγηθεί από το ότι οι τιμές των 96 h που ευνοούν την τεχνική BB έχουν μεγαλύτερη βαρύτητα από εκείνες των 24 h. Το δεύτερο συμπέρασμα είναι ότι για να μπορούσαμε να πάρουμε καλύτερα αποτελέσματα και να θεωρούσαμε ότι είναι ικανά να στηρίξουν κάποιο μοντέλο πρόβλεψης, χρειαζόμαστε πολύ μεγαλύτερο αριθμό δεδομένων (≥ 1500 δείγματα έναντι των δικών μας 200).

6.6 Συμπεράσματα

Το πείραμα που διενεργήθηκε με αφορμή τη διπλωματική αυτή εργασία, προσφέρει μια αρχική αλλά συνάμα περιεκτική ματιά στα βιολογικά αποτελέσματα λόγω ιοντίζουσας ακτινοβολίας που παρουσιάζονται σε απομακρυσμένους ιστούς ποντικών. Στην προσπάθεια να εντοπίσουμε λόγους που θα συμβάλουν αυξητικά στη δημιουργία των βλαβών DNA, ο αριθμός τους μελετήθηκε ως συνάρτηση των διαστάσεων της περιοχής ακτινοβολήσης, της δόσης, του χρόνου παρέλευσης μέχρι την απομόνωση και της τεχνικής ακτινοβολήσης. Σε κάθε περίπτωση τα άμεσα και έμμεσα αποτελέσματα της ΙΑ στα κύτταρα της περιοχής ακτινοβολήσης (απόπτωση, μεμονωμένες ή/και σύνθετες βλάβες DNA, ελεύθερες ρίζες) φαίνεται πως προκαλούν παρατεταμένο στρες στον οργανισμό μέσω των διάφορων μονοπατιών και αποκρίσεων αυτού.

Καθώς οι τιμές των βλαβών των απομακρυσμένων ιστών είναι σημαντικά διαφορετικές από εκείνες των μη ακτινοβολημένων control τους είμαστε αρχικά σίγουροι για την επιτυχή ανίχνευση βλαβών στο DNA των πρώτων. Ακόμα, μπορούμε να πούμε με σιγουριά πως οι βλάβες αυτές οφείλονται καθαρά σε ενδογενείς παράγοντες καθώς μετρήθηκε μηδενική διασπορά (ή έως 1 mGy) της δόσης σε απόσταση 5 cm μακριά από το σημείο ακτινοβολήσης. Η μέση τιμή των βλαβών για τα δείγματα control στη γλώσσα είναι 1541 Clusters/Gbp ενώ η αντίστοιχη τιμή για το ορθό είναι 1487 Clusters/Gbp. Και οι δύο τιμές είναι κοντά στο εύρος τιμών που έχουν βρεθεί και σε άλλες μελέτες [113], οπότε μπορούμε να θεωρήσουμε ότι οι τιμές ελέγχου μας είναι σωστές και οτιδήποτε παραπάνω από αυτές υποδεικνύει επαγωγή περαιτέρω βλαβών λόγω ΜΣΕ.

Οι οξειδωτικές βλάβες που υπολογίστηκαν στη γλώσσα ήταν κατά μέσο όρο 2585 Clusters/Gbp, ενώ στο ορθό 3019 Clusters/Gbp, δηλαδή κατά ~1,17 φορές υψηλότερες. Η διαφορά αυτή μπορεί να οφείλεται σε διαφορές στην ικανότητα επιδιόρθωσης των βλαβών από τους διαφορετικούς ιστούς καθώς και σε παθοφυσιολογικές αποκρίσεις που περιλαμβάνουν φλεγμονώδεις αποκρίσεις και την αντιοξειδωτική ικανότητα. Από αυτό φαίνεται πως υπάρχουν ιστολογικά κριτήρια στην εμφάνιση περισσότερων ή λιγότερων OCDLs και DSBs. Ένα από αυτά και ίσως το βασικότερο είναι η ταχύτητα διαίρεσης των διαφορετικών κυττάρων. Για παράδειγμα τα κύτταρα του ορθού αντικαθίστανται από νέα κύτταρα κάθε 2-4 μέρες ενώ τα κύτταρα της γλώσσας κάθε 10 μέρες. Επειδή οι οξειδωτικές σύνθετες διπλόκλωνες βλάβες παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του κυττάρου, το οποίο χρειάζεται περίπου 2.67 μέρες ή 64 ώρες για την επιδιόρθωσή τους, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι τα κύτταρα που διαιρούνται γρηγορότερα έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να μεταφέρουν τις βλάβες τους στις νέες γενιές. Αντίθετα, η απόσταση του ιστού από το αρχικό σημείο ακτινοβολήσης δεν φαίνεται να παίζει κάποιο σημαντικό ρόλο.

Ένα άλλο αξιοσημείωτο γεγονός ήταν ότι η εμφάνιση των ΜΣΕ δεν φαίνεται να επηρεάστηκε από τις διαστάσεις της δέσμης στην περιοχή ακτινοβολήσης. Τόσο για περιοχές αρκετά μικρές 0,5 mm² (2x2 mm² field) όσο και για τις μεγαλύτερες 64 mm² (8x8 mm² field) δεν παρατηρήθηκε σημαντική διακύμανση στις τιμές των βλαβών που μετρήθηκαν σε συνέπεια με τα αποτελέσματα ευρύτερης έρευνας [123]. Οι ακραίες τιμές των βλαβών στους ιστούς της γλώσσας και του εντέρου διαφέρουν κατά περίπου 15% και 13% αντίστοιχα, ποσοστό που μειώνεται ακόμα περισσότερο με την ομαδοποίηση των τιμών ανά διάσταση. Έτσι τελικά μπορούμε να πούμε με σχετική σιγουριά ότι το γινόμενο της απορροφούμενης δόσης με την περιοχή ακτινοβολήσης δε φαίνεται να επηρεάζει τις ΜΣΕ που παρατηρούνται στους απομακρυσμένους ιστούς.

Το τρίτο στοιχείο που είναι εμφανές από τα παραπάνω αποτελέσματα, είναι πως οι οξειδωτικές βλάβες που μετρήθηκαν έχουν αρκετά κοντινές τιμές και για τις δύο δόσεις ακτινοβολίας που χρησιμοποιήθηκαν. Υπάρχει μια διαφαινόμενη μικρή μείωση των βλαβών για τη δόση των 40 Gy, που πιθανότατα οφείλεται στο μεγαλύτερο αριθμό αποπτωτικών κυττάρων που προκύπτουν από μια τόσο υψηλή δόση, ωστόσο μετά από ώρα τα αποτελέσματα εξισορροπούνται. Οπότε τελικά και οι δύο δόσεις είναι ικανές να δημιουργήσουν εκτεταμένες βλάβες στο σημείο ακτινοβολήσης, με αποτέλεσμα να εξωθούνται σε δράση οι μηχανισμοί επαγωγής ΜΣΕ δημιουργώντας ένα παρατεταμένο οξειδωτικό στρες που θα επιφέρει νέες οξειδωτικές βλάβες και δίκλωνες θραύσεις στους απομακρυσμένους ιστούς. Από τα παραπάνω, μπορούμε να πούμε πως υπάρχει κάποιο πλατό δόσης μετά το οποίο οι βλάβες δεν αυξάνονται περαιτέρω και το οποίο όπως φαίνεται έχει ήδη ξεπεραστεί από τη δόση των 10 Gy.

Όσο αφορά στο χρόνο που πέρασε για την απομόνωση των ιστών, παρατηρήσαμε ότι και μετά από 96 ώρες από την αρχική ακτινοβολήση τα επίπεδα των βλαβών εμφανίζονται το ίδιο υψηλά αν όχι υψηλότερα χωρίς να παρατηρείται τάση για πτώση. Τα συμπλέγματα αυτά δεν γίνεται να είναι ίδια με εκείνα της άμεσης απόκρισης του οργανισμού καθώς λόγω κυτταρικής διαίρεσης οι βλάβες σε απέναντι κλώνους γίνονται μονόκλωνες και δε θα μπορούσαμε να τις ανιχνεύσουμε. Οπότε υπάρχει μια διαφαινόμενη επαγωγή και αναδημιουργία των οξειδωτικών βλαβών DNA σε απομακρυσμένους ιστούς που υποδεικνύει παρατεταμένη και διευρυμένη ανάπτυξη στρες.

Εν κατακλείδι, από τις προσπάθειες που έγιναν για να ανιχνευτούν οι εξαρτήσεις των τιμών από τις διάφορες παραμέτρους που μελετήθηκαν, το πιο ασφαλές συμπέρασμα που μπορέσαμε να εξάγουμε είναι η παρουσία μιας παρατεταμένης φλεγμονώδους απόκρισης που προάγει τη συνεχή αναδημιουργία των βλαβών DNA. Παρόλο που είχαμε ισχυρές ενδείξεις κατά περιπτώσεις για το μοτίβο που ακολουθούν οι τιμές, η σημαντικότητα του αποτελέσματος ή τα όρια των σφαλμάτων δεν μας επέτρεψαν να πούμε με σιγουριά ότι υπό τις συνθήκες αυτές θα προβλέπεται το συγκεκριμένο αποτέλεσμα που λάβαμε. Έτσι, θα μπορούσαμε να πούμε ότι τα δεδομένα μας ήταν επαρκή για μια ποσοτική εκτίμηση, ωστόσο για μια πιο ποιοτική μελέτη θα πρέπει να προστεθούν πολλά ακόμη δεδομένα ώστε να μπορέσουν οι στατικές μελέτες να βγάλουν κάποιο μοντέλο πρόβλεψης. Μια καλή μελλοντική κατεύθυνση αφορά στη διεξοδική μελέτη των διαφορετικών πιθανών τρόπων ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού, των σημάτων κινδύνου, των ειδών των μακροφάγων και των κυτοκίνων που εμπλέκονται καθώς και της αναλογίας των διάφορων ομαδοποιημένων βλαβών στο DNA, ώστε να αποκτήσουμε μια καλύτερη εικόνα του φαινομένου και των αποτελεσμάτων που επιφέρει τελικά η ακτινοβολία ενός οργανισμού.

Βιβλιογραφία

1. Σαρρής, Π. (2004) *Εισαγωγή στην κυτταρική βιολογία και γενετική*.
2. Wolfe, Stephen L. (1972) *Biology of the cell*, Wadsworth Pub. Co.
3. Alberts, B., et al. (2009) *Essential cell biology*. 3rd edition, New York: Garland Science
4. Lodish, H., et al. (2007) *Molecular Cell Biology*. 6th edition, W.H.Freeman and Company
5. E.I. Azzam et al. (2012) *Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury*. *Cancer Letters* 327 48–60
6. Μακροπούλου, Μ. (2010) *Σημειώσεις Βιοφυσικής*,
7. Nigg EA. *Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle*. (June 1995). *BioEssays* 17 (6): 471–80
8. Cooper, G.M., *The Cell: A molecular approach*. 2nd edition, ed. 2000, Sunderland (MA): Sinauer Associates
9. Μαργαρίτης, Χ.Λ., *Ραδιοβιολογία*, ed.1998, Επτάλοφος
10. Edward, L.A., *Radiation Biophysics*, 2nd edition, ed. 1998, Academic Press
11. International Atomic Energy Agency, *Radiation Biology*, ed. 2010, IAEA
12. Ελληνική Επιτροπή Ατομικής Ενέργειας (2011) *Μαθήματα ακτινοπροστασίας για χειριστές ιατρικών μηχανημάτων ιοντίζουσων ακτινοβολιών*. Αθήνα.
13. Γαζής, Ε.Ν. ,(1999) *Ιοντίζουσες ακτινοβολίες*, εκδ. ΕΜΠ
14. Spinks, J.W.T. and Woods, R.J. (1990) *An introduction to Radiation Chemistry*, 3rd edition, ed., Wiley-Interscience
15. Georgakilas, A.G., P. O'Neill, and R.D. Stewart (2013) *Induction and repair of clustered DNA lesions: What do we know so far?* *Rad Res.*, 180(1): p. 100-109
16. Ward, J.F. (1988) *DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation and repairability*, *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 35 (3): 95-125
17. De Bont R, van Larebeke N. (2004) *Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data*. *Mutagenesis* 19(3):169-185
18. Lhomme, J; JF Constant; M Demeunyk (1999). *Abasic DNA Structure Reactivity and Recognition*. *Biopolymers* 52 (2): 65-83.
19. Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair* (2004). 3(1):1-12
20. Ward, J.F (1981) *Some biochemical consequences of the spatial distribution of ionizing radiation produced free radicals*. *Radiat. Res.* 86:185-195
21. Hada, M. and A.G. Georgakilas (2008) *Formation of clustered DNA Damage after high-LET irradiation: A review*. *J. Radiat. Res.* 49: p. 203-210.
22. Godhead, D.T., (1994), *Initial events in the cellular effects of ionizing radiation: clustered damage in DNA*. *Int. J. Radiat. Biol.* 65: 7-17

23. Grenon, M. et al. (2001) *Checkpoint activation in response to double-strand breaks requires the Mre11/Rad50/Xrs2 complex*. *Nat. Cell Biol.* 3:844–847
24. Durocher, D. and S.P. Jackson (2001) *DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme? Current Opinion in Cell Biology.* 13(2): p. 225-231.
25. Ashcroft, M. et al., (1999) *Regulation of p53 Function and Stability by Phosphorylation*. *Mol. Cell. Biol.*, 19(3): 1751-1758
26. Bartek J, Lukas J (2003) *Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer*. *Cancer Cell* 3: 421–429
27. Wen-Cheng Chou, et al. (2008) *Chk2-dependent phosphorylation of XRCC1 in the DNA damage response promotes base excision*. *The EMBO Journal* 27: 3140-3150
28. Chiruvella, K.K. et al. (2013) *Repair of double-strand breaks by end joining*. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5: a012757
29. Price, B.D. and D'Andrea, A.D. (2013) *Chromatin remodeling at DNA double-strand breaks*. *Cell* 152, 1344–1354
30. Pena-Diaz, J. and Jiricny, J. (2012) *Mammalian mismatch repair: error-free or error-prone?* *Trends Biochem. Sci.* 37, 206–214
31. Kamileri, I. et al. (2012) *Nucleotide excision repair: new tricks with old bricks*. *Trends Genet.* 28:566–573
32. Schermerhorn K.M. and Delaney S. (2014) *A Chemical and Kinetic Perspective on Base Excision Repair of DNA*. *Acc. Chem. Res.*, 47 (4): 1238–1246
33. Beard, W. A. And Wilson, S. H. (2006) *Structure and Mechanism of DNA Polymerase β* . *Chem. Rev.* 106, 361–382
34. Al-Tassan, N. et al., (2002) *Inherited Variants of MYH Associated with Somatic G:C→T:A Mutations in Colorectal Tumors*. *Nat. Genet.* 30:227–232
35. Doetsch, P., Cunningham, R. (1990) *The Enzymology of Apurinic/Apyrimidinic Endonucleases*. *Mutat. Res.* 236:173–201
36. Kovtun, I. V., et al., (2007) *OGG1 Initiates Age-dependent CAG Trinucleotide Expansion in Somatic Cells*. *Nature* 447, 447–452.
37. Walker FO, (2007) *Huntington's disease*, *Lancet* 369 (9557): 218–28
38. M. Kadhim et al. (2013) *Non-targeted effects of ionising radiation—Implications for low dose risk*, *Mutation Research* 752:84–98
39. Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S, Loeb LA (1992). *8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G-T and C-A substitutions*. *J Biol Chem.* 267 (1): 166–72
40. Sawyer, SA; Parsch, J; Zhang, Z; Hartl, DL (2007) *Prevalence of positive selection among nearly neutral amino acid replacements in Drosophila* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 (16): 6504–10
41. Majno, G. and I. Joris (1995) *Apoptosis, oncosis and necrosis: An overview of cell death*. *Am. J. Pathol.* 146: p. 3-15.

42. Cohen, B.L. (2007) *The cancer risk from low-level radiation. Radiation Dose from Adult and Pediatric Multidetector Computed Tomography.*
43. International Commission on Radiological Protection(2012) *ICRP statement on tissue reactions and early and late effects of radiation in normal tissues and organs – threshold doses for tissue reactions in a radiation protection context*, ICRP publ. 118, Ann. ICRP 41(1-2): 1–322.
44. Takuma Nomiya (2013) *Discussions on target theory: past and present*, J Radiat Res. Nov, 54(6): 1161–1163.
45. Smilenov, E.J. Hall, W.M. Bonner, O.A. Sedelnikova (2006) *A microbeam study of DNA double-strand breaks in bystander primary human fibroblasts.* Radiation protection dosimetry 122:256-259.
46. Hatzi, I.V. et al. (2015) *Non-targeted radiation effects in vivo: A critical glance of the future in radiobiology.* Cancer Letters 356(1):34-42
47. C.N. Sprung et al. (2015) *Oxidative DNA damage caused by inflammation may link to stress-induced non-targeted effects*, Cancer Letters 356: 72-81.
48. Ermolaeva, M.A and Schumacher, B. (2013) *The innate immune system as mediator of systemic DNA damage responses.* Commun. Integr. Biol. 13;6(6):e26926
49. Siva, S. et al. (2015) *Abscopal effects of radiation therapy: A clinical review for the radiobiologist.* Cancer Letters 356(1):82–90
50. Wright, E. G. (2010) *Manifestations and mechanisms of non-targeted effects of ionizing radiation.* Mutation Research 687(1-2):28-33
51. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F (2008) *Cancer-related inflammation.* Nature 454:436–444.
52. Redon, C. E. et al., (2010) *Tumors induce complex DNA damage in distant proliferative tissues in vivo.* PNAS 107(42):17992-7
53. Morgan, W.F and Sowa,M.B. (2015) *Non-targeted effects induced by ionizing radiation: Mechanisms and potential impact on radiation induced health effects.* Cancer Letters 356(1):17-21
54. Nagasawa, J.B. Little (1992) *Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles.* Cancer research 52:6394-6396
55. Shao, C. et al. (2004) *Targeted cytoplasmic irradiation induces bystander response*, Proc. Natl. Acad Sci. USA 101(37):13495-500
56. G. Schettino, S.T. Al Rashid, K.M. Prise (2010) *Radiation microbeams as spatial and temporal probes of subcellular and tissue response.* Mutation research 704 68-77
57. Matsumoto, H. & Ohnishi T. (2004) *Contribution of radiation-induced, nitric oxide-mediated bystander effect to radiation-induced adaptive response.* Biol. Sci. Space 18(3):108-9
58. Joiner, M.C. et al. (1996) *Hypersensitivity to very-low single radiation doses: its relationship to the adaptive response and induced radioresistance.* Mutat. Res. 358 :171– 183.
59. R. Mole (1953) *Whole body irradiation – radiobiology or medicine?.* Br J. Radiol. 26 234–241.

60. Τσίντου Μαγδαληνή (2011) *Μη στοχευμένες επιδράσεις της ιοντίζουσας ακτινοβολίας*. Helmedica 8.
61. M.P. Nobler (1969) *The abscopal effect in malignant lymphoma and its relationship to lymphocyte circulation*. Radiology 93:410–412.
62. GOH, K.O. & SUMNER, H. (1968) *Breaks in normal human chromosomes: Are they induced by a transferable substance in the plasma of persons exposed to total-body irradiation?* Radiat. Res. 35(1): 171-81
63. M.A. Khan, R.P. Hill, J. Van Dyk (1998) *Partial volume rat lung irradiation: an evaluation of early DNA damage*. Int. J. Radiat. Oncology Biol. Phys. 40: 467–476.
64. Koturbash, I. et al. (2008) *In vivo bystander effect: cranial X-irradiation leads to elevated DNA damage, altered cellular proliferation and apoptosis, and increased p53 levels in shielded spleen*. Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys. 70(2):554-62
65. Hayashi, Y. et al. (2005) *Long-term effects of radiation dose on inflammatory markers in atomic bomb survivors*, Am. J. Med. 118:83–86.
66. T. Hayashi, Y. et al (2003) *Radiation dose-dependent increases in inflammatory response markers in A-bomb survivors*. Int. J. Radiat. Biol. 79:129–136.
67. R. Wakeford, M.P. Little (2003) *Risk coefficients for childhood cancer after intrauterine irradiation: a review*. Int. J. Radiat. Biol. 79:293–309.
68. [179] International Commission on Radiological Protection (2003) *Biological effects after prenatal irradiation (embryo and fetus)*, Ann. ICRP 33:5–206.
69. D.L. Preston, H. Cullings, A. Suyama, S. Funamoto, N. Nishi, M. Soda, K. Mabuchi, K. Kodama, F. Kasagi, R.E. Shore (2008) *Solid cancer incidence in atomic bomb survivors exposed in utero or as young children*. J. Natl. Cancer Inst. 100: 428–436.
70. M.S. Pearce, J.A. Salotti, M.P. Little, K. McHugh, C. Lee, K.P. Kim, N.L. Howe, C.M. Ronckers, P. Rajaraman, A.W. Sir Craft, L. Parker, G.A. Berrington de (2012) *Radiation exposure from CT scans in childhood and subsequent risk of leukaemia and brain tumours: a retrospective cohort study*. Lancet 380: 499–505.
71. Annals of the ICRP: (2012) *Early and late effects of radiation in normal tissues and organs: threshold doses for tissue reactions and other non-cancer effects of radiation in a radiation protection context*. public draft;. published at ICRP website: www.icrp.org
72. Danae A. Laskaratou, Ifigeneia V. Mavragani, and Alexandros G. Georgakilas (2014) *Cancer and Inflammation Mechanisms: Chemical, Biological and Clinical Aspects. Ch 18: Inflammatory pathways of radiation-induced tissue injury*. 1st Edition. John Wiley & Sons.
73. Doty RL: *The olfactory system and its disorders*. Semin Neurol 2009, 29:74–81.
74. Rodgers CC: *Dental X-ray exposure and Alzheimer's disease: a hypothetical etiological association*. Med Hypotheses 2011, 77:29–34
75. Lazarini, F. et al. (2009) *Cellular and behavioral effects of cranial irradiation of the subventricular zone in adult mice*. PLoS One 4:e7017.
76. Loganovsky KN, Volovik SV, Manton KG, Bazyka DA, Flor-Henry P: *Whether ionizing radiation is a risk factor for schizophrenia spectrum disorders?*, World J Biol Psychiatry 2005, 6:212–230

77. Iwata Y, Suzuki K, Wakuda T, Seki N, Thanseem I, Matsuzaki H, Mamiya T, Ueki T, Mikawa S, Sasaki T, Suda S, Yamamoto S, Tsuchiya KJ, Sugihara G, Nakamura K, Sato K, Takei N, Hashimoto K, Mori N: *Irradiation in adulthood as a new model of schizophrenia*. PLoS One 2008, 3:e2283.
78. Acharya MM, Lan ML, Kan VH, Patel NH, Giedzinski E, Tseng BP, Limoli CL: *Consequences of ionizing radiation-induced damage in human neural stem cells*. Free Radic Biol Med 2010, 49:1846–1855.
79. Picano, E. et al. (2012) *Cancer and non-cancer brain and eye effects of chronic low-dose ionizing radiation exposure*. BMC Cancer, 12:157
80. Mancuso, M. et al. (2011) *Oncogenic bystander 705 radiation effects in Patched heterozygous mouse cerebellum*, Proc. Nat. Acad. 706 Sci. USA 105 (2008) 12445–12450.
81. K. Ohba, K. Omagari, T. Nakamura, N. Ikuno, S. Saeki, I. Matsuo, H. Kinoshita, J. Masuda, H. Hazama, I. Sakamoto, *Abscopal regression of hepatocellular carcinoma after radiotherapy for bone metastasis*, Gut 43 (1998) 575–577.
82. Balkwill, F & Joffroy, C., *TNF: a tumor-suppressing factor or a tumor-promoting factor?*, Future Oncol. 6(12):1833-6
83. Havaki, S. et al (2015) *The role of oxidative DNA damage in radiation induced bystander effect*, Cancer Letters 356: 43–51
84. Klammer, H. et al (2015) *Bystander effects as manifestation of intercellular communication of DNA damage and of the cellular oxidative status*. Cancer Letters 356: 58-71
85. E.I. Azzam, S.M. de Toledo, J.B. Little, *Oxidative metabolism, gap junctions and the ionizing radiation-induced bystander effect*, Oncogene 22 (2003) 7050– 7057.
86. S. Prithivirajasingh, M.D. Story, S.A. Bergh, F.B. Geara, K.K. Ang, S.M. Ismail, et al., *Accumulation of the common mitochondrial DNA deletion induced by ionizing radiation*, FEBS Lett. 571 (2004) 227–232.
87. M.A. Graziewicz, B.J. Day, W.C. Copeland, *The mitochondrial DNA polymerase as a target of oxidative damage*, Nucl. Acids Res. 30 (2002) 2817–2824.
88. Land, G. L. & Messmer, K. (2012) *The danger theory in view of the injury hypothesis: 20 years later*. Front. Immunology 3:349
89. Matzinger, P. (1994). *Tolerance, danger, and the extended family*. Annu. Rev. Immunol. 12, 991–1045.
90. Heil, M. & Land, W. G. (2014) *Danger signals – damaged-self recognition across the tree of life*. Front. Plant Sci. 5:578
91. Chatzinikolaou, G., Karakasilioti, I. & Garinis, G.A. (2014) *DNA damage and innate immunity: links and trade-offs*, Trends in Immunology vol. 35, issue 9, p429-435
92. Glebova, K. et al. (2015) *Oxidized extracellular DNA as a stress signal that may modify response to anticancer therapy*. Cancer Letters 356: 22-33
93. Patel, S.P. (2011) *The Inflammatory response to double stranded DNA in endothelial cells is mediated by NFkB and TNFa*. Plosone 6(5): e19910

94. Zhang, X. et al. (2011) *Cutting edge: Ku70 is a novel cytosolic DNA sensor that induces type III rather than type I IFN*. J. Immunol. 186, 4541–4545
95. Ferguson, B.J. et al. (2012) *DNA-PK is a DNA sensor for IRF-3-dependent innate immunity*. Elife 1, e00047
96. Aivaliotis, I. L. (2012) *How do cytokines trigger genomic instability?*, Journal of Biomedicine & Biotechnology 2012:536761
97. Zhou, H. et al. (2008) *Mitochondrial function and nuclear factor-kappaB-mediated signaling in radiation-induced bystander effects*, Cancer Res. 68: 2233–2240.
98. Zhou, H. et al. (2005) *Mechanism of radiation-induced bystander effect: role of the cyclooxygenase-2 signaling pathway*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 102: 14641–14646.
99. J.S. Dickey, B.J. Baird, C.E. Redon, M.V. Sokolov, O.A. Sedelnikova, W.M. Bonner, (2009) *Intercellular communication of cellular stress monitored by gamma-H2AX induction*. Carcinogenesis 30: 1686-1695.
100. V.G. Gorgoulis, et al., (2003) *P53 activates ICAM-1 (CD54) expression in an NF- kappaB-independent manner*, EMBO J. 22 1567–1578.
101. Sprung, C.N. et al. (2015) *Immunological markers that predict radiation toxicity*. Cancer Letters
102. Klimp, A.H. et al. (2002) *A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer*. Crit. Rev. Onc. Hematol. 44(2):143-61.
103. Tawa, R. et al. (1998) *Effects of X-ray irradiation on genomic DNA methylation levels in mouse tissues*. J Radiat. Res. 39(4):271-8.
104. Franco, R. et al. (2008) *DNA methylation and carcinogenesis*. Cancer Letters 266:6-1
105. Ghandhi, S.A. (2008), *Global gene expression analyses of bystander and alpha particle irradiated normal human lung fibroblasts: synchronous and differential responses*, BMC Med. Genomics 1:63.
106. Chaudry, M.A. (2006), *Radiation-induced gene expression profile of human cells deficient in 8-hydroxy-2'-deoxyguanine glycosylase*, Int. J. Cancer 118(3):633-42
107. Lontos, M. (2007), *Deregulated overexpression of hCdt1 and hCdc6 promotes malignant behavior*, Cancer Res. 67(22):10899-909.
108. Sutherland, B.M. et al. (2003), *Quantifying clustered DNA damage induction and repair by gel electrophoresis, electronic imaging and number average length analysis*. Mutat. Res. 531: 93–107
109. Sutherland B.M. et al. (2003), *Evaluation of number average length analysis in quantifying double strand breaks in genomic DNAs*. Biochemistry. 42:3375-84.
110. Hada, M. & Georgakilas, A.G. (2008), *Formation of clustered DNA damage after high-LET irradiation: a review*. J. Radiat. Res. 49(3):203-10
111. Clifford D. Mol, Tahide Izumi, Sankar Mitra, and John A. Tainer (2000). *"DNA-bound structures and mutants reveal abasic DNA binding by APE1 DNA repair and coordination"*. Nature 403 (6768): 451–456

112. Mark R. Kelley & Melissa L. Fishel (2007). "*The DNA base excision repair protein Ape1/Ref-1 as a Therapeutic and chemopreventive target*". *Molecular Aspects of Medicine* 28 (3-4): 375–395
113. Gollapalle, E. et al. (2007), *Detection of oxidative clustered DNA lesions in X-Irradiated mouse skin tissues and human MCF-7 breast cancer cells*. *Radiation Research* 167:207-216
114. J. Cadet, T. Douki, D. Gasparutto & J. Ravanat, (2003) *Oxidative damage to DNA: Formation, measurement and biochemical features*. *Mutat. Res.* 531, 5–23
115. C. M. Gedik, A. Collins and EESCOD (2005), *Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: Results of an in terlaboratory validation study*. *FASEB J.* 19, 82–84
116. Bennett, P.V. et al (2005) *Endogenous DNA damage clusters in human skin, 3-D model and cultured skin cells*. *Free Radic. Biol. Med.* 39, 832–839
117. A. G. Georgakilas, P. V. Bennett and B. M. Sutherland, *High efficiency detection of bistranded abasic clusters in γ -irradiated DNA by putrescine*. *Nucleic Acids Res.* 30, 2800–2808
118. Redon C, Dickey JS, Nakamura A, Kareva I, Naf D, Nowsheen S, et al. (2010) *Tumors induce complex DNA damage in distant proliferative tissues in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:17992–97.
119. Chastain PD, Nakamura J, Rao S, Chu H, Ibrahim JG, Swenberg JA, et al. (2010) *Abasic sites preferentially form at regions undergoing DNA replication*. *FASEB J* 24:3674–80.
120. Boiteux, S. and J.P. Radicella, *The human OGG1 gene: structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis*. *Arch Biochem Biophys*, 2000. 377(1): p. 1-8.
121. Klaunig JE, Kamendulis LM (2004) *The role of oxidative stress in carcinogenesis*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44: 239-267.
122. Lindahl T (1993) *Instability and decay of the primary structure of DNA*. *Nature* 362: 709-715.
123. Jessica Ventura, Pavel N. Lobachevsky, Jason S. Palazzolo, Helen Forrester, Nicole M. Haynes, Alesia Ivashkevich, Andrew W. Stevenson, Christopher J. Hall, Andreas Ntargaras, Vasilis Kotsaris, Gerasimos Ch. Pollakis, Gianna Potsi, Konstantinos Skordylis, Georgia Terzoudi, Ioannis S. Pateras, Vassilis G. Gorgoulis, Alexandros G. Georgakilas, Carl N. Sprung, Olga A. Martin, *Localized Synchrotron Irradiation of Mouse Skin Induces Persistent Systemic Genotoxic and immune Responses*. *Cancer Research*, 2017

Παράρτημα

Εδώ περιλαμβάνονται τα αναλυτικά αποτελέσματα από τον υπολογισμό των OCDLs των ιστών

Δείγματα γλώσσας					
Sample Name	hOGG1 enzyme				
	Clusters/Gbp (1st run)	Clusters/Gbp (Rerun)	Average Clusters/Gbp	Standard Error	Average Group Value of CI/Gbp
1 MRT 10Gy 2x2.1 Tongue -24h	2714,110707	2675,376449	2694,743578	274,7330073	2471,60188
1 MRT 10Gy 2x2.2 Tongue -24h	2345,858764	1340,653466	1843,256115		
1 MRT 10Gy 2x2.3 Tongue -24h	2985,720752	3432,110363	3208,915558		
1 MRT 10Gy 2x2.4 Tongue -24h	2356,317611	3220,35826	2788,337935		
1 MRT 10Gy 2x2.5 Tongue -24h	2699,871255	945,6411699	1822,756213		
2 MRT 10Gy 2x2.1 Tongue -96h	2414,984838	2418,08837	2416,536604	152,4408057	2260,174007
2 MRT 10Gy 2x2.2 Tongue -96h	2369,365494	2381,660568	2375,513031		
2 MRT 10Gy 2x2.3 Tongue -96h	1480,123209	2097,532554	1788,827881		
2 MRT 10Gy 2x2.4 Tongue -96h	2524,174012	2803,955824	2664,064918		
2 MRT 10Gy 2x2.5 Tongue -96h	2212,743798	1899,111403	2055,9276		
3 MRT 40Gy 2x2.1 Tongue -24h	1975,621546		1975,621546	274,9017041	2680,670105
3 MRT 40Gy 2x2.2 Tongue -24h	2143,845059		2143,845059		
3 MRT 40Gy 2x2.3 Tongue -24h	3397,438776		3397,438776		
3 MRT 40Gy 2x2.4 Tongue -24h	3136,25031		3136,25031		
3 MRT 40Gy 2x2.5 Tongue -24h	2750,194833		2750,194833		
4 MRT 40Gy 2x2.1 Tongue -96h	2522,047049		2522,047049	376,6053289	2562,634191
4 MRT 40Gy 2x2.2 Tongue -96h	3678,962566		3678,962566		
4 MRT 40Gy 2x2.3 Tongue -96h	3042,303952		3042,303952		

4 MRT 40Gy 2x2.4 Tongue -96h	2057,930854		2057,930854		
4 MRT 40Gy 2x2.5 Tongue -96h	1511,926534		1511,926534		
5 MRT 10Gy 8x8.1 Tongue -24h	3100,400085		3100,400085	261,3409449	2724,623173
5 MRT 10Gy 8x8.2 Tongue -24h	1946,30109		1946,30109		
5 MRT 10Gy 8x8.3 Tongue -24h	3029,698379		3029,698379		
5 MRT 10Gy 8x8.4 Tongue -24h	3283,832033		3283,832033		
5 MRT 10Gy 8x8.5 Tongue -24h	2262,884278		2262,884278		
6 MRT 10Gy 8x8.1 Tongue -96h	3463,959619		3463,959619	363,2413788	2731,386233
6 MRT 10Gy 8x8.2 Tongue -96h	2322,923301		2322,923301		
6 MRT 10Gy 8x8.3 Tongue -96h	1504,012971		1504,012971		
6 MRT 10Gy 8x8.4 Tongue -96h	3285,470745		3285,470745		
6 MRT 10Gy 8x8.5 Tongue -96h	3080,56453		3080,56453		
7 MRT 40Gy 8x8.1 Tongue -24h	3032,925525		3032,925525	247,1196197	2820,746896
7 MRT 40Gy 8x8.2 Tongue -24h	2243,121312		2243,121312		
7 MRT 40Gy 8x8.3 Tongue -24h	3469,993318		3469,993318		
7 MRT 40Gy 8x8.4 Tongue -24h	2242,441928		2242,441928		
7 MRT 40Gy 8x8.5 Tongue -24h	3115,252398		3115,252398		
8 MRT 40Gy 8x8.1 Tongue -96h	3489,646814		3489,646814	244,6505758	2819,100624
8 MRT 40Gy 8x8.2 Tongue -96h	2342,011128		2342,011128		
8 MRT 40Gy 8x8.3 Tongue -96h	2947,251933		2947,251933		
8 MRT 40Gy 8x8.4 Tongue -96h	2183,063578		2183,063578		
8 MRT 40Gy 8x8.5 Tongue -96h	3133,529667		3133,529667		
9 BB 10Gy 2x2.1 Tongue -24h				279,7468606	2767,943467
9 BB 10Gy 2x2.2 Tongue -24h	2252,124563		2252,124563		

9 BB 10Gy 2x2.3 Tongue -24h	2323,453983		2323,453983		
9 BB 10Gy 2x2.4 Tongue -24h	3332,842958		3332,842958		
9 BB 10Gy 2x2.5 Tongue -24h	3163,352362		3163,352362		
10 BB 10Gy 2x2.1 Tongue -96h	3982,815026		3982,815026	365,5570781	2815,164573
10 BB 10Gy 2x2.2 Tongue -96h	3279,991621		3279,991621		
10 BB 10Gy 2x2.3 Tongue -96h	2625,303601		2625,303601		
10 BB 10Gy 2x2.4 Tongue -96h	2184,821597		2184,821597		
10 BB 10Gy 2x2.5 Tongue -96h	2002,89102		2002,89102		
11 BB 40Gy 2x2.1 Tongue -24h	2321,592594		2321,592594	183,0662501	2209,038181
11 BB 40Gy 2x2.2 Tongue -24h	2868,012467		2868,012467		
11 BB 40Gy 2x2.3 Tongue -24h	1834,02058		1834,02058		
11 BB 40Gy 2x2.4 Tongue -24h	2056,063456		2056,063456		
11 BB 40Gy 2x2.5 Tongue -24h	1965,501807		1965,501807		
12 BB 40Gy 2x2.1 Tongue -96h		1081,267274	1081,267274	620,2153216	2599,131966
12 BB 40Gy 2x2.2 Tongue -96h		3796,478755	3796,478755		
12 BB 40Gy 2x2.3 Tongue -96h		3724,27655	3724,27655		
12 BB 40Gy 2x2.4 Tongue -96h	442,9071349	1775,356142	1109,131638		
12 BB 40Gy 2x2.5 Tongue -96h	3015,488254	3553,522973	3284,505614		
13 BB 10Gy 8x8.1 Tongue -24h		3237,588798	3237,588798	203,7831578	2578,214723
13 BB 10Gy 8x8.2 Tongue -24h	272,4289958	3732,374965	2002,401981		
13 BB 10Gy 8x8.3 Tongue -24h	2928,425822	2576,222169	2752,323996		
13 BB 10Gy 8x8.4 Tongue -24h		2468,166568	2468,166568		
13 BB 10Gy 8x8.5 Tongue -24h	2071,257866	2789,926677	2430,592272		
14 BB 10Gy 8x8.1 Tongue -96h	615,9326281	715,6764421	665,8045351	608,6324872	2113,043357

14 BB 10Gy 8x8.2 Tongue -96h	1194,769287	1907,11166	1550,940474		
14 BB 10Gy 8x8.3 Tongue -96h					
14 BB 10Gy 8x8.4 Tongue -96h	3234,449738	2822,008573	3028,229155		
14 BB 10Gy 8x8.5 Tongue -96h	2119,799827	4294,598701	3207,199264		
15 BB 40Gy 8x8.1 Tongue -24h		2369,11769	2369,11769	164,5545795	2570,821075
15 BB 40Gy 8x8.2 Tongue -24h	3157,018101	2065,568259	2611,29318		
15 BB 40Gy 8x8.3 Tongue -24h	2548,393066	3469,662617	3009,027842		
15 BB 40Gy 8x8.4 Tongue -24h		2065,686999	2065,686999		
15 BB 40Gy 8x8.5 Tongue -24h	2563,737318	3034,222005	2798,979662		
16 BB 40Gy 8x8.1 Tongue -96h	3167,88745	2558,543899	2863,215675	85,42921645	2585,48502
16 BB 40Gy 8x8.2 Tongue -96h		2522,152576	2522,152576		
16 BB 40Gy 8x8.3 Tongue -96h	1409,18108	3319,975843	2364,578462		
16 BB 40Gy 8x8.4 Tongue -96h	2646,41304	2709,933	2678,17302		
16 BB 40Gy 8x8.5 Tongue -96h	2937,782249	2060,828485	2499,305367		
17 BB 10Gy 8x1.1 Tongue -24h	3868,942349	2427,495621	3148,218985	254,1267893	2749,566122
17 BB 10Gy 8x1.2 Tongue -24h	3921,685574	2850,456265	3386,07092		
17 BB 10Gy 8x1.3 Tongue -24h	2268,166689		2268,166689		
17 BB 10Gy 8x1.4 Tongue -24h	1468,314878	2649,440219	2058,877549		
17 BB 10Gy 8x1.5 Tongue -24h	3040,717589	2732,275345	2886,496467		
18 BB 10Gy 8x1.1 Tongue -96h	3099,703834	3233,07507	3166,389452	296,6511876	2879,379589
18 BB 10Gy 8x1.2 Tongue -96h	3356,176151	3797,818323	3576,997237		
18 BB 10Gy 8x1.3 Tongue -96h	2427,276934	2413,674113	2420,475524		
18 BB 10Gy 8x1.4 Tongue -96h	1424,727585	3282,584704	2353,656145		
18 BB 10Gy 8x1.5 Tongue -96h					

19 BB 40Gy 8x1.1 Tongue -24h	3669,801521	2672,130005	3170,965763	261,3840616	2609,512907
19 BB 40Gy 8x1.2 Tongue -24h	367,2595523	4009,063755	2188,161654		
19 BB 40Gy 8x1.3 Tongue -24h	121,9550459	4160,377534	2141,16629		
19 BB 40Gy 8x1.4 Tongue -24h	2422,114871	3453,400974	2937,757922		
19 BB 40Gy 8x1.5 Tongue -24h					
20 BB 40Gy 8x1.1 Tongue -96h	3358,160412		3358,160412	265,2526038	2801,020336
20 BB 40Gy 8x1.2 Tongue -96h		2560,693896	2560,693896		
20 BB 40Gy 8x1.3 Tongue -96h	3784,615843	3030,606511	3407,611177		
20 BB 40Gy 8x1.4 Tongue -96h	2336,020604	1643,006195	1989,513399		
20 BB 40Gy 8x1.5 Tongue -96h	1227,380496	4150,8651	2689,122798		
21 No IR 1	1498,802354	1378,942746	1438,87255	56,86009404	1541,017891
21 No IR 2	1438,159122	1383,490161	1410,824641		
21 No IR 3	1680,866331	1710,77317	1695,81975		
21 No IR 4	1323,516997	1692,47373	1507,995363		
21 No IR 5	1698,252829	1604,901473	1651,577151		

Δείγματα εντέρου					
Sample Name	hOGG1 enzyme				
	Clusters/Gbp (1sC run)	Clusters/Gbp (Rerun)	Average Clusters/Gbp	Standard Error	Average Group Value of CI/Gbp
1 MRC 10Gy 2x2.1 Colon -24h	3142,843931	2947,537237	3045,190584	65,92465897	3107,830077
1 MRC 10Gy 2x2.2 Colon -24h	3178,720583	3096,973976	3137,84728		
1 MRC 10Gy 2x2.3 Colon -24h	3237,776545	3316,433612	3277,105079		
1 MRC 10Gy 2x2.4 Colon -24h	3430,38549	2511,969243	2971,177367		
1 MRC 10Gy 2x2.5 Colon -24h					
2 MRC 10Gy 2x2.2 Colon -96h	3368,490633	3269,002171	3318,746402	117,7476664	3050,333069
2 MRC 10Gy 2x2.3 Colon -96h	3334,255438	2595,801803	2965,02862		
2 MRC 10Gy 2x2.4 Colon -96h	3234,013111	3058,476555	3146,244833		
2 MRC 10Gy 2x2.5 Colon -96h	2455,47457	3087,15027	2771,31242		
3 MRC 40Gy 2x2.1 Colon -24h	2973,29111	2536,841504	2755,066307	93,15860072	3011,181165
3 MRC 40Gy 2x2.2 Colon -24h	3276,218564		3276,218564		
3 MRC 40Gy 2x2.3 Colon -24h	3165,847011		3165,847011		
3 MRC 40Gy 2x2.4 Colon -24h	3408,102881	2479,954172	2944,028526		
3 MRC 40Gy 2x2.5 Colon -24h	3144,754007	2684,736826	2914,745417		
4 MRC 40Gy 2x2.1 Colon -96h	3408,228508	2543,886846	2976,057677	139,5007161	3034,348258
4 MRC 40Gy 2x2.2 Colon -96h		3254,597923	3254,597923		
4 MRC 40Gy 2x2.3 Colon -96h	3412,119912		3412,119912		
4 MRC 40Gy 2x2.4 Colon -96h	2682,461665	2533,661559	2608,061612		
4 MRC 40Gy 2x2.5 Colon -96h	2300,209046	3541,59929	2920,904168		
5 MRC 10Gy 8x8.1 Colon -24h	2877,691343	2277,478817	2577,58508	146,6347641	2990,941377
5 MRC 10Gy 8x8.2 Colon -24h	3065,077842	3059,394301	3062,236072		

5 MRC 10Gy 8x8.3 Colon -24h	3283,259003	2823,560433	3053,409718		
5 MRC 10Gy 8x8.4 Colon -24h	3435,167571	3105,901709	3270,53464		
6 MRC 10Gy 8x8.1 Colon -96h	3263,659866	3355,542318	3309,601092	118,1783721	3123,797301
6 MRC 10Gy 8x8.2 Colon -96h	3344,29415	3161,630626	3252,962388		
6 MRC 10Gy 8x8.3 Colon -96h	3312,400163	3149,326643	3230,863403		
6 MRC 10Gy 8x8.4 Colon -96h	2376,024283	2944,370075	2660,197179		
6 MRC 10Gy 8x8.5 Colon -96h	3126,595231	3204,129657	3165,362444		
7 MRC 40Gy 8x8.1 Colon -24h	2792,284533	2712,081065	2752,182799	196,3815416	2732,012821
7 MRC 40Gy 8x8.2 Colon -24h	3251,926224	3714,542983	3483,234604		
7 MRC 40Gy 8x8.3 Colon -24h	2061,371509	2740,389654	2400,880581		
7 MRC 40Gy 8x8.4 Colon -24h	2761,730245	2266,600993	2514,165619		
7 MRC 40Gy 8x8.5 Colon -24h	2762,9375	2256,263505	2509,600503		
8 MRC 40Gy 8x8.1 Colon -96h	3171,464502	2252,829897	2712,147199	172,7933627	3172,252172
8 MRC 40Gy 8x8.2 Colon -96h	3262,606695	3271,070741	3266,838718		
8 MRC 40Gy 8x8.3 Colon -96h		3543,220702	3543,220702		
8 MRC 40Gy 8x8.4 Colon -96h	2959,828101	3373,776032	3166,802066		
9 BB 10Gy 2x2.1 Colon -24h	2316,858215	3625,719054	2971,288635	164,1523643	2996,710183
9 BB 10Gy 2x2.2 Colon -24h	3268,116052	3409,277682	3338,696867		
9 BB 10Gy 2x2.3 Colon -24h	2589,859593	2739,066005	2664,462799		
9 BB 10Gy 2x2.4 Colon -24h	3409,277682	3388,250625	3398,764154		
9 BB 10Gy 2x2.5 Colon -24h	2115,31666	3105,360263	2610,338461		
10 BB 10Gy 2x2.1 Colon -96h	2993,1656	3302,150906	3147,658253	150,5344444	2897,56011
10 BB 10Gy 2x2.2 Colon -96h	2501,097756	3030,908188	2766,002972		
10 BB 10Gy 2x2.3 Colon -96h	2015,710795	2719,26377	2367,487282		

10 BB 10Gy 2x2.4 Colon -96h		3165,372754	3165,372754		
10 BB 10Gy 2x2.5 Colon -96h	2605,714087	3476,844492	3041,279289		
11 BB 40Gy 2x2.1 Colon -24h	4367,31796		4367,31796	482,7116706	3126,799613
11 BB 40Gy 2x2.2 Colon -24h	3074,5747		3074,5747		
11 BB 40Gy 2x2.3 Colon -24h	2008,967479		2008,967479		
11 BB 40Gy 2x2.4 Colon -24h					
11 BB 40Gy 2x2.5 Colon -24h	3056,338312		3056,338312		
12 BB 40Gy 2x2.2 Colon -96h	3753,103049		3753,103049	405,965999	3262,964806
12 BB 40Gy 2x2.3 Colon -96h	2481,433592		2481,433592		
12 BB 40Gy 2x2.4 Colon -96h	2672,380354		2672,380354		
12 BB 40Gy 2x2.5 Colon -96h	4144,942231		4144,942231		
13 BB 10Gy 8x8.1 Colon -24h	2031,58294		2031,58294	393,5776607	3142,836505
13 BB 10Gy 8x8.2 Colon -24h	3877,476071		3877,476071		
13 BB 10Gy 8x8.3 Colon -24h					
13 BB 10Gy 8x8.4 Colon -24h	3249,468328		3249,468328		
13 BB 10Gy 8x8.5 Colon -24h	3412,818682		3412,818682		
14 BB 10Gy 8x8.1 Colon -96h	3118,922977		3118,922977	387,3223568	3672,815381
14 BB 10Gy 8x8.3 Colon -96h	3736,475923		3736,475923		
14 BB 10Gy 8x8.4 Colon -96h	3090,522649		3090,522649		
14 BB 10Gy 8x8.5 Colon -96h	4745,339978		4745,339978		
15 BB 40Gy 8x8.1 Colon -24h	3990,664911		3990,664911	350,8124967	3153,936437
15 BB 40Gy 8x8.2 Colon -24h	3550,704546		3550,704546		
15 BB 40Gy 8x8.3 Colon -24h	2102,223716		2102,223716		
15 BB 40Gy 8x8.4 Colon -24h	3553,567876		3553,567876		

15 BB 40Gy 8x8.5 Colon -24h	2572,521136		2572,521136		
16 BB 40Gy 8x8.1 Colon -96h	2193,521178		2193,521178	515,7605087	3088,54229
16 BB 40Gy 8x8.3 Colon -96h	3091,947437		3091,947437		
16 BB 40Gy 8x8.4 Colon -96h	3980,158255		3980,158255		
16 BB 40Gy 8x8.5 Colon -96h					
17 BB 10Gy 8x1.1 Colon -24h	3388,584623		3388,584623	151,2564634	3264,807877
17 BB 10Gy 8x1.2 Colon -24h	3599,812218		3599,812218		
17 BB 10Gy 8x1.3 Colon -24h	2728,011301		2728,011301		
17 BB 10Gy 8x1.4 Colon -24h	3443,149734		3443,149734		
17 BB 10Gy 8x1.5 Colon -24h	3164,481507		3164,481507		
18 BB 10Gy 8x1.1 Colon -96h	2084,669363		2084,669363	217,5008842	2258,697116
18 BB 10Gy 8x1.2 Colon -96h	2882,357959		2882,357959		
18 BB 10Gy 8x1.3 Colon -96h	1580,819552		1580,819552		
18 BB 10Gy 8x1.4 Colon -96h	2229,068832		2229,068832		
18 BB 10Gy 8x1.5 Colon -96h	2516,569875		2516,569875		
19 BB 40Gy 8x1.1 Colon -24h	2944,724813	2316,050897	2630,387855	162,0290473	2340,596328
19 BB 40Gy 8x1.2 Colon -24h	2222,09364	1906,04186	2064,06775		
19 BB 40Gy 8x1.3 Colon -24h	1856,590184	1964,37401	1910,482097		
19 BB 40Gy 8x1.4 Colon -24h	2701,52902	2827,189535	2764,359277		
19 BB 40Gy 8x1.5 Colon -24h	2381,259503	2286,109818	2333,684661		
20 BB 40Gy 8x1.1 Colon -96h				135,1786765	3334,902375
20 BB 40Gy 8x1.2 Colon -96h	3457,534956	3315,718791	3386,626873		
20 BB 40Gy 8x1.3 Colon -96h	3373,060233	3926,745637	3649,902935		
20 BB 40Gy 8x1.4 Colon -96h	3222,014626	3397,719085	3309,866855		

20 BB 40Gy 8x1.5 Colon -96h	3032,975125	2953,450546	2993,212836		
21 No IR 1		1461,490831	1461,490831	93,03523563	1487,455798
21 No IR 2	1666,614181		1666,614181		
21 No IR 3	975,5087345	1585,469102	1280,488918		
21 No IR 4	1227,152656	1363,221755	1295,187205		
21 No IR 5	1867,873381	1599,122332	1733,497857		