



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ
ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΚΗΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ
ΓΕΩΡΓΑΚΙΛΑΣ

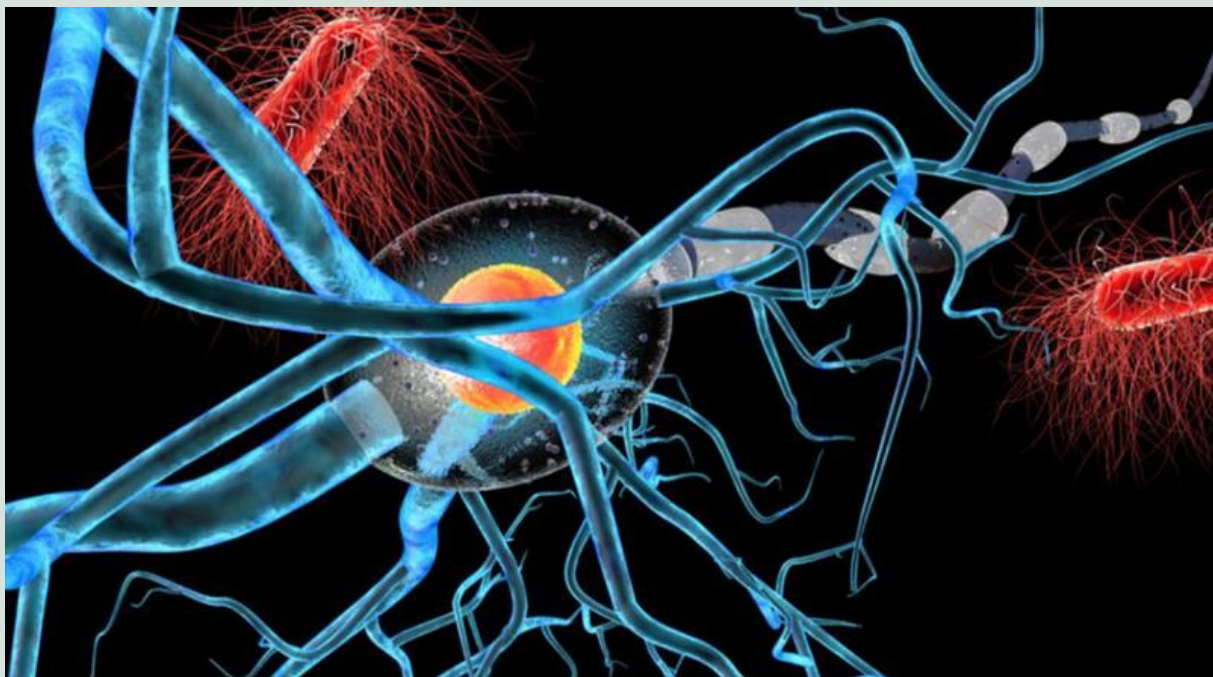
ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΖΩΩΝ ΚΑΙ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΟΥΡΑΝΙΑ
ΤΣΙΤΣΙΛΩΝΗ

Η ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΟΥ ΔΕΚΑΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΠΡΟΘΥΜΟΣΙΝΗ $\alpha(100-109)$ ΣΤΟ ΑΙΜΑ ΩΣ ΠΙΘΑΝΟΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗΣ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΣΤΗ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ Ή ΤΗΝ ΑΚΤΙΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ



ΑΝΤΩΝΙΟΣ ΠΑΣΧΑΛΗΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΘΗΝΑ 2020

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Ανοσολογίας του Τομέα Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου της Σχολής Βιολογίας ΕΚΠΑ για την παροχή εργαστηριακού εξοπλισμού και κυρίως τη Καθηγήτρια Δρ. Ουρανία Τσιτσιλώνη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και σε συνεργασία με τον υπεύθυνο καθηγητή μου, Δρ. Αλέξανδρο Γεωργακίλα, μου ανέθεσαν την παρούσα διπλωματική εργασία.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον επιβλέποντα Καθηγητή Δρ. Αλέξανδρο Γεωργακίλα για τη διαρκή στήριξη και τις πολύτιμες συμβουλές του.

Ακόμα, ένα μεγάλο ευχαριστώ στον υποψήφιο διδάκτορα Μπιρμπίλη Αναστάσιο για την εκπαίδευση και τις πολύτιμες γνώσεις που μου μετέδωσε, τις χρήσιμες συμβουλές του, το χρόνο που αφιέρωσε για το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα της παρούσας εργασίας, καθώς επίσης και για τη διαρκή φιλική του συμπαράσταση.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Γεωργία Τερζούδη του Ινστιτούτου Υγειοφυσικής & Περιβαλλοντικής Υγιεινής ΙΠΤ-Α, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» και την υποψήφια διδάκτορα Νικολακοπούλου Αγγελική για τη πολύτιμη συνεισφορά τους, διαθέτοντας μου το ακτινοβολητή Κοβαλτίου για την πραγματοποίηση των ακτινοβολιών.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συνεργάτες μου στο εργαστήριο για την άψογη συνεργασία μας και τη βοήθειά τους καθ' όλη την διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους φίλους μου για την ηθική συμπαράσταση που μου προσέφεραν καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας εργασίας.

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα	2
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	5
1.1 Θυμοσίνες.....	6
1.2 Προθυμοσίνη α (προΤα)	6
1.2.1 Ενδοκυτταρικός ρόλος της προΤα.....	7
1.2.2 Εξωκυτταρικός ρόλος της προΤα.....	10
1.3 Το δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109).....	11
1.4 Καρκίνος	12
1.4.1 Ρόλος της προΤα και προΤα(100-109) στο καρκίνο	13
1.4.2 Πολλαπλό Μυέλωμα (ΠΜ)	14
1.4.3 Θεραπεία του ΠΜ – Bortezomib.....	15
1.5 Ακτινοβολίες	17
1.5.1 Εισαγωγή	17
1.5.2 Αλληλεπίδραση ακτινοβολίας με την βιολογική ύλη.....	18
1.5.2.1 Χαρακτηριστικά μεγέθη ακτινοβολίας	23
1.5.2.2 Επίδραση ακτινοβολιών στον άνθρωπο.....	27
1.5.2.3 Μη στοχευόμενη επίδραση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας	35
1.6 Ακτινοθεραπεία.....	38
1.6.1 Εισαγωγή	38
1.6.2 Εφαρμογές Ακτινοθεραπείας.....	41
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	48
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	51
3.1 Εισαγωγή.....	52
3.2 Βασικά Αναλώσιμα.....	52
3.3 Κυτταρικές καλλιέργειες.....	53
3.4 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και βιωσιμότητας κυττάρων με αμοκυτταρόμετρο Neubauer	55
3.5 Επαγωγή κυτταρικού θανάτου σε καρκινικές κυτταρικές σειρές	57

3.6 Μέθοδος κατακρήμνισης πρωτεϊνών από ανθρώπινο πλάσμα με ακετόνη	58
3.7 Μέτρηση αποπτωτικών - νεκρωτικών κυττάρων με κυτταρομετρία ροής	59
3.8 Μέθοδος ποσοτικής ανίχνευσης προΤα(100-109) με ELISA	61
3.9 γ -Ακτινοβόληση κυτταρικών σειρών	64
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	67
4.1 Έλεγχος σταθερότητας και επαναληψιμότητας της μεθόδου ανίχνευσης του προΤα(100-109)	68
4.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του προΤα(100-109) σε υπερκείμενα καλλιιεργειών καρκινικών σειρών	69
4.2.1 Ανάλυση αποτελεσμάτων καρκινικών σειρών που οδηγήθηκαν σε απόπτωση με χορήγηση χημικών παραγόντων	69
4.2.1.1 Ανάλυση των αποτελεσμάτων της καρκινικής σειράς H929 μετά από χορήγηση του συνδυασμού TNF-α και εμετίνης	69
4.2.1.2 Ανάλυση των αποτελεσμάτων της καρκινικής σειράς HeLa μετά από χορήγηση του συνδυασμού TNF -α και εμετίνης	72
4.2.2 Ανάλυση αποτελεσμάτων κυττάρων της καρκινικής σειράς H929 που οδηγήθηκαν σε απόπτωση με χορήγηση του αναστολέα πρωτεασώματος bortezomib	76
4.2.3 Ανάλυση αποτελεσμάτων κυττάρων της καρκινικής σειράς H929 που οδηγήθηκαν σε απόπτωση έπειτα από γ -ακτινοβόληση	79
4.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του προΤα(100-109) στο πλάσμα υγιών δοτών και ασθενών με ΠΜ μετά από θεραπευτική χορήγηση αναστολέα πρωτεασώματος bortezomib	84
4.3.1 Ανάλυση αποτελεσμάτων δειγμάτων υγιών δοτών	84
4.3.2 Ανάλυση αποτελεσμάτων δειγματοληψίας από ασθενείς που τους χορηγήθηκε θεραπευτικά ο αναστολέας πρωτεασώματος, bortezomib	86
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	88
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	93
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	99

ΚΕΦΑΛΑΙΟ

1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Θυμοσίνες

Οι πρώτες μελέτες γύρω από τις θυμοσίνες ξεκίνησαν το 1966, όταν απομονώθηκε θύμος αδένας από τον ανθρώπινο οργανισμό και με χρήση κλασικών μεθόδων καθαρισμού, απομονώθηκε ένα εκχύλισμα, στο οποίο εντοπίστηκαν ουσίες που θεωρήθηκαν αρχικά ως “ορμόνες”. Ο εν λόγω παράγοντας λεμφοποίησης ονομάστηκε θυμοσίνη (Goldstein, 2007).

Στη προσπάθεια περαιτέρω μελέτης των θυμοσινών, το 1975 η ίδια ερευνητική ομάδα απομόνωσε από θύμο αδένα μόσχου, έπειτα από εφαρμογή πέντε διαδοχικών σταδίων καθαρισμού, ένα ιδιαίτερα ενεργό εκχύλισμα, το οποίο ονομάστηκε θυμοσίνη – κλάσμα V (Thymosin Fraction V, TFV). Το TFV, αποτελείται από τουλάχιστον 40, μικρά όξινα πολυπεπίδια, με μοριακό βάρος το οποίο κυμαίνεται από 1.000 έως 15.000 Da.

Με βάση το ισοηλεκτρικό σημείο (pI), το TFV χωρίζεται σε τρεις διακριτές περιοχές που χαρακτηρίζονται με τα ελληνικά γράμματα α, β, και γ. Η περιοχή α αποτελείται από πεπίδια με pI κάτω από 5 (ισχυρά όξινη), η β περιοχή από πεπίδια με pI 5,0 – 7,0 (όξινη), και η ανώτερη γ περιοχή από πεπίδια με pI > 7,0 (βασική). Οι δείκτες 1, 2, 3 κοκ. Στην ονοματολογία των θυμοσινών υποδηλώνουν τη σειρά με την οποία απομονώθηκαν από το TFV (Goldstein, 2007).

Ανάλογα με το αν οι ουσίες που απομονώθηκαν είναι βιολογικά ενεργές ή όχι, χαρακτηρίζονται ως θυμοσίνες ή απλά πεπίδια, αντίστοιχα. Τα περισσότερα πολυπεπίδια που έχουν απομονωθεί μέχρι σήμερα, ανήκουν στην οικογένεια των α- και β- θυμοσινών, ενώ ακόμα δεν έχει ταυτοποιηθεί εκπρόσωπος της γ περιοχής.

Από αυτές, η θυμοσίνη α1 (Ta1), το πρόδρομο της πολυπεπίδιο, προθυμοσίνη α (προTa) και η θυμοσίνη β4 (Tβ4), ευθύνονται κατά κύριο λόγο για την ενεργότητα του κλάσματος TFV. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιείται σήμερα εντατική έρευνα για το ρόλο και την θεραπευτική και κλινική αξιοποίηση των τριών αυτών μορίων (Kappa et al., 2013).

1.2 Προθυμοσίνη α (προTa)

Η προTa είναι ένα πολυπεπίδιο που κωδικοποιείται από το γονίδιο *PTMA*, το οποίο βρίσκεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 2 (2q37.1). Στον άνθρωπο αποτελείται από 109-110 αμινοξέα, με το γλουταμικό και το ασπαρτικό οξύ να βρίσκονται σε αφθονία, προσδίδοντας στο πολυπεπίδιο έναν ιδιαίτερος όξινο χαρακτήρα (pH 3,55). Σαν μόριο, παρουσιάζει ιδιαίτερα υψηλή συντηρητικότητα στα θηλαστικά, εκφράζεται σε όλους τους κυτταρικούς ιστούς και περισσότερο σε εκείνους που εμφανίζουν υψηλό πολλαπλασιαστικό δυναμικό. Η προTa δεν έχει καθορισμένη δευτεροταγή δομή και η δομή της μεταβάλλεται ανάλογα με τη σύνδεσή της με άλλες πρωτεΐνες ή μακρομόρια στην κυτταρική μεμβράνη αλλά και στο

εσωτερικό των κυττάρων (κυτταρόπλασμα και πυρήνα).. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η περιοχή 101-104 αποτελεί την αλληλουχία του σήματος πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signal, NLS), η οποία επιτρέπει την παραμονή της προΤα στον πυρήνα (Freire, 2018).

Ως προς την λειτουργία της, η προΤα εμφανίζει διττό ρόλο, τόσο ενδοκυτταρικό, όσο και εξωκυτταρικό.

1.2.1 Ενδοκυτταρικός ρόλος της προΤα

Μέχρι σήμερα, έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες, προκειμένου να εξακριβωθεί ο ενδοκυτταρικός ρόλος της προΤα. Γονιδιακή και πρωτεωμική ανάλυση, έχουν οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι η προΤα συμμετέχει σε μια πληθώρα λειτουργιών που λαμβάνουν χώρα τόσο στον πυρήνα, όσο και στο κυτταρόπλασμα.

➤ Ρόλος στον πολλαπλασιασμό

Κύτταρα με υψηλό πολλαπλασιαστικό δυναμικό, όπως τα καρκινικά, εμφανίζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *PTMA*, γεγονός που καταδεικνύει τον κρίσιμο ρόλο της προΤα στον πολλαπλασιασμό και στην κυτταρική επιβίωση. Έχει δειχθεί ότι σε καρκινικά κύτταρα, η ενεργοποίηση του ογκογονιδίου *c-MYC* ή του μεταγραφικού παράγοντα E2F, οδηγεί στην αύξηση της μεταγραφής του γονιδίου *PTMA*, με αποτέλεσμα, την επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Kappa et al., 2013).

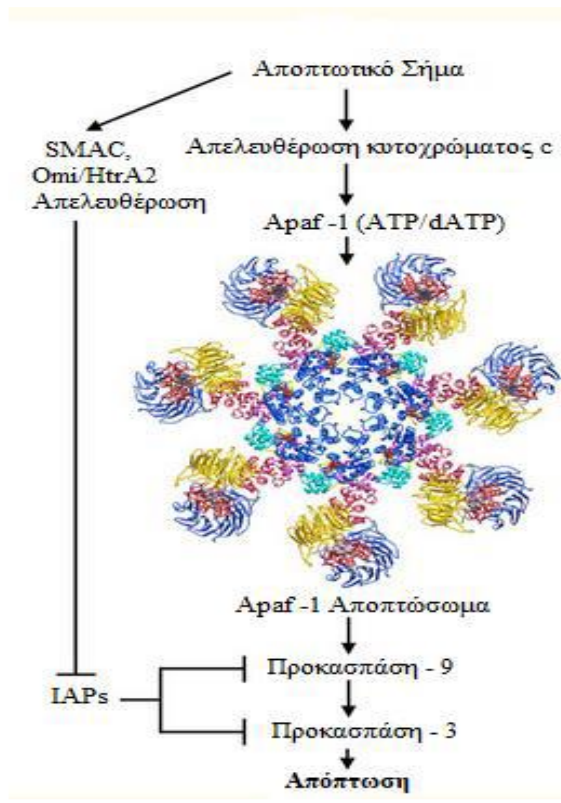
Επιπροσθέτως, η προΤα συμβάλλει στην αντιγραφή, και επάγει τη μεταγραφική ενεργότητα της χρωματίνης. Συγκεκριμένα, αλληλεπιδρά με τη συνδετική ιστόνη H1, δρώντας ως μοριακός συνοδός (τσαπερόνη). Η H1 είναι υπεύθυνη για την οργάνωση και σταθεροποίηση των νουκλεοσωμάτων σε μεγαλύτερες δομές συμπυκνωμένης χρωματίνης. Απουσία της προΤα, η H1 προσδένεται στα νουκλεοσώματα και προκαλεί τη συμπύκνωση της ευχρωματίνης σε ετεροχρωματίνη. Η αλληλεπίδρασή της με την προΤα, διευκολύνει τη μεταφορά της από και προς τη χρωματίνη, παίζοντας έτσι σημαντικό ρόλο στη λειτουργία της αντιγραφής και της μεταγραφής του DNA, γεγονός που επιβεβαιώθηκε μετά από αποσιώπηση του γονιδίου της προΤα, με χρήση της μεθόδου του μικρού-παρεμβαλλόμενου RNA (siRNA) (George and Brown, 2010).

Κατά τη μεταγραφή, η πρωτεΐνη-μεταγραφικός παράγοντας cAMP response element-binding protein (CREB), αφού προσδεθεί στην αλληλουχία CRE του DNA, φωσφορυλιώνεται από κινάσες (όπως η PKA), ενώ, παράλληλα το σύμπλοκο συνδέτη-CREB (CREB-binding protein – CBP)-p300 αλληλεπιδρά με την προΤα. Τα παραπάνω έχουν ως αποτέλεσμα, τη σταθεροποίηση του συμπλόκου CREB-CBP-p300,

οδηγώντας σε ακετυλίωση των ιστονών από την p300, στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και τελικά στη μεταγραφή γονιδίων.

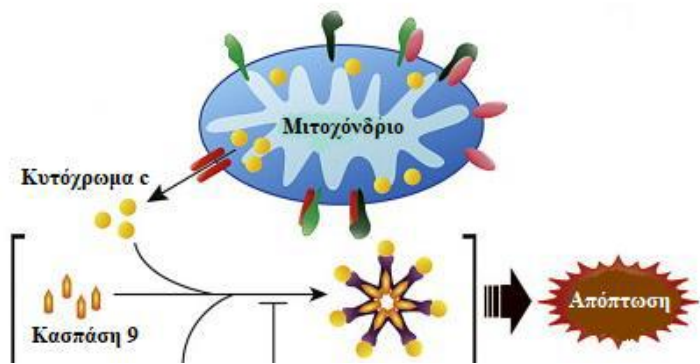
➤ *Ρόλος στην απόπτωση*

Η προΤα αναστέλλει το μηχανισμό της απόπτωσης αλληλεπιδρώντας με τον αποπτωτικό παράγοντα ενεργοποίησης των πρωτεασών 1 (Apoptotic protease activating factor 1, Araf-1) και αναστέλλοντας τη δημιουργία του αποπτωσώματος (Qi et al., 2010). Το αποπτώσωμα αποτελεί μια δυναμική, τεταρτοταγή πρωτεϊνική δομή, που ενεργοποιείται από ένα κατάλληλο εξωτερικό ή εσωτερικό σήμα, όπως τη μη αναστρέψιμη βλάβη του DNA, την ενεργοποίηση ογκογονιδίων ή κάποια ιϊκή μόλυνση. Η παραπάνω δράση της προΤα πυροδοτεί την ενεργοποίηση ενός σηματοδοτικού καταρράκτη, που περιλαμβάνει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια, την ενεργοποίηση του παράγοντα Araf-1 και τη δημιουργία του αποπτωσώματος (Εικόνα 1, Yuan and Akey, 2013).



Εικόνα 1: Διαδικασία ενεργοποίησης αποπτωσώματος (Yuan and Akey, 2013).

Αναλυτικότερα, στο μονοπάτι της απόπτωσης, τα ενεργοποιημένα από την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, μονομερή Araf-1, σχηματίζουν τη δακτυλιοειδή πλατφόρμα του αποπτωσώματος (Bratton and Salvesen, 2010; Hu et al., 1999; Rodriguez and Lazebnik, 1999; Srinivasula et al., 1998; Zou et al., 1999, 1997), το



Εικόνα 2: Αναστολή σχηματισμού του αποπτωσώματος λόγω σύνδεσης της προΤα στα μονομερή Araf-1 (Lin, Lu and Chao, 2015).

οποίο στρατολογεί και ενεργοποιεί την προκασπάση 9 (pc-9), με αποτέλεσμα τη μετέπειτα ενεργοποίηση ενός καταρράκτη κασπασών που περιλαμβάνει τις κασπάσες -3, -6 και -7 (Jiang et al., 2003). Οι κασπάσες αυτές διασπών με τη σειρά τους, κυτταρικά, πρωτεϊνικά υποστρώματα-στόχους, σε μια διαδικασία

που έχει ως τελικό αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο (**Εικόνα 2**, Jiang et al., 2003; Qi et al., 2010). Η προΤα, φαίνεται να συμμετέχει στην αρνητική ρύθμιση της ενεργοποίησης του άξονα pε9 αποπτωσώματος σε δύο στάδια (**Εικόνα 3**): 1) αλληλεπιδρώντας με τον Araf-1 και, 2) επιδρώντας στη λειτουργία μιτοχονδριακών πρωτεϊνών όπως η Bax και η Bad, με αποτέλεσμα τη ρύθμιση της απελευθέρωσης κυτοχρώματος c, που οδηγεί στην αναστολή σχηματισμού του αποπτωσώματος και τελικά στην παρεμπόδιση της απόπτωσης (Lin et al., 2015). Η άποψη αυτή ισχυροποιήθηκε, ύστερα από πειράματα εξάλειψης της έκφρασης του γονιδίου της προΤα, με τη χρήση μικρού-παρεμβαλλόμενου RNA (siRNA) (Jiang et al., 2003). Αυτή η δράση της προΤα, είχε παρατηρηθεί και νωρίτερα, το 2003, από την ομάδα των Jiang et al. Αναλυτικότερα, με χρήση siRNA απενεργοποιήθηκε η έκφραση του *PTMA* σε καλλιέργειες κυττάρων HeLa (καρκίνος τραχήλου της μήτρας) και τα αποτελέσματα κατέδειξαν υψηλά ποσοστά απόπτωσης.

Το 2006 η ομάδα των Malicet et al., (2006), κατέδειξε σε *in vitro* πειράματα έναν προτεινόμενο μηχανισμό αντιαποπτωτικής δράσης της προΤα, ο οποίος σχετίζεται με την αλληλεπίδρασή της με μια μικρή πρωτεΐνη stress, την p8. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη σχηματίζει σύμπλοκο με την προΤα, με αποτέλεσμα τη ραγδαία μεταβολή των δευτεροταγών και τριτοταγών δομών των δύο πρωτεϊνών. Ο σχηματισμός αυτής της τεταρτοταγούς δομής, βρέθηκε ότι αναστέλλει τη δράση των κασπασών 3, 7 και 9. Προκειμένου ναδειχτεί ότι απαιτείται η παρουσία και των δύο πρωτεϊνικών μορίων για την αναστολή της δράσης των κασπασών, στα πλαίσια της ίδιας μελέτης, πραγματοποιήθηκαν πειράματα καταστολής της έκφρασης του κάθε γονιδίου ξεχωριστά, αλλά και ταυτόχρονα. Τα αποτελέσματα ανάδειξαν παρόμοια αύξηση των επιπέδων αναστολής της δράσης των κασπασών, γεγονός το οποίο καταδεικνύει τον σημαντικό ρόλο των δύο πρωτεϊνών στον αντι-αποπτωτικό μηχανισμό.

Σήμερα, διεξάγονται αρκετές έρευνες, για τη μελέτη της παρεμπόδισης της σύνδεσης προΤα-Araf-1, με τη χρήση μικρών μορίων, με απώτερο σκοπό την επαγωγή απόπτωσης σε καρκινικά κύτταρα (Qi et al., 2010).

MHC) τάξης II τόσο σε ανθρώπινα μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα όσο και σε καρκινικά κύτταρα, τα οποία δεν εκφράζουν τα εν λόγω μόρια (Baxevanis et al., 1992).

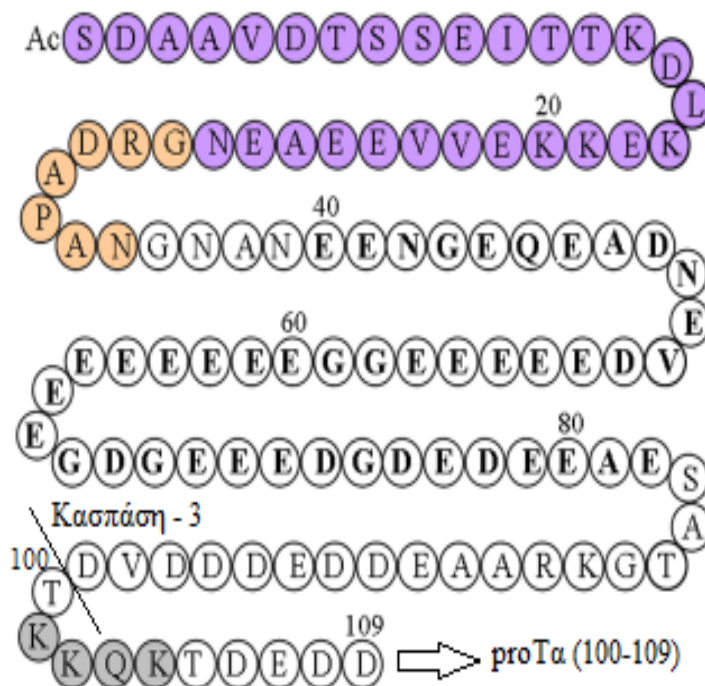
Ακόμη, έχει δειχθεί ότι η προΤα ενισχύει την κυτταροτοξικότητα των φυσικών φονικών (Natural Killer, NK) κυττάρων, ενώ, δρώντας συνεργιστικά με την IL-2, ενισχύει τη δράση των ενεργοποιημένων από λεμφοκίνες φονικών (Lymphokine-Activated Killer, LAK) κυττάρων (Cordero et al., 1992). Λίγα χρόνια αργότερα, το 1997, η ομάδα των Heidecke et al., (1997) μετέβη σε μια σειρά *in vitro* πειραμάτων και έδειξε ότι η προΤα ενίσχυσε τη χημειοταξία, την κυτταροτοξικότητα, καθώς και την οξειδωτική απάντηση των ουδετερόφιλων ασθενών με μελάνωμα, καρκίνο του μαστού και καρκίνο του παχέος εντέρου.

Σχετικά με τον ανοσορυθμιστικό μηχανισμό δράσης, η ομάδα των Mosoian et al., το 2010 έδειξε ότι η προΤα προσδέεται και σηματοδοτεί μέσω υποδοχέων τύπου Toll (Toll-like receptors, TLRs), ενεργοποιώντας τόσο την εξαρτώμενη από το TRIF σηματοδοτικό μονοπάτι, παραγωγή της ιντερφερόνης-β (INF- β), όσο και την εξαρτώμενη από το MyD88 μονοπάτι παραγωγή σημαντικών προφλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως είναι ο παράγοντας νέκρωσης όγκων α (Tumor Necrosis Factor, TNF-α). Συγκεκριμένα η προΤα ανήκει στην οικογένεια των μοριακών μοτίβων σχετιζόμενων με τον κίνδυνο (Danger - Associated Molecular Patterns, DAMPs) και σηματοδοτεί μέσω του TLR-4 (Birmipilis et al., 2019; Mosoian et al., 2010; Samara et al., 2017).

1.3 Το δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109)

Το 2006, η ομάδα των Skopeliti et al., (2006), έδειξε ότι το ανοσοδραστικό κέντρο της προΤα εδρεύει στο καρβοξυτελικό της άκρο και συγκεκριμένα στο δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109), με συνέπεια αυτό το δεκαπεπτίδιο να είναι υπεύθυνο για την ανοσορυθμιστική της δράση. Πιο αναλυτικά, μελετήθηκαν *in vitro* τα πεπτιδικά θραύσματα που προέκυψαν έπειτα από πέψη της προΤα με θρυψίνη. Τα θραύσματα που παρουσίασαν τη μεγαλύτερη ανοσοενισχυτική δραστηριότητα ήταν τα (89-102) και (102-109). Τρία χρόνια αργότερα, το 2009, η ίδια ομάδα συνέχισε την έρευνά της, μέσω σύνθεσης επεκτεινόμενων κατά ένα αμινοξικό κατάλοιπο πεπτιδικών αλληλουχιών, μεταξύ των περιοχών (103-109) και (94-109). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το προΤα(100-109) διεγείρει τη δραστηριότητα των λεμφοκυττάρων και προκάλεσε την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων, εμφανίζοντας φάσμα δράσης, συγκρίσιμο με το ακέραιο μόριο της προΤα, γεγονός που το καταδεικνύει ως το ανοσοδραστικό κέντρο του πολυπεπτιδίου (Skopeliti et al., 2009).

Εκτός των άλλων, βρέθηκε ότι το σήμα πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signal, NLS) εντοπίζεται στις θέσεις (100-105), γεγονός το οποίο υποστηρίζει την ανοσορυθμιστική ικανότητα του προΤα(100-109) (Skopeliti et al., 2009). Συμπληρωματικές μελέτες της δομής του προΤα(100-109) από την ίδια ομάδα κατέδειξαν ότι δεν παράγει ίνες αμυλοειδούς, ενώ σε αντίθεση με το ακέραιο πεπτίδιο, δε δημιουργεί σφαιρικά συσσωματώματα. Επιπλέον, το δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109) παράγεται από τη δράση ενεργοποιημένων κασπασών στο μόριο της προΤα, κατά τη διάρκεια της απόπτωσης (Skopeliti et al., 2009). Μετά την έναρξη της απόπτωσης, μέσω της κασπάσης 3, η προΤα θραύεται στη κύρια



Εικόνα 4: Νωρίς κατά την απόπτωση, η κασπάση -3 κόβει την προΤα στην θέση DDVD με την ακόλουθη απελευθέρωση του δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109).

καρβοξυτελική της θέση (DDVD99) και με διαδοχική σειρά σε άλλες δύο θέσεις: AAVD6 και NGRD31 (Εικόνα 4). Το πρώτο σημείο θραύσης απενεργοποιεί το τμήμα NLS της προΤα, με συνέπεια να διαρρηει το ανοσοδραστικό θραύσμα της προΤα, προΤα(100-109) από τον πυρήνα προς το κυτταρόπλασμα και τελικά εκτός του κυττάρου. Τέλος, έχει δειχθεί σε *in vitro* πειράματα, ότι οι κασπάσες 3 και 7, θραύουν την προΤα μόνο στη θέση D99, γεγονός το οποίο φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο και στην *in vivo* διάσπαση της προΤα (Evstafieva et al., 2003).

1.4 Καρκίνος

Βασική λειτουργία των περισσότερων ανθρώπινων οργάνων και ιστών είναι η διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ της αναγέννησης κυττάρων και του κυτταρικού θανάτου. Μια αλληλουχία αυστηρά ρυθμιστικών μηχανισμών είναι υπεύθυνη ώστε ο εναπομένων αριθμός κυττάρων και παραμένει σταθερός. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις η εμφάνιση κυττάρων με ικανότητα διαφυγής από τους εν λόγω μηχανισμούς, οδηγεί στη δημιουργία ενός υπολογίσιμου κυτταρικού πληθυσμού. Η ανάπτυξη του πληθυσμού αυτού σε μεγάλη κλίμακα, έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία ενός όγκου ή νεοπλασματος (Kindt et al., 2007).

Η εμφάνιση του καρκίνου οφείλεται στον συνεχή και ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Τα φυσιολογικά κύτταρα εκτελούν τις διάφορες λειτουργίες

τους μέσω απόκρισης σε κατάλληλα ρυθμιστικά σήματα. Εν αντιθέσει, τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσονται και διαιρούνται χωρίς να υπόκεινται σε κάποιο μηχανισμό ρύθμισης, διηθούν υγιείς ιστούς και όργανα, και τελικά διασπείρονται σε ολόκληρο το σώμα (Cooper, 2000).

Η διάκριση των όγκων σε καλοήθεις και κακοήθεις γίνεται με βάση :

- a. την διήθηση των γύρω ιστών
- b. τον αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού τους
- c. το μεταστατικό τους δυναμικό

Οι κακοήθεις όγκοι έχουν την δυνατότητα να απελευθερώνουν μεμονωμένα κύτταρα, τα οποία μπορούν να μετακινούνται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος ή της λέμφου, δημιουργώντας έναν νέο όγκο σε διαφορετικό, συχνά απομακρυσμένο, σημείο του σώματος από το αρχικό σημείο δημιουργίας και ανάπτυξής τους. Η διαδικασία αυτή, ονομάζεται μετάσταση. Το 2007 η ομάδα του Kindt et al., κατάφερε να διαχωρίσει τους κακοήθεις όγκους με βάση την εμβρυϊκή προέλευση του ιστού από τον οποίο πηγάζουν. Η διάκριση αυτή κατηγοριοποίησε τους κακοήθεις όγκους σε:

- a. καρκινώματα (από ενδο- ή εξωδερμικούς ιστούς)
- b. λευχαιμίες και λεμφώματα (κακοήθεις όγκοι των αιμοποιητικών κυττάρων του μυελού)
- c. σαρκώματα (από μεσοδερμικούς ιστούς).

1.4.1 Ρόλος της προΤα και προΤα(100-109) στο καρκίνο

Από τα πρώτα *in vitro* πειράματα σε ανθρώπινο μοντέλο, το 2013, η ομάδα των Karra et al., 2013 κατέδειξε ότι η προΤα ενίσχυσε τη μειωμένη κυτταροτοξικότητα των κυτταροτοξικών Τα λεμφοκυττάρων (CTL), των NK και LAK κυττάρων, καθώς και την παραγωγή κυτταροκινών σε καρκινοπαθείς, μέσω της μείωσης της προσταγλανδίνης E2 (PGE2), και της αύξησης της παραγωγής IL-2 από τα λεμφοκύτταρα των ασθενών. Παρόλα αυτά, η χορήγηση της προΤα στον άνθρωπο χρήζει περαιτέρω κλινικής αξιολόγησης.

Άλλες μελέτες σε καλλιέργειες ανθρωπίνων μονοκυττάρων του περιφερικού αίματος, διαφοροποιημένων προς ανώριμα δένδριτικά κύτταρα έδειξαν ότι η χορήγηση της προΤα ή του προΤα(100-109) είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή της ωρίμανσης των κυττάρων καθώς και της ικανότητάς τους να ενεργοποιούν, παρουσία κατάλλεξλων αντιγόνων, αντιγονοειδικά T-κύτταρα *in vitro* (Ioannou et al., 2013).

Επιπλέον, άλλες μελέτες φανέρωσαν ότι η προΤα και το δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109) πυροδοτεί την ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού, δρώντας ενισχυτικά τόσο στη φαγοκυτταρική τους ικανότητα και την παραγωγή και

απελευθέρωση ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) όσο και στην κυτταροτοξικότητά τους έναντι των καρκινικών κυττάρων. Τέλος, φαίνεται ότι σε περιπτώσεις καρκίνου των ωοθηκών, αυξάνεται η κυτταροτοξική δράση των λεμφοκυττάρων του ασκίτικου υγρού, έναντι των αυτόλογων καρκινικών κυττάρων (Samara et al., 2013).

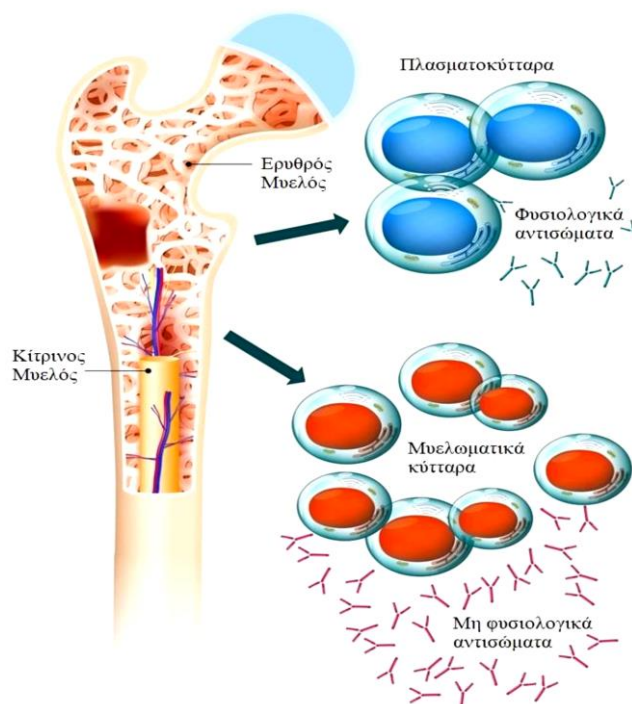
Πρόσφατα δημοσιευμένες μελέτες κατέδειξαν την αντικαρκινική δράση τόσο της προΤα όσο και του ανοσοδραστικού της πεπτιδίου και *in vivo*. Συγκεκριμένα, η ενδοπεριτοναϊκή θεραπευτική χορήγηση του συνδυασμού πεπτιδικού εμβολίου (Acid Wash Extract, AWE) με προΤα ή προΤα(100-109), μείωσε δραματικά το ρυθμό ανάπτυξης των όγκων ποντικών που είχαν προηγουμένως ενοφθαλμιστεί υποδόρια με συγγενικά μελανωματικά κύτταρα και αύξηση του χρόνου επιβίωσής τους (Birmpilis et al., 2019). Ο προτεινόμενος μηχανισμός αντικαρκινικής δράσης σχετίζεται με την ενεργοποίηση του TLR-4 των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (περιτοναϊκών μακροφάγων) από την προΤα και το προΤα(100-109), που οδηγεί στην ωρίμανσή τους και στην αύξηση της παρουσίας των αντιγόνων των καρκινικών κυττάρων στα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα με την ταυτόχρονη έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών και χημειοκινών. Τα εν λόγω T λεμφοκύτταρα με τη σειρά τους εκκρίνουν Th1-τύπου κυτταροκίνες ενεργοποιώντας τα κυτταροτοξικά T και NK κύτταρα τα οποία λύουν τα καρκινικά κύτταρα (Birmpilis et al., 2019).

1.4.2 Πολλαπλό Μυέλωμα (ΠΜ)

Από τους προαναφερθέντες τύπους όγκων, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το πολλαπλό μυέλωμα (ΠΜ), το οποίο ανήκει στις αιματολογικές κακοήθειες και αποτελεί το 1% των ανθράπινων νεοπλασιών και το 10-15% του συνόλου των κακοηθών αιματολογικών νοσημάτων. Ο επιπολασμός του ΠΜ υπολογίζεται σε περίπου 2-4 νέες περιπτώσεις κάθε χρόνο ανά 100.000 άτομα (Ράπτης et al., 2016).

Το ΠΜ αποτελεί τη δεύτερη συχνότερη κακοήθεια μετά το λέμφωμα Non-Hodgkin και σχετίζεται με την εξαλλαγή των πλήρως διαφοροποιημένων πλασματοκυττάρων. Τα πλασματοκύτταρα προέρχονται από τα B-λεμφοκύτταρα και σε φυσιολογικές συνθήκες παράγουν ανοσοσφαιρίνες. Το πολλαπλό μυέλωμα είναι αποτέλεσμα κυτταρογενετικών ανωμαλιών που έχει σαν επακόλουθο τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό, την αποφυγή της απόπτωσης και τη διαφυγή των κυττάρων από τον έλεγχο του ανοσοποιητικού συστήματος. Σε αρχικά στάδια τα κακοήθη πλασματοκύτταρα εδρεύουν στο μυελό των οστών, ενώ σε πιο προχωρημένα στάδια, εντοπίζονται στην κυκλοφορία του αίματος και σε άλλους ιστούς και όργανα (**Εικόνα 5**). Βασικό χαρακτηριστικό του ΠΜ αποτελεί η έκκριση μιας μονόκλωνης ανοσοσφαιρινικής πρωτεΐνης (πρωτεΐνη M), από τα κακοήθη πλασματοκύτταρα. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι σε ορισμένους ασθενείς παρατηρείται έκκριση μόνο μονόκλωνων ελαφρών αλυσίδων, ενώ σε άλλους δεν παρατηρείται έκκριση πρωτεΐνης

Μ. Η έκκριση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης και η εμφάνιση κυτταροκινών αποτελεί πρόδρομο των συμπτωμάτων του ΠΜ και ως απόρροια αυτών, εκδηλώνονται καταστάσεις που καταστρέφουν όργανα και οστά, όπως νεφρική ανεπάρκεια, υπερκαλιαιμία και αναιμία, ομάδα χαρακτηριστικών συμπτωμάτων που αναφέρονται με τη συντομογραφία CRAB (C=calcium (elevated), R=renal failure, A=anemia, B=bone lesions) (Kumar et al., 2017).



Εικόνα 5: Στο πολλαπλό μυέλωμα έχουμε υπέρμετρη παραγωγή πλασματοκυττάρων τα οποία παράγουν τη μυελωματική ανοσοσφαιρίνη Μ.

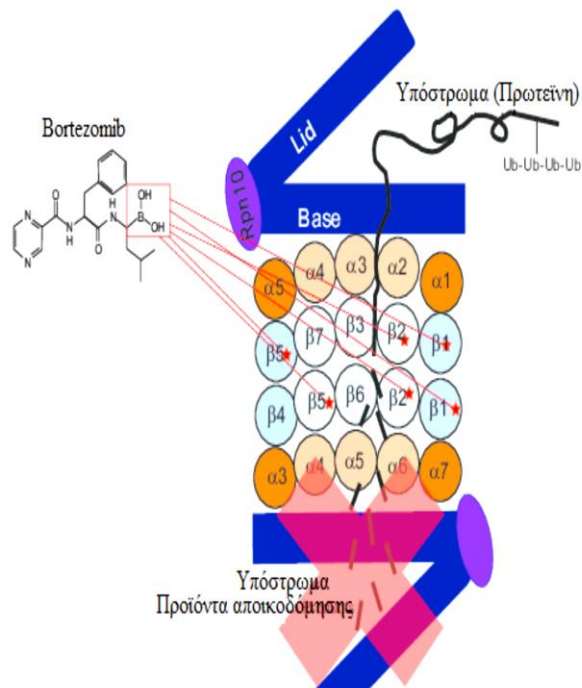
1.4.3 Θεραπεία του ΠΜ – Bortezomib

Το bortezomib αποτελεί ένα από τα βασικότερα θεραπευτικά μέσα αντιμετώπισης του ΠΜ. Συγκεκριμένα, η εν λόγω δραστική ουσία ενδείκνυται, ως μονοθεραπεία ή σε συνδυασμό με άλλες δραστικές ουσίες (π.χ. δοξορουβικίνη, δεξαμεθαζόνη, μελφαλάνη, πρεδνιζόνη, θαλιδομίδη), για τη θεραπεία ενήλικων ασθενών με μη προθεραπευμένο ή εξελισσόμενο ΠΜ.

Πρόκειται για ένα μόριο βορίου, γνωστό και ως PS-341 που αναστέλλει ειδικά και αντιστρεπτά κατάλοιπα θρεονίνης της υπομονάδας 26S του πρωτεασώματος (**Εικόνα**

6). Το πρωτεάσωμα βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα όλων των ευκαρυωτικών κυττάρων και αποτελώντας ενζυμικό σύμπλοκο, είναι υπεύθυνο για τη διαχείριση της πρωτεϊνικής αποικοδόμησης των πρωτεϊνών του κυττάρου. Οι πρωτεΐνες που δεν έχουν πλέον λειτουργικό ρόλο, συμπεριλαμβανομένων και αυτών του κυτταρικού κύκλου, της απόπτωσης και της κυτταρικής σηματοδότησης, σημαίνονται με ουβικιτίνη και οδηγούνται στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση και ανακύκλωση των αμινοξέων τους. Η διαδικασία αυτή, διατηρεί την ισορροπία μεταξύ των πρωτεϊνών που αναστέλλουν ή επάγουν τον κυτταρικό κύκλο, οδηγώντας σε κυτταρικό θάνατο (Field-Smith et al., 2006).

Η δράση του bortezomib έναντι των μυελωματικών κύτταρων στηρίζεται στην αναστολή της αποικοδόμησης του αναστολέα kappa B (IκB), και συνεπώς στη σταθεροποίηση του πυρηνικού παράγοντα (συμπλόκου) kappa B (Nuclear Factor κB, NF-κB). Το γεγονός αυτό οδηγεί στη μετατόπιση του συμπλόκου στον πυρήνα και τελικά στην αναστολή των πολλαπλών καταρροϊκών μονοπατιών που είναι απαραίτητα στην κυτταρική σηματοδότηση του πολλαπλού μυελώματος.



Εικόνα 6: Το bortezomib αποτελεί ένωση βορίου που αναστέλλει την υπομονάδα 26S του πρωτεασώματος μέσω σύνδεσης με θρεονίνη (Researchgate).

Το bortezomib παρουσιάζει μεγαλύτερη δραστηριότητα έναντι των καρκινικών κυττάρων σε σχέση με τα φυσιολογικά, λόγω της απενεργοποίησης σημαντικών σηματοδοτικών μηχανισμών, υπεύθυνων για τον πολλαπλασιασμό τους (Field-Smith et al., 2006).

1.5 Ακτινοβολίες

1.5.1 Εισαγωγή

Ιοντίζουσες είναι οι ακτινοβολίες που μεταφέρουν ενέργεια ικανή να εισχωρήσει στην ύλη, να προκαλέσει ιοντισμό των ατόμων, να διασπάσει βίαια χημικούς δεσμούς και να προκαλέσει βιολογικές βλάβες στον ανθρώπινο οργανισμό. Ο ιοντισμός ενός ουδέτερου ατόμου είναι η βίαιη απομάκρυνση ενός ηλεκτρονίου από τις στιβάδες του, λόγω εξωτερικού αιτίου, με αποτέλεσμα την παραγωγή δύο αντίθετα φορτισμένων ιόντων, του θετικού ατόμου και του αρνητικού ηλεκτρονίου.

Οι γνωστότερες ιοντίζουσες ακτινοβολίες που έχουν άμεση ιατρική εφαρμογή είναι οι ακτίνες X, καθώς και οι ακτινοβολίες α, β, και γ που εκπέμπονται από τους ασταθείς πυρήνες ατόμων.

Ακτινοβολία α: Σωματιδιακή ακτινοβολία που αποτελείται από δύο πρωτόνια και δύο νετρόνια. Έχει μικρή διεισδυτικότητα και μπορεί να αποκοπεί από ένα φύλλο χαρτί. Είναι δύσκολα ανιχνεύσιμη και αποτελεί σημαντικό κίνδυνο εσωτερικής έκθεσης. Τα σωματίδια α είναι πυρήνες ηλίου έχουν μεγάλη μάζα, και θετικό φορτίο.

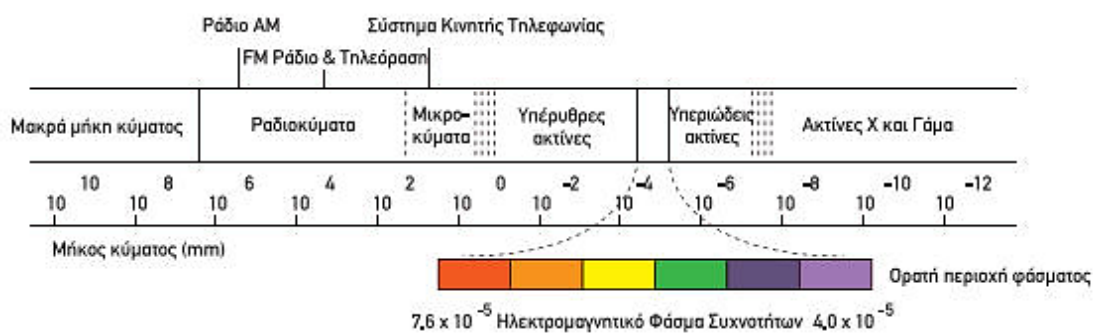
Ακτινοβολία β: Σωματιδιακή ακτινοβολία που αποτελείται από αρνητικά φορτισμένα ηλεκτρόνια ή θετικά φορτισμένα ποζιτρόνια. Είναι πιο διεισδυτική από την ακτινοβολία α, αλλά μπορεί να αποκοπεί από φύλλα πλαστικού ή λεπτά μεταλλικά φύλλα. Αποτελεί κίνδυνο εξωτερικής έκθεσης ματιών και δέρματος και κίνδυνο εσωτερικής έκθεσης. Ο βαθμός ανίχνευσης εξαρτάται από την ενέργεια των β σωματιδίων.

Ακτινοβολία X ή γ: Ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία ενέργειας ικανής να προκαλέσει ιοντισμό. Για θωράκιση χρειάζεται να χρησιμοποιηθεί χάλυβας, μόλυβδος ή σκυρόδεμα (ή συνδυασμός τους). Είναι πολύ πιο διεισδυτική από τη β ακτινοβολία και αποτελεί κίνδυνο εξωτερικής και εσωτερικής έκθεσης. Μπορεί να ανιχνευθεί ευκολότερα από την ακτινοβολία α και β. Οι ακτίνες γ προέρχονται από τον πυρήνα ατόμων ραδιενεργών ισοτόπων όπως το κοβάλτιο, το καίσιο, το ιρίδιο. Οι ακτίνες X προέρχονται από την πρόσκρουση ταχέως κινουμένων ηλεκτρονίων σε μεταλλικό στόχο π.χ. βολφράμιο.

Μη ιοντίζουσα, ή γνωστή και ως ηλεκτρομαγνητική, είναι η ακτινοβολία που μεταφέρει σχετικά μικρή ενέργεια, που δεν προκαλεί ιοντισμό, είναι ικανή όμως να προκαλέσει ηλεκτρικές, χημικές και θερμικές επιδράσεις στον οργανισμό. Πρόκειται για ταλαντώσεις ηλεκτρικών και μαγνητικών πεδίων που διαδίδονται στο χώρο υπό τη μορφή κύματος. Τα διάφορα είδη ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας διακρίνονται

μεταξύ τους ανάλογα με τη συχνότητα ή το μήκος του διαδιδόμενου κύματος (**Εικόνα 7**). Στις ακτινοβολίες αυτές εντάσσονται:

- τα στατικά ηλεκτρικά και μαγνητικά πεδία, που δεν μεταβάλλονται και έτσι δεν δημιουργούν ηλεκτρομαγνητικά κύματα. Παράδειγμα: το φυσικό μαγνητικό πεδίο της γης
- τα χαμηλόσυχνα (50 Hz) ηλεκτρικά και μαγνητικά πεδία, που δημιουργούνται από τις ηλεκτρικές συσκευές, τους υποσταθμούς και τις γραμμές μεταφοράς και διανομής ηλεκτρικής ενέργειας
- τα ραδιοκύματα και τα μικροκύματα που εκπέμπονται από κεραιές επικοινωνιών, κεραιές ραδιοφωνίας και τηλεόρασης, φούρνους μικροκυμάτων
- η υπέρυθη, η ορατή (φως), και τμήμα της υπεριώδους ακτινοβολίας



Εικόνα7: Φάσμα ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας.

1.5.2 Αλληλεπίδραση ακτινοβολίας με την βιολογική ύλη

Η αλληλεπίδραση των ακτινοβολιών με την βιολογική ύλη διαχωρίζεται σε δύο κατηγορίες: την απορρόφηση και τη σκέδαση. Κατά την απορρόφηση αρχικό πρωτογενές φωτόνιο χάνεται και η ενέργεια απορροφάται εξ' ολοκλήρου από το άτομο. Κατά τη σκέδαση το πρωτογενές φωτόνιο αποκλίνει της πορείας του και ταυτόχρονα αλλάζει ενέργεια (δευτερογενές φωτόνιο).

Στη περίπτωση των ηλεκτρομαγνητικών ακτινοβολιών(γ ή X), τα φωτόνια καθώς διεισδύουν στην ύλη, αλληλεπιδρούν με τα άτομα του υλικού με αποτέλεσμα να εξασθενούν. Μακροσκοπικά η εξασθένιση μιας δέσμης περιγράφεται από το γραμμικό συντελεστή εξασθενίσεων μ . Η μεταβολή της έντασης της δέσμης dI κατά τη διέλευση της από το πάχος του υλικού dx δίνονται από τη σχέση :

$$dI = -\mu \times dx$$

ενώ με την ολοκλήρωση της σχέσης αυτής για πεπερασμένο πάχος υλικού x και αρχική ένταση δέσμης I_0 προκύπτει η ένταση σε συγκεκριμένο πάχος :

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

Η ένταση της δέσμης μπορεί να εκφράζεται σε αριθμό σωματιδίων ή ενέργειας ανά μονάδα χρόνου και ανά μονάδα εμβαδού. Ο γραμμικός συντελεστής εξασθένησης συνδέεται με το πάχος υποδιπλασιασμού (HVL) το οποίο είναι το πάχος του υλικού στο οποίο η ένταση πέφτει στο μισό της αρχικής της τιμής :

$$\mu = \frac{0.693}{\text{HVL}}$$

Ο συντελεστής εξασθένησης εξαρτάται από την ενέργεια των φωτονίων, την ατομική σύνθεση του υλικού και τη μάζα του υλικού, όχι όμως από τη φυσική του κατάσταση. Για το λόγο αυτό εισάγεται ο μαζικός συντελεστής εξασθένησης μ_m ώστε να κανονικοποιηθεί η εξάρτηση από την πυκνότητα του υλικού :

$$\mu_m = \frac{\mu}{\rho}$$

Η μακροσκοπική παράμετρος του γραμμικού συντελεστή εξασθένησης συνδέεται με τη μικροσκοπική περιγραφή αλληλεπιδράσεων μέσω της ενεργούς διατομής συγκρούσεως (σ):

$$\mu = n \times \sigma = \frac{\rho}{A} \times N_0 \times \sigma$$

όπου N_0 ο αριθμός Avogadro, A το ατομικό βάρος και n ο αριθμός υλικού ανά μονάδα όγκου.

Η ενεργός διατομή συγκρούσεως έχει μονάδες επιφάνειας καθώς αναπαριστά το εμβαδόν σφαιρών που “βλέπουν” τα φωτόνια στη θέση των ατόμων της ύλης. Μεγάλη ενεργός διατομή συγκρούσεως σημαίνει μεγάλη πιθανότητα συγκρούσεως και αντίστροφα. Η ενεργός διατομή σκέδασης εξαρτάται έτσι από το είδος της αλληλεπίδρασης για δεδομένη ενέργεια φωτονίου και είδος ατόμου. Φωτόνια με ενέργειες της τάξης των keV βρίσκουν εφαρμογή στην ακτινοδιαγνωστική ενώ φωτόνια με ενέργειες της τάξης των MeV χρησιμοποιούνται στη ακτινοθεραπεία. (Ψαρράκος Κ., 2009)

Οι μηχανισμοί απορροφήσεως και σκεδάσεως των φωτονίων εκφράζονται μέσα από την ενεργό διατομή σύγκρουσης με ανάλυση σε 4 συνεισφορές :

$$\sigma = \sigma_{pe} + \sigma_{pp} + \sigma_c + \sigma_{coh}$$

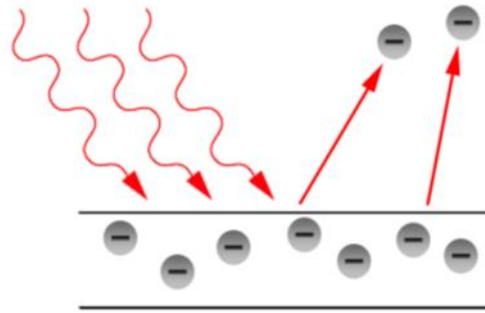
όπου οι συνεισφορές ερμηνεύονται ως εξής:

- σ_{pe} = ενεργός διατομή φωτοηλεκτρικού φαινομένου.

- σ_{pp} = ενεργός διατομή δίδυμης γένεσης.
- σ_c = ενεργός διατομή σκέδασης Compton.
- σ_{coh} = ενεργός διατομή σύμφωνης σκέδασης.

Φωτοηλεκτρική απορρόφηση

Κατά την φωτοηλεκτρική απορρόφηση το φωτόνιο έχει αρκετή ενέργεια ώστε να αποσπάσει ένα ηλεκτρόνιο από το άτομο στο οποίο ανήκει (Εικόνα 8). Το ηλεκτρόνιο αυτό καλείται φωτοηλεκτρόνιο και μεταφέρει κατά ενέργεια $h\nu - b$, όπου $h\nu$ η ενέργεια του φωτονίου και b το έργο εξόδου από το άτομο (ενέργεια σύνδεσης). Όταν το ηλεκτρόνιο εσωτερικής στοιβάδας εγκαταλείψει το άτομο ένα ηλεκτρόνιο εξωτερικής στοιβάδας θα αποδιεγερθεί



Εικόνα 8: Φωτοηλεκτρικό φαινόμενο.

και θα καλύψει το κενό. Θα προκύψει έτσι η εκπομπή χαρακτηριστικής ακτινοβολίας μαζί με τον ιοντισμό του ατόμου. Η εξάρτηση της διατομής σκέδασης λόγω φωτοηλεκτρικού φαινομένου για χαμηλές ενέργειες φωτονίων εξαρτάται έντονα από τον ατομικό αριθμό του υλικού Z :

$$\sigma_{pe} \propto \frac{Z^4}{h\nu^3}$$

Αντίστοιχα ο μαζικός συντελεστής εξασθένησης λόγω φωτοηλεκτρικού φαινομένου :

$$\left(\frac{\mu}{\rho}\right)_{pe} \propto \frac{AZ^4}{h\nu^3}$$

Για μεγαλύτερες ενέργειες ο εκθέτης αυξάνει μέχρι και την τιμή 4.5.

Αυτή είναι η βάση της ακτινοδιαγνωστικής. Με ακτινοβολία X μερικών δεκάδων keV, όργανα όπως τα οστά που περιέχουν ουσίες υψηλού Z (λόγω παρουσίας Ca), παρουσιάζουν έντονη αντίθεση.

Δίδυμος γένεση

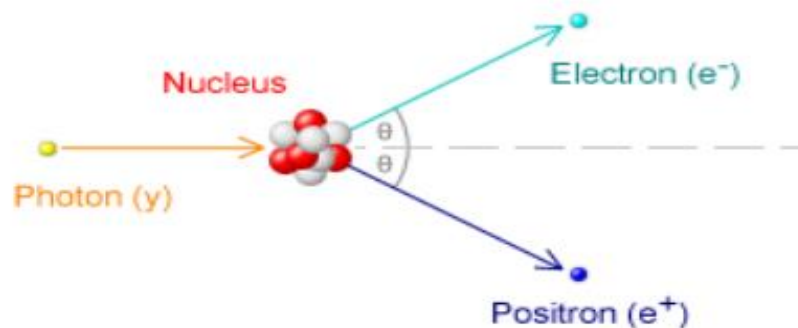
Στη δίδυμο γένεση το φωτόνιο εξαφανίζεται και δημιουργείται ένα ζεύγος ηλεκτρονίου – ποζιτρονίου (Εικόνα 9). Για να συμβεί δίδυμος γένεση θα πρέπει το αρχικό φωτόνιο να έχει ενέργεια τουλάχιστον 2 φορές την ενέργεια ηρεμίας του ηλεκτρονίου, δηλαδή $2 \times 0.511\text{MeV} = 1.02\text{MeV}$. Για ενέργειες της τάξης του MeV η ενεργός διατομή

σκέδασης για δίδυμο γένεση εξαρτάται από τον ατομικό αριθμό και την ενέργεια του φωτονίου ως :

$$\sigma_{pe} \propto \ln(h\nu) \times Z^a$$

με $a = 2$ για μικρά Z και $a < 2$ για μεγάλα Z .

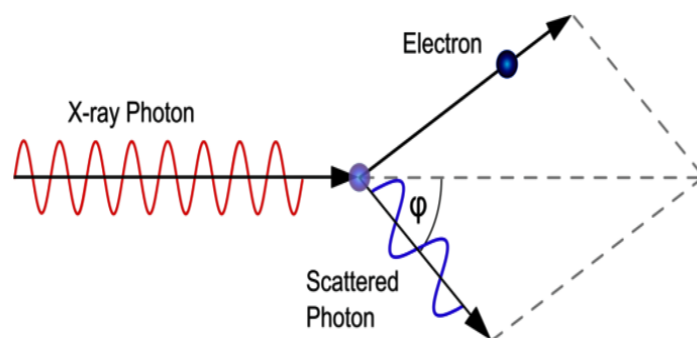
Το ζεύγος ηλεκτρονίου - ποζιτρονίου που σχηματίζεται ζει για περίπου 10^{-7} sec και στη συνέχεια εξαυλώνεται παράγοντας ένα ζεύγος φωτονίων. Στο φαινόμενο αυτό στηρίζεται η camera ποζιτρονίων pet.



Εικόνα 9: Δίδυμος γένεση.

Σκέδαση Compton

Η σκέδαση Compton είναι η σύγκρουση του εισερχόμενου φωτονίου με ένα ηλεκτρόνιο (Εικόνα 10). Πρόκειται για σχετικιστικό φαινόμενο στο οποίο το πρωτογενές φωτόνιο χάνει ενέργεια (ασύμφωνη σκέδαση) κατά τη σύγκρουση (ή ισοδύναμα



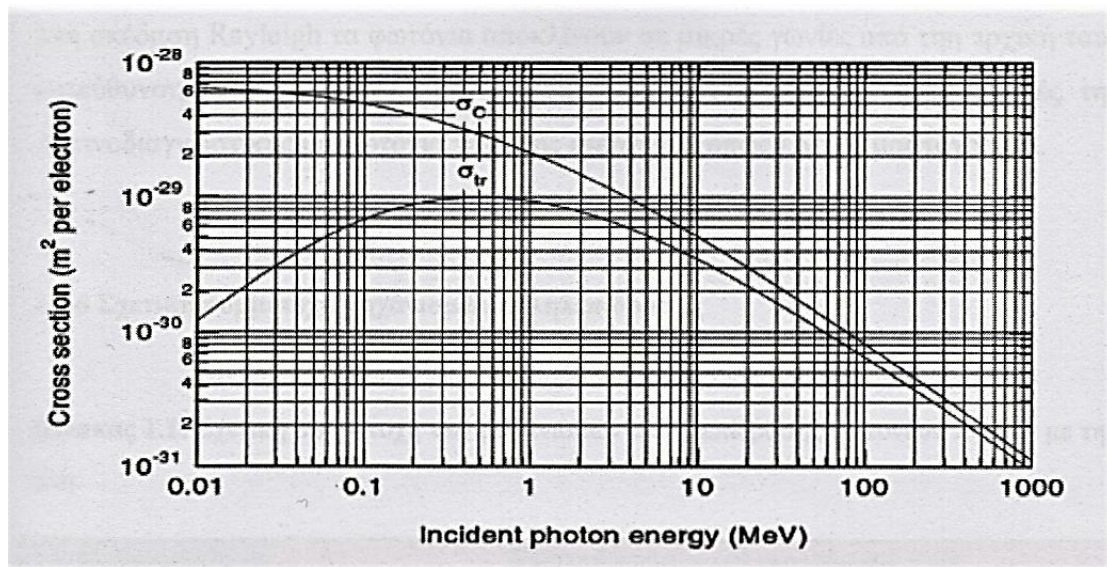
Εικόνα 10: Σκέδαση Compton.

αυξάνει το μήκος κύματός του), δηλαδή, υπάρχει ένα νέο φωτόνιο. Το νέο φωτόνιο

μπορεί να σκεδαστεί σε μεγάλο εύρος γωνιών ακόμα και σε 180 μοίρες (οπισθοσκέδαση). Για την σκέδαση Compton ισχύει :

$$\sigma_c = Z \times \sigma_e$$

με σ_e η ενεργός διατομή του ηλεκτρονίου για σκέδαση Compton, η εξάρτηση της οποίας από την ενέργεια του φωτονίου δίνεται από την σχέση Klein-Nishina (**Εικόνα 11**).



Εικόνα 11: Η ενεργός διατομή του ηλεκτρονίου για σκέδαση Compton. Ο όρος σ_{tr} είναι η συνεισφορά της σύμφωνης σκέδασης. Σε χαμηλές ενέργειες υπερισχύει η ασύμφωνη σκέδαση.

Στη σκέδαση Compton ένα τμήμα της ενέργειας του πρωτογενούς φωτονίου μεταφέρεται στο ηλεκτρόνιο. Έτσι η ενεργός διατομή του φαινομένου Compton είναι άθροισμα δύο παραμέτρων:

$$\sigma_c = \sigma_\alpha + \sigma_{tr}$$

Σε μεγάλες ενέργειες το ποσοστό απώλειας ενέργειας φωτονίου είναι μικρό.

Σύμφωνη Σκέδαση (Rayleigh)

Αυτή η σκέδαση μπορεί να περιγράψει από την κλασσική ηλεκτρομαγνητική θεωρία και ισχύει στην περιοχή πολύ μικρών χαμηλών ενεργειών για τα φωτόνια. Στη σύμφωνη σκέδαση το φωτόνιο δε χάνει καθόλου από την αρχική του ενέργεια. Για την ενεργό διατομή ισχύει :

$$\sigma_{\text{coh}} \begin{cases} = Z^2 \times \sigma_{\text{th}} , \text{για } E < E_0 \\ \propto \frac{1}{h\nu^2} , \text{για } E > E_0 \end{cases}$$

όπου E_0 η ενέργεια μετάβασης μεταξύ των δύο εξαρτήσεων. Για υλικά χαμηλού Z είναι E_0 περίπου 1 keV και για υλικά υψηλού Z είναι $E_0 \cong 10$ keV. Επίσης σ_{th} είναι η διατομή σκέδασης Thomson που είναι σταθερή ($\sigma_{\text{th}} = 0.655 \times 10^{-24} \text{ cm}^2$).

Στη σκέδαση Rayleigh τα φωτόνια αποκλίνουν σε μικρές γωνίες από την αρχική τους κατεύθυνση. Το φαινόμενο αυτό λαμβάνει υπόψη σε κάποιες εφαρμογές της ακτινοδιαγνωστικής με φωτόνια χαμηλής ενέργειας , όπως είναι η μαστογραφία (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Σχετική συμμετοχή των μηχανισμών αλληλεπίδρασης φωτονίων X και γ με την ύλη.

Ενέργεια φωτονίων	Σχετική συμμετοχή μηχανισμού (%)		
	Φωτοηλεκτρικό φαινόμενο	Σκέδαση Compton	Δίδυμος γένεση
10keV	95	5	0
26	50	50	0
50	11	89	0
60	7	93	0
100	1	99	0
200	0	100	0
600	0	100	0
1MeV	0	100	0
2	0	99	1
6	0	88	12
10	0	77	23
20	0	56	44

1.5.2.1 Χαρακτηριστικά μεγέθη ακτινοβολίας

Κατά τη χρήση ιοντίζουσών ακτινοβολιών, είναι κρίσιμο να προσδιοριστούν οι ποσοτικές μετρήσεις καθώς επίσης και η συσχέτιση των ποσοτήτων που χαρακτηρίζουν τις ακτινοβολίες με τις επιδράσεις τους στα υλικά ή βιολογικά συστήματα. Η επιστήμη που μελετά τους προαναφερθέντες παράγοντες είναι η δοσιμετρία και τα βασικά στοιχεία της περιλαμβάνουν τα παρακάτω μεγέθη.

Γραμμικώς μεταφερόμενη ενέργεια (LET, linear energy transfer)

Η γραμμικώς μεταφερόμενη ενέργεια (linear energy transfer) ορίζεται μέσω της υπό περιορισμό γραμμικώς μεταφερόμενης ενέργειας (L_{Δ}). Η τελευταία είναι το πηλίκο της ενέργειας dE_{Δ} που χάνει ένα φορτισμένο σωματίδιο εξαιτίας συγκρούσεων με τα ηλεκτρόνια του υλικού, δια την απόσταση dl που διανύει μέσα στο υλικό. Μονάδα μέτρησης στο S.I. είναι το J/m ή Ev/m ή KeV/ μ m :

$$L_{\Delta} = dE_{\Delta} / dl$$

Η ενέργεια dE_{Δ} δεν περιλαμβάνει το άθροισμα των κινητικών ενεργειών όλων των ηλεκτρονίων που ελευθερώνονται από τις συγκρούσεις του φορτισμένου σωματιδίου και έχουν κινητική ενέργεια μεγαλύτερη από κάποια συγκεκριμένη τιμή Δ . Η LET ορίζεται ως η L_{Δ} με Δ να τείνει στο άπειρο.

Kerma (kinetic energy released per unit mass)

Κέρμα K σε ένα σημείο ορίζεται το πηλίκο dE_{tr} προς τη μάζα dm , όπου dE_{tr} είναι το άθροισμα των αρχικών κινητικών ενεργειών όλων των φορτισμένων σωματιδίων τα οποία απελευθερώνονται από μη φορτισμένα ιοντίζοντα σωματίδια στον όγκο όπου υπάρχει μάζα dm . Μονάδα μέτρησης είναι το J/Kg ή το Gy. Σε περίπτωση που το υλικό όπου μεταφέρεται η ενέργεια είναι αέρας τότε το kerma λέγεται air kerma. (Ψαρράκος K., 2009)

Έκθεση

Ορίζεται μέσω της απόλυτης τιμής του ολικού φορτίου (dq) των ιόντων ενός φορτίου, θετικού ή αρνητικού πρόσημου, τα οποία παράγονται σε μάζα αέρα dm , όταν όλα τα ηλεκτρόνια και ποζιτρόνια που δημιουργούνται από τα φωτόνια στον αέρα μάζας dm σταματούν τελείως σε αυτόν. Αφορά μόνο ακτινοβολία X και γ . Αν με X συμβολιστεί η έκθεση, τότε $X = dq/dm$. Μονάδα μέτρησης της έκθεσης (SI) είναι το 1C/kg και το Roentgen (R) που ορίζεται ως $1R = 2.58 \cdot 10^{-4}C/kg$ (Ψαρράκος K., 2009).

Απορροφούμενη δόση

Ορίζεται ως το πηλίκο της μέσης τιμής της στοιχειώδους ενέργειας de που προσλαμβάνει στοιχειώδης μάζα dm προς τη μάζα αυτή. Δηλαδή, $D = de/dm$ και έχει μονάδα μέτρηση το Grey (Gy), όπου $1Gy = 1J/kg$. Η απορροφούμενη δόση είναι ανεξάρτητη από το είδος της ακτινοβολίας καθώς και απ' το υλικό, αφού εξαρτάται μόνο από την ενέργειά της. Επειδή σαν μονάδα μέτρησης το Gy είναι μεγάλο στις διαγνωστικές εφαρμογές χρησιμοποιούμε υποπολλαπλάσιά του: $1cGy = 0.01 Gy$ ή $1mGy = 0.001 Gy$.

Δόση ιστού ή οργάνου

Η μέση τιμή της απορροφούμενης δόσης στους ιστούς και τα όργανα του ανθρώπινου σώματος ονομάζεται δόση ιστού ή οργάνου. Οι ιοντίζουσες ακτινοβολίες επάγουν βιολογικές επιδράσεις σε έναν ιστό ή όργανο οι οποίες εξαρτώνται κυρίως από τη μέση δόση που θα απορροφήσει ο εν λόγω ιστός ή όργανο, το είδος της ακτινοβολίας, το συνολικό χρόνο της ακτινοβολήσης, την ηλικία και το φύλο του ακτινοβοληθέντος ατόμου, τη θερμοκρασία, την οξυγόνωση και την πιθανή ύπαρξη χημικών ουσιών (Ψαρράκος Κ., 2009).

Ισοδύναμη δόση

Η βιολογική επιβάρυνση της ακτινοβολίας σε κάποιο ιστό ποσοτικοποιείται με τη βοήθεια της δόσης D που λαμβάνει ένας ιστός T πολλαπλασιασμένης με ένα παράγοντα βαρύτητας ή συντελεστή στάθμισης ακτινοβολίας που χαρακτηρίζει την ακτινοβολία. Σύμφωνα με την Διεθνή Επιτροπή Ραδιολογικής Προστασίας (ICRP) ο παράγοντας βαρύτητας της ακτινοβολίας W_R , εξαρτάται από το είδος της ακτινοβολίας (Πίνακας 2). Μονάδα μέτρησης της ισοδύναμης δόσης είναι το Sievert (Sv) το οποίο έχει διαστάσεις Gy. Συνεπώς διαπιστώνεται πως οι διαστάσεις του γινομένου της δόσης με τον παράγοντα βαρύτητα ακτινοβολίας είναι ίδιες με αυτές της απορροφούμενης δόσης αφού η ποσότητα W_R είναι καθαρός αριθμός (Ψαρράκος Κ., 2009).

$$H_T = W_R * D$$

Πίνακας 2: Συντελεστής βαρύτητας (στάθμισης) για τις ακτινοβολίες.

Είδος ακτινοβολίας	W_R
Φωτόνια (X ή γ)	1
Ηλεκτρόνια	1
Πρωτόνια	2-5
Σωματία α, θραύσματα σχάσης, βαρέα ιόντα	20
Νετρόνια	5-20

Φαίνεται στον παραπάνω πίνακα ότι η βλάβη από σωματία α είναι 20 φορές μεγαλύτερη από αυτή που προκαλούν τα φωτόνια.

Ενεργός δόση

Η μέση απορροφούμενη δόση όλων των ακτινοβοληθέντων ιστών και οργάνων, ονομάζεται ενεργός δόση. Ο συνολικός κίνδυνος από την πρόσληψη ακτινοβολίας, εξαρτάται όχι μόνο από το είδος και την ενέργεια της ακτινοβολίας, αλλά και από το είδος του ιστού (ή των ιστών) που την προσέλαβε. Η ενεργός δόση (E_{eff}) περιγράφει την επιβάρυνση αυτή της υγείας από την ακτινοβολία και ορίζεται ως:

$$E_{eff} = \sum_T W_T \times \sum_R W_R \times D$$

Όπου W_T η ο συντελεστής βαρύτητας που χαρακτηρίζει τον ιστό. Σύμφωνα με την Διεθνή Επιτροπή Ραδιολογικής Προστασίας (ICRP) το άθροισμα των παραγόντων βαρύτητας οργάνων και ιστών W_T ισούται με 1 (**Πίνακας 3**). Ουσιαστικά πρόκειται για τιμή που βασίζεται στη φυσική δόση που κατανέμεται σε κάθε ένα από τους ανθρώπινους ιστούς και τροποποιείται από την ευαισθησία του κάθε ιστού ως προς την εμφάνιση καρκίνου. Η ενεργός δόση μετριέται σε Sv (Ψαρράκος Κ., 2009).

Πίνακας 3: Συντελεστής βαρύτητας (στάθμισης) διάφορους ιστούς.

Ιστός	W_T
Καρδιά, μυελός των οστών, κόλον, πνεύμονες, στομάχι, νεφροί, πάγκρεας, μήτρα κ.λπ.	0.12
Γονάδες	0.08
Ουροδόχος κύστη, οισοφάγος, ήπαρ, θυρεοειδής αδένας	0.04
Επιφάνεια οστών, εγκέφαλος, σιελογόνοι αδένες, δέρμα	0.01

Σχετική Βιολογική Δραστικότητα RBE

Οι ποσότητες ισοδύναμης δόσης ιστού ή οργάνου και η ενεργός δόση χρησιμοποιούνται μόνο για χαμηλές δόσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας για την εκτίμηση

των ακτινοεπαγόμενων επιδράσεων, δηλαδή κυρίως σε ακτινοδιαγνωστικές πράξεις. Για την περίπτωση των υψηλών δόσεων ακτινοβολίας, όπως αυτές που δίνονται για ακτινοθεραπευτικούς σκοπούς, συχνά χρησιμοποιούμε την ποσότητα σχετική βιολογική δραστηριότητα ή RBE. Ορίζεται ως ο λόγος της απορροφούμενης δόσης από φωτόνια ορισμένης ενέργειας με χαμηλή LET προς την δόση της υπό εξέταση ακτινοβολίας R που προκαλεί τη βιολογική απόκριση κάτω από παρόμοιες συνθήκες. Η τιμή της RBE εξαρτάται από το είδος και την ενέργεια της ακτινοβολίας καθώς και από το ακτινοβολούμενο βιολογικό υλικό (Ψαρράκος Κ., 2009).

1.5.2.2 Επίδραση ακτινοβολιών στον άνθρωπο

Οι βιολογικές επιδράσεις της ιοντίζουσας ακτινοβολίας εξαρτώνται από ένα πλήθος παραγόντων που συνοψίζονται επιγραμματικά ως εξής:

- την απορροφούμενη δόση στους ιστούς ή στα κύτταρα
- το είδος της ακτινοβολίας
- τη σχετική βιολογική επίδραση της ακτινοβολίας
- τη χωρική και χρονική κατανομή της εναποτιθέμενης ενέργειας
- το συνολικό αριθμό κυττάρων που ακτινοβολούνται

Ανάλογα με την ταχύτητα διαίρεσης και την εξειδίκευση τους, τα κύτταρα ανταποκρίνονται σε χαμηλής δόσης ακτινοβολία με γραμμικό τρόπο. Η ακτινοβολία οποιουδήποτε βιολογικού υλικού μπορεί να διαχωριστεί σε τρία στάδια όπως αναλύονται παρακάτω:

Φυσικό στάδιο: Η ιοντίζουσα ακτινοβολία αλληλεπιδρά με το βιολογικό υλικό και απορροφάται ενέργεια από την ύλη μέσω ιοντισμών και διεγέρσεων.

Χημικό στάδιο: Οι ιοντισμοί και οι διεγέρσεις από το φυσικό στάδιο προκαλούν ρήξη των χημικών δεσμών και συνεπώς δημιουργούνται ελεύθερες ρίζες οι οποίες με τη σειρά τους έχουν άμεσες ή έμμεσες βιολογικές επιδράσεις. (Sunder, 1998)

Βιολογικό στάδιο: Στο στάδιο αυτό, ενζυμικοί μηχανισμοί επεμβαίνουν και επιδιορθώνουν τους μοριακούς σχηματισμούς που έχουν υποστεί βλάβη κατά το χημικό στάδιο, με σκοπό την πλήρη αποκατάσταση αυτών.

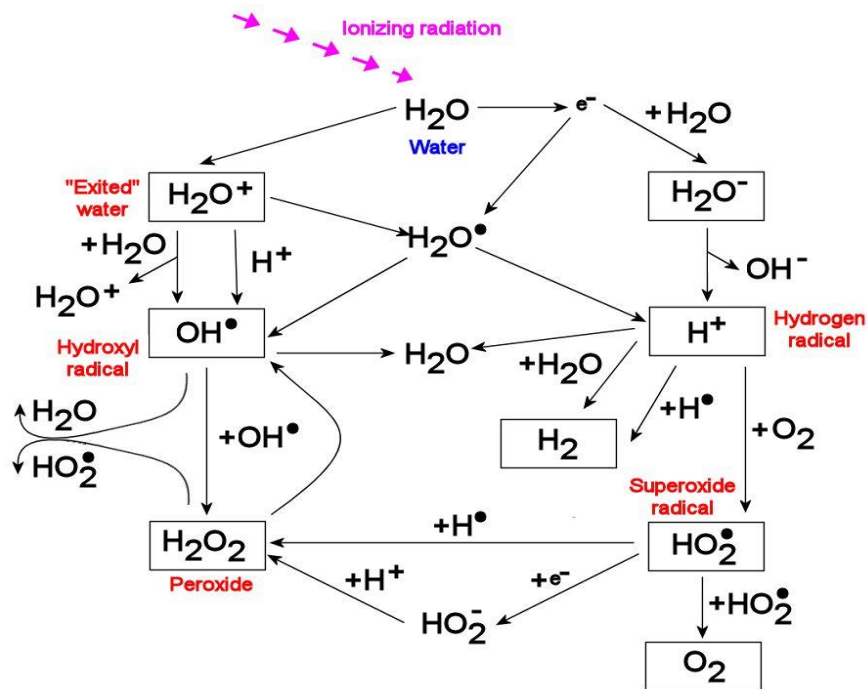
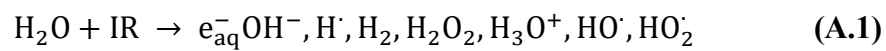
Άμεσες και έμμεσες βλάβες

Ανάλογα με το σημείο εφαρμογής της δράσης της ακτινοβολίας (σωματιδιακής ή ηλεκτρομαγνητικής) η βλάβη μπορεί να χαρακτηριστεί ως άμεση ή έμμεση. Οι άμεσες βλάβες δρουν κατευθείαν πάνω στο μόριο προκαλώντας αλλοιώσεις. Η πιο χαρακτηριστική άμεση βλάβη είναι η οξειδωση με αποβολή ενός ηλεκτρονίου, που μπορεί να προκληθεί είτε από ουσίες που εκκρίνονται είτε από την ίδια την ακτινοβολία. Οι έμμεσες δρουν στο περιβάλλον του μορίου ενεργοποιώντας ένα

μονοπάτι που θα προκαλέσει τελικά την αλλοίωση. Η πιο συνηθισμένη περίπτωση έμμεσων βλαβών είναι εκείνες που προέρχονται από τη ραδιόλυση του νερού. Η ακτινοβολία διεγείρει τα μόρια του νερού και παράγει τα αντιδραστήρια που βλάπτουν το DNA. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω παράγει, κυρίως το HO^\cdot . Οι περισσότερες βλάβες στο DNA είναι αποτέλεσμα της έμμεσης δράσης της ακτινοβολίας.

Ραδιόλυση του νερού

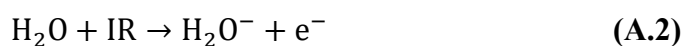
Η ραδιόλυση του νερού είναι η διάσπαση των δεσμών του μορίου του λόγω ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Συνήθως αυτή η ακτινοβολία προέρχεται από τη διάσπαση πυρήνων, από επιταχυνόμενα σωματίδια ή από ακτίνες X (Εικόνα 12). Η εποπτική εικόνα της ραδιόλυσης μπορεί να δοθεί σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Εικόνα 12: Διαδικασία ραδιόλυσης του νερού.

Τα προϊόντα παράγονται σε διαφορετικές σχετικές συγκεντρώσεις και έχουν διαφορετικές βιολογικές επιπτώσεις. Η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα στα τρία προαναφερθέντα στάδια αλληλεπίδρασης της ακτινοβολίας με την βιολογική ύλη:

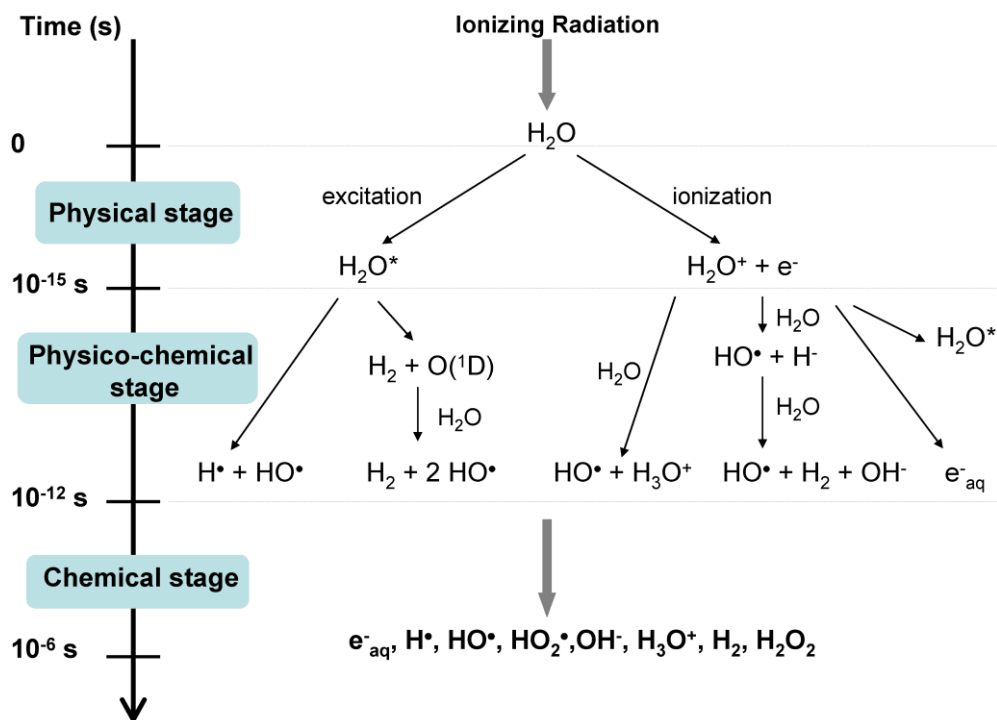
1. Φυσικό στάδιο: Συμβαίνει μέχρι περίπου 10^{-15} δευτερόλεπτα μετά από τον ιοντισμό του νερού. Προκαλεί το σχηματισμό του H_2O^- και e^- και το διεγερμένο H_2O^* .



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

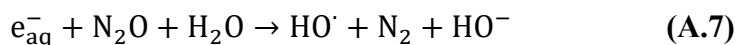


3. Βιολογικό στάδιο: Συμβαίνει περίπου 10^{-12} με 10^{-6} δευτερόλεπτα μετά από τον ιοντισμό του νερού. Εκεί παράγονται τα υπόλοιπα προϊόντα της εξίσωσης (Sunder, 1998) (**Εικόνα 13**).

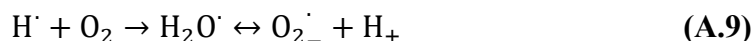


Εικόνα 13: Στάδια ραδιόλυσης του νερού.

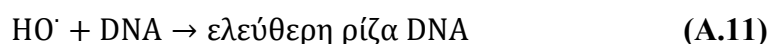
Για ιστούς κορεσμένους σε NO_2 γίνεται ακόμη η αντίδραση A7, οπότε τα ηλεκτρόνια καταναλώνονται παράγοντας υδροξύλιο.



Ακόμη, για οξυγονωμένους ιστούς γίνονται οι αντιδράσεις A8, A9, που καταναλώνουν πολύ γρήγορα ηλεκτρόνια και οξυγόνο παράγοντας το αβλαβές για το DNA $\text{O}_2\cdot^-$ και πρωτόνια.



Κάποιες ουσίες παράγονται σε τόσο μικρές ποσότητες που μπορούν να αγνοηθούν. Εκείνες που τελικά μένουν και προκαλούν βλάβες στο DNA είναι το $\text{H}\cdot$ και το $\text{HO}\cdot$. Το H_2O_2 δεν είναι ελεύθερη ρίζα αλλά μέσω αντιδράσεων τύπου Fenton παράγει $\text{HO}\cdot$. Τα βασικά χημικά μονοπάτια που προκαλούν την βλάβη στο DNA μπορούν χωρίς βλάβη της γενικότητας να γραφτούν ως εξής:

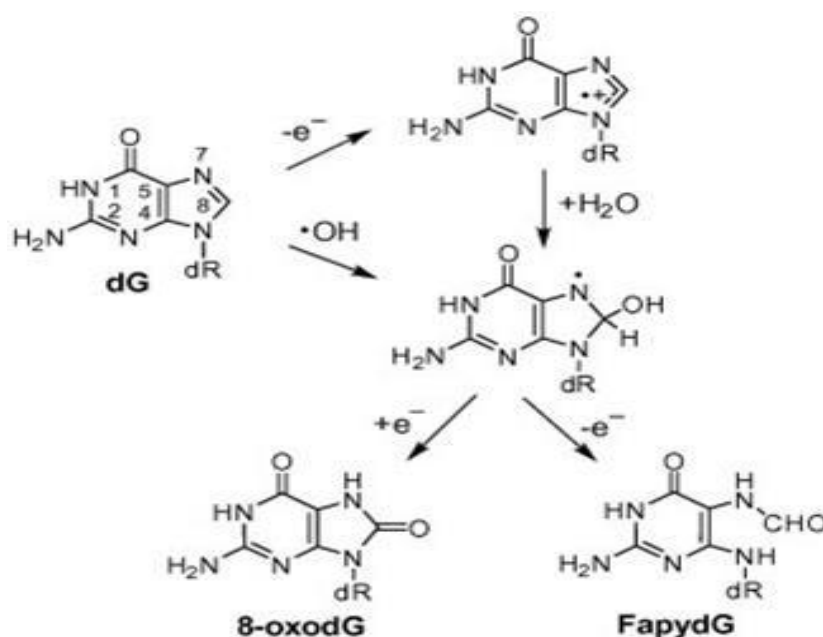


Οι ελεύθερες ρίζες στη συνέχεια αντιδρούν και δημιουργούνται πολλές διαφορετικές βλάβες. Το κυριότερο απ' τα δύο είναι το HO· και έχει μελετηθεί εκτενώς ως προς την επίδρασή του με τη βιολογική ύλη. (Buck et al., 2012; Le Caër, 2011)

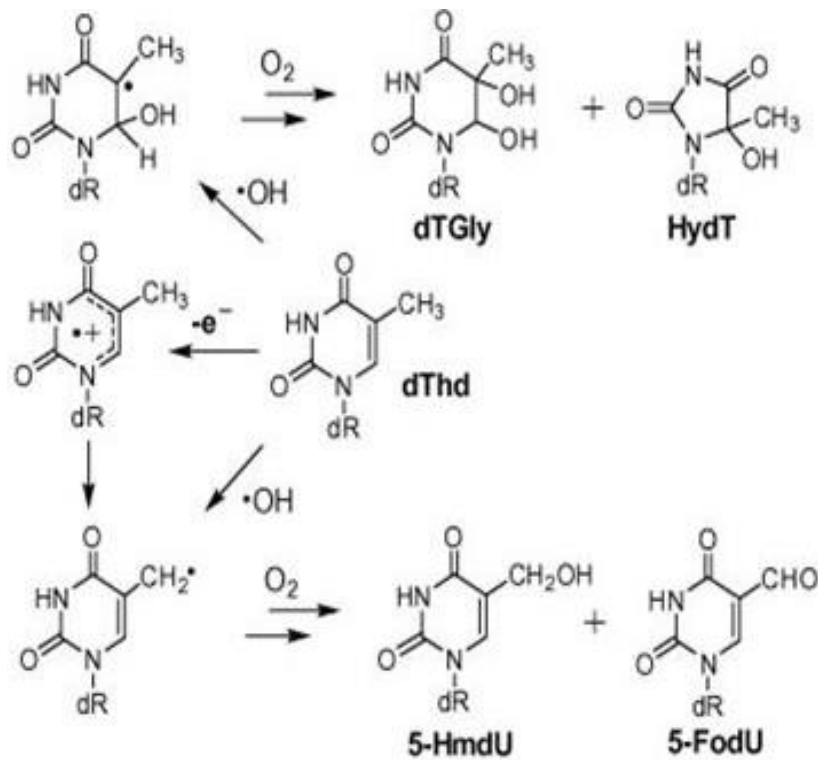
Μεμονωμένες βλάβες DNA

Λαμβάνοντας υπόψη τα συστατικά του DNA (φωσφορική ομάδα, δεοξυριβόζη, αζωτούχος βάση), τους παράγοντες που μπορεί να προκαλέσουν βλάβη (HO·, ιοντισμός, φάρμακα, κ.α.) και τις θέσεις στις οποίες μπορεί να προκληθεί η βλάβη, μπορεί να φτιαχτεί μία μεγάλη λίστα με τις μεμονωμένες αλλοιώσεις που εμφανίζονται στο DNA. Η σχετική ευπάθεια των περιοχών της βλάβης βρίσκεται πειραματικά ή μέσω προσομοίωσης και σχολιάζεται στην αξιολόγηση των βλαβών. Παρακάτω αναφέρονται ενδεικτικά, ορισμένες συχνά εμφανιζόμενες μεμονωμένες βλάβες.

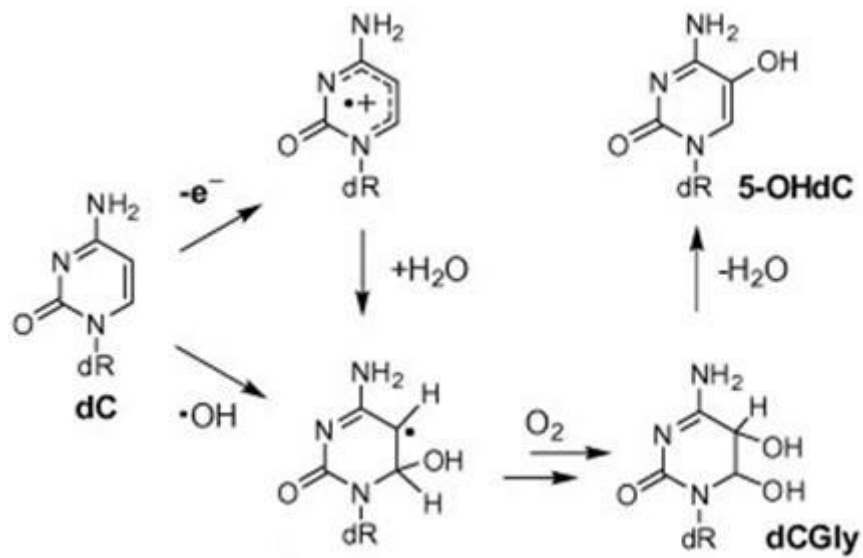
1. **Οξειδωμένες βάσεις:** Πρόκειται για αλλοιωμένες μορφές των αζωτούχων βάσεων. Στις **Εικόνες 14a – 14d** φαίνεται πώς από οξείδωση ενός ηλεκτρονίου και τη δράση του HO· προκύπτουν ορισμένες βλάβες στη Γουανίνη (dG2), τη Θυμίνη (dT), την Κυτοσίνη (dC) και την Αδενίνη (dA). Να σημειωθεί ότι το γράμμα d μπροστά από τις αζωτούχες βάσεις δηλώνει ότι είναι ενωμένες με δεοξυριβόζη (Cadet and Wagner, 2014; Spothem-Maurizot and Davidková, 2011; Terzidis et al., 2015).



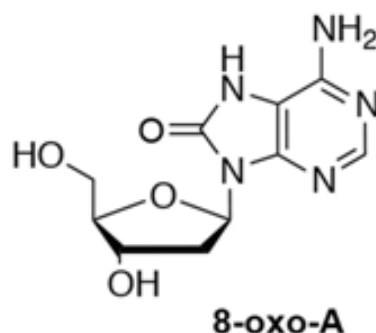
Εικόνα 14a: Μονοπάτια οξείδωσης της Γουανίνης. Κάποιες υποβαθμισμένες μορφές που παρατηρούνται για τη Γουανίνη είναι οι 8-oxodG, 8-oxodGuo, 8-oxodGua, FapyGua και FapydG.



Εικόνα 14β: Μονοπάτια οξείδωσης της Θυμίνης. Κάποιες υποβαθμισμένες μορφές που παρατηρούνται για τη Θυμίνη είναι οι dTGly, Tg, HmdU, 5-FodU, 5'R-HydT και 5'S-HydT.



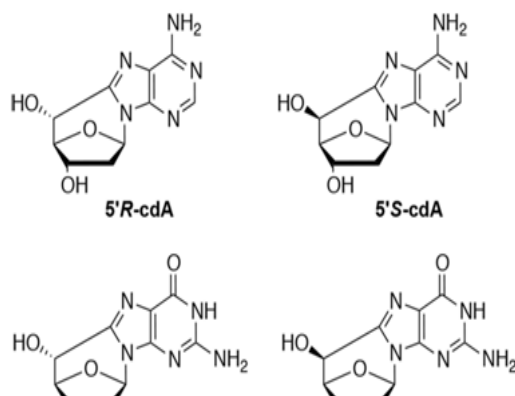
Εικόνα 14γ: Μονοπάτια οξείδωσης της Κυτοσίνης. Κάποιες υποβαθμισμένες μορφές που παρατηρούνται για την Κυτοσίνη 5-OHdC, dUGly, ImidC, 5'R-HydU και 5'S-HydU.



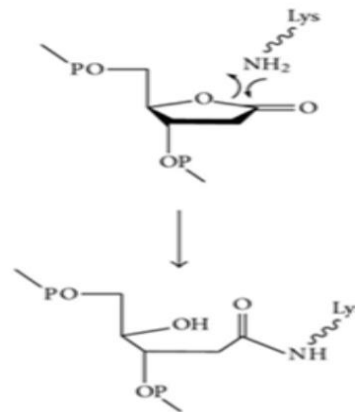
Εικόνα 14δ: Οξείδωση της Αδερίνης. Η βασική υποβαθμισμένη μορφή που παρατηρείται για την Αδερίνη είναι η 8-oxodA.

2. **Άλλες οξειδωτικές βλάβες:** Εκτός από τις αζωτούχες βάσεις, οξείδωση μπορεί να υποστεί και η δεοξυριβόζη. Αυτές οι βλάβες αποτελούν το 1/4 των βλαβών που παθαίνει το DNA από οξειδωτικούς παράγοντες. Τέτοιες οξειδώσεις μπορούν να αποτελέσουν το πρώτο βήμα στα περισσότερα μονοπάτια που οδηγούν σε βλάβες, όπως αυτές που παρουσιάζονται στη συνέχεια. Στις οξειδωτικές βλάβες περιλαμβάνονται ακόμη η dL και η C4-AP, οι οποίες προκύπτουν μετά από οξείδωση του άνθρακα C1' και C4' της ριβόζης αντίστοιχα. Η dL παρουσιάζεται στην **Εικόνα 15** (Giglia-Mari et al., 2011; Quiñones and Demple, 2016).

3. **Κυκλοπυρίνες:** Από τις κυριότερες βλάβες του HO είναι οι τέσσερις δομές των κυκλοπυρινών: 5'R-cdG, 5'S-cdG, 5'R-cdA, 5'S-cdA. Εμφανίζονται με το σχηματισμό ομοιοπολικού δεσμού ανάμεσα στον άνθρακα C8 της πουρίνης και τον άνθρακα C5 της δεοξυριβόζης (**Εικόνα 16**). Με την πάροδο του χρόνου αυτές συσσωρεύονται όντας μία από τις συνέπειες της γήρανσης. Συσσωρεύονται με διαφορετική ταχύτητα σε κάθε ιστό. Μελέτη της ομάδας των Terzidis et al., 2015 έδειξε ότι συσσωρεύονται ταχύτερα στο ήπαρ και λιγότερο στον εγκέφαλο.



Εικόνα 15: Οξείδωση της Δεοξυριβόζης και παραγωγή της βλάβης dL (Quiñones & Demple, 2016).



Εικόνα 16: Δομή Κυκλοπουρίνων.

- Αβασικές περιοχές:** Αν ο δεσμός ανάμεσα στη δεοξυριβόζη και την αζωτούχο βάση διαταραχτεί μπορεί είτε η τελευταία να αποδεσμευτεί άμεσα από το νουκλεοτίδιο μένοντας η περιοχή χωρίς βάση, είτε να περάσει από ένα ενδιάμεσο χημικά ασταθές στάδιο πριν τελικώς αποδεσμευτεί. Αυτές οι περιοχές λέγονται απουρινικές/ απυριμιδινικές ή γενικότερα αβασικές περιοχές.
- Μονόκλωνες θραύσεις (Single Strand Breaks – SSB):** Στην περίπτωση που η βλάβη συμβεί σε άνθρακα της δεοξυριβόζης είναι πιθανό να σπάσει ο δεσμός ανάμεσα σε διαδοχικά νουκλεοτίδια και να γίνει έτσι θραύση στον κλώνο του DNA. Προκύπτουν συνήθως από απαγωγή υδρογόνου σε κάποιον από τους άνθρακες C3', C4' και C5' του σακχάρου (Terzidis et al., 2015).

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

Οι περιοχές συσσωρευμένων/ομαδοποιημένων βλαβών (ή clusters), προκύπτουν όταν σε μία μικρή περιοχή μαζεύονται πάνω από μία βλάβες. Πιο συγκεκριμένα ως δίκλωνες θραύσεις του DNA ορίζονται ένα σύμπλεγμα θραύσεων μονής αλυσίδας, με τουλάχιστον ένα σπάσιμο και στις δύο απέναντι αλυσίδες, σε πολύ κοντινή απόσταση. Αυτό συμβαίνει όταν η πηγή της βλάβης δεν πλήττει το DNA ομοιογενώς, όπως το οξειδωτικό στρες από τον μεταβολισμό, αλλά με τρόπο ανομοιογενή, όπως στην περίπτωση των ιοντιζουσών ακτινοβολιών.

Η γραμμική εναπόθεση ενέργειας (LET) σχετίζεται άμεσα με τη δημιουργία συσσωρευμένων βλαβών καθώς η αύξηση της LET είναι ανάλογη της πιθανότητας εμφάνισης πολύπλοκων βλαβών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της συσχέτισης είναι φωτόνια με μεγάλη ενέργεια και σωματιδιακή ακτινοβολία που μεταφέροντας μεγάλη ενέργεια, είναι υπεύθυνα για την εκδήλωση πολλαπλών ιοντισμών τοπικά, με

τα δευτερεύοντα ηλεκτρόνια που παράγονται να είναι πολύ επικίνδυνα στο περιβάλλον που εκπέμπονται (Kinner et al., 2008).

Η δράση των μηχανισμών επιδιόρθωσης του κυττάρου έναντι των πολύπλοκων αυτών βλαβών μειώνεται μη γραμμικά, με συνέπεια τη δυσκολία επιβίωσής του. Οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί του κυττάρου είναι σχεδιασμένοι ώστε να αποτρέπουν τις μεμονωμένες βλάβες, όταν όμως συσσωρεύονται, η περιοχή της βλάβης αλλάζει δομή και χημεία πολλαπλώς, με αποτέλεσμα οι μηχανισμοί αυτοί να μην είναι πλέον αποτελεσματικοί, τόσο στην προσδεσιμότητα στην περιοχή όσο και στη λειτουργία τους, και ορισμένες φορές δε μπορούν να προχωρήσουν σε επιδιόρθωση.

Επιπροσθέτως, μετά από μερικά χημικά βήματα οι συσσωρευμένες βλάβες μπορεί να οδηγήσουν σε πιο επιβλαβή για το γονιδίωμα βλάβη, τη δίκλωνη θραύση. Οι δίκλωνες θραύσεις προκύπτουν στην απλούστερη περίπτωση όταν δύο μονόκλωνες θραύσεις βρεθούν στους δύο απέναντι κλώνους και σε απόσταση μικρότερη από τρία ζεύγη βάσεων. Δεδομένου όμως ότι αυτή η περίπτωση πρόκλησης δίκλωνης θραύσης είναι πρακτικώς αμελητέα, η συνηθέστερη αιτία πρόκλησής της είναι οι πολύπλοκες βλάβες. Οι δίκλωνες θραύσεις προκύπτουν, κυρίως, από την ιοντίζουσα ακτινοβολία και κάποια ραδιομιμητικά φάρμακα, όπως η Σισπλατίνη και η Μπλεομυκίνη (Dumont and Monari, 2015).

Οι δίκλωνες θραύσεις συνδέονται άμεσα με τη γήρανση (aging) και τον γηρασμό (senescence) των κυττάρων. Ο γηρασμός, όντας μορφή αναστολής του κυτταρικού κύκλου καθίσταται μη αναστρέψιμη διαδικασία και όταν συμβεί, το κύτταρο επιβιώνει αλλά δεν πολλαπλασιάζεται πλέον. Η κυτταρική γήρανση αλλοιώνει την κυτταρική λειτουργία προκαλώντας γονιδιακή αστάθεια, γηρασμό, απόπτωση και κάποιες μορφές καρκίνων. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι θεραπείες που προκαλούν DSBs, έχουν ως συνέπεια κυτταρική γήρανση. Η επιδιόρθωση γίνεται πιο αργή και λιγότερο αποτελεσματική όσο η γήρανση προχωρά, γιατί μειώνονται τα επίπεδα των επιδιορθωτικών πρωτεϊνών. Παράλληλα παρατηρείται μείωση της ετεροχρωματίνης και εξομάλυνση των μεταγραφικά ενεργών περιοχών, ενώ οι μεταλλάξεις που προκαλούνται φυσικά δε φαίνεται να επηρεάζουν σημαντικά τη γήρανση. Η γήρανση και ο γηρασμός, εκτός από εξωτερικούς παράγοντες, επηρεάζονται, όπως υποδηλώνει το όνομά τους από την ηλικία (Gorbunova and Seluanov, 2016; Siddiqui et al., 2015).

1.5.2.3 Μη στοχευόμενη επίδραση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας

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

- Φαινόμενο του παρατυχόντος (Bystander Effect)
- Παρεμπύπτον φαινόμενο (abscopal effect)
- Γονιδιακή αστάθεια

- Προσαρμοστική απόκριση στην ακτινοβολία (Radiation Induced Adaptive Response – RIAR)
- Υπερευαισθησία σε χαμηλές δόσεις ακτινοβολίας
- Ενεργοποίηση γονιδίων από ακτινοβολία

Φαινόμενο του παρατυχόντος (Bystander Effect): Πρόκειται για επιδράσεις της ακτινοβολίας σε κύτταρα τα οποία δεν έχει διαπεράσει και συνεπώς αλληλεπιδράσει με αυτά. Τέτοια φαινόμενα ονομάστηκαν “επαγόμενα από την ακτινοβολία φαινόμενα του παρατυχόντος” – “radiation-induced bystander effects” (RIBE) (Blyth and Sykes, 2011).

Μελέτες έχουν δείξει ότι κύτταρα που περιβάλουν την ακτινοβοληθείσα περιοχή εμφανίζουν χρωμοσωματικές αλλοιώσεις, ανταλλαγές γενετικού υλικού μεταξύ των αδελφών χρωματίδων, γονιδιωματική αστάθεια, επαγωγή απόπτωσης, αλλαγές στη μεταγωγή σήματος, προσαρμογή στην ακτινοβολία, παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου και δημιουργία νεοπλασιών (Chai and Hei, 2008; Hei, 2006). Οι επιβλαβείς δράσεις και οι παράπλευρες βλάβες της ακτινοβολίας φαίνεται να γίνονται εντονότερες καθώς έχει παρατηρηθεί ότι συνδέονται και με τη μακροπρόθεσμη επαγωγή καρκίνου (Hall and Hei, 2003). Παρόλα αυτά, πληθώρα μελετών αποδίδουν στο φαινόμενο του παρατυχόντος και ευεργετικές συνέπειες όπως την ενίσχυση της ακτινοανθεκτικότητας ή την αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Little, 2006). Παρά τα έως σήμερα πειραματικά δεδομένα ως προς το φαινόμενο του παρατυχόντος, η έννοιά του παραμένει ασαφής. Ορισμένες μελέτες, προσπαθώντας να κατανοήσουν σε βάθος τη φύση του φαινομένου αυτού, χρησιμοποίησαν ποικίλα βιολογικά σημεία ελέγχου μετά την ακτινοβολή και διαπίστωσαν ότι δεν υπάρχουν στοιχεία που οδηγούν στο εν λόγω φαινόμενο (Terzoudi et al., 2010).

Πρόσφατες *in vitro* μελέτες κατέδειξαν δύο κύριους μηχανισμούς μετάδοσης σήματος από τα ακτινοβολημένα κύτταρα στα μη (Merrifield and Kovalchuk, 2013). Ο ένας είναι η διακυτταρική επικοινωνία μέσω των χασμοσυνδέσμων, η οποία εξασφαλίζεται από την ικανότητα των χασμοσυνδέσμων να μεταφέρουν σήματα από το ένα κύτταρο στο άλλο, ενώ στον δεύτερο μεταφέρονται παράγοντες μικρού μοριακού βάρους που έχουν εκκριθεί από τα ακτινοβολημένα κύτταρα. Τέτοιες ουσίες μπορεί να είναι ROS, κυτταροκίνες, ιόντα ασβεστίου, μικρά τμήματα RNA και άλλα. Οι ουσίες αυτές προσλαμβάνονται από τα μη ακτινοβολημένα κύτταρα ενεργοποιώντας τις αντίστοιχες αντιδράσεις (Merrifield and Kovalchuk, 2013; Sedelnikova et al., 2010; Temme and Bauer, 2013). Πιο αναλυτικά (Desouky et al., 2015):

- η μετάδοση μικρής εμβέλειας που ονομάζεται Διακυτταρική Επικοινωνία με Διάστακτη Διασταύρωση (Gap Junctional Intercellular Communication-GJIC), εξαρτάται άμεσα από την ικανότητα του κυττάρου να μεταφέρει το σήμα μέσω της επαφής γειτονικών κυττάρων

- η μετάδοση μεγάλης εμβέλειας που ονομάζεται Διακυτταρική Επικοινωνία με Απομακρυσμένη Κυτταρική Σηματοδότηση (Distant cell Signaling Intercellular Communication – DSIC), περιλαμβάνει τις παρεμπίπτουσες συνέπειες και την απόκριση απομακρυσμένου ιστού στην ακτινοβολία. Στο φαινόμενο αυτό, σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν τα μικρά μόρια (ROS/RNS, ορμόνες, κυτταροκίνες, χημειοκίνες, οξειδωτικά ένζυμα και άλλοι δείκτες απόκρισης σε φλεγμονή). Οι παρεμπίπτουσες συνέπειες εκτείνονται περί τα 5 mm ενώ η απόκριση απομακρυσμένου ιστού μπορεί να ξεπεράσει την κλίμακα των εκατοστών. Στο φαινόμενο αυτό, οι ROS συνεισφέρουν στο φαινόμενο τόσο εξωκυτταρικά όσο και ενδοκυτταρικά μέσω συνεχών φαινομένων. Δεδομένου ότι οι περισσότερες ROS επιβιώνουν για μικρό χρονικό διάστημα, δρουν τοπικά. Ωστόσο το H₂O₂ έχει μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής και μικρό μέγεθος με αποτέλεσμα να εισχωρεί στην κυτταρική μεμβράνη και να πλήττει άλλα κύτταρα ή ιστούς, μακριά από τον εκτεθειμένο ιστό.

Έχει παρατηρηθεί ότι ακτινοβολίες υψηλής LET είναι πιθανότερο να προκαλέσουν GJIC, ενώ ακτινοβολίες χαμηλής LET πιθανότερα προκαλούν DSIC (Desouky et al., 2015; Nikitaki et al., 2016).

Η απόκριση στη χαμηλή δόση ακτινοβολίας δεν εξηγείται από την κλασική θεωρία της ακτινοβιολογίας, καθώς εμφανίζει ορισμένα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, όπως η προσαρμοστική απόκριση στην ακτινοβολία. Η προσαρμοστική απόκριση στην ακτινοβολία προκαλείται από χαμηλής δόσης και χαμηλής LET ακτινοβολία και μπορεί να προστατεύσει τα κύτταρα και ολόκληρο τον οργανισμό έναντι ενδογενών βλαβών ή βλαβών που μπορεί να προκαλέσει η επακόλουθη έκθεση στην ακτινοβολία. Αυτό το φαινόμενο εξαρτάται από τη δόση, το ρυθμό δόσης, το ρυθμό έκφρασης γονιδίων στο κύτταρο, τις συνθήκες καλλιέργειας και τη φάση του κυτταρικού κύκλου. Οι εν λόγω δόσεις είναι της τάξης των 0.01 - 0.5 Gy και οι ρυθμοί 0.01 ως 0.1 Gy/ min (Desouky et al., 2015).

Παρεμπίπτον φαινόμενο (abscopal effect): Κατά το φαινόμενο αυτό η ακτινοβολία κάποιου όγκου σε ένα όργανο, έχει ως αποτέλεσμα τη συρρίκνωση άλλου απομακρυσμένου όγκου, σε άλλο όργανο. Φαίνεται ότι οι μηχανισμοί που συμμετέχουν στο φαινόμενο αυτό είναι α) η συστημική έκκριση κυτταροκινών και β) η τοπική φλεγμονή που οδηγεί είτε σε φαινόμενο από απόσταση ή σε συστηματική ανοσολογική απόκριση έναντι των καρκινικών αντιγόνων που βρίσκονται στην περιοχή. Παράλληλα έχει δειχθεί ότι σε χαμηλές δόσεις (π.χ 0,5 Gy) ακτίνων –X ή –γ, το εν λόγω φαινόμενο επάγει αντιφλεγμονώδη δράση η οποία συμβάλει ανοσοκατασταλτικά σε χρόνιες φλεγμονώδεις νόσους (Frey et al., 2015; Large et al., 2015).

1.6 Ακτινοθεραπεία

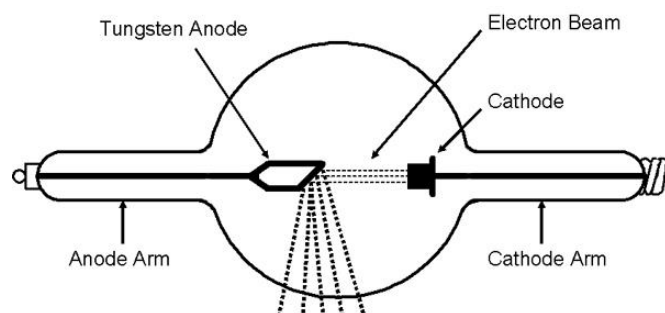
1.6.1 Εισαγωγή

Ακτινοθεραπεία είναι η κλινική ογκολογική ειδικότητα αντιμετώπισης καρκίνου με τη χρήση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Στόχος της ακτινοθεραπείας είναι η χορήγηση θεραπευτικής δόσης ακτινοβολίας, απόλυτα υπολογίσιμης και κατευθυνόμενης με μέγιστη δυνατή ακρίβεια σε συγκεκριμένο γεωμετρικό όγκο ιστών. Αρχή της είναι η χορήγηση υψηλής δόσης ακτινοβολίας στην κακοήθεια και ταυτόχρονα η προστασία των υγιών δομών που περιβάλλουν την ακτινοβοληθείσα περιοχή.

Η ακτινοθεραπεία εμφανίστηκε στο ιατρικό προσκήνιο κατά τα τέλη του 19ου αιώνα, με την απονομή τριών βραβείων Nobel για ανακαλύψεις που σχετίζονταν με την ιοντίζουσα ακτινοβολία. Τον Δεκέμβριο του 1895 ο Γερμανός μηχανολόγος μηχανικός και φυσικός Wilhelm Röntgen (1845-1923) ανακάλυψε τις ακτίνες-X. Λίγους μήνες αργότερα, τον Ιούνιο του 1896, ο Γάλλος φυσικός Antoine Henri Becquerel (1852-1908) ανακάλυψε τη φυσική ραδιενέργεια, δηλαδή την ιδιότητα που χαρακτηρίζει ορισμένα στοιχεία να εκπέμπουν αυθόρμητα ακτίνες ή υποατομικά σωματίδια από την ύλη. Ακολουθεί το βραβείο Nobel το 1898 που απονεμήθηκε στο ζεύγος της Πολωνογαλλίδας φυσικού και χημικού Marie Skłodowska-Curie (1867-1934) και του Γάλλου φυσικού Pierre Curie (1859-1906) που απομόνωσαν τα ραδιενεργά στοιχεία ράδιο και πολώνιο.

Οι τρεις αυτές θεμελιώδεις ανακαλύψεις άνοιξαν τον δρόμο για τις δύο βασικές τεχνικές ακτινοθεραπείας: την τηλεακτινοθεραπεία με χρήση μακράς απόστασης πηγής-ακτινοβολούμενης επιφάνειας (Source-Surface-Distance, SSD), η οποία αργότερα ονομάστηκε ακτινοθεραπεία εξωτερικής δέσμης (External-Beam RadioTherapy, EBRT), καθώς επίσης και τη βραχυθεραπεία, η οποία βασίστηκε σε μια βραχεία SSD, που αρχικά επιτυγχανόταν με ράδιο και αργότερα με ακτίνες -X 50 keV. Η πρώτη κλινική εφαρμογή της ακτινοβολίας για θεραπεία του καρκίνου τοποθετείται το 1896, σχεδόν 6 μήνες μετά την ανακάλυψη του Röntgen και επρόκειτο για ασθενείς που έπασχαν από γαστρικό καρκίνο και βασικοκυτταρικό καρκίνωμα.

Οι επιβλαβείς συνέπειες της ακτινοβολίας έγιναν εμφανείς πολύ σύντομα, ελήφθησαν δε σοβαρά υπόψη για τη βελτιστοποίηση της θεραπευτικής αναλογίας, καθώς επίσης για την αναζήτηση μεθόδων ακτινοπροστασίας. Η δράση κατά του καρκίνου ενισχύθηκε το 1913, όταν και σχεδιάστηκαν



Εικόνα17: Διάταξη σωλήνα Coolidge.

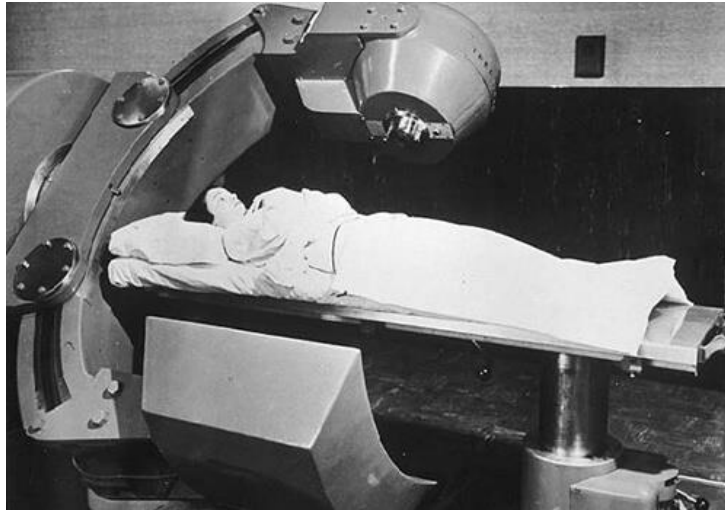
μεταποιημένοι σωλήνες ή βελόνες ραδίου, καθώς επίσης και σωλήνες Coolidge με απώτερο σκοπό τη χρησιμοποίηση της ακτινοθεραπείας σε επίπεδο ρουτίνας (**Εικόνα 17**). Σκοπός της ακτινοθεραπείας από άποψη φυσικής, ήταν η χορήγηση στον όγκο-στόχου όσο το δυνατόν πλησιέστερα προς το 100% της δόσης και σχεδόν μηδενική χορήγηση ακτινοβολίας στα παρακείμενα, υγιή όργανα. Όπως έγινε άμεσα αντιληπτό, η χορήγηση επαρκών δόσεων σε όγκους εντοπιζόμενους σε βαθύτερα σημεία του οργανισμού με 50 έως και 200 keV ήταν ανεπαρκής, κυρίως λόγω της αναπόφευκτης συνυπάρχουσας τοξικής επίδρασης στο δέρμα. Η θεραπεία του καρκίνου με ακτινοθεραπεία εξωτερικής δέσμης (EBRT) ήταν αδύναμη και περιοριζόταν σε μικρούς επιφανειακούς όγκους (δέρματος και φωνητικών χορδών) ή σε εγγενώς ακτινοευαίσθητους καρκίνους όπως το λέμφωμα Hodgkin ή το σεμίνωμα. Επιπροσθέτως η βραχυθεραπεία περιοριζόταν σε πιο «προσιτούς» όγκους όπως στον καρκίνο του κινητού μέρους της γλώσσας, του ορθού ή της μήτρας.

Το 1927 ο Γάλλος ιατρός και βιολόγος Claudius Regaud (1870-1940) και ο Γάλλος φυσικός R. Ferroux προχώρησαν στην ανακάλυψη του ρόλου της κλασματοποίησης για τη δημιουργία μιας ευνοϊκής διαφορικής επίδρασης μεταξύ των καρκινικών και των υγιών κυττάρων. Επτά χρόνια αργότερα, το 1934 ο Γάλλος πρωτοπόρος ιατρός ακτινοθεραπευτής και ογκολόγος Henri Coutard (1876-1950) πρότεινε ένα σχήμα κλασματοποίησης 200 Röntgen ανά κλάσμα, πέντε φορές την εβδομάδα, το οποίο μετασχηματίστηκε στο σύγχρονο πρότυπο σχήμα του κλάσματος των 2 Gy, που σχετικά πρόσφατα συνδυάστηκε καλά με το μοντέλο α/β για να περιγράψει τη βιολογική του επίδραση. Το μοντέλο αυτό προκύπτει από το δείκτη επιβίωσης των κυττάρων S από την ακτινοβολία, δηλαδή το βιολογικό αποτέλεσμα:

$$S = e^{-\alpha D - \beta D^2} ,$$

με α , β είναι κλινικές παράμετροι που εξαρτώνται από την ακτινοβολία και τα κύτταρα που ακτινοβολούνται.

Έπειτα από αρκετές μελέτες, το κοβάλτιο Co^{60} υιοθετήθηκε ως μια εναλλακτική πηγή ακτίνων γ υψηλής ενέργειας για τηλεακτινοθεραπεία, με υψηλότερες δόσεις από αυτές που μπορούσαν να εφαρμοστούν με το ράδιο. Η πρώτη μονάδα τηλεκοβαλτίου εγκαταστάθηκε το 1948 στο Hamilton του Καναδά (**Εικόνα 18**).



Εικόνα 18: Το 1951 θεραπεύτηκε ο πρώτος ασθενής με ακτινοβολία Co^{60} στον Καναδά.

Τις δεκαετίες του 1950 και 1960 εισήχθησαν στην ακτινοθεραπεία θεραπευτικά μηχανήματα υψηλής ενέργειας (megavoltage), που μετέπειτα ονομάστηκαν γραμμικοί επιταχυντές ή Linacs (linear accelerators). Οι γραμμικοί επιταχυντές είχαν τη δυνατότητα να παράγουν υψηλή ενέργεια, βαθέως εισδύουσες δέσμες, επιτρέποντας για πρώτη φορά τη θεραπεία όγκων εντοπιζόμενων βαθιά μέσα στο σώμα, χωρίς υψηλή δΟΣΟΛΗΨΙΑ των υγιών ιστών που περιέβαλαν τον ακτινοβοληθέντα όγκο και την καταστροφή του υπερκείμενου δέρματος.

Οι επόμενες δυο δεκαετίες, φέρουν την έλευση νέων απεικονιστικών τεχνολογιών, συμπεριλαμβανομένης της απεικόνισης μαγνητικού συντονισμού (MRI), καθώς επίσης και της τομογραφίας εκπομπής ποζιτρονίων (PET). Το γεγονός αυτό προώθησε την ακτινοθεραπεία από την 3-D συμπαγή (conformal) ακτινοθεραπεία στην ακτινοθεραπεία διαμορφωμένης έντασης (intensity-modulated radiation therapy, IMRT), καθώς επίσης και στην ακτινοθεραπεία με κατεύθυνση εικόνας (image guided radiation therapy, IGRT). Πιο συγκεκριμένα IMRT χρησιμοποιεί δέσμες ακτινοβολίας με διαφορετικές εντάσεις για τη χορήγηση διαφορετικών δόσεων ακτινοβολίας την ίδια στιγμή. Η τεχνολογία αυτή επιτρέπει τη χορήγηση υψηλότερων δόσεων ακτινοβολίας μέσα στον όγκο και χαμηλότερων δόσεων στους παρακείμενους υγιείς ιστούς. Η IGRT χρησιμοποιείται σε περιοχές του σώματος που είναι επιρρεπείς σε κινήσεις. Δεδομένου ότι οι όγκοι μπορούν στην πραγματικότητα να μετακινούνται μεταξύ των θεραπειών, η σχετική τεχνολογία επιτρέπει στον ακτινοθεραπευτή-ογκολόγο να απεικονίζει τον όγκο αμέσως πριν και κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Οι τεχνολογίες αυτές είναι ευρέως διαδεδομένες έως σήμερα και επιδέχονται συνεχώς βελτιστοποιήσεις με σκοπό την μέγιστη δυνατή εναπόθεση ενέργειας στον εντοπισμένο όγκο και την ελάχιστη δυνατή τοξικότητα στους γειτονικούς φυσιολογικούς ιστούς.

Σήμερα, η ισχύς της EBRT με ακτινοβολία φωτονίων (X ή γ) έχει αυξηθεί με ενέργειες έως και 35 MeV. Εκτός από τις πηγές κοβαλτίου, που ήταν για χρόνια το κύριο “όπλο”

της ακτινοθεραπείας, πλέον χρησιμοποιούνται επιταχυντές και ραδιενεργές πηγές όπως το ράδιο Ra^{226} , το καίσιο Cs^{137} , ο χρυσός Au^{198} , το ιρίδιο Ir^{192} , το ιώδιο I^{125} .

Σκοπός της ακτινοθεραπείας είναι:

1. η ριζική θεραπευτική αντιμετώπιση μιας κακοήθειας,
2. η ενίσχυση του θεραπευτικού αποτελέσματος της χειρουργικής θεραπείας και τέλος
3. η ανακούφιση του ασθενούς από ενοχλητικά συμπτώματα που οφείλονται στην κακοήθεια.

Συνεπώς, ανάλογα τον σκοπό της η ακτινοθεραπεία μπορεί να διακριθεί στις κάτωθι κατηγορίες.

Θεραπευτική ή ριζική: Σε πολλές περιπτώσεις η ακτινοθεραπεία λαμβάνει το κύριο θεραπευτικό βάρος στους ανεγχείρητους συμπαγείς όγκους είτε λόγω προχωρημένου σταδίου είτε λόγω ιατρικών αντενδείξεων π.χ. καρδιακή ανεπάρκεια. Οι δόσεις που απαιτούνται είναι υψηλές υπό την προϋπόθεση ότι το επιτρέπει η φυσική κατάσταση του ασθενούς.

Επικουρική: Θεωρείται εκείνη που υποβοηθά το θεραπευτικό αποτέλεσμα της χειρουργικής θεραπείας, μειώνοντας σημαντικά τη πιθανότητα υποτροπής. Εφαρμόζεται επί ενδείξεων που προκύπτουν από τα παθολογοανατομικά ευρήματα.

Συμπληρωματική: Είναι το ίδιο σημαντική με την χειρουργική επέμβαση ως προς το θεραπευτικό αποτέλεσμα. Εφαρμόζεται στις περιπτώσεις ατελούς εξαιρέσεως του όγκου. Πρέπει να τονιστεί ότι όταν η ακτινοθεραπεία συνδυάζεται με τη χειρουργική, δεν θα πρέπει να είναι και οι δύο ριζικές διότι επισείουν σοβαρές επιπλοκές.

Ανακουφιστική: Σκοπός της είναι η άρση των ενοχλητικών συμπτωμάτων όπως π.χ. της μητρορραγίας, της αιμόπτυσης, του μεταστατικού οστικού άλγους, της δυσκαταποσίας λόγω στενώσεως του οισοφάγου, δύσπνοια λόγω στενώσεως ή αποφράξεως βρόγχου. Εφαρμόζεται ακόμα και αν το προσδόκιμο επιβίωσης είναι μικρό διότι εκτός από την ανακούφιση στοχεύει και στην επίτευξη μακράς ασυμπτωματικής περιόδου και στη βελτίωση της ποιότητας ζωής. (I.P. Κουβάρης, 2007)

1.6.2 Εφαρμογές Ακτινοθεραπείας

Όπως προαναφέρθηκε, η ακτινοβολία φωτονίων (γ ή X) είναι οι κύριοι εκπρόσωποι των ακτινοβολιών που βρίσκουν ιατρική εφαρμογή, ιδιαίτερα στην αντιμετώπιση του καρκίνου. Παρόλα αυτά, τα τελευταία χρόνια έχουν αναδειχθεί νέες μέθοδοι ακτινοβολιών που εκδηλώνουν σημαντική συνεισφορά στην καταπολέμηση

κακοηθειών και νεοπλασμάτων τόσο σε πειραματικό όσο και σε κλινικό επίπεδο. Πιο συγκεκριμένα:

γ – knife

Η ραδιοχειρουργική γ-knife χρησιμοποιείται για τη θεραπεία μεταστατικών όγκων του εγκεφάλου, ακουστικού νευρώματος, μηνιγγιωμάτων, εγκεφαλικών αρτηριακών δυσπλασιών και άλλων ενδοκρανιακών νόσων. Το 1968 ο Σουηδός νευροχειρουργός Lars Leksell (1907-1986), όντας ο πρωτοπόρος στην εφαρμογή στερεοτακτικών μεθόδων χειρουργικής με χρήση στερεοτακτικής στεφάνης, έθεσε σε λειτουργία το πρώτο γ-knife στη Σουηδία. Η ακτινοβολία προέρχεται από 190 πηγές κοβαλτίου Co^{60} που φορτώνονται στη μονάδα του γ-knife. Χιλιάδες ακτίνες ακτινοβολίας μπορούν να παραχθούν από αυτές τις πηγές, με απόκλιση κατώτερη του 0.5 του χιλιοστού. Δεδομένου ότι κάθε ακτίνα μεμονωμένα έχει μικρή ισχύ για να βλάψει το φυσιολογικό ιστό που διαπερνά στο δρόμο της προς το στόχο, όταν οι ακτίνες συναθροιστούν στην περιοχή του όγκου, αναπτύσσεται υψηλή δόση ακτινοβολίας, επαρκής για τον θεραπεύσει (Kano et al., 2011). Μετακινώντας την κεφαλή του ασθενούς σε σχέση με το ισόκεντρο της δέσμης, η δόση της ακτινοβολίας μπορεί να βελτιστοποιείται ανάλογα με τη μορφή και το μέγεθος του στόχου.

Οι αρχές του γ-knife διατυπώθηκαν από τον Σουηδό Νευροχειρουργό Lars Leksell, κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1950, και βασίζονταν στη δημιουργία μίας πολλαπλής πηγής εκπομπής ακτίνων-γ, που θα είναι σε θέση να επικεντρωθεί με μεγάλη ακρίβεια σε έναν ενδοκρανιακό στόχο και έτσι να αντικαταστήσει σε ορισμένες περιπτώσεις την ανοικτή χειρουργική επέμβαση. Το 1967 λειτούργησε η πρώτη μονάδα γ-knife στο Νοσοκομείο Karolinska, στη Στοκχόλμη. Η χειρουργική με το γ-knife αποτελεί μια εναλλακτική μορφή θεραπείας έναντι της ανοιχτής χειρουργικής κρανιοτομίας. Είναι μια μη επεμβατική μέθοδος, εφαρμόζεται με τοπική αναισθησία ως θεραπεία μιας ημέρας και είναι πάρα πολύ καλά ανεκτή. Με τη μέθοδο αυτή, χορηγείται υψηλή δόση ακτινοβολίας, με πολύ μεγάλη ακρίβεια, σε μικρούς ενδοκρανιακούς στόχους (όγκους ή εστιακές βλάβες), σε μια συνεδρία, αφήνοντας άθικτο τον περιβάλλοντα ιστό. Δεν απαιτείται χρόνος ανάρρωσης, πολύ σημαντικός παράγοντας για τους ασθενείς, που επιστρέφουν στις καθημερινές συνήθειες και δραστηριότητες τους την επόμενη ημέρα της θεραπείας. Επίσης, είναι η ιδανική θεραπεία για παιδιατρικούς όγκους, επειδή η δόση στον υγιή εγκεφαλικό ιστό είναι ελάχιστη. Οι επιπλοκές είναι ελάχιστες, αλλά ασήμαντες συγκρινόμενες με αυτές της ανοικτής νευροχειρουργικής. Η ακτινοχειρουργική με γ-knife προσφέρει ένα μεγάλο πλεονέκτημα στη χειρουργική του εγκεφάλου αλλάζοντας το τοπίο στο πεδίο της νευροχειρουργικής. Όπως είναι γνωστό, υπάρχουν βλάβες σε περιοχές του εγκεφάλου, όπου η χειρουργική θεραπευτική αντιμετώπιση σχετίζεται με σημαντική νοσηρότητα και θνητότητα, που οφείλεται σε διάφορους παράγοντες, όπως το βάθος και η εξαιρεσιμότητα της βλάβης καθώς και η σχετική της θέση με αρτηρίες, νεύρα ή άλλα ζωτικά εγκεφαλικά κέντρα. Η θεραπεία με γ-knife δεν αφαιρεί το στόχο, αλλά

καταστρέφει το DNA των κυττάρων του όγκου-στόχου, τα οποία χάνουν την ικανότητα αναπαραγωγής, λύνονται και απομακρύνονται με τη βοήθεια του αμυντικού συστήματος. Στις αρτηριοφλεβώδεις δυσπλασίες, η ακτινοχειρουργική προκαλεί πάχυνση των τοιχωμάτων των αγγείων, τα οποία και αποφράσσονται. Το θεραπευτικό αποτέλεσμα για τους καλοήθεις όγκους και τις αγγειακές δυσπλασίες γίνεται εμφανές σε 6 -24 μήνες περίπου, ενώ για τους κακοήθεις και μεταστατικούς όγκους ακόμα και σε 2-3 μήνες. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρώτη θεραπευτική επιλογή αμιγώς ή σε συνδυασμό με άλλες θεραπευτικές τεχνικές (χειρουργική, ακτινοθεραπεία, εμβολισμό). Επίσης, έχει τη δυνατότητα ακτινοβολήσης περισσότερων του ενός στόχων κατά την ίδια εφαρμογή, χωρίς απώτερες επιπλοκές από ακτινοβολήση τμήματος ή όλου του εγκεφάλου. Μέσω της χρήσης υπολογιστικών προγραμμάτων που παρέχουν τη δυνατότητα τρισδιάστατου προγραμματισμού θεραπείας, βάσει απεικονιστικών εξετάσεων (μαγνητικών και αξονικών τομογραφιών ή αγγειογραφιών) και του υψηλού βαθμού ακινητοποίησης του ασθενούς, ο οποίος επιτυγχάνεται με τη χρήση στερεοτακτικής στεφάνης (καθήλωσή της στο κεφάλι του ασθενούς υπό τοπική αναισθησία), η θεραπεία ελαχιστοποιεί την ακτινοβολία που καταλήγει στον περιβάλλοντα υγιή ιστό του εγκεφάλου. Η ακρίβεια του γ-knife καθιστά εφικτή τη χορήγηση υψηλής δόσης ακτινοβολίας προς τον στόχο με ελάχιστο κίνδυνο να πληγούν υγιείς ιστοί σε μία και μόνο συνεδρία. Σήμερα έχουν αναπτυχθεί ανάλογες διατάξεις που βασίζονται στη χρήση ακτίνων X, όπως το X- knife και το Cyberknife (B.Σπυρόπουλος, 2015).

Ακτινοβολία π - μεσονίων

Τα μεσόνια είναι αδρόνια που αποτελούνται από ένα κουάρκ και ένα αντικουάρκ. Το πρώτο μεσόνιο που παρατηρήθηκε ήταν το π - μεσόνιο, το 1947. Ο Χιντέκι Γιουκάβα είχε προβλέψει την ύπαρξη των μεσονίων θεωρητικά το 1935 ενώ το 1949 τιμήθηκε με το Βραβείο Νόμπελ Φυσικής για την εργασία του αυτή. Η ακτινοθεραπεία με αρνητικά π-μεσόνια, είναι μια μορφή ακτινοθεραπείας στην οποία χρησιμοποιείται μια δέσμη υποατομικών σωματιδίων, που είναι γνωστά ως αρνητικά μεσόνια π ή πόνια, που εκπέμπεται από έναν γραμμικό επιταχυντή πρωτονίων. Όταν τα σωματίδια κατευθύνονται σε έναν όγκο, προκαλούν «έκρηξη» των ατομικών πυρήνων των κακοήθων κυττάρων με αποτέλεσμα να σκορπίζουν έντονα ραδιενεργά υποατομικά σωματίδια μέσω του όγκου. Η ακτινοθεραπεία με π-μεσόνια μπορεί να εφαρμοστεί με δόσεις μικρότερες των 22 Gy ενώ έχει παρατηρηθεί ότι έχει έως και 60 % μεγαλύτερη βιολογική δράση από τις συμβατικές τεχνικές της ακτινοβολίας X. Επιπροσθέτως, τα π-μεσόνια είναι αρκετά βραχύβια ($\sim 26 \times 10^{-7}$ sec), γεγονός το οποίο καταδεικνύει ότι προκαλούν βλάβες στο DNA «στο τέλος της ζωής τους».

Η συγκεκριμένη μέθοδος αντιμετώπισης του καρκίνου έχει δείξει θετικά αποτελέσματα σε τοπικά προχωρημένα νεοπλάσματα, ιδιαίτερα εκείνα του προστάτη, γλοιώματα και προχωρημένους καρκίνους της κεφαλής και του τραχήλου. Παρά τα αρκετά ενθαρρυντικά στοιχεία των έως τώρα κλινικών μελετών, η ακτινοθεραπεία πονίων

χρήζει περαιτέρω μελέτης καθώς παρά το ότι θεωρείται ακτινοβολία μέτριου LET, εμφανίζει υψηλά ποσοστά τοξικότητας. Το πρώτο κέντρο ακτινοθεραπείας με π - μεσόνια έκλεισε το 1983, έχοντας ακτινοβολήσει 200 ασθενείς, ενώ το Paul Scherer Institut στην Ελβετία έκλεισε το 1993 έχοντας ακτινοβολήσει 500 ασθενείς (Barker et al., 2019; Β.Σπυρόπουλος, 2015).

Ακτινοβολία νετρονίων

Ως γνωστόν τα νετρόνια έχουν ίδια μάζα με τα πρωτόνια, δεν έχουν φορτίο και παράγονται από επιτάχυνση ενός φορτισμένου σωματιδίου π.χ. πρωτονίου ή δευτερονίου και βομβαρδισμό στόχου από κατάλληλο υλικό όπως είναι το βηρύλλιο. Αυτά καλούνται νετρόνια παραγόμενα στα κυκλοτρόνια. Τα νετρόνια εκπέμπονται επίσης ως δευτερεύοντα, δηλαδή ως προϊόντα της διάσπασης του πυρήνα βαρέων ραδιενεργών ατόμων μέσα σε πυρηνικούς αντιδραστήρες. Είναι τα πρώτα από τα βαρέα σωματίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην ακτινοθεραπεία μεταξύ του 1938 και 1943, με πεδίο εφαρμογής τους υποξικούς ιστούς, είχαν όμως σοβαρές παρενέργειες. Έως σήμερα, τα μηχανήματα παραγωγής τους επιδέχθηκαν πληθώρα βελτιώσεων και θεωρούνται πλέον κατάλληλα για την ακτινοθεραπεία των ανεγχείρητων ή υποτροπιάζόντων όγκων των σιελογόνων αδένων, των ανεγχείρητων σαρκωμάτων των μαλακών μορίων, οστών και χόνδρων. Παρά την πρόοδο της μεθόδου αυτής, η εφαρμογή σε κλινικό επίπεδο χρήζει περαιτέρω μελέτης, ενώ οι ασθενείς που υπόκεινται σε θεραπείες με νετρόνια, μπαίνουν σε ερευνητικά πρωτόκολλα θεραπείας (I.P. Κουβάρης, 2007).

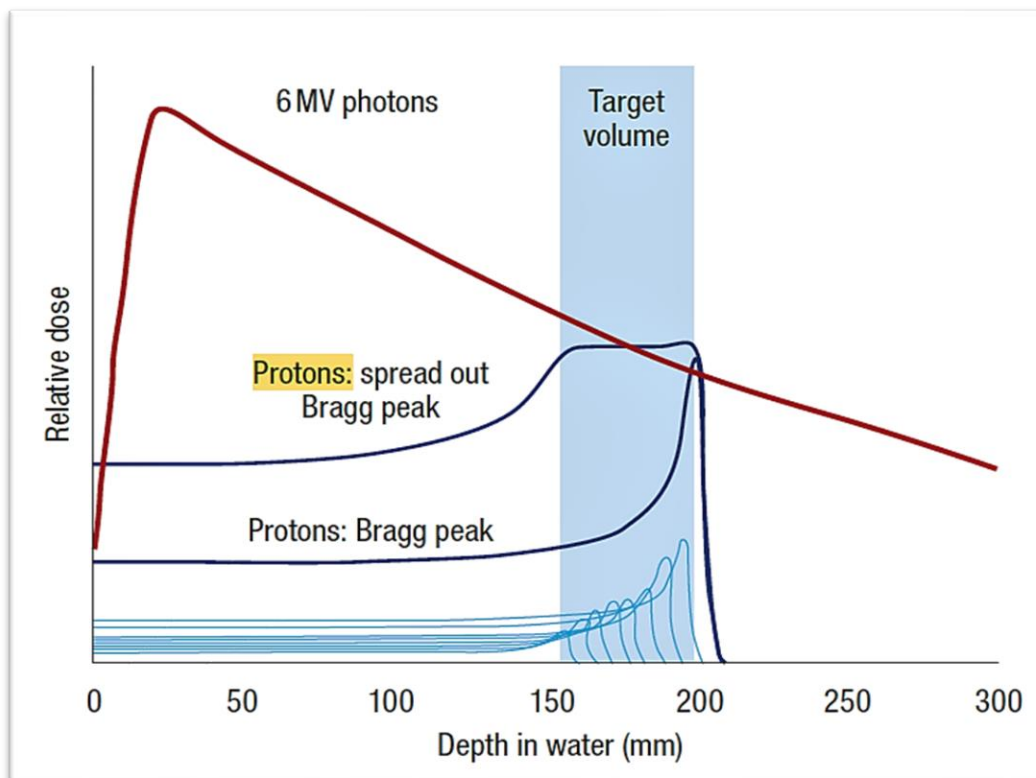
Ακτινοβολία πρωτονίων

Στη θεραπεία με δέσμη πρωτονίων, τα πρωτόνια επιταχύνονται με έναν μεγαλύτερο επιταχυντή που ονομάζεται κύκλοτρο. Στο κύκλοτρο τα πρωτόνια επιταχύνονται σε μεγάλες ενέργειες της τάξεως των 100 έως 300 MeV πριν κατευθυνθούν στο θάλαμο της θεραπείας. Οι δέσμες πρωτονίων διεισδύουν στον ιστό σε περιορισμένο βάθος, εναποθέτοντας την περισσότερη ενέργεια στο τέλος της διαδρομής τους, καθώς η ταχύτητα μειώνεται ώσπου να δώσουν όλη την ενέργεια. Αυτό σημαίνει ότι η δόση της ακτινοβολίας φτάνει σε μία κορυφή και πέφτει απότομα χωρίς να εναποθέτει ενέργεια σε ένα πεπερασμένο φάσμα. Αυτό είναι σε αντίθεση με τα φωτόνια τα οποία καθώς διεισδύουν τους ιστούς εναποθέτουν ενέργεια στους ιστούς ενόσω ταξιδεύουν μέχρι να διασχίσουν όλο το σώμα. Για να μεταφερθεί υψηλής δόσης συμβατική ακτινοβολία στον όγκο του όγκου, παρακάμπτοντας τους φυσιολογικούς ιστούς, πολλαπλές δέσμες πρωτονίων από ποικίλες γωνίες πρέπει να χρησιμοποιηθούν για να επικαλύψουν τον όγκο – στόχο. Για τα πρωτόνια η θέση μέγιστης εναπόθεσης ενέργειας ονομάζεται Bragg Peak (**Εικόνα 19**). Το πλάτος και το βάθος του Bragg peak είναι συνάρτηση της ενέργειας της δόσης και της σύνθεσης των ιστών του στοχευμένου όγκου. Δεδομένου ότι το Bragg Peak είναι αρκετά μικρότερο συγκριτικά με το μέγεθός το όγκου, για να

καλυφθεί ο εντοπιζόμενος όγκος σε βάθος χρειάζεται να επιτευχθεί η μέγιστη κορυφή Bragg Peak (spread out Bragg Peak) με δέσμες διαφορετικών ενεργειών.

Για την πιο αποτελεσματική και διακεκριμένη μεταφορά ενέργειας στον όγκο – στόχο με τη δέσμη πρωτονίων, χρησιμοποιείται η τεχνική “Pencil Beam Scanning” (PBC) ή “Spot Scanning”. Κατά την μέθοδο αυτή, η θεραπεία του όγκου γίνεται σε στρώματα. Πιο αναλυτικά, ολόκληρος ο όγκος του στόχου επικαλύπτεται με μία συγκεκριμένη ενέργεια δέσμης πρωτονίων πριν το επόμενο στρώμα σαρωθεί από μια διαφορετική ενεργειακή δέσμη μέχρι η χορηγηθείσα δόση να περιλαμβάνει την διαμήκη έκταση του όγκου – στόχου (Barker et al., 2019).

Η ακτινοβολία πρωτονίων βρίσκει άμεση εφαρμογή σε ασθενείς με όγκους που εντοπίζονται σε ζωτικά δοσοπεριοριστικά όργανα καθώς επίσης και σε περιπτώσεις όπου αντενδείκνυται η εγχείρηση, ενώ η ακτινοθεραπεία με φωτόνια επάγει τον κίνδυνο σοβαρών επιπλοκών. Παράλληλα η ακτινοβολήση με δέσμες πρωτονίων κρίνεται η μόνη κατάλληλη μη επεμβατική μέθοδος σε περιπτώσεις παρασπονδυλικών όγκων που είναι τεχνικά ανεγχείρητοι. Στις περιπτώσεις αυτές η συνολική δόση της ριζικής ακτινοθεραπείας φωτονίων περιορίζεται από τη γειτνίασή τους με το νωτιαίο μυελό.



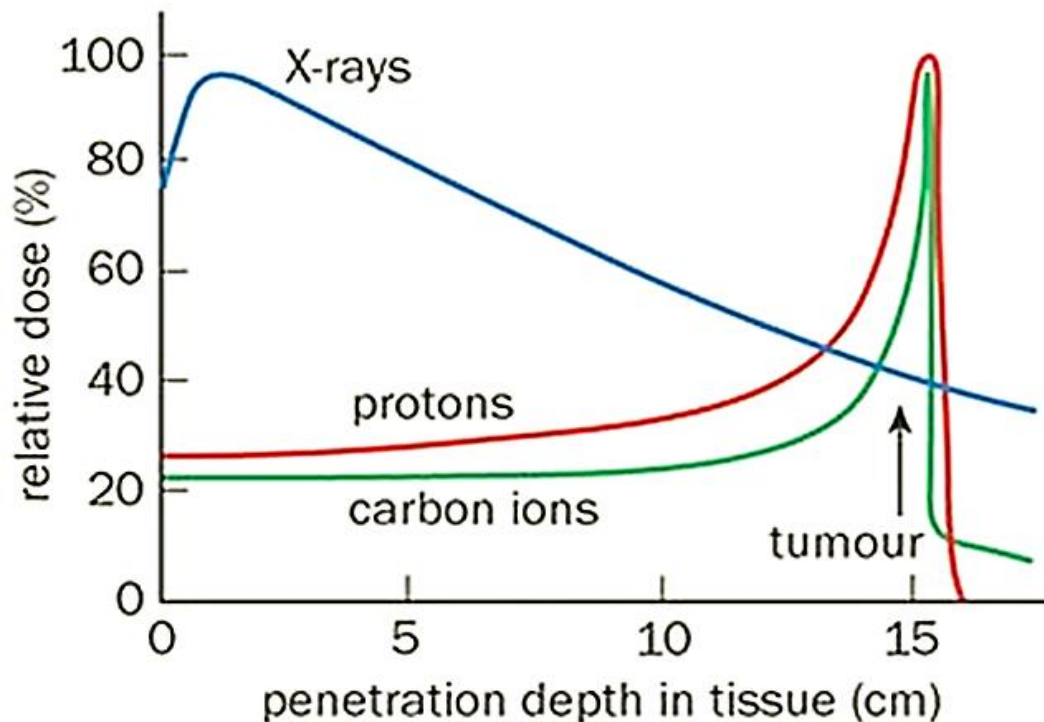
Εικόνα 19: Συγκριτική εικόνα εναποτιθέμενης δόσης μεταξύ ακτινοβολίας πρωτονίων και φωτονίων στο νερό. Πολλαπλές μονοενεργειακές δέσμες πρωτονίων σε διαφορετικές ενέργειες και με διαφορετικές εντάσεις συνδυάζονται για να καλύψουν ολόκληρο τον όγκο – στόχο με μία προκαθορισμένα δόση. Η ολική δόση (η συνολική ποσότητα ενέργειας που απορροφάται από τον ασθενή) που απαιτείται για τη χορήγηση της απαραίτητης δόσης στον όγκο - στόχο μπορεί να μειωθεί σημαντικά με τα πρωτόνια. Για

τη δέσμη φωτονίων υπάρχει σύντομη αρχική συσσώρευση δόσης η οποία παρέχει κάποια προστασία του δέρματος αλλά αυτό δεν παρατηρείται για δέσμες πρωτονίων.

Ακτινοβολία βαρέων ιόντων

Όπως έχει προαναφερθεί, η ακτινοβολήση με φορτισμένα σωματίδια φαίνεται να υπερέχει έναντι της συμβατικής μεθόδου με δέσμες φωτονίων (ακτίνων X ή γ) κυρίως λόγω της εναπόθεσης πυκνότερης δέσμης ιοντίζουσας ακτινοβολίας υψηλής ενέργειας στον εντοπιζόμενο όγκο, της σημαντικά μικρότερης δόσης που λαμβάνουν οι περιβαλλόμενοι υγείς ιστοί καθώς επίσης και του χαμηλότερου ποσοστού τοξικότητας που προκαλείται στους ιστούς αυτούς. Μέχρι πριν μερικά χρόνια η ανάπτυξη νέων κέντρων σωματιδιακής ακτινοθεραπείας είχε ως κύριο εκπρόσωπο τα πρωτόνια, όμως τις τελευταίες δεκαετίες αναπτύσσονται κέντρα ακτινοθεραπείας με βαρέα ιόντα και συγκεκριμένα ιόντα άνθρακα $^{12}\text{C}^{+6}$ (Εικόνα 20). Από τα πρώτα κέντρα ακτινοθεραπείας με ιόντα άνθρακα $^{12}\text{C}^{+6}$ είναι το Εθνικό Ινστιτούτο Ραδιολογικών Επιστημών το οποίο εδρεύει από το 1994 στην Τσίμπα της Ιαπωνίας (National Institute of Radiobiological Sciences, NIRS), ενώ έως το 2015 έχουν κατασκευαστεί δύο στην Ευρώπη και έξι στην Ασία.

Έχει παρατηρηθεί ότι η τεχνική αυτή παρέχει καλύτερη φυσική κατανομή της δόσης επειδή η πλευρική σκέδαση είναι μικρότερη και φέρει υψηλότερη σχετική βιολογική



Εικόνα 20: Συγκριτικό γράφημα της σχετικής ποσοστιαίας δόσης ως προς το βάθος διείσδυσης στον ακτινοβοληθέντα ιστό, μεταξύ ακτινοβολίας φωτονίων, πρωτονίων και ιόντων άνθρακα.

αποτελεσματικότητα και χαμηλότερη αναλογία ενίσχυσης οξυγόνου. Τα χαρακτηριστικά αυτά της δέσμης ιόντων άνθρακα είναι άκρως αναγκαία για την εξάλειψη ακτινοάντοχων υποξικών όγκων. Η διαφορά μεταξύ πυκνών ιοντισμένων πυρήνων και αραιών ακτίνων X και πρωτονίων επιφέρει περαιτέρω ραδιολογικά αποτελέσματα όπως μειωμένη ικανότητα επισκευής, μειωμένη εξάρτηση από τον κυτταρικό κύκλο και πιθανώς ισχυρότερες ανοσολογικές αποκρίσεις.

Έως σήμερα κλινικές μελέτες και εφαρμογές φανερώνουν ότι η ακτινοβολία με δέσμες ιόντων άνθρακα φέρει σημαντικά θετικά αποτελέσματα σε όγκους που εμφανίζονται στον κεφάλι και τον λαιμό, όπως κακήθης μελάνωμα των βλεννογόνων και αδενοειδές κυστικό καρκίνωμα. Μάλιστα, μελέτες του ινστιτούτου NIRS έδειξαν ότι ο συνδυασμός της συγκεκριμένης μεθόδου ακτινοθεραπείας με χημειοθεραπεία DAV (daunomycin, cytarabine και vincristine) μειώνει σημαντικά τις μεταστατικές εστίες. Επιπροσθέτως, πέραν της στερεοτακτικής ακτινοθεραπείας με ακτίνες X έναντι της χειρουργικής επέμβασης για την αντιμετώπιση όγκων στους πνεύμονες, η ακτινοθεραπεία με δέσμες ιόντων άνθρακα φαίνεται να αποτελεί ένα επιπλέον αξιόλογο εργαλείο στα χέρια των ογκολόγων και ακτινοθεραπευτών. Έχει παρατηρηθεί ότι σε κακοήθειες σταδίου IB στους πνεύμονες, τα ιόντα άνθρακα είναι πιο αποτελεσματικά συγκριτικά με στερεοτακτική ακτινοβολία πρωτονίων, ως προς τον τοπικό έλεγχο της περιοχής του όγκου αλλά και της τοξικότητας του πνεύμονα. Τέλος, νέες κλινικές εφαρμογές λαμβάνουν χώρα σε όγκους στα οστά, στους μαλακούς ιστούς, στον προστάτη, στο πάγκρεας, στο τράχηλο της μήτρας καθώς επίσης και σε ηπατοκυτταρικό και τοπικά υποτροπιάζον ορθικό καρκίνωμα με ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Παρόλα αυτά οι κλινικές μελέτες δείχνουν ότι οι εφαρμογές αυτές επιφέρουν σημαντικές παράπλευρες δράσεις στους περιβάλλοντες ιστούς, καθιστώντας την περαιτέρω μελέτη κρίσιμη. (Kamada et al., 2015).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ

2

ΣΚΟΠΟΣ

Σύμφωνα με την προαναφερθείσα θεωρητική ανάλυση, η προΤα είναι μία πρωτεΐνη η οποία εδρεύει στον πυρήνα και κατέχει κρίσιμο ρόλο τόσο ενδοκυτταρικά όσο και εξωκυτταρικά. Ενδοκυτταρικά, αποτελεί κομβικό παράγοντα για την ανάπτυξη και την επιβίωση του κυττάρου καθώς συντελεί σε διεργασίες όπως ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση. Έξω από το κύτταρο, δρά ανοσορυθμιστικά σε πλήθος κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Παράλληλα, έχει δειχθεί ότι το καρβοξυτελικό άκρο της, το δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109), στο οποίο εντοπίζεται το ανοσοδραστικό της κέντρο, αποκόπτεται και εξωκυτταρώνεται κατά της διαδικασία της απόπτωσης, όταν δρουν σε αυτό οι ενεργοποιημένες κασπάσες (κυρίως η κασπάση 3) (Evstafieva et al., 2003).

Επιπροσθέτως, το 2017, σε *in vitro* πειράματα που έλαβαν χώρα στο εργαστήριο μας, έγινε εμφανής η συσχέτιση της αύξησης της συγκέντρωσης του προΤα(100-109) με τη επαγωγή αποπτωτικού θανάτου, ως άμεση συνέπεια της ενδοκυτταρικής παραγωγής και εξωκυττάρωσης του προΤα(100-109) που προήλθε από την επαγωγή ανοσογονικής απόπτωσης σε κυτταρικούς πληθυσμούς (Samara et al., 2017b).

Δεδομένης της παραπάνω συσχέτισης, απώτερος σκοπός της εργασίας αυτής, ήταν η μελέτη του εν δυνάμει ρόλου του προΤα(100-109) ως βιοδείκτη. Αναλυτικότερα, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του προΤα(100-109) τόσο στον ορό ασθενών με ΠΜ, οι οποίοι έλαβαν θεραπευτικά τον αναστολέα πρωτεασώματος bortezomib, όσο και σε υπερκείμενα καλλιέργειών καρκινικών σειρών που οδηγήθηκαν σε απόπτωση. Για την επαγωγή αποπτωτικού θανάτου στις καλλιέργειες καρκινικών σειρών εφαρμόστηκαν δυο μέθοδοι: α) χορήγηση χημικών παραγόντων και β) έκθεση των κυτταρικών σειρών σε ακτινοβολία φωτονίων και συγκεκριμένα σε ακτίνες -γ.

Με βάση την κεντρική υπόθεση, η μαζική επαγωγή απόπτωσης των μυελωματικών κυττάρων από το bortezomib, έχει ως άμεση συνέπεια την αύξηση της συγκέντρωσης του προΤα(100-109) και πακολούθως την ανάδειξη της θεραπευτικής αγωγής με το συγκεκριμένο αντικαρκινικό φαρμακευτικό σκεύασμα, ως επιτυχής.

Αξίζει να σημειωθεί ότι, ο ποσοτικός προσδιορισμός του προΤα(100-109) έγινε με τη βοήθεια *in-house* μεθόδου ELISA ανταγωνιστικού τύπου η οποία αναπτύχθηκε από την ομάδα του εργαστηρίου μας.

Τέλος, για τον καθορισμό των φυσιολογικών τιμών συγκέντρωσης του προΤα(100-109), προσδιορίστηκε ποσοτικά η συγκέντρωση του εν λόγω πεπτιδίου στο πλάσμα υγιών ανθρώπων.

Εν κατακλείδι, η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία πραγματεύεται τα εξής:

- ✓ Τη μέγιστη δυνατή αξιοπιστία και επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων μέσω της βελτιστοποίησης της μεθόδου ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού του δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109) (με *in-house* ανταγωνιστικού τύπου ELISA).

- ✓ Το καθορισμό των φυσιολογικών τιμών του προΤα(100-109) σε πλάσμα που συλλέχθηκε από δείγματα φυσιολογικών δοτών, μέσω ποσοτικού προσδιορισμού του πεπτιδίου και κατάλληλης στατιστικής επεξεργασίας.
- ✓ Την *in vitro* μέτρηση του προΤα(100-109) σε υπερκείμενα κυτταρικών καλλιιεργειών H929, τα οποία επώαστηκαν με τον αντικαρκινικό παράγοντα bortezomib καθώς επίσης και με τον συνδυασμό των αποπτωτικών παραγόντων εμετίνης και TNF -α. Παράλληλα οι εν λόγω κυτταρικές καλλιέργειες εκτέθηκαν σε θεραπευτικές δόσεις γ- ακτινοβολίας. Σκοπός των πειραμάτων αυτών ήταν η επαλήθευση της συσχέτισης της σταδιακής επαγωγής της απόπτωσης με παράλληλη αύξηση της συγκέντρωσης του προΤα(100-109) στα υπερκείμενα των καλλιιεργειών.
- ✓ Την *ex vivo* ποσοτικοποίηση του προΤα(100-109) στο πλάσμα τεσσάρων ασθενών με ΠΜ που τους χορηγήθηκε θεραπευτικά το bortezomib, με σκοπό την ανάδειξη της αποτελεσματικότητας του εν λόγω φαρμάκου. Η μελέτη αυτή, έγινε μέσω κινητικής μελέτης, ύστερα από δειγματοληψία πριν και 6, 12, 24 και 48 ώρες μετά την χορήγηση του bortezomib.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Εισαγωγή

Στο παρόν κεφάλαιο περιγράφονται οι μέθοδοι και οι τεχνικές που εφαρμόστηκαν, καθώς και τα αναλώσιμα και η οργανολογία που χρησιμοποιήθηκε, για την εκπόνηση της πειραματικής διαδικασίας.

3.2 Βασικά Αναλώσιμα

Ο απαραίτητος εργαστηριακός εξοπλισμός για σχεδόν όλες τις πειραματικές διαδικασίες είναι ο ακόλουθος:

- ❖ Πιπέττες μεταβλητού όγκου 2, 20, 200 και 1000 μL (Nichiryo, Japan)
- ❖ Ρύγχη πιπετών 10, 200 και 1000 μL (Greiner, Austria)
- ❖ Ηλεκτρικό πιστόλι για τη χρήση των πιπετών μιας χρήσεως (Labnet, USA)
- ❖ Πλαστικές πιπέττες μιας χρήσεως 1, 2, 5, 10 και 25 mL (Greiner, Austria)
- ❖ Σωληνάρια φυγοκέντρησης τύπου Falcon 15 και 50 mL (Greiner, Austria)
- ❖ Επωαστικός κλίβανος 37 °C και 5% CO₂ (Sanyo Electric Co, Japan)
- ❖ Φυγόκεντρος ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας και αποσπώμενης κεφαλής (Jouan, DJB Labcare, UK)
- ❖ Φυγόκεντρος ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας και αποσπώμενης κεφαλής (LaborTechnik – Hermle, Germany)
- ❖ Θάλαμος νηματικής ροής (Laminar Flow) BH-EN-2004 (Faster, Italy)
- ❖ Οπτικό μικροσκόπιο (Optika, Italy)
- ❖ Ανεστραμμένο μικροσκόπιο (Zeiss, Italy)

Επιπροσθέτως, παρακάτω αναφέρονται ορισμένα αναλώσιμα διαλύματα που παρασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν σχεδόν σε όλες τις πειραματικές διατάξεις:

- ❖ Θρεπτικό υλικό ή πλήρες RPMI-1640: Σε ένα μπουκάλι θρεπτικού υλικού RPMI-1640 των 500 mL (Lonza, Germany) προσθέσαμε τα κάτωθι συστατικά:
 - 1) 5 mL Penicillin 10.000 U/mL, Streptomycin 10.000 mg/mL και Gentamycin 10 mg/mL (Lonza, Germany)
 - 2) 5 mL Hepes 1 M (Lonza, Germany)
 - 3) FBS με τελική συγκέντρωση 10% w/v

3.3 Κυτταρικές καλλιέργειες

Κατά τη χρήση κυτταρικών σειρών για πειραματικές μελέτες, απαιτείται τα κύτταρα να αναπτύσσονται κάτω από αυστηρά ελεγχόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες. Τα κύτταρα των θηλαστικών, χρειάζονται για την ανάπτυξή τους, θερμοκρασία 37 °C και 5% CO₂, συνθήκες οι οποίες παρέχονται με τη βοήθεια ενός επωαστικού κλιβάνου. Άλλες σημαντικές παράμετροι για την ομαλή ανάπτυξη των κυττάρων είναι, η χρήση του σωστού θρεπτικού υλικού εμπλουτισμένου με όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά και αυξητικούς παράγοντες, καθώς και η χρήση αντιβιοτικών για την αποτροπή επιμολύνσεων.

Υλικά και αναλώσιμα

- ✓ RPMI-1640 (Lonza, Germany)
- ✓ DPBS, χωρίς Ca²⁺ και Mg²⁺ (Lonza, Germany)
- ✓ FBS θερμικά απενεργοποιημένο στους 56 °C για 30' (FBS, Lonza)
- ✓ EDTA 2 mM (EDTA, Sigma-Aldrich)
- ✓ Πλαστικές φλάσκες καλλιέργειας με φίλτρο (Greiner, Bio-One)
- ✓ Υδατόλουτρο
- ✓ Σωληνάρια κρυοσυντήρησης των 2 ml (cryovials, Greiner, Bio-One)
- ✓ Καταψύκτης -20 °C
- ✓ Καταψύκτης -80 °C
- ✓ Δοχείο αζώτου

Πρωτόκολλο εργασίας

Η καλλιέργεια των κυτταρικών σειρών αποτελείται από τρεις βασικές διαδικασίες, την απόψυξη των κυττάρων, την ανακαλλιέργεια και την κρυοσυντήρηση.

Απόψυξη κυττάρων

Για την απόψυξη των κυττάρων χρειάζομαστε περίπου 50 mL θρεπτικό υλικό. Τα παγωμένα κύτταρα περιέχουν DMSO, το οποίο είναι κρυοπροστατευτικό και θα πρέπει να αφαιρεθεί (ξεπλυθεί), γιατί είναι τοξικό για τα κύτταρα. Η διαδικασία της απόψυξης των κυττάρων αποτελείται από τα παρακάτω βήματα:

- 1) Γεμίζουμε ένα falcon με 10 μL θρεπτικό υλικό για κάθε 1 μL κυτταρικού εναιωρήματος (cell suspension).
- 2) Φυγοκεντρούμε στις 1.500 rpm για 5' στους 4°C και τα κύτταρα καθιζάνουν με την μορφή ιζήματος (pellet).

- 3) Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε με 1 mL πλήρους θρεπτικού υλικού.
- 4) Ελέγχουμε τη βιωσιμότητα με τη χρήση πλάκας Neubauer.
- 5) Μεταφέρουμε 1 mL σε φλάσκα και προσθέτουμε κατάλληλη ποσότητα πλήρους θρεπτικού υλικού.
- 6) Κλείνουμε καλά το πώμα με το φίλτρο και τοποθετούμε τη φλάσκα στον επωαστικό κλίβανο.
- 7) Επωάζουμε μέχρις ότου να αναπτυχθεί ο επιθυμητός αριθμός κυττάρων.

Ανακαλλιέργεια κυττάρων

- 1) Για προσκολλώμενες κυτταρικές σειρές: Τα κύτταρα προσκολλώνται σε πλαστικές επιφάνειες μέσω ορισμένων μορίων, των ιντεγκρινών. Οι ιντεγκρίνες για να συμβάλλουν στην προσκόλληση των κυττάρων στην πλαστική επιφάνεια δεσμεύουν ιόντα ασβεστίου.
 - i. Αρχικά ξεπλένουμε την φλάσκα με το θρεπτικό υλικό που υπάρχει σε αυτή 3 φορές με DPBS και το αφαιρούμε. Τα κύτταρα παραμένουν προσκολλημένα στο πυθμένα.
 - ii. Ρίχνουμε 2-3 mL για τη μικρή φλάσκα (των 25mm²) ή 6-7 mL για τη μεγάλη (των 50 mm²) από το διάλυμα EDTA-DPBS (αφού το θερμάνουμε στο υδατόλουτρο στους 37 °C ώστε να έχει την ίδια θερμοκρασία με τα κύτταρα). Το EDTA, ως χηλική ένωση, δεσμεύει τα ιόντα ασβεστίου και έτσι τα κύτταρα αποκολλώνται από την πλαστική επιφάνεια της φλάσκας.
 - iii. Κάνουμε μια μικρή ανάδευση και τοποθετούμε στον επωαστικό κλίβανο για 5-10'.
 - iv. Παρατηρούμε στο μικροσκόπιο για εμφανή αποκόλληση.
 - v. Ξεπλένουμε την φλάσκα 2-3 φορές με το υλικό που έχει μέσα και μεταγγίζουμε όλη την ποσότητα σε ένα falcon.
- 2) Για αιωρούμενες κυτταρικές σειρές:
 - i. Μεταγγίζουμε όλη την ποσότητα με τα κύτταρα που περιέχεται στη φλάσκα, σε ένα falcon και προσθέτουμε 5-6 mL πλήρες RPMI-1640.
 - ii. Φυγοκεντρούμε στις 1.500 rpm για 5' στους 4 °C.
 - iii. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε με 1 mL πλήρους RPMI-1640, σπάζοντας το ίζημα με πιπετάρισμα.
 - iv. Μοιράζουμε το υλικό στον επιθυμητό αριθμό από φλάσκες.

Κρυοσυντήρηση κυττάρων

Η ψύξη των κυττάρων (κρυοσυντήρηση), στους -80°C ή σε υγρό άζωτο, είναι απαραίτητη όταν χρειάζεται να συντηρήσουμε τις κυτταρικές σειρές, για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα. Κατά το φάση της κρυοσυντήρησης, τα κύτταρα θα πρέπει να είναι μεταβολικά ενεργά και υγιή. Επιθυμητό είναι να αποφεύγεται η δημιουργία πάγου και

η απώλεια νερού, ενώ σημαντική είναι η χρήση του DMSO το οποίο παρέχει κρυοπροστασία.

Αφού ακολουθήσουμε τα βήματα 1 έως 4 της διαδικασίας της ανακαλλιέργειας των κυττάρων εργαζόμαστε ως εξής:

- 1) Συλλέγουμε το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας σε EDTA-DPBS και φυγοκεντρούμε σε 1.500 rpm για 5'.
- 2) Επαναιωρούμε το ίζημα σε 1 mL πλήρους RPMI-1640.
- 3) Παρατηρούμε τη βιωσιμότητα (>95%) και μετράμε τα κύτταρα σε πλάκα Neubauer.
- 4) Σημειώνουμε σε ένα cryovial το όνομα της σειράς, τον αριθμό των κυττάρων και το τοποθετούμε στο ειδικό δοχείο.

Γενικά ρυθμίζουμε τα κύτταρα ώστε να έχουμε σε κάθε cryovial μέχρι 10×10^6 κύτταρα με 0,1 mL DMSO, 0,5 mL πλήρες RPMI και 0,4 mL ορό / mL παγώματος.

3.4 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και βιωσιμότητας κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer

Προκειμένου να αναπτυχθούν και να διατηρηθούν οι καλλιέργειες, είναι σημαντικό να γνωρίζουμε τη φυσική κατάσταση των κυττάρων και η βιωσιμότητά τους. Για το λόγο αυτό είναι διαδεδομένη η μέτρηση του αριθμού και ο έλεγχος βιωσιμότητας των κυττάρων σε εναιώρημα, με τη χρήση της πλάκας Neubauer (αιμοκυτταρόμετρο), η οποία περιέχει κατάλληλα επεξεργασμένες και βαθμονομημένες λείες επιφάνειες. Η μέθοδος αυτή μας επιτρέπει να βρίσκουμε υπολογιστικά τις παραμέτρους αυτές, εφόσον η καταμέτρηση όλων των κυττάρων μιας καλλιέργειας θα ήταν πρακτικά αδύνατη. Η διαδικασία βασίζεται σε χρωστικές οι οποίες δεν διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη των ζωντανών κυττάρων, σε αντίθεση με τα νεκρά τα οποία βάφονται με τη χρωστική. Η πιο γνωστή χρωστική είναι η Trypan Blue, που χρωματίζει μπλε τα νεκρά κύτταρα.

Υλικά και αναλώσιμα

- ✓ Κυτταρικό εναιώρημα του δείγματος
- ✓ Κυανό του τρυπανίου (Trypan Blue) σε διάλυμα 0,4% w/v (Sigma-Aldrich)
- ✓ Microplate elisa 96 wells με πυθμένα σχήματος U (Greiner, Bio-One)
- ✓ Αντικειμενοφόρος πλάκα αιμοκυτταρομέτρησης Neubauer (Sigma-Aldrich)
- ✓ Καλυπτρίδα

Πρωτόκολλο εργασίας

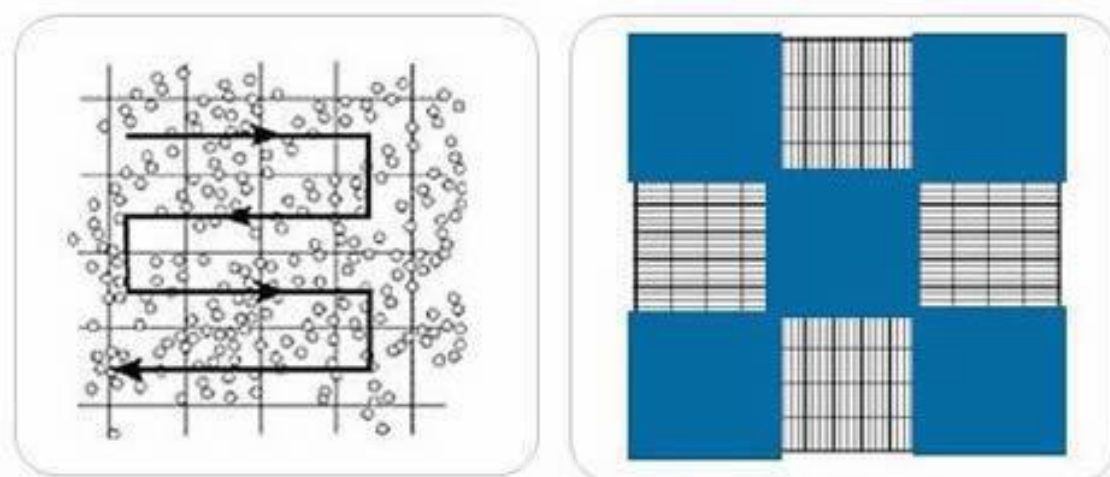
- 1) Μεταφέρονται 20 μl από το κυτταρικό εναιώρημα σε ένα φρεάτιο (well) πλάκας 96 θέσεων.
- 2) Προστίθεται ίσος όγκος Trypan Blue, οπότε το δείγμα αραιώνεται 1:2. Σε περίπτωση που το δείγμα μας είναι αρκετά συμπυκνωμένο πραγματοποιούμε μεγαλύτερη αραιώση.
- 3) Τοποθετούμε μια τετράγωνη καλυπτρίδα στην πλάκα Neubauer και γεμίζουμε τις ειδικές θέσεις με το αραιωμένο δείγμα, μέχρι την πλήρωση της θέσεως. Η βαθμονομημένη θέση πληρώνεται με τη βοήθεια του τριχοειδικού φαινομένου.
- 4) Εστιάζουμε με τον αντικειμενικό φακό την βαθμονομημένη περιοχή, η οποία αποτελείται από κάθετες και οριζόντιες γραμμές, σχηματίζοντας μια τετράγωνη περιοχή, εμβαδού 1 mm², και όγκου 0,1 mm³ (**Εικόνα 21**).
- 5) Καταμετρούμε τον αριθμό των κυττάρων (ζωντανών και νεκρών) στην περιοχή αυτή. Για καλύτερη ακρίβεια πραγματοποιούμε την μέτρηση με πορεία μαιάνδρου και θέτουμε σαν παραδοχή ότι η καταμέτρηση των κυττάρων που βρίσκονται πάνω και δεξιά των περιθωρίων του κάθε τετραγώνου θα γίνεται στο επόμενο τετράγωνο. Για να θεωρηθεί κατάλληλη μια καλλιέργεια για περαιτέρω χρήση της σε πειράματα, πρέπει η βιωσιμότητά της να είναι >95%.

Ο υπολογισμός της βιωσιμότητας πραγματοποιείται με τον παρακάτω τύπο:

$$\begin{aligned} \% \text{Βιωσιμότητας} \\ = \frac{\text{Ολικός Αριθμός Κυττάρων} - \text{Αριθμός Νεκρών Κυττάρων}}{\text{Ολικός Αριθμός Κυττάρων}} \times 100 \end{aligned}$$

Ενώ ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των κυττάρων στο εναιώρημα πραγματοποιείται με τον τύπο:

$$C \text{ (κύτταρα/ ml)} = \text{αριθμός κυττάρων} \times \text{συντελεστής αραιώσης} \times 10^4$$



Εικόνα 21: Ποσοτική μέτρηση κυττάρων και βιωσιμότητας σε πλάκα Neubauer. Η πορεία καταμέτρησης των κυττάρων σε σχήμα μαϊάνδρου προτείνεται, προκειμένου να διευκολύνει τον παρατηρητή.

3.5 Επαγωγή κυτταρικού θανάτου σε καρκινικές κυτταρικές σειρές

Σύμφωνα με παλαιότερες μελέτες , έχει διαπιστωθεί ότι η επαγωγή αποπτωτικού θανάτου των κυττάρων οδηγεί στη εξωκυττάρωση του δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109) ύστερα από πέψη της προΤα από τις κασπάσες 3 και 7. Επίσης, η κυτταρική σειρά HeLa είναι γνωστό ότι υπερεκφράζει την προΤα, σε σχέση με άλλες καρκινικές σειρές. Με βάση τα δεδομένα αυτά, καλλιέργεια από HeLa οδηγήθηκαν σε απόπτωση με τη χρήση του αναστολέα πρωτεασώματος Bortezomib, προκειμένου να συσχετισθεί η αύξηση των αποπτωτικών κυττάρων με την παράλληλη αύξηση της συγκέντρωσης του δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109).

Υλικά και αναλώσιμα

- ✓ Καλλιέργεια κυττάρων HeLa
- ✓ Φλάσκες κυτταροκαλλιιεργειών με φίλτρο (Greiner, Austria)
- ✓ Μικροπλάκες καλλιιεργειών 6 θέσεων (Greiner, Austria)
- ✓ Πλήρες RPMI-1640 (Lonza, UK)
- ✓ DPBS, χωρίς Ca²⁺ και Mg²⁺ (Lonza, Germany)
- ✓ EDTA 2 mM (EDTA, Sigma-Aldrich)
- ✓ Bortezomib
- ✓ Emetine
- ✓ TNF-α
- ✓ Αναστολέας πρωτεασών Complete (Roche, Germany)

Πρωτόκολλο εργασίας

Ημέρα 1

- 1) Για προσκολλώμενα κύτταρα: Αποκολλούμε τα κύτταρα από τη φλάσκα με χρήση διαλύματος DPBS-EDTA.
Για αιωρούμενα κύτταρα : Ξεκινάμε από το βήμα 2.
- 2) Μετράμε τον αριθμό και τη βιωσιμότητα με τη βοήθεια πλάκας Neubauer και της χρωστικής TrypanBlue. Εφόσον η βιωσιμότητα είναι >95%, συνεχίζουμε το πείραμα.
- 3) Φυγοκεντρούμε το εναιώρημα από τη φλάσκα στις 1.500 rpm για 5 λεπτά, απορρίπτουμε το υπερκείμενο και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε πλήρες θρεπτικό υλικό σε συγκέντρωση $0,5 \times 10^6$ κύτταρα/ ml.
- 4) Επιστρώνουμε τα κύτταρα σε μικροπλάκα 6/ ή 24 φρεατίων και επωάζουμε στον κλίβανο.

Ημέρα 2

- 1) Για προσκολλώμενα κύτταρα: Ελέγχουμε αν τα κύτταρα έχουν προσκολληθεί στον πυθμένα καθώς και την πυκνότητά τους.
Για αιωρούμενα κύτταρα : Ελέγχουμε την πυκνότητα των κυττάρων.
- 2) Το υπερκείμενο απορρίπτεται και στη συνέχεια πραγματοποιούμε προσεκτική πλύση 3 φορές με DPBS, για να απομακρύνουμε τα νεκρά κύτταρα.
- 3) Προσθέτουμε στα φρεάτια τον επαγωγικό παράγοντα διαλυμένο σε θρεπτικό υλικό ενώ στο ένα από αυτά προσθέτουμε μόνο θρεπτικό υλικό. Το φρεάτιο αυτό θα χρησιμοποιηθεί ως μάρτυρας.
- 4) Μετά το χρονικό διάστημα επώασης που έχουμε ορίσει, συλλέγουμε το υλικό του φρεατίου και φυγοκεντρούμε στις 1.500 rpm για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο συλλέγεται σε erpendorf με complete, και αποθηκεύεται στους -20°C μέχρι να αναλυθεί το δείγμα.

3.6 Μέθοδος κατακρήμνισης πρωτεϊνών από ανθρώπινο πλάσμα με ακετόνη

Το ανθρώπινο πλάσμα αποτελείται από μια πληθώρα πρωτεϊνών, ορισμένες εκ των οποίων βρίσκονται σε μεγάλη συγκέντρωση (κυρίως η αλβουρίνη). Η παρουσία τους, καθιστά δύσκολη την ανίχνευση μικρών πεπτιδίων και η απομάκρυνσή τους ενδείκνυται για την αύξηση της ειδικότητας ανίχνευσής τους, ή για την αποφυγή μη ειδικών δεσμεύσεων. Η χρήση παγωμένης ακετόνης αποτελεί μια αποτελεσματική μέθοδος κατακρήμνισης (**Εικόνα 22**).

Υλικά και αναλώσιμα

- ✓ Παγωμένη καθαρή ακετόνη (Chem-Lab, Belgium)
- ✓ Συσκευή εξάτμισης Savant Speedvac (ThermoFisher, USA)
- ✓ Eppendorf (Greiner, Austria)

Πρωτόκολλο εργασίας

- 1) Ποσότητα δείγματος μεταφέρεται σε eppendorf.
- 2) Προστίθενται 3 όγκοι κρύας ακετόνης. Το δείγμα αποκτά νεφελώδη σύσταση.
- 3) Το δείγμα ομογενοποιείται σε vortex και φυλάσσεται για 12 ώρες στους -20°C .
- 4) Την επόμενη μέρα, τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 10.000 rpm για 30' και στους 4°C και τα υπερκείμενα συλλέγονται σε νέα eppendorfs.
- 5) Η ακετόνη εξατμίζεται, με τη βοήθεια συσκευής speed vac, σε χαμηλή ταχύτητα για την αποφυγή υπερθέρμανσης.
- 6) Τα δείγματα αναλύονται άμεσα.



Εικόνα 22: Διαδικασία κατακρήμνισης δειγμάτων πλάσματος με την προσθήκη κρύας ακετόνης. Η πορεία αυτή είναι σημαντική για την απομάκρυνση των μεγαλομοριακών πρωτεϊνών που αποτελούν εμπόδιο στην ανίχνευση πεπτιδίων μικρού μοριακού βάρους.

3.7 Μέτρηση αποπτωτικών - νεκρωτικών κυττάρων με κυτταρομετρία ροής

Κατά την απόπτωση, το κύτταρο υπόκειται σε χαρακτηριστικές μορφολογικές αλλαγές μεταξύ των οποίων είναι η απώλεια της ασυμμετρίας της κυτταροπλασματικής

μεμβράνης. Στα αποπτωτικά κύτταρα παρουσιάζεται μετατόπιση του μεμβρανικού φωσφολιπιδίου φωσφατιδυλοσερίνη (PS) από την εσωτερική πλευρά της μεμβράνης στην εξωτερική, με αποτέλεσμα την έκθεσή του στο εξωκυττάριο περιβάλλον. Η Αννεξίνη (ή αννεξίνη V) είναι μέλος της οικογένειας των αννεξινών, μιας οικογένειας ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών, που δεσμεύουν την φωσφατιδυλοσερίνη, μέσω μιας εξαρτώμενης από ασβέστιο (Ca^{2+}) διαδικασίας. Η σημασμένη με φθοριόχρωμα αννεξίνη V μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σήμανση και αναγνώριση των αποπτωτικών κυττάρων. Παρόλα αυτά, η αννεξίνη από μόνη της δεν μπορεί να ξεχωρίσει τα αποπτωτικά από τα νεκρωτικά κύτταρα. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται επικουρικά διάλυμα ιωδιούχου προπιδίου (PI), μιας φθορίζουσας χρωστικής που δεσμεύεται στο DNA. Τα πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα, δεν δεσμεύουν το PI, ενώ τα όψιμα αποπτωτικά και τα νεκρωτικά βάφονται θετικά λόγω της εισόδου της χρωστικής στο εσωτερικό του πυρήνα, όπου δεσμεύεται στο DNA (**Εικόνα 23**).

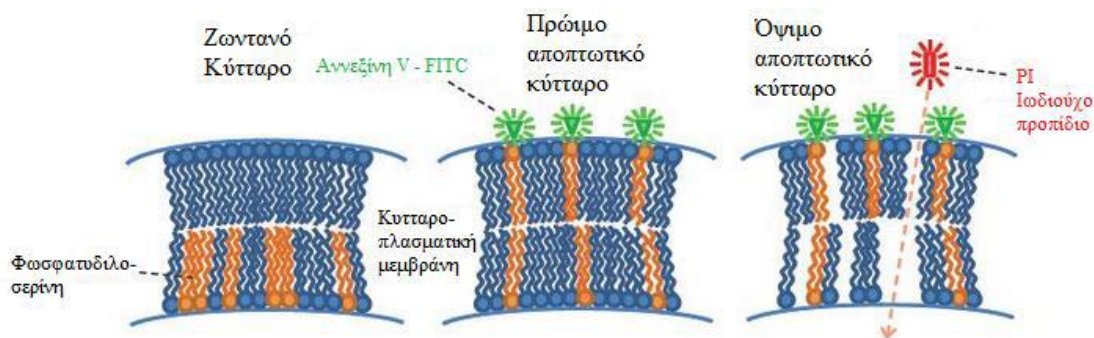
Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- ✓ Κυτταρικές σειρές HeLa, K562, H929
- ✓ FITC-αννεξίνη V (BioLegend, USA)
- ✓ Ιωδιούχο προπίδιο (PI) – (BioLegend, USA)
- ✓ 10X ρυθμιστικό διάλυμα δέσμευσης της Αννεξίνης V. Το αρχικό διάλυμα αραιώνεται 10X με απεσταγμένο νερό και είναι έτοιμο προς χρήση.
- ✓ Σωληνάρια Facs Tubes των 5 mL (Corning ScienceMexico, Mexico)
- ✓ Κυτταρόμετρο ροής FACSCanto II (BD, USA)

Πρωτόκολλο εργασίας

- 1) Σε συνέχεια του πρωτοκόλλου της ενότητας 3.7., αφού συλλέξουμε το υπερκείμενο, το κυτταρικό ίζημα που απομένει θα πρέπει να αποκολληθεί και να προχωρήσει σε διαδικασία σήμανσης και χρώσης με αννεξίνη V – PI. Για την αποκόλληση είναι σημαντικό να αποφεύγονται ουσίες που δεσμεύουν το ασβέστιο, όπως το EDTA, λόγω εξάρτησης της αννεξίνης V από αυτό.
- 2) Τα κύτταρα συλλέγονται σε νέο σωληνάριο και φυγοκεντρώνονται στις 1.500 rpm για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίπτεται.
- 3) Επαναιωρούμε τα κύτταρα σε ποσότητα πλήρους θρεπτικού υλικού και φυγοκεντρούμε στις 1.500 rpm για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίπτεται.
- 4) Ξεπλένουμε τα κύτταρα 2 φορές με την προσθήκη κρύου DPBS και στη συνέχεια φυγοκεντρούμε.
- 5) Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε ρυθμιστικό διάλυμα δέσμευσης σε συγκέντρωση $0,25-1,0 \times 10^7$ κύτταρα/mL.
- 6) Μεταφέρουμε 100 μl από το κυτταρικό εναιώρημα σε ένα Facs Tube των 5 mL.
- 7) Προσθέτουμε 5 μl από το διάλυμα Αννεξίνη V – FITC.
- 8) Προσθέτουμε 10 μl από το διάλυμα PI.

- 9) Αναδεύουμε ήπια τα κύτταρα σε vortex και επωάζουμε για 15' σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) στο σκοτάδι.
- 10) Προσθέτουμε σε κάθε σωληνάριο 400 μl από το διάλυμα δέσμευσης της αννεξίνης V και τα δείγματα είναι έτοιμα προς ανάλυση.
- 11) Τα δείγματα πρέπει να αναλυθούν μέσα σε μια ώρα το αργότερο.



Εικόνα 23: Κατά την κυτταρική απόπτωση, το μεμβρανικό φωσφολιπίδιο φωσφατυδιλοσερίνη (PS) μετατοπίζεται και εκτίθεται στο εξωτερικό μέρος της κυτταρικής μεμβράνης. Στην πρώιμη απόπτωση, η αννεξίνη V - FITC, συνδέεται ειδικά με την PS, ενώ το PI δεν μπορεί να εισέλθει στον πυρήνα λόγω ακεραιότητας της μεμβράνης. Στα όψιμα αποπτωτικά και νεκρωτικά, η μεμβράνη διαρρηγνύεται με αποτέλεσμα τη δέσμευση του PI στο DNA.

3.8 Μέθοδος ποσοτικής ανίχνευσης προΤα(100-109) με ELISA

Για την ποσοτική μέτρηση του δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109), σχεδιάστηκε από την εργαστηριακή μας ομάδα, πρωτόκολλο ELISA ανταγωνιστικού τύπου. Για τις ανάγκες της μεθόδου, χρησιμοποιήθηκαν αντι-προΤα(100-109) πολυκλωνικά αντισώματα τα οποία απομονώθηκαν από ανοσοποιημένα κουνέλια.

Συγκεκριμένα, λευκά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας ανοσοποιήθηκαν με προΤα(100-109) συνδεδεμένο με κυστεΐνη και στη συνέχεια συλλέχθηκαν οι πολυκλωνικοί αντι-οροί τους. Κατόπιν, καθарίστηκε το κλάσμα IgG με χρήση ειδικής στήλης, από το οποίο απομονώθηκαν τα αντι-προΤα(100-109) πολυκλωνικά αντισώματα μετά από διαδοχικές εκπλύσεις.

Η διαδικασία της ELISA ανταγωνιστικού τύπου περιλαμβάνει την συνεπώαση του δείγματος με τα πολυκλωνικά IgGs αντισώματα έναντι του προΤα(100-109), και του βιοτινυλιωμένου αντιγόνου προΤα(100-109). Το σημασμένο αντιγόνο ανταγωνίζεται με το αντιγόνο του δείγματος (μη σημασμένο) για τις θέσεις πρόσδεσης στο αντίσωμα. Επομένως, όσο μικρότερη είναι η συγκέντρωση του δείγματος σε προΤα(100-109) τόσες περισσότερες θέσεις δέσμευσης μένουν ελεύθερες για να δεσμευτεί το βιοτινυλιωμένο – προΤα(100-109) και άρα, τόσο πιο ισχυρό θα είναι και το

παραγόμενο σήμα. Το σήμα προκύπτει μέσω του συστήματος βιοτίνη - στρεπταβιδίνη - υπεροξειδάση (Horseradishperoxidase, HPR) - ABTS. Η στρεπταβιδίνη βρίσκεται συζευγμένη με υπεροξειδάση και δεσμεύει με μεγάλη συγγένεια τη βιοτίνη (η βιοτίνη παρέχει 4 θέσεις δέσμευσης της στρεπταβιδίνης) (Samara et al., 2014).

Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (Washing Buffer) – {8 g NaCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,2 g KCl, και 0,24 g KH₂PO₄ σε 1 L νερό, pH 7,4 στο οποίο προστίθεται 0,05% v/v Tween 20}
- ✓ PBS Tablets (Sigma-Aldrich, USA)
- ✓ Tween 20 (Sigma-Aldrich, USA)
- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης (Dilution Buffer) – (0,5% w/v BSA σε Washing Buffer)
- ✓ BSA κλάσμα V, pH 7,0 (PAA, Austria)
- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα κορεσμού (Blocking Buffer) – (2% w/v BSA σε PBS)
- ✓ Πρωτεΐνη A, από το βακτήριο *Staphylococcus aureus* (Calbiochem, Darmstadt, Germany)
- ✓ Στρεπταβιδίνη συζευγμένη με υπεροξειδάση (HPR) – (JacksonImmunoResearch, Dianova, Germany)
- ✓ Διάλυμα υποστρώματος {10 mg ABTS διαλυμένα σε 1 mL απεσταγμένου νερού αραιώνονται με 9 mL ρυθμιστικού διαλύματος υποστρώματος (2,1 g κιτρικού οξέος διαλυμένα σε 100 mL νερού) και προστίθενται 10 μL H₂O₂ (30%), pH 4,5}
- ✓ Κιτρικό οξύ
- ✓ 2,2'-αζινο – δις (3-αιθυλβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικό οξύ)-2NH₄ άλας (ABTS) χρωμογόνο για την υπεροξειδάση (SERVA, Heidelberg, Germany)
- ✓ Μικροπλάκες 96 φρεατίων, Maxisorp (VWR International, Pennsylvania, USA)
- ✓ Eppendorf 1,5 και 2,0 mL (Greiner, Austria)
- ✓ Αναδευτήρας DTS-2 (Neolab, Heidelberg, Germany)
- ✓ Συσκευή ανάγνωσης μικροπλάκων
- ✓ Κυκλικός ομογενοποιητής υγρών (Labnet, USA)

Πρωτόκολλο εργασίας

Η ποσοτική ανίχνευση του δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109) με την *in-house* ELISA αποτελείται από τρία πειραματικά στάδια επομένως η ολοκλήρωσή της απαιτεί τρεις διαδοχικές ημέρες εργασίας (**Εικόνα 24**).

Ημέρα 1

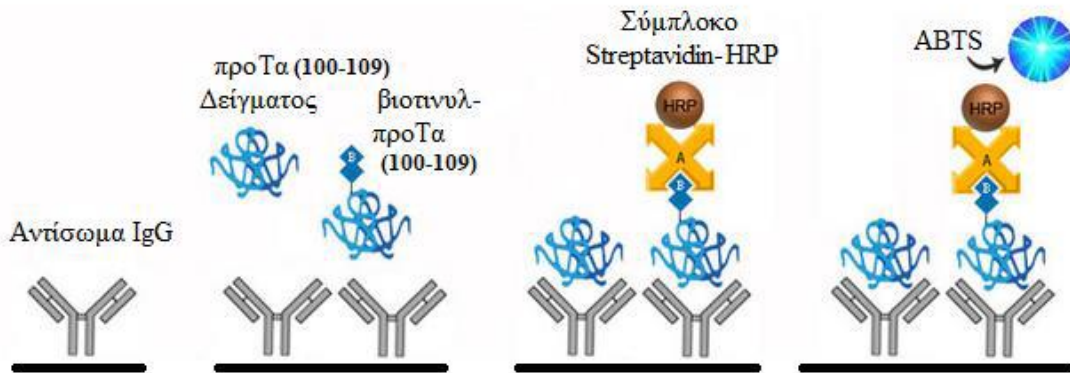
- 1) Γίνεται κατακρήμνιση πρωτεϊνών από :
 - a. πλάσμα υγιών δοτών, αν το δείγμα προς μελέτη προέρχεται ανθρώπινο πλάσμα.
 - b. πλήρες RPMI-1640, αν το δείγμα προέρχεται από κυτταρικές καλλιέργειες.

Ημέρα 2

- 1) Επίστρωση της μικρόπλακας 96 φρεατίων με πρωτεΐνη A (1 mg/mL) (1% του τελικού όγκου πρωτεΐνη A σε DPBS, 100 μL/φρεάτιο) και επώαση όλη τη νύχτα στους 4 °C (ή εναλλακτικά 1 ώρα, στους 37 °C). Η πρωτεΐνη A προέρχεται από το βακτήριο *Staphylococcus aureus* και έχει την ιδιότητα να προσδένει την Fc περιοχή των ανοσοσφαιρινών IgG.
- 2) Παράλληλα, επωάζονται οι ειδικές για το δεκαπεπτιδίο IgG (0,375 μg/mL) με βιοτινυλιωμένο προΤα(100-109) (5 ng/mL) και :
 - a. ελεύθερο προΤα(100-109) (0,1 ng/mL – 10 μg/mL) προς ανταγωνισμό, για το σχεδιασμό της πρότυπης καμπύλης , όλη νύχτα στους 4 °C.
 - b. δείγμα υπό ανίχνευση άγνωστης συγκέντρωσης προΤα(100-109) προς ανταγωνισμό, όλη νύχτα στους 4 °C.

Ημέρα 3

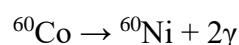
- 1) Η πλάκα ξεπλένεται με DPBS και οι μη ειδικές θέσεις δέσμωσης καλύπτονται με διάλυμα κορεσμού (200 μL/φρεάτιο) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
- 2) 100 μL του προεπωασμένου μείγματος μεταφέρονται στην πλάκα, η οποία επωάζεται για 75 λεπτά στους 37 °C σε αναδευτήρα στις 150 στροφές.
- 3) Ακολουθεί έκπλυση με διάλυμα πλύσης και προστίθενται 100 mL/φρεάτιο συζευγμένης με υπεροξειδάση (HPR) στρεπταβιδίνης (σε διάλυμα αραιώσης 1/5000) και η πλάκα επωάζεται περαιτέρω για 90 λεπτά στους 37 °C. Η στρεπταβιδίνη είναι απομονωμένη από το βακτήριο *Streptomyces avidinii* και δεσμεύει τη βιοτίνη (ικανότητα σύνδεσης 10 mg βιοτίνης ανά mg στρεπταβιδίνης).
- 4) Μετά από εντατική έκπλυση με διάλυμα πλύσης, προστίθενται στη πλάκα 100 mL/φρεάτιο διαλύματος ενζυμικού υποστρώματος ABTS και η πλάκα επωάζεται για 20 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου.
- 5) Τέλος, η οπτική πυκνότητα μετρείται σε μετρητή ELISA στα 405 nm.



Εικόνα 24: Διαδικασία μεθόδου ELISA ανταγωνιστικού τύπου. Το ελεύθερο προΤα(100-109) στο δείγμα, ανταγωνίζεται τις θέσεις πρόσδεσης στις IgG, με το βιοτινυλωμένο-προΤα(100-109). Το σήμα προκύπτει, από το σύστημα βιοτίνη-στρεπταβιδίνη-υπεροξειδάση μετά την προσθήκη του υποστρώματος ABTS. Όσο πιο ισχυρό είναι το σήμα, τόσο λιγότερη συγκέντρωση προΤα(100-109) περιέχεται στο υπό μελέτη δείγμα.

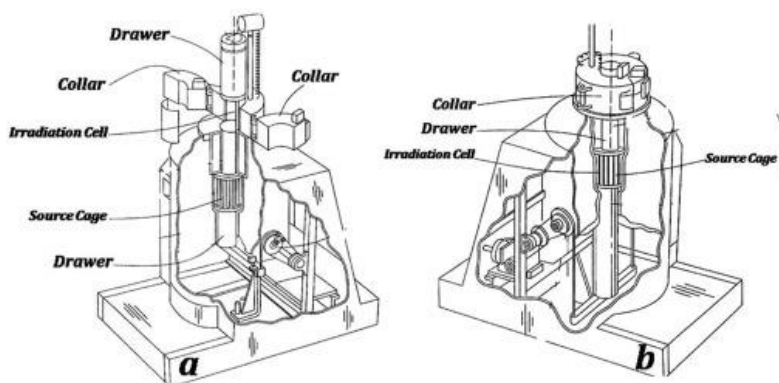
3.9 γ -Ακτινοβόληση κυτταρικών σειρών

Όπως έχει αναφερθεί στην υποενότητα 1.6.2 η βασική πηγή ακτίνων γ υψηλής ενέργειας για τηλεακτινοθεραπεία, είναι αυτή του Κοβαλτίου ^{60}Co με χρόνο ημιζωής που ανέρχεται στα 5,27 χρόνια. Το Κοβάλτιο (Cobaltum) είναι μέταλλο με ατομικό αριθμό 27 και ατομικό βάρος 58,93. Έχει θερμοκρασία τήξης $1.495\text{ }^{\circ}\text{C}$ και θερμοκρασία βρασμού $2.870\text{ }^{\circ}\text{C}$. Το μόνο σταθερό ισότοπο κοβαλτίου είναι το ^{59}Co . Το ^{60}Co , ένα τεχνητά παραγόμενο ραδιενεργό ισότοπο του κοβαλτίου, αποτελεί σημαντικό ραδιενεργό «ανιχνευτή» και βοηθό στη θεραπεία του καρκίνου. Εκπέμπει ιοντίζουσα ακτινοβολία με τη μορφή υψηλής ενέργειας ακτίνων-γ ενώ αποδιεγείρεται εκπέμποντας πρώτα ένα σωματίδιο βήτα με ενέργεια $0,31\text{ MeV}$ που απορροφάται στην ασάλινη κάψουλα της πηγής. Μετά την εκπομπή με το σωματίδιο βήτα, ο πυρήνας εισέρχεται σε μια διεγερμένη κατάσταση ^{60}Ni . Το ^{60}Ni αποδιεγείρεται στη βασική κατάσταση εκπέμποντας δύο ακτίνες γάμμα ανά αποδιέγερση. Από τις δύο ακτίνες γάμμα που εκπέμπονται, η μία έχει ενέργεια $1,17\text{ MeV}$ ενώ η δεύτερη $1,33\text{ MeV}$. Πιο συνοπτικά η αποδιέγερση του ^{60}Co :



Η δέσμη μπορεί να θεωρηθεί πολυενεργειακή γιατί περισσότερες από μία ενέργειες προκύπτουν από το ισότοπο. Για πρακτικούς σκοπούς, ο μέσος όρος των δύο ενεργειών για να δώσει μια αποτελεσματική ενέργεια $1,25\text{ MeV}$ (Washington and Leaver, 2015).

Η ακτινοβόληση των δειγμάτων γίνεται με ακτινοβολητή κοβαλτίου ^{60}Co GammaCell 220 Irradiator (Atomic Energy of Canada Ltd, Ottawa, Canada, Ιανουάριος 1974, ενεργότητας 5470 Ci) σε θερμοκρασία δωματίου και με ρυθμό δόσης 1 Gy/min για 6min (Εικόνα 25). Για τον προσδιορισμό του ρυθμού δόσης χρησιμοποιήθηκε φορητό δοσίμετρο, το οποίο τοποθετήθηκε ακριβώς στο σημείο τοποθέτησης των δειγμάτων.



Εικόνα 25: Ακτινοβολητής Gammacell 200 Irradiator πηγής κοβαλτίου ^{60}Co .

Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- ✓ Επωαστικός κλίβανος
- ✓ Καλλιέργεια κυττάρων H929
- ✓ Φλάσκες κυτταροκαλλιεργειών με φίλτρο (Greiner, Austria)
- ✓ Μικροπλάκες καλλιεργειών 24 θέσεων (Greiner, Austria)
- ✓ Πλήρες RPMI-1640 (Lonza, UK)
- ✓ Ακτινοβολητής κοβαλτίου ^{60}Co Gammacell 220 Irradiator

Πρωτόκολλο εργασίας

- 1) Προσδιορισμός συγκέντρωσης και βιωσιμότητας κυττάρων σύμφωνα με την μέθοδο 3.4.
- 2) Ρύθμιση της συγκέντρωσης των κυττάρων στα 1×10^6 κύτταρα/ mL και τοποθέτηση 3 mL σε φλάσκα κυτταροκαλλιιεργειών.
- 3) Τοποθέτηση της φλάσκας στο θάλαμο ακτινοβόλησης του ακτινοβολητή της πηγής κοβαλτίου ^{60}Co .
- 4) Αφαίρεση της φλάσκας ύστερα από την επιθυμητή δόση ακτινοβόλησης.

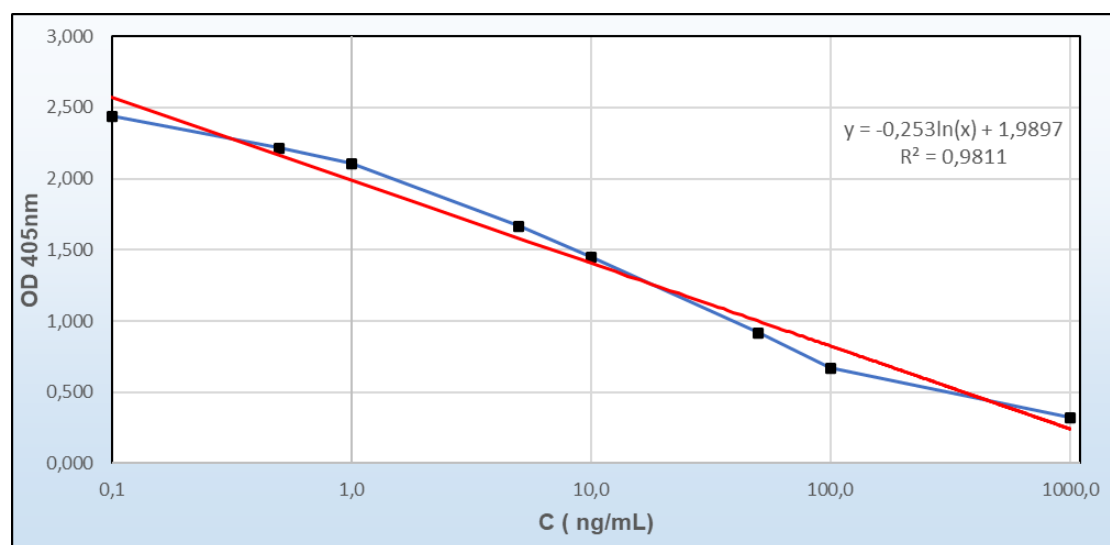
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

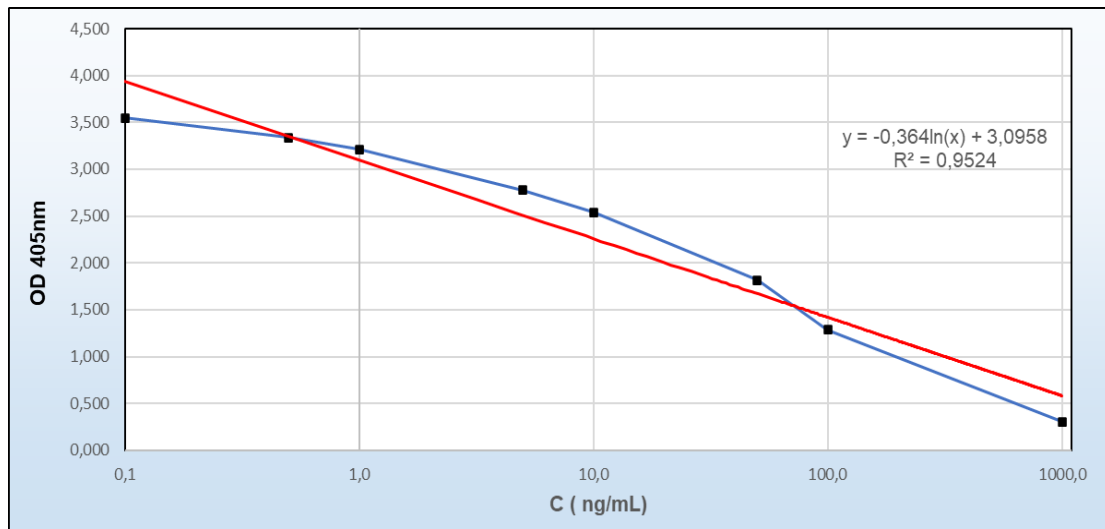
4.1 Έλεγχος σταθερότητας και επαναληψιμότητας της μεθόδου ανίχνευσης του προΤα(100-109)

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων που αφορούν τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109) σε δείγματα ασθενών ή υπερκείμενα καλλιέργειών χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο της μεθόδου ELISA ανταγωνιστικού τύπου που περιγράφηκε στο σχετικό κεφάλαιο των μεθόδων (Κεφάλαιο 3.8).

Για τον σκοπό αυτό έγινε μια σειρά δοκιμαστικών πρότυπων καμπυλών για την επιβεβαίωση των συγκεντρώσεων των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο της *in-house* ELISA καθώς επίσης και η ακρίβεια της μεθόδου.

Παρακάτω παρατίθενται ενδεικτικά δύο πρότυπες καμπύλες που χρησιμοποιήθηκαν για την μέτρηση του προΤα(100-109) στα πειράματα. Παρατηρείται ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, γεγονός που επιβεβαιώνει την επαναληψιμότητα και την ακρίβεια της μεθόδου (**Διάγραμμα 1**).





Διάγραμμα 1: Ενδεικτικές πρότυπες καμπύλες που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση του προΤα(100-109) κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων.

4.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του προΤα(100-109) σε υπερκείμενα καλλιέργειών καρκινικών σειρών

Στη προσπάθεια μας να συσχετίσουμε τα επίπεδα ανοσογονικού τύπου απόπτωσης με τη συγκέντρωση του δεκαπεπτιδίου, μελετήσαμε *in vitro* καρκινικές κυτταρικές σειρές. Πιο συγκεκριμένα κυτταρικές καλλιέργειες των σειρών H929 (ΠΜ) και HeLa (καρκίνος τραχήλου της μήτρας), οδηγήθηκαν σε απόπτωση μετά από χορήγηση χημικών παραγόντων και συγκεκριμένα του συνδυασμού TNF-α και εμετίνης. Εν συνεχεία, ακολούθησε η ποσοτική ανίχνευση της συγκέντρωσης του προΤα(100-109) με εφαρμογή του πρωτοκόλλου ELISA (Κεφάλαιο 3.8) στα υπερκείμενα των καλλιέργειών, ενώ στο εναπομείναν κυτταρικό ίζημα προσδιορίστηκαν τα επίπεδα απόπτωσης με κυτταρομετρία ροής (Κεφάλαιο 3.7).

4.2.1 Ανάλυση αποτελεσμάτων καρκινικών σειρών που οδηγήθηκαν σε απόπτωση με χορήγηση χημικών παραγόντων

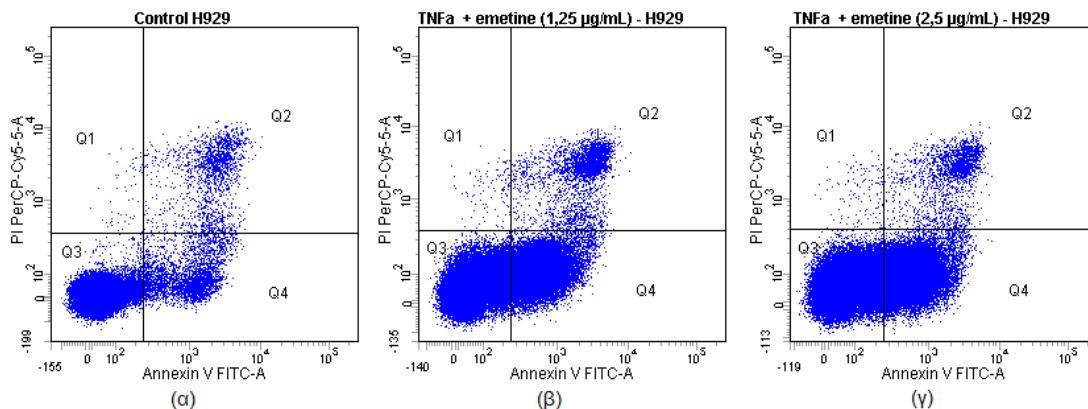
4.2.1.1 Ανάλυση των αποτελεσμάτων της καρκινικής σειράς H929 μετά από χορήγηση του συνδυασμού TNF-α και εμετίνης

Έπειτα από επώαση των κυττάρων της καρκινικής σειράς H929 με το συνδυασμό TNF -α + εμετίνη, συγκέντρωσης 6 ng/mL + 1,25 μg/mL και 6 ng/mL + 2,5 μg/mL, αντίστοιχα, για 4 ώρες εξάγαμε τα κάτωθι αποτελέσματα:

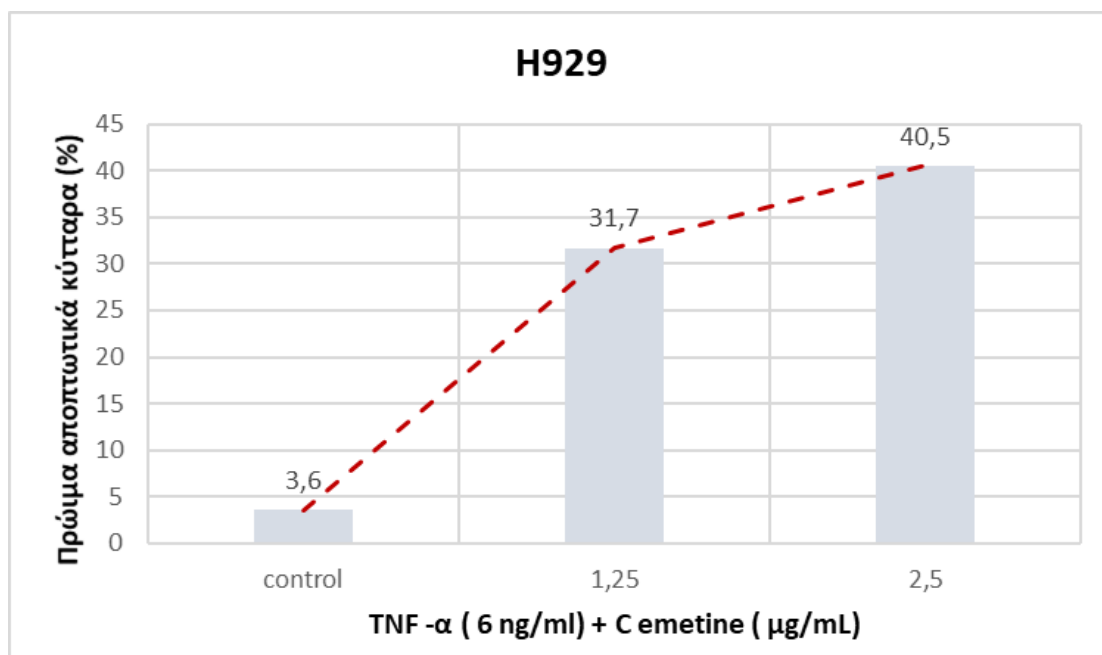
Προσδιορισμός επιπέδων απόπτωσης με κυτταρομετρία ροής

Πίνακας 4: Ποσοστιαίος προσδιορισμός πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων με χρήση κυτταρόμετρου (FACS).

	Annexin V- PI- (Q3)	Annexin V+ PI- (Q4)	Annexin V+ PI+ (Q2)	Annexin V- PI+ (Q1)
Παράγοντες	Ζωντανά κύτταρα (%)	Πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα (%)	Όψιμα αποπτωτικά/ πρώιμα νεκρωτικά κύτταρα (%)	Νεκρωτικά κύτταρα (%)
Μάρτυρας (Control)	94,5	3,6	1,8	0,1
TNF -α (6 ng/mL) + emetine (1,25 μg/mL)	64,0	31,7	4,1	0,2
TNF -α (6 ng/mL) + emetine (2,5 μg/mL)	56,3	40,5	3,0	0,2

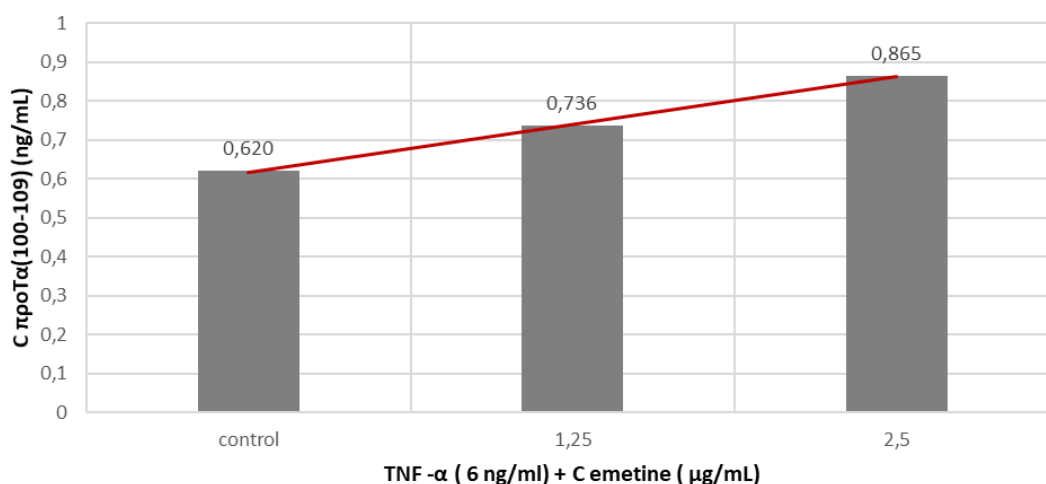


Εικόνα 26: Καλλιέργειες ανθρώπινων κυττάρων H929 (ΠΜ) επωάστηκαν με το συνδυασμό παραγόντων TNF- α + εμετίνης [6 ng/mL + 1,25 μ g/mL (β) και 6 ng/mL + 2,5 μ g/mL (γ)] για 4 ώρες και ελέγχθηκαν ως προς τα επίπεδα απόπτωσης με κυτταρομετρία ροής. Παρατηρείται αύξηση 31,7% και 40,5% των πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων στα κύτταρα που επωάστηκαν με TNF - α + εμετίνη (6 ng/mL + 1,25 μ g/mL και 6 ng/mL + 2,5 μ g/mL), αντίστοιχα, σε σχέση με τον μάρτυρα (α) που τα ποσοστό παρέμεινε χαμηλό στο 3,6%.



Διάγραμμα 2: Διάγραμμα ποσοστού πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων της σειράς H929 συναρτήσει της συγκέντρωσης του συνδυασμού TNF- α + εμετίνη.

Ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης του προΤα(100-109) με ELISA



Διάγραμμα 3: Διάγραμμα συγκέντρωσης του προΤα(100-109) στα υπερκείμενα καλλιέργειών της σειράς H929 συναρτήσει της συγκέντρωσης του συνδυασμού TNF-α + εμετίνη.

Παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού των πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων (Q4) στις καλλιέργειες που επώαστηκαν με TNF-α + εμετίνη [6 ng/mL + 1,25 μg/mL (β) και 6 ng/mL + 2,5 μg/mL (γ)], με ποσοστά 31,7% και 40,5% αντίστοιχα, σε σχέση με τον μάρτυρα (α), όπου τα ποσοστά παρέμειναν χαμηλά, στο 3,6%. Επιπροσθέτως, ανάλογα αποτελέσματα λήφθηκαν και στην ποσοτική ανίχνευση του προΤα(100-109) καθώς σημειώθηκε βαθμιαία αύξηση της συγκέντρωσης του πεπτιδίου κατά 18,6% και 63,7% στα κύτταρα που επώαστηκαν με TNF-α + εμετίνη (6 ng/mL + 1,25 μg/mL και 6 ng/mL + 2,5 μg/mL) αντίστοιχα, σε σχέση με τον μάρτυρα.

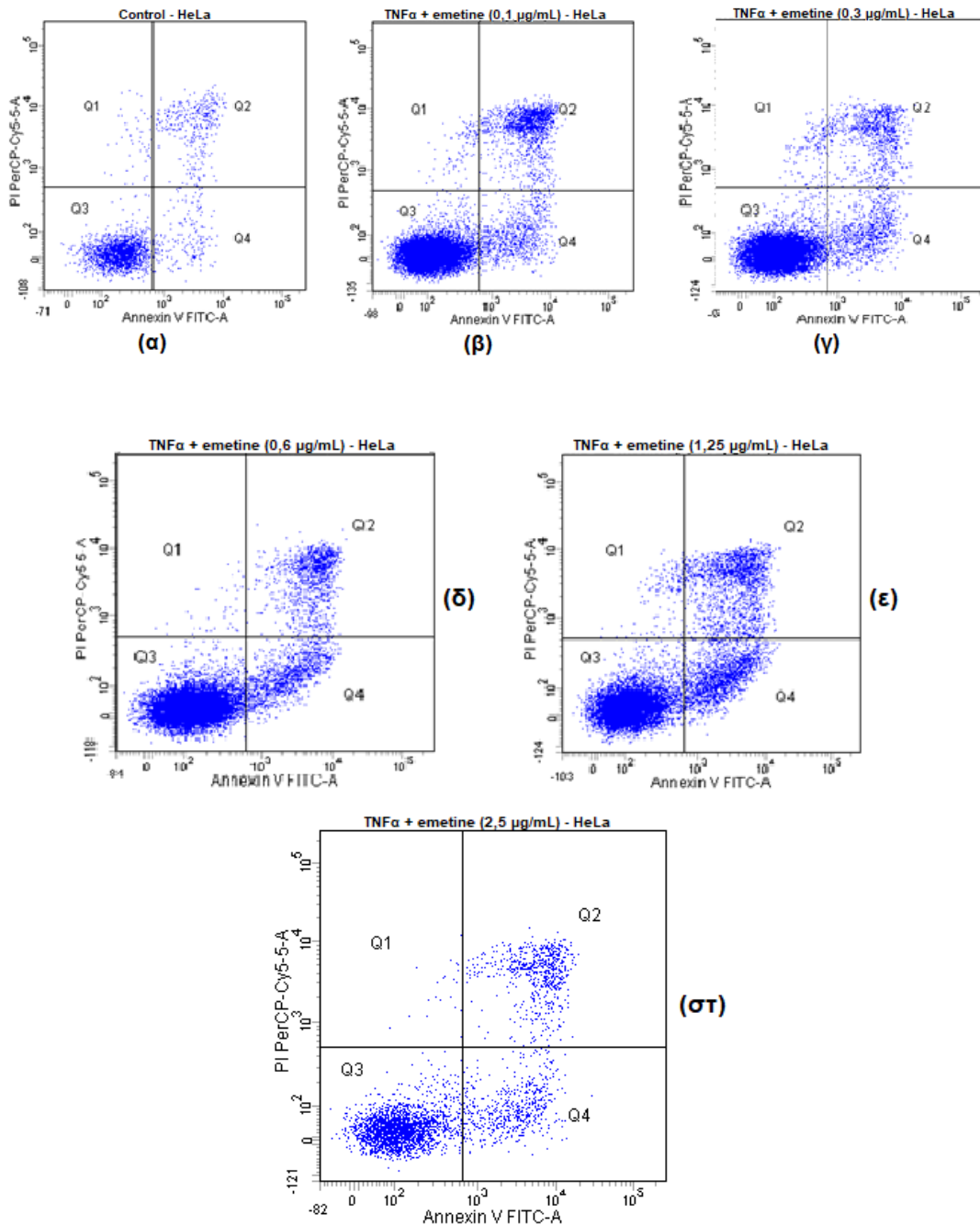
4.2.1.2 Ανάλυση των αποτελεσμάτων της καρκινικής σειράς HeLa μετά από χορήγηση του συνδυασμού TNF -α και εμετίνης

Έπειτα από επώαση των κυττάρων της καρκινικής σειράς HeLa με τον συνδυασμό TNF -α + εμετίνη, συγκέντρωσης 6 ng/mL + 0,15625/ 0,3125/ 0,625/ 1,25/ 2,5 μg/mL, για 4 ώρες εξάγαμε τα κάτωθι αποτελέσματα:

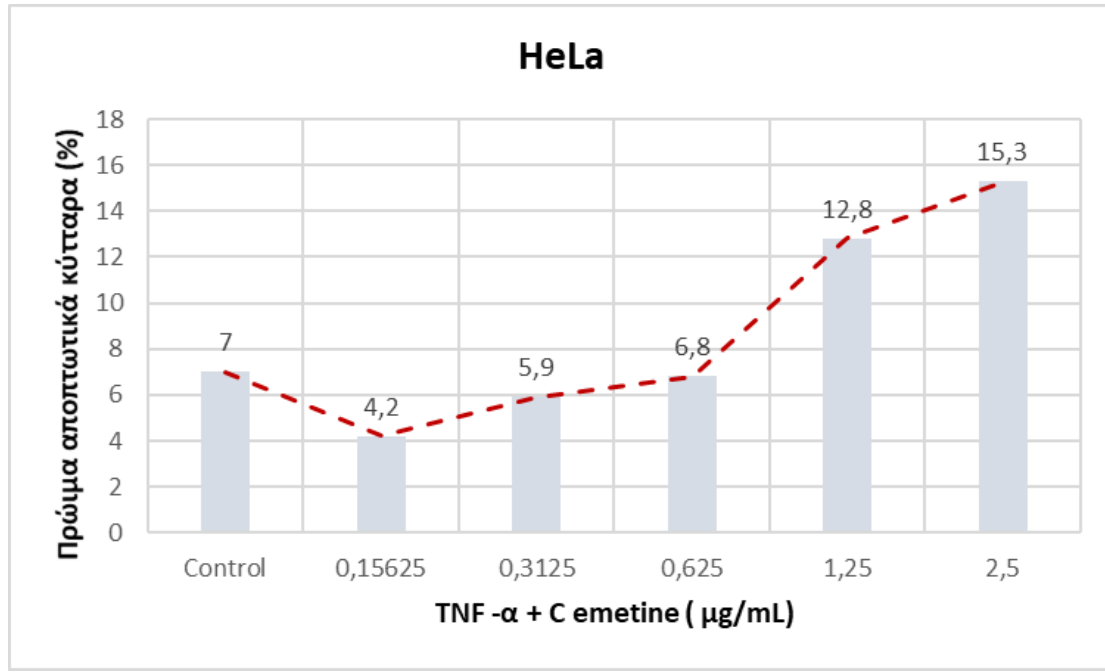
Προσδιορισμός επιπέδων απόπτωσης με κυτταρομετρία ροής

Πίνακας 5: Ποσοστιαίος προσδιορισμός πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων με χρήση κυτταρόμετρου (FACS).

	Annexin V- PI- (Q3)	Annexin V+ PI- (Q4)	Annexin V+ PI+ (Q2)	Annexin V- PI+ (Q1)
TNF -α (6 ng/mL) + C emetine (μg/mL)	Ζωντανά κύτταρα (%)	Πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα (%)	Όψιμα αποπτωτικά/ πρώιμα νεκρωτικά κύτταρα (%)	Νεκρωτικά κύτταρα (%)
Μάρτυρας (Control)	78,3	7,0	12,8	1,9
0,15625	86,0	4,2	9,1	0,6
0,3125	87,5	5,9	5,6	1,1
0,625	86,0	6,8	6,9	0,2
1,25	73,3	12,8	12,5	1,0
2,5	66,3	15,3	17,6	0,7

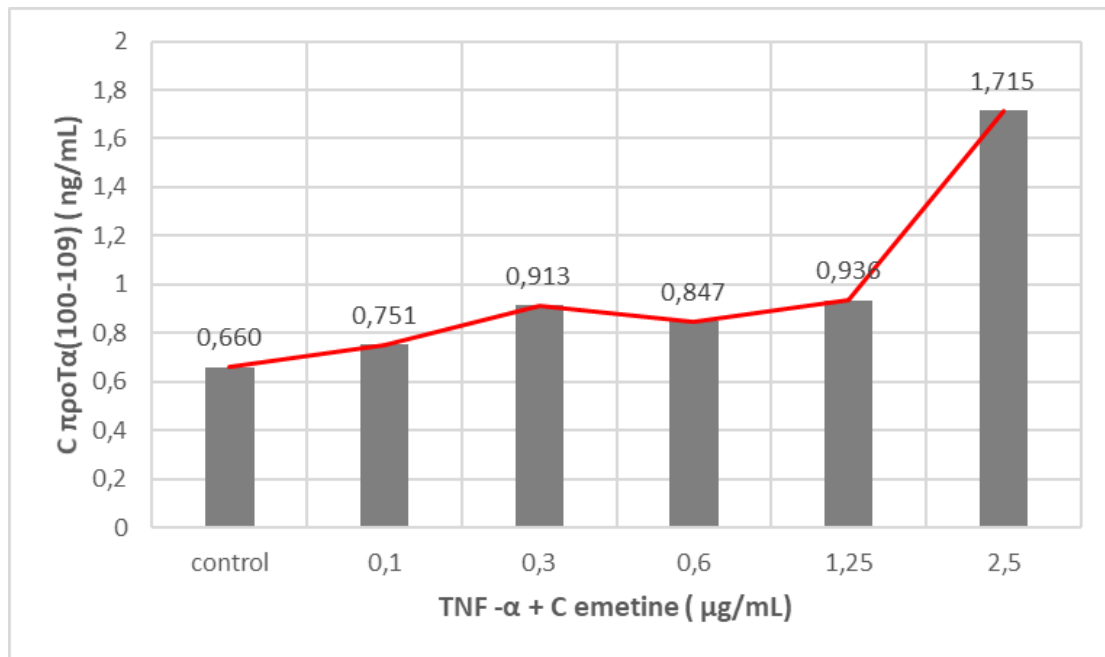


Εικόνα 27: Προσδιορισμός επαγωγής πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων της καρκινικής σειράς HeLa έπειτα από επώαση 4 ωρών με το συνδυασμό TNF -α + εμετίνη [6 ng/mL + 0,15625 μg/mL (β), 6 ng/mL + 0,3125 μg/mL (γ), 6 ng/mL + 0,625 μg/mL (δ), 6 ng/mL + 1,25 μg/mL (ε) και 6 ng/mL + 2,5 μg/mL (σ)]. Παρατηρείται αύξηση 15,3% των πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων στα κύτταρα που επωάστηκαν με TNF -α + εμετίνη (6 ng/mL + 2,5 μg/mL), σε σχέση με τον μάρτυρα (α) που τα ποσοστό παρέμεινε χαμηλό στο 4,7%.



Διάγραμμα 4: Διάγραμμα ποσοστού πρώμων αποπτωτικών κυττάρων της σειράς HeLa συναρτήσει της συγκέντρωσης του συνδυασμού TNF-α + εμετίνη.

Ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης του προΤα(100-109) με ELISA



Διάγραμμα 5: Διάγραμμα συγκέντρωσης του προΤα(100-109) στα υπερκείμενα καλλιεργειών της σειράς HeLa συναρτήσει της συγκέντρωσης του συνδυασμού TNF-α + εμετίνη.

Παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού των πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων (Q4) στις καλλιέργειες που επώαστηκαν με TNF-α + εμετίνη 6 ng/mL + 2,5μg/mL με ποσοστό 15,3% (στ) σε σχέση με τον μάρτυρα (α), όπου το ποσοστό παρέμεινε χαμηλό, στο 7,0%. Επιπροσθέτως, έπειτα από ποσοτική ανίχνευση του προΤα(100-109) με ELISA, σημειώθηκε σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης του πεπτιδίου κατά 159,7% στα κύτταρα που επώαστηκαν με TNF-α + εμετίνη (6 ng/mL + 2,5 μg/mL), σε σχέση με τον μάρτυρα.

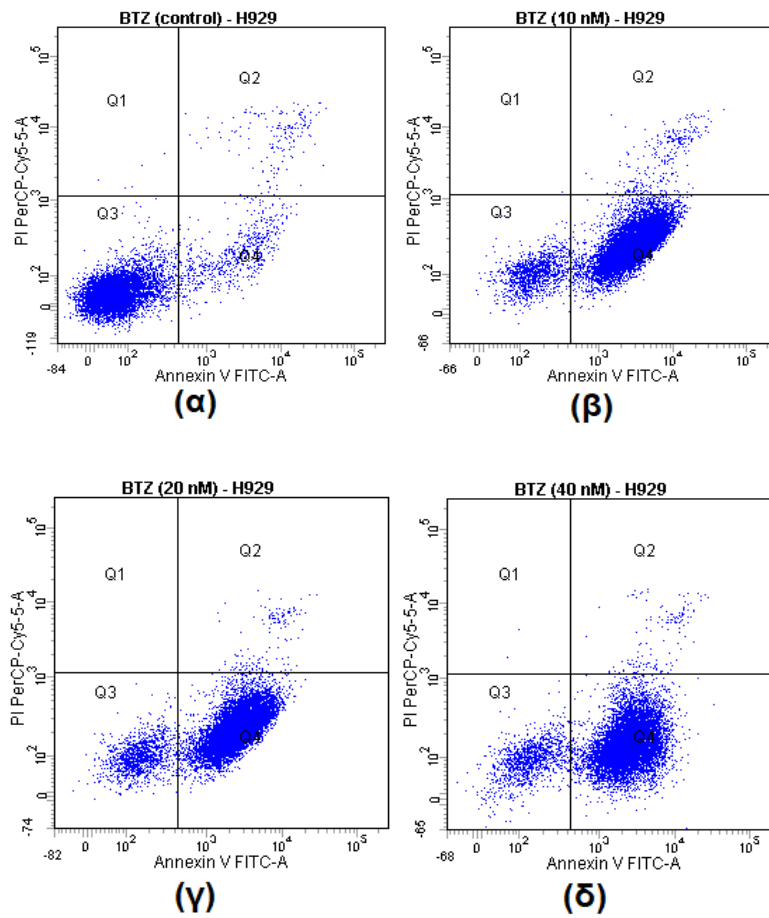
4.2.2 Ανάλυση αποτελεσμάτων κυττάρων της καρκινικής σειράς H929 που οδηγήθηκαν σε απόπτωση με χορήγηση του αναστολέα πρωτεασώματος bortezomib

Σύμφωνα με τις βιβλιογραφικές αναφορές, το IC₅₀ του bortezomib, δηλαδή η συγκέντρωση με την οποία πρέπει να επωαστούν για 72 ώρες κυτταρικές καλλιέργειες της σειράς H929 έτσι ώστε να οδηγηθεί σε θάνατο το 50% του πληθυσμού, έχει υπολογιστεί στα 2,47 nM (Ramakrishnan and Mager, 2018). Συνεπώς, για τους σκοπούς της μελέτης μας, κύτταρα της καρκινικής σειράς H929 επώαστηκαν για 48 ώρες με bortezomib συγκέντρωσης 10, 20 και 40 nM. Τα αποτελέσματα αναλύονται ακολούθως:

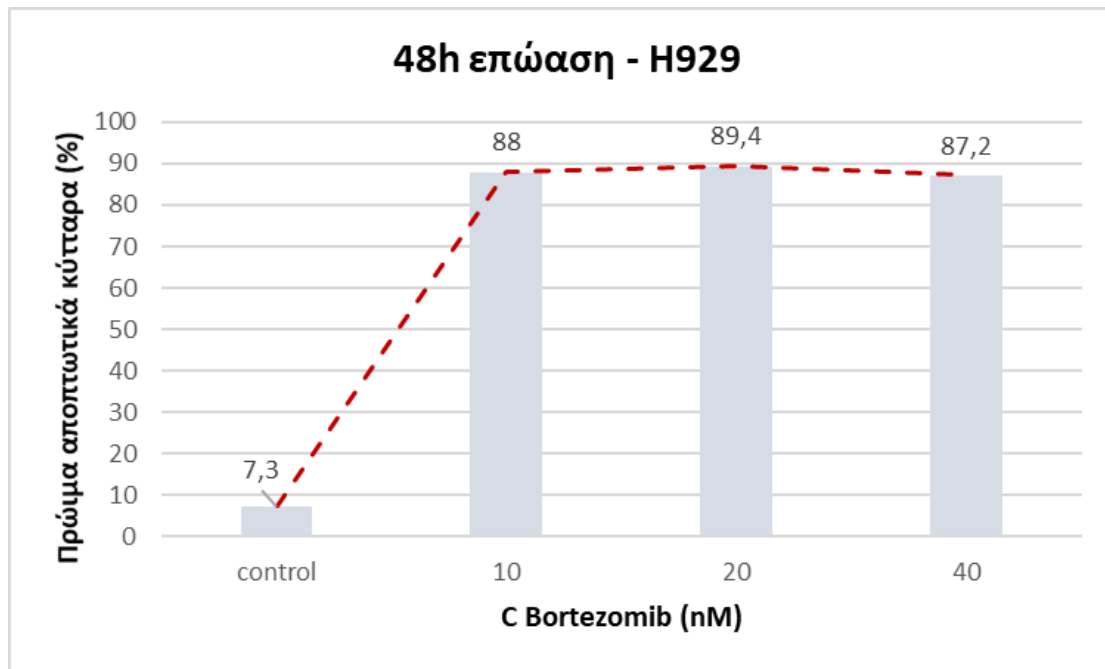
Προσδιορισμός επιπέδων απόπτωσης με κυτταρομετρία ροής

Πίνακας 6: Ποσοστιαίος προσδιορισμός των πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων με χρήση κυτταρομετρίας ροής (FACS)

	Annexin V- PI- (Q3)	Annexin V+ PI- (Q4)	Annexin V+ PI+ (Q2)	Annexin V- PI+ (Q1)
C bortezomib (nM)	Ζωντανά κύτταρα (%)	Πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα (%)	Όψιμα αποπτωτικά/ πρώιμα νεκρωτικά κύτταρα (%)	Νεκρωτικά κύτταρα (%)
Μάρτυρας (Control)	90,7	7,3	2,0	0,1
10	9,9	88,0	2,1	0,0
20	9,5	89,4	1,1	0,0
40	11,4	87,2	1,4	0,0

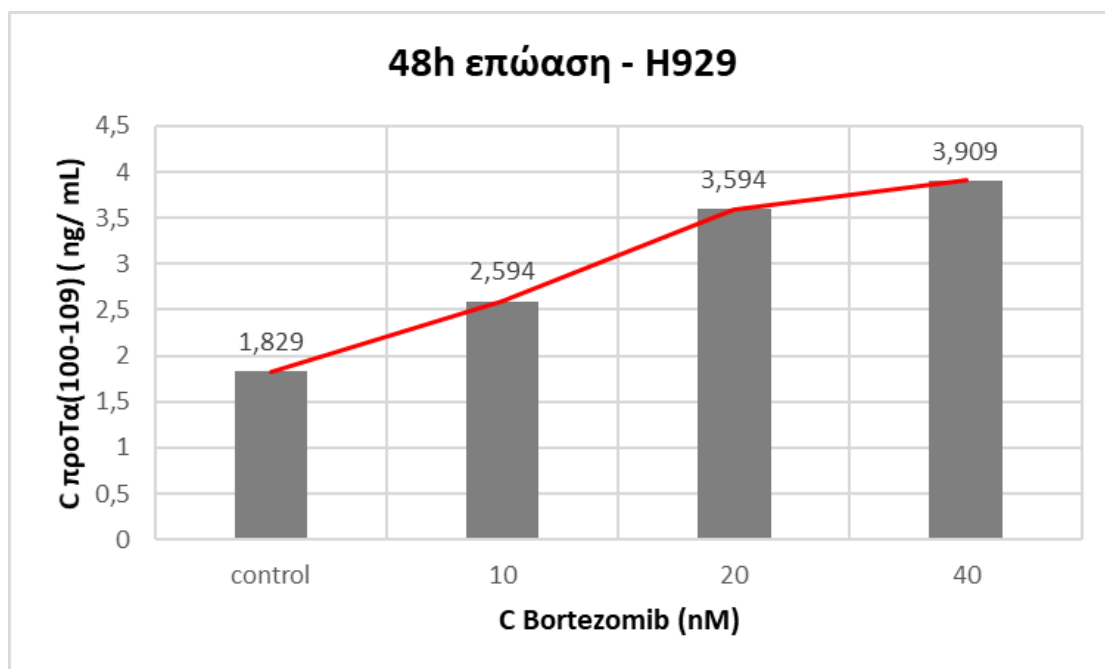


Εικόνα 28: Καλλιέργειες ανθρώπινων κυττάρων H929 επωάστηκαν για 48 ώρες με bortezomib συγκέντρωσης 10 (β), 20 (γ) και 40 (δ) και ελέγχθηκαν ως προς τα επίπεδα απόπτωσης με κυτταρομετρία ροής. Παρατηρείται παρόμοια αύξηση των ποσοστών των πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων στα κύτταρα που επωάστηκαν και στις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις της εν λόγω δραστικής ουσίας, με ποσοστά 88,0%, 89,4% και 87,2% αντίστοιχα, συγκριτικά με το ποσοστό του μάρτυρα(α) που ανέρχεται στο 7,3%.



Διάγραμμα 6: Διάγραμμα ποσοστού πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων της σειράς H929 συναρτήσει της συγκέντρωσης του αναστολέα πρωτεασώματος, bortezomib.

Ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης του προΤα(100-109) με ELISA



Διάγραμμα 7: Διάγραμμα συγκέντρωσης του προΤα(100-109) στα υπερκείμενα κυττάρων της σειράς H929 συναρτήσει της συγκέντρωσης του αναστολέα πρωτεασώματος, bortezomib.

Παρατηρήθηκε παρόμοια αύξηση του αριθμού των πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων (Q4) στα κύτταρα που επώαστηκαν με bortezomib και των τριών συγκεντρώσεων (10 (28β), 20 (28γ) και 40 (28δ), με το μέσο ποσοστό απόπτωσης να είναι 88,2%, σε σχέση με τον μάρτυρα (28α), όπου τα ποσοστά παρέμειναν χαμηλά, στο 7,3%. Αντιθέτως, στα αποτελέσματα που λήφθηκαν στην ποσοτική ανίχνευση του προΤα(100-109), σημειώθηκε βαθμιαία αύξηση της συγκέντρωσης του πεπτιδίου κατά 41,81%, 96,5% και 113,7% στα κύτταρα που επώαστηκαν με bortezomib 10, 20 και 40 nM αντίστοιχα, σε σχέση με τον μάρτυρα.

4.2.3 Ανάλυση αποτελεσμάτων κυττάρων της καρκινικής σειράς H929 που οδηγήθηκαν σε απόπτωση έπειτα από γ -ακτινοβολία

Δεδομένης της ανάγκης για περαιτέρω μελέτη της συσχέτισης της συγκέντρωσης του προΤα(100-109) με την ανοσογονικού τύπου απόπτωση, θελήσαμε να επάγουμε αποπτωτικό θάνατο σε κύτταρα της καρκινικής σειράς H929 μέσω έκθεσης αυτών σε ακτίνες-γ. Όπως αναλύθηκε στην παράγραφο 1.5.2.2, η αλληλεπίδραση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας με τη βιολογική ύλη έχει ως συνέπεια την πρόκληση ποικίλων βλαβών στο DNA των κυττάρων. Από αυτές, οι πιο σοβαρές είναι οι DSBs, οι οποίες λόγω της πολυπλοκότητάς τους, όταν δε μπορούν να επιδιορθωθούν από τους αντίστοιχους μηχανισμούς των κυττάρων, οδηγούν τα κύτταρα σε απόπτωση.

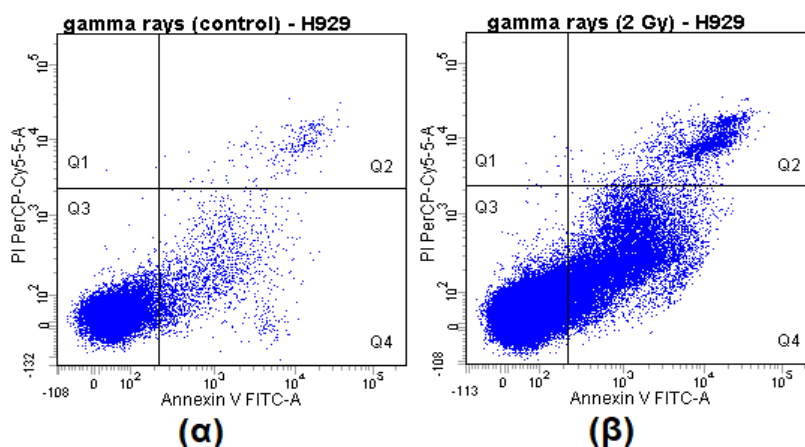
Για τους σκοπούς της μελέτης αυτής, στηριζόμενοι στη βιβλιογραφία (Banfalvi et al., 2007; Boutis et al., 2006; Pan et al., 2019; Zhang et al., 2010), εκθέσαμε κυτταρικές καλλιέργειες της σειράς H929 σε δόσεις των 2, 5 και 10 Gy και προσδιορίσαμε ποσοστιαία τα πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα με κυτταρομετρία ροής σύμφωνα με την μέθοδο 3.7, ενώ η ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης του προΤα(100-109) στα υπερκείμενα των εν λόγω κυτταρικών καλλιεργειών πραγματοποιήθηκε με *in-house* ELISA του εργαστηρίου σύμφωνα με την μέθοδο 3.8.

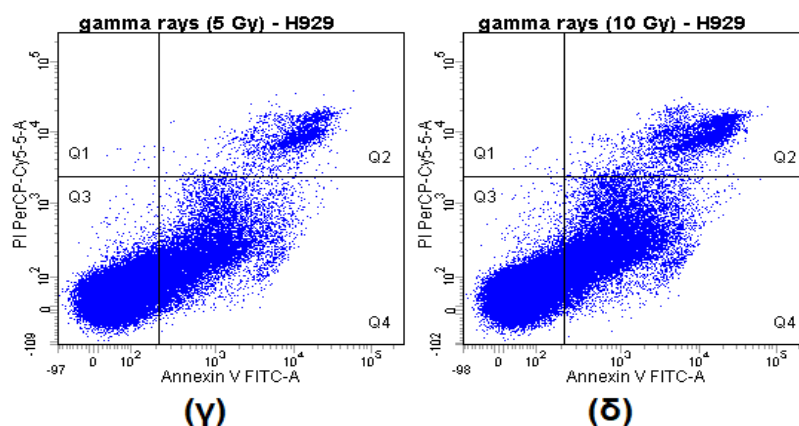
Συγκεντρωτικά, έπειτα από επώαση 48h/ 72h των κυττάρων της καρκινικής σειράς H929 μετά από γ-ακτινοβολία με δόσεις 2, 5 και 10 Gy εξάγαμε τα κάτωθι αποτελέσματα έπειτα από χρήση κυτταρομετρίας ροής:

Προσδιορισμός επιπέδων απόπτωσης με κυτταρομετρία ροής

Πίνακας 7: Ποσοστιαίος προσδιορισμός των πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων 48 ώρες μετά την γ -ακτινοβόληση, με χρήση κυτταρομετρίας ροής (FACS).

48h μετά την ακτινοβόληση	Annexin V- PI- (Q3)	Annexin V+ PI- (Q4)	Annexin V+ PI+ (Q2)	Annexin V- PI+ (Q1)
Δόση γ - ακτινοβόλησης	Ζωντανά κύτταρα (%)	Πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα (%)	Όψιμα αποπτωτικά/ πρώιμα νεκρωτικά κύτταρα (%)	Νεκρωτικά κύτταρα (%)
Μάρτυρας (Control)	89,7	9,1	1,3	0,0
2	82,6	15,2	2,2	0,0
5	82,7	14,7	2,6	0,0
10	75,3	19,9	4,8	0,0

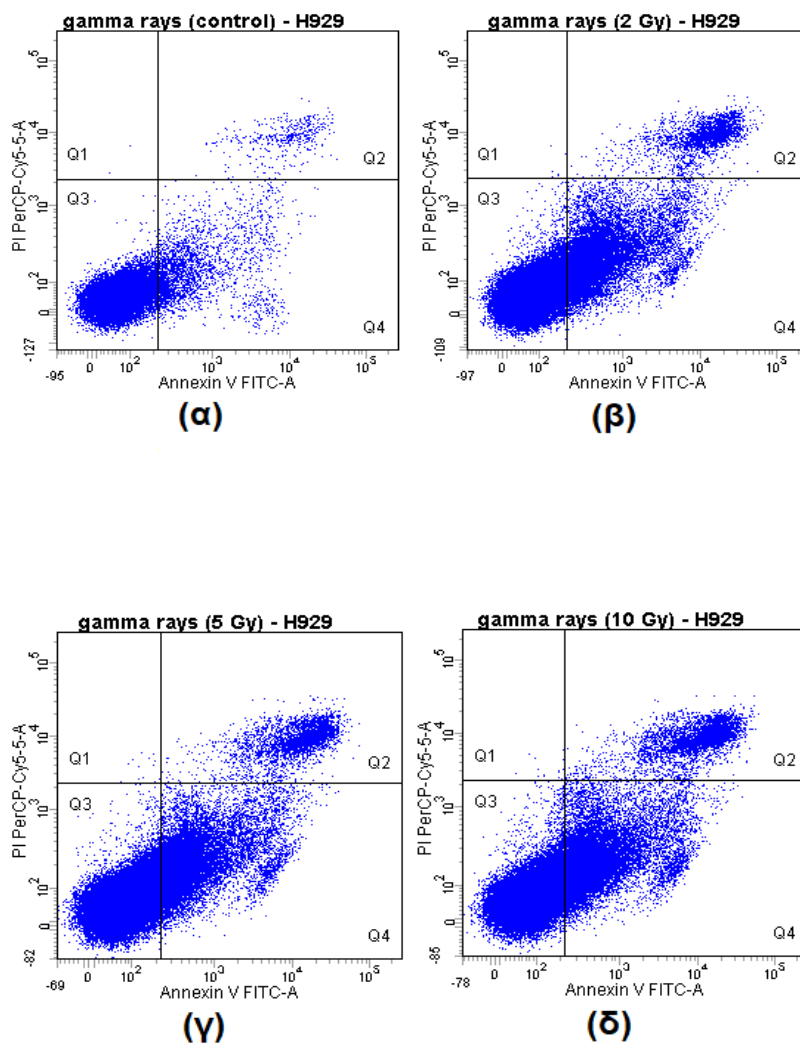




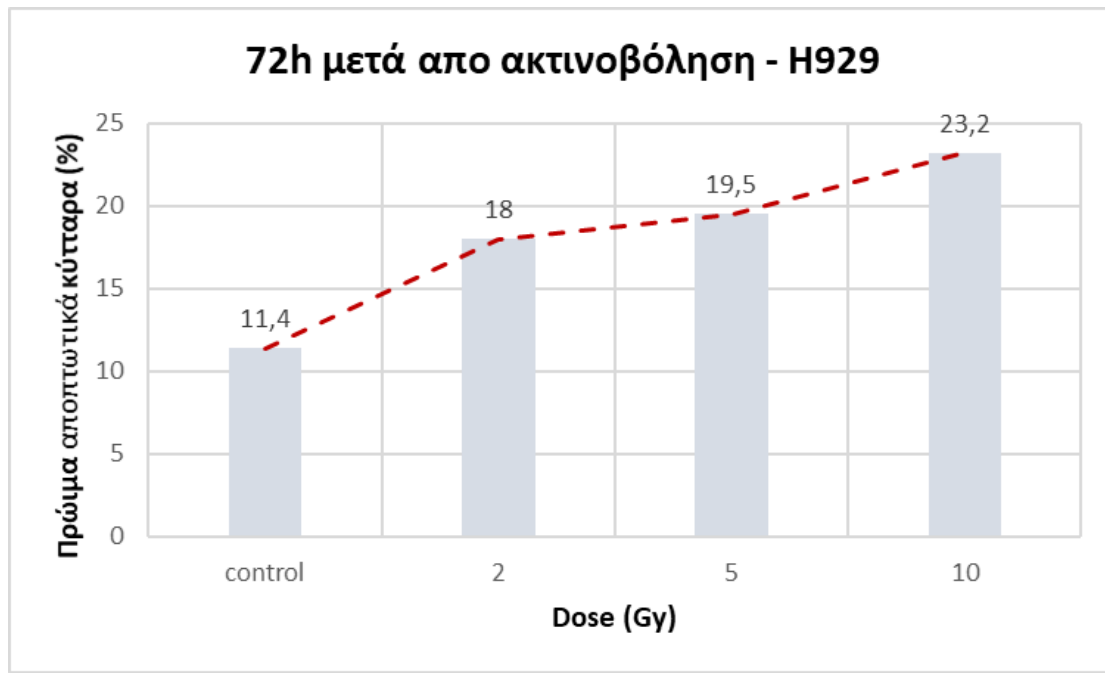
Εικόνα 29: Καλλιέργειες ανθρώπινων κυττάρων H929 εκτέθηκαν σε αυξανόμενες δόσεις ακτίνων γ , δόσεων 2 (β), 5 (γ) και 10 (δ) Gy και 48 ώρες μετά ελέγχθηκαν ως προς τα επίπεδα απόπτωσης με κυτταρομετρία ροής. Παρατηρείται αύξηση 19,9% των πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων στα κύτταρα που ακτινοβολήθηκαν με ακτίνες γ δόσης 10 Gy, σε σχέση με τον μάρτυρα (α) που το ποσοστό υπολογίστηκε στο 9,1%.

Πίνακας 8: Ποσοστιαίος προσδιορισμός των πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων 72 ώρες μετά την γ -ακτινοβολήση, με χρήση κυτταρομετρίας ροής (FACS).

72h μετά την ακτινοβολήση	Annexin V- PI- (Q3)	Annexin V+ PI- (Q4)	Annexin V+ PI+ (Q2)	Annexin V- PI+ (Q1)
Δόση γ - ακτινοβολήσης	Ζωντανά κύτταρα (%)	Πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα (%)	Όψιμα αποπτωτικά/ πρώιμα νεκρωτικά κύτταρα (%)	Νεκρωτικά κύτταρα (%)
Μάρτυρας (Control)	86,7	11,4	2,0	0,0
2	78,6	18,0	3,4	0,0
5	76,0	19,5	4,5	0,0
10	70,9	23,2	5,9	0,0



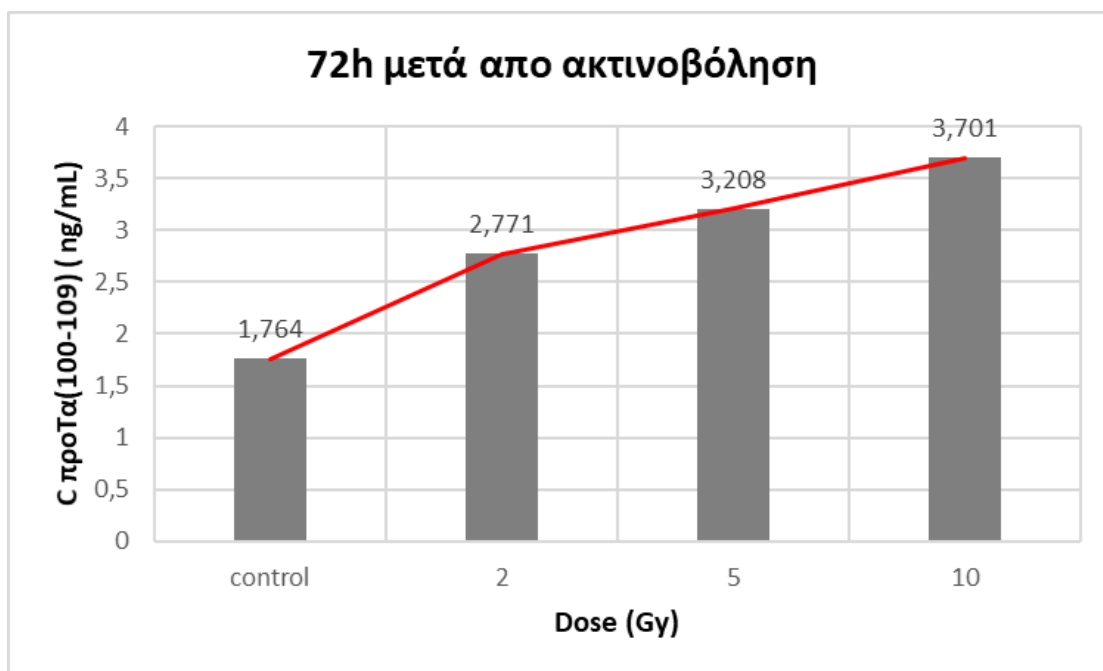
Εικόνα 30: Καλλιέργειες ανθρώπινων κυττάρων H929 εκτέθηκαν σε αυξανόμενες δόσεις ακτίνων γ , δόσεων 2 (β), 5 (γ) και 10 (δ) Gy και 72 ώρες μετά ελέγχθηκαν ως προς τα επίπεδα απόπτωσης με κυτταρομετρία ροής. Παρατηρείται αύξηση 23,2% των πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων στα κύτταρα που ακτινοβολήθηκαν με ακτίνες γ δόσης 10 Gy, σε σχέση με τον μάρτυρα (α) που το ποσοστό υπολογίστηκε στο 11,4%.



Διάγραμμα 8: Διάγραμμα ποσοστού πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων της σειράς H929 συναρτήσει της δόσης γ- ακτινοβολίας.

Σε αυτό το σημείο επιλέξαμε να προσδιορίσουμε τα επίπεδα συγκέντρωσης του προΤα(100-109) στα υπερκείμενα των καλλιιεργειών, 72 ώρες μετά την έκθεσή τους στις ακτινοβολίες γ-. Επομένως εξάγαμε να παρακάτω αποτελέσματα:

Ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης του προΤα(100-109) με ELISA



Διάγραμμα 9: Διάγραμμα συγκέντρωσης του προΤα(100-109) στα υπερκείμενα των κυττάρων H929, 72 ώρες μετά την γ- ακτινοβόληση, συναρτήσει των δόσεων της ακτινοβολίας.

Παρατηρήθηκε παρόμοια αύξηση του αριθμού των πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων (Q4) 48 ώρες μετά από τη γ- ακτινοβολία στις δόσεις των 2 (29β) και 5 (29γ) Gy με ποσοστά 15,2% και 14,7% αντίστοιχα, σε σχέση με τον μάρτυρα (29α), όπου τα ποσοστά παρέμειναν σχετικά χαμηλά, στο 9,1%, ενώ για τα κύτταρα που ακτινοβολήθηκαν με 10 Gy, το ποσοστό απόπτωσης έφτασε το 19,9%. Παραπλήσια αποτελέσματα λάβαμε και 72 ώρες μετά την ακτινοβολία καθώς παρατηρήθηκε σχεδόν ίδια αύξηση του αριθμού των πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων (Q4) στις δόσεις των 2 (30β) και 5 (30γ) Gy με ποσοστά 18% και 19,5% αντίστοιχα, σε σχέση με τον μάρτυρα (30α), όπου τα ποσοστά παρέμειναν σχετικά χαμηλά, στο 11,4%, ενώ για τα κύτταρα που ακτινοβολήθηκαν με 10 Gy, το ποσοστό απόπτωσης έφτασε το 23,2%. Επιπροσθέτως, ανάλογα αποτελέσματα λήφθηκαν και στην ποσοτική ανίχνευση του προΤα(100-109) καθώς σημειώθηκε βαθμιαία αύξηση της συγκέντρωσης του πεπτιδίου κατά 57,1%, 81,6% και 109,8% στα κύτταρα που ακτινοβολήθηκαν με 2, 5 και 10 Gy αντίστοιχα, σε σχέση με τον μάρτυρα.

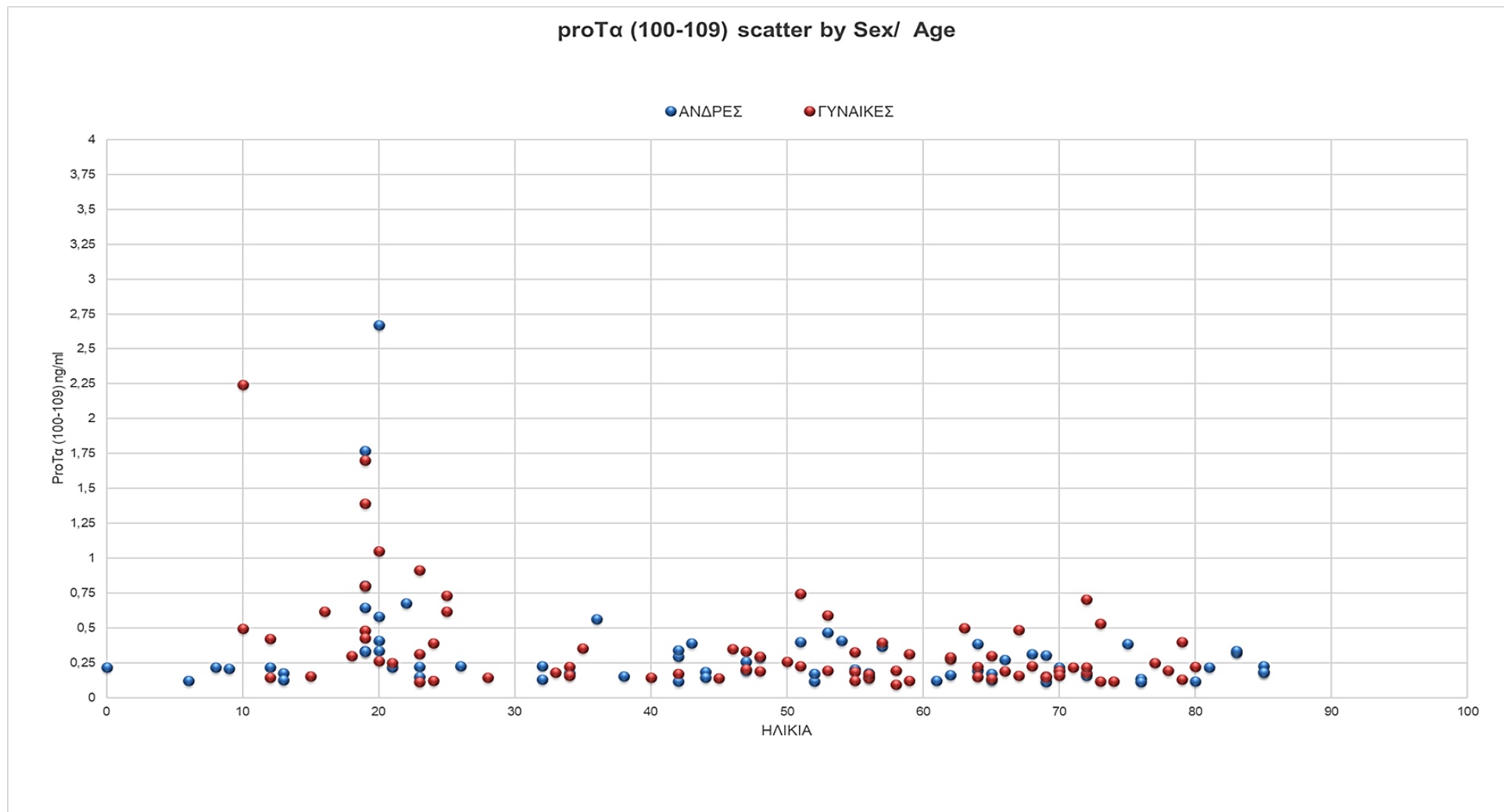
4.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του προΤα(100-109) στο πλάσμα υγιών δοτών και ασθενών με ΠΜ μετά από θεραπευτική χορήγηση αναστολέα πρωτεασώματος bortezomib

4.3.1 Ανάλυση αποτελεσμάτων δειγμάτων υγιών δοτών

Για την βέλτιστη δυνατή ποσοτικοποίηση και συσχέτιση του προΤα(100-109) στο πλάσμα ασθενών, έπειτα από χορήγηση bortezomib, κρίθηκε αναγκαία η μέτρηση και η στατιστική ανάλυση του εν λόγω δεκαπεπτιδίου στο πλάσμα υγιών δοτών. Για το σκοπό αυτό, έγινε δειγματοληψία 147 υγιών ατόμων ώστε να προσδιοριστούν τα φυσιολογικά επίπεδα συγκέντρωσης του προΤα(100-109). Μετά από αφαίρεση των ακραίων τιμών, έγινε στατιστική επεξεργασία ανά φύλο και ηλικία με τα αποτελέσματα να συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 9: Επεξεργασία δειγμάτων 147 υγιών δοτών για το προσδιορισμό των φυσιολογικών τιμών συγκέντρωσης του προΤα(100-109) στο πλάσμα.

Πληθυσμός	Πλήθος δοτών	Μέση τιμή συγκέντρωσης προΤα(100-109) (ng /mL)
Σύνολο	147	0,342
Άνδρες	68	0,344
Γυναίκες	79	0,343



Διάγραμμα 12: Κατανομή φυσιολογικών τιμών του proTa(100-109) στο πλάσμα υγιών ατόμων ανα φύλο και ηλικία

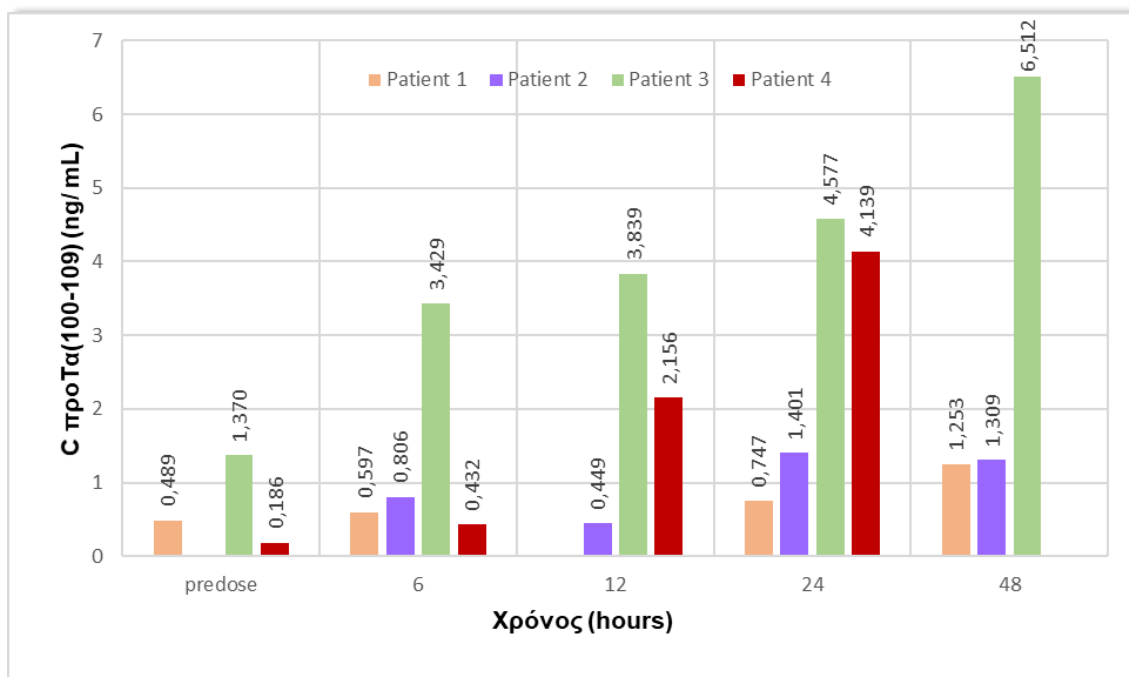
4.3.2 Ανάλυση αποτελεσμάτων δειγματοληψίας από ασθενείς που τους χορηγήθηκε θεραπευτικά ο αναστολέας πρωτεασώματος, bortezomib

Όπως έχει προαναφερθεί, σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η επιβεβαίωση της συσχέτισης της συγκέντρωσης του προΤα(100-109) με τα επίπεδα αποπτωτικού θανάτου. Συνεπώς, προχωρήσαμε σε μια σειρά *ex vivo* πειραμάτων θέλοντας να υπολογίσουμε την συγκέντρωση του δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109) στο πλάσμα τεσσάρων ασθενών που έλαβαν θεραπευτικά τον αναστολέα πρωτεασώματος, bortezomib. Η δειγματοληψία έγινε πριν και 6, 12, 24 και 48 ώρες μετά τη χορήγηση του bortezomib με σκοπό την βαθύτερη κινητική μελέτη της δραστηριότητας του συγκεκριμένου φαρμακευτικού σκευάσματος.

Προσδιορισμός επιπέδων απόπτωσης με κυτταρομετρία ροής

Πίνακας 10: Ποσοτικός προσδιορισμός του προΤα(100-109) στο πλάσμα τεσσάρων ασθενών μετά από χορήγηση του αναστολέα πρωτεασώματος, bortezomib. Η δειγματοληψία έγινε πριν και 6, 12, 24 και 48 ώρες μετά την χορήγηση του εν λόγω φαρμακευτικού σκευάσματος.

Χρόνος δειγματοληψίας (ώρες)	C προΤα(100-109) (ng/mL)			
	Ασθενής 1	Ασθενής 2	Ασθενής 3	Ασθενής 4
predose	0,489	-	1,371	0,186
6	0,597	0,806	3,429	0,432
12	-	0,449	3,839	2,156
24	0,747	1,401	4,577	4,139
48	1,253	1,309	6,512	-



Διάγραμμα 13: Κινητική μελέτη της συγκέντρωσης του δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109) στο πλάσμα ασθενών με ΠΜ μετά από χορήγηση bortezomib. Οι δειγματοληψίες έγιναν πριν (predose) και 6, 12, 24 και 48 ώρες μετά τη χορήγηση bortezomib. Σε όλους τους ασθενείς, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις του δεκαπεπτιδίου παρατηρήθηκαν στις 24 και 48 ώρες μετά τη χορήγηση bortezomib.

Σύμφωνα με την παραπάνω ανάλυση των πειραματικών δεδομένων έπειτα από τον ποσοτικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης του προΤα(100-109) στο πλάσμα ασθενών με ΠΜ στους οποίους χορηγήθηκε θεραπευτικά ο αναστολέας πρωτεασώματος, bortezomib, παρατηρούνται υψηλές τιμές συγκεντρώσεων και στους τέσσερις ασθενείς κυρίως στις 24 και 48 ώρες μετά την χορήγηση του εν λόγω φαρμάκου. Πιο συγκεκριμένα, σημειώθηκε αύξηση ως και 375,3% (ασθενής #3), συγκριτικά με την αρχική συγκέντρωση του δεκαπεπτιδίου στο πλάσμα, πριν τη χορήγηση bortezomib.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η προΤα είναι όξινο πολυπεπίδιο που εντοπίζεται σε όλα τα κύτταρα των θηλαστικών, εδρεύει στον πυρήνα και παρουσιάζει υψηλή συντηρητικότητα. Βρίσκεται σε μεγάλη συγκέντρωση στα κύτταρα του θύμου αδένου και αποτελεί ένα από τα κυριότερα δραστικά συστατικά του TFV. Στον άνθρωπο αποτελείται από 109-110 αμινοξικά κατάλοιπα.

Ύστερα από πολυετείς έρευνες πάνω στη δράση και το ρόλο της, έχειδειχθεί ότι η προΤα παίζει κρίσιμο ρόλο τόσο ενδοκυτταρικά όσο και εξωκυτταρικά. Ενδοκυτταρικά, εμπλέκεται σε διεργασίες όπως ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση αποτελώντας κομβικό παράγοντα για την ανάπτυξη και την επιβίωση του κυττάρου, ενώ έξω από αυτό, συμμετέχει σε φαινόμενα κυτταρομεσολαβητικής ανοσίας. Επιπροσθέτως, έχειδειχθεί ότι το καρβοξυτελικό άκρο της, το δεκαπεπίδιο προΤα(100-109), στο οποίο εντοπίζεται το ανοσοδραστικό της κέντρο, αποκόπτεται και εξωκυττάρωνεται κατά τη διαδικασία της απόπτωσης, μετά από τη δράση των ενεργοποιημένων κασπασών και κυρίως της κασπάσης 3 (Evstafieva et al., 2003).

Τόσο το δεκαπεπίδιο προΤα(100-109) όσο και το ακέραιο μόριο παρουσιάζουν σημαντική ανοσοενισχυτική δράση, που σχετίζεται, μεταξύ άλλων και με τη διέγερση των διάφορων λευκοκυτταρικών υποπληθυσμών (Ioannou et al., 2012) καθώς και με την ωρίμανση και την αύξηση της ανοσοϊκανότητας των δενδριτικών κυττάρων, τα οποία διαφοροποιούνται από μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος σηματοδοτώντας μέσω του TLR-4 (Ioannou et al., 2013).

Με βάση την αποδεδειγμένη εξωκυττάρωση του προΤα(100-109) στα κύτταρα που οδηγούνται σε απόπτωση, καθώς επίσης και με βάση προηγούμενα *in vitro* πειράματα του εργαστηρίου μας, που κατέδειξαν τη συσχέτιση της αύξησης της συγκέντρωσης του προΤα(100-109) με τη επαγωγή αποπτωτικού θανάτου, ως άμεση συνέπεια της ενδοκυτταρικής παραγωγής και εξωκυττάρωσης του δεκαπεπιδίου (Samara et al., 2017b), θελήσαμε να διερευνήσουμε τη δυνατότητα της χρήσης του ως ενός εν δυνάμει βιοδείκτη της δραστηριότητας χημειοθεραπειών ή ακτινοθεραπειών.

Η ερευνητική μας μελέτη χωρίστηκε σε δύο βασικές κατευθύνσεις:

1. τη συσχέτιση της συγκέντρωσης του προΤα(100-109) με τα ποσοστά απόπτωσης καρκινικών κυτταρικών σειρών, η οποία επήλθε τόσο με χορήγηση χημικών παραγόντων και φαρμακευτικών σκευασμάτων, όσο και με έκθεση των κυττάρων σε ακτίνες γ
2. την *ex vivo* ανίχνευση του προΤα(100-109) στο πλάσμα ασθενών που τους χορηγήθηκε θεραπευτικά ο αναστολέας πρωτεασώματος, bortezomib

Σε πρώτο στάδιο, προσπαθήσαμε *in vitro* να προσδιορίσουμε ποσοτικά τη συγκέντρωση του προΤα(100-109) στα υπερκείμενα καλλιέργειών των καρκινικών σειρών με χρήση της *in-house* ELISA που αναπτύχθηκε από την ομάδα του εργαστηρίου μας και να τα συσχετίσουμε με το ποσοστό των πρώιμων αποπτωτικών

κυττάρων με χρήση κυτταρομετρίας ροής. Συγκεκριμένα, καρκινικά κύτταρα των σειρών H929 και HeLa επώαστηκαν για 6 ώρες με το συνδυασμό των χημικών παραγόντων TNF- α και εμετίνης σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται ως εξής:

- Στις κυτταρικές καλλιέργειες της σειράς H929, παρατηρήθηκε βαθμιαία αύξηση της συγκέντρωσης του προΤα(100-109) στα κύτταρα που τους χορηγήθηκε ο συνδυασμός TNF- α + εμετίνη σε συγκεντρώσεις 6 ng/mL + 1,25 μ g/mL και 6 ng/mL + 2,5 μ g/mL κατά 18,6% και 63,7% αντίστοιχα, ως προς τον μάρτυρα. Ταυτόχρονα, τα ποσοστά των πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων στις ίδιες συγκεντρώσεις του συνδυασμού TNF- α + εμετίνης, προσδιορίστηκαν στα 31,7% και 40,5% αντίστοιχα, συγκριτικά με το χαμηλό ποσοστό του μάρτυρα, της τάξεως του 3,6%.
- Στις κυτταρικές καλλιέργειες της σειράς HeLa παρατηρήθηκε εξίσου σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης του δεκαπεπτιδίου έπειτα από επώαση με το συνδυασμό TNF- α + εμετίνη. Αναλυτικότερα, στα υπερκείμενα καλλιεργειών της συγκεκριμένης σειράς που επώαστηκαν με TNF- α + εμετίνη 6 ng/mL + 2,5 μ g/mL, ανιχνεύτηκε 159,7% υψηλότερη συγκέντρωση του προΤα(100-109) σε σχέση με τον μάρτυρα. Η παρατήρηση αυτή μπορεί να συσχετιστεί με το αντίστοιχο ποσοστό πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων που υπολογίστηκε στο 15,3% σε σύγκριση με τον μάρτυρα παρέμεινε χαμηλό, στο 7,0%.

Σε δεύτερο στάδιο, θελήσαμε να προσδιορίσουμε τη συγκέντρωση του προΤα(100-109) σε κύτταρα της σειράς H929, έπειτα από χορήγηση και 48/ωρη επώαση με τη δραστική ουσία, bortezomib, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Παρατηρήθηκε βαθμιαία αύξηση της συγκέντρωσης του πεπτιδίου κατά 41,81%, 96,5% και 113,7% στα κύτταρα που επώαστηκαν με bortezomib 10, 20 και 40 nM αντίστοιχα, σε σχέση με τον μάρτυρα, γεγονός το οποίο φαίνεται να συσχετίζεται με τα υψηλά ποσοστά πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων που σημειώθηκαν.

Σε επόμενη φάση, για να μελετήσουμε περαιτέρω την πιθανή συσχέτιση των αυξημένων επιπέδων συγκέντρωσης του δεκαπεπτιδίου με την αύξηση του ποσοστού των πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων, θελήσαμε να διερευνήσουμε αν τα επίπεδα απόπτωσης καρκινικών κυττάρων μπορούν να συσχετιστούν με τη συγκέντρωση του προΤα(100-109), έπειτα από γ -ακτινοβολία. Είναι γνωστό ότι η ιοντίζουσα ακτινοβολία επιδρά στα κύτταρα, οδηγώντας τόσο σε σχηματισμό ελεύθερων ριζών (κυρίως OH \cdot και H $_2$ O $_2$), όσο και σε επαγωγή δίκλωνων θραύσεων του DNA (DSBs). Στην ακτινοθεραπεία οι DSBs είναι οι πλέον επιθυμητές, καθώς έχει δειχθεί ότι επάγουν την κυτταρική γήρανση η οποία αλλοιώνει την κυτταρική λειτουργία με τελικό αποτέλεσμα την ανοσογονικού τύπου απόπτωση. Πιο συγκεκριμένα, κύτταρα της σειράς H929 εκτέθηκαν σε γ -ακτινοβολία δόσης 2, 5 και 10 Gy με τη βοήθεια της

Δρ. Γεωργίας Τερζούδη του Ινστιτούτου Υγειοφυσικής & Περιβαλλοντικής Υγιεινής ΠΠΤ-Α, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος». Παρατηρήθηκε βαθμιαία αύξηση της συγκέντρωσης του πεπτιδίου, 72 ώρες μετά την ακτινοβολήση, κατά 57,1%, 81,6% και 109,8% στα κύτταρα που ακτινοβολήθηκαν με 2, 5 και 10 Gy αντίστοιχα, σε σχέση με τον μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αυτά είναι συγκρίσιμα με τα αντίστοιχα ποσοστά των πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων στις αντίστοιχες δόσεις, γεγονός που πιθανώς να δείχνει πιθανή συσχέτιση της συγκέντρωσης του δεκαπεπτιδίου με την επαγωγή ανοσογονικού τύπου απόπτωση.

Μετά τις προαναφερθείσες *in vitro* μελέτες, προχωρήσαμε σε *ex vivo* διερεύνηση της υπόθεσής μας, συλλέγοντας 147 δείγματα υγιών δοτών (68 ανδρών, 79 γυναικών), προκειμένου να μετρήσουμε τα επίπεδα του προΤα(100-109) και να καθορίσουμε τις φυσιολογικές τιμές. Μετά από στατιστική ανάλυση και αφαίρεση των ακραίων τιμών, η μέση συγκέντρωση του προΤα(100-109) στο σύνολο του πληθυσμού υπολογίστηκε στα 0,342 ng/mL.

Εν συνεχεία, για να επιβεβαιώσουμε τη συσχέτιση της συγκέντρωσης του δεκαπεπτιδίου με τα ποσοστιαία επίπεδα αποπτωτικών κυττάρων που παρατηρήθηκε στα *in vitro* πειράματά μας, συλλέξαμε δείγματα από τέσσερις ασθενείς με ΠΜ, με τη βοήθεια του Αν. Καθηγητή Θεραπευτικής-Παθολογίας/Ογκολογίας Δρ. Ευστάθιου Καστρίτη, από την Αιματολογική/Ογκολογική Μονάδα της Θεραπευτικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΠΓΝΑ «Αλεξάνδρα»). Συγκεκριμένα, προσδιορίσαμε ποσοτικά τη συγκέντρωση του προΤα(100-109) στο πλάσμα τεσσάρων ασθενών πριν και μετά τη θεραπευτική χορήγηση bortezomib, μιας δραστικής ουσίας/ αναστολέα πρωτεασώματος που έχει βρεθεί ότι επάγει τον ανοσογονικού τύπου κυτταρικό, αποπτωτικό θάνατο. Προκειμένου να κάνουμε μια κινητική μελέτη, η δειγματοληψία έγινε πριν και 6, 12, 24 και 48 ώρες μετά τη χορήγηση bortezomib. Τα αποτελέσματα έδειξαν αξιοσημείωτη αύξηση του δεκαπεπτιδίου, ιδιαίτερα 24 και 48 ώρες μετά τη χορήγηση, υποδηλώνοντας έτσι πιθανή συσχέτιση των επιπέδων της ανοσογονικού τύπου απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων με τα επίπεδα συγκέντρωσης του δεκαπεπτιδίου, γεγονός που πιθανώς να σημαίνει ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία με bortezomib.

Βάσει των παραπάνω, καταδεικνύεται πιθανή συσχέτιση της συγκέντρωσης του προΤα(100-109) με την επαγωγή ανοσογονικού τύπου απόπτωσης, τόσο στα υπερκείμενα καλλιέργειών καρκινικών σειρών όσο και στο πλάσμα ασθενών με ΠΜ. Η περαιτέρω μελέτη της συσχέτισης της συγκέντρωσης του προΤα(100-109) με τα επίπεδα απόπτωσης, επαγόμενης από άλλα φαρμακευτικά σκευάσματα ή ακτινοβολίες, θα επιβεβαιώσει το ρόλο του προΤα(100-109) ως ενός εν δυνάμει προγνωστικού βιοδείκτη της αποτελεσματικότητας σχημάτων αντικαρκινικής θεραπείας. Ως εκ τούτου, οι μελλοντικοί στόχοι συνοψίζονται στα παρακάτω:

- Συλλογή και ανάλυση επιπλέον δειγμάτων υγιών ατόμων προκειμένου να τεθούν με μεγαλύτερη ακρίβεια τα όρια των φυσιολογικών τιμών.
- *In vitro* και *ex vivo* μελέτη της συσχέτισης της συγκέντρωσης του προΤα(100-109) με τα ποσοστά πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων έπειτα από χορήγηση και άλλων αντικαρκινικών φαρμακευτικών σκευασμάτων.
- *In vitro* μελέτη περισσότερων καρκινικών σειρών μετά από επίδραση αποπτωτικών παραγόντων ή γ- και Χ- ακτινοβολίας.
- *Ex vivo* μελέτη της εν λόγω συσχέτισης σε δείγματα από καρκινοπαθείς που έχουν εκτεθεί σε ακτινοθεραπευτικές δόσεις γ- ή Χ- ακτινοβολίας και περαιτέρω συσχέτιση με την ανταπόκρισή τους στη θεραπεία.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Bai, Q.-X., Zhang, X.-Y., 2012. Curcumin Enhances Cytotoxic Effects of Bortezomib in Human Multiple Myeloma H929 Cells: Potential Roles of NF- κ B/JNK. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 4831–4838. <https://doi.org/10.3390/ijms13044831>
- Banfalvi, G., Klaisz, M., Ujvarosi, K., Trencsenyi, G., Rozsa, D., Nagy, G., 2007. Gamma irradiation induced apoptotic changes in the chromatin structure of human erythroleukemia K562 cells. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 12, 2271–2283. <https://doi.org/10.1007/s10495-007-0146-9>
- Barker, C., Lowe, M., Radhakrishna, G., 2019. An introduction to proton beam therapy. *Br. J. Hosp. Med. Lond. Engl.* 2005 80, 574–578. <https://doi.org/10.12968/hmed.2019.80.10.574>
- Baxevanis, C.N., Thanos, D., Reclos, G.J., Anastasopoulos, E., Tsokos, G.C., Papamatheakis, J., Papamichail, M., 1992. Prothymosin alpha enhances human and murine MHC class II surface antigen expression and messenger RNA accumulation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 148, 1979–1984.
- Birmpilis, A.I., Karachaliou, C.-E., Samara, P., Ioannou, K., Selemenakis, P., Kostopoulos, I.V., Kavrochorianou, N., Kalbacher, H., Livaniou, E., Haralambous, S., Kotsinas, A., Farzaneh, F., Trougakos, I.P., Voelter, W., Dimopoulos, M.-A., Bamias, A., Tsitsilonis, O., 2019. Antitumor Reactive T-Cell Responses Are Enhanced In Vivo by DAMP Prothymosin Alpha and Its C-Terminal Decapeptide. *Cancers* 11. <https://doi.org/10.3390/cancers11111764>
- Blyth, B.J., Sykes, P.J., 2011. Radiation-induced bystander effects: what are they, and how relevant are they to human radiation exposures? *Radiat. Res.* 176, 139–157. <https://doi.org/10.1667/rr2548.1>
- Boutis, A., Papazisis, K., Pistevou-Gompaki, K., Lambropoulos, A., Sofroniadis, I., Papageorgiou, A., Destouni, E., Kortsaris, A., 2006. Cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor olomoucine enhances gamma-irradiation-induced apoptosis and cell cycle arrest in Raji cells. *Anticancer Res.* 26, 3493–3498.
- Bratton, S.B., Salvesen, G.S., 2010. Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome. *J. Cell Sci.* 123, 3209–3214. <https://doi.org/10.1242/jcs.073643>
- Buck, E.C., Wittman, R.S., Skomurski, F.N., Cantrell, K.J., McNamara, B.K., Soderquist, C.Z., 2012. Radiolysis Process Model (No. PNNL-21554). Pacific Northwest National Lab. (PNNL), Richland, WA (United States). <https://doi.org/10.2172/1069211>
- Cadet, J., Wagner, J.R., 2014. Oxidatively generated base damage to cellular DNA by hydroxyl radical and one-electron oxidants: similarities and differences. *Arch. Biochem. Biophys.* 557, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.05.001>

- Chai, Y., Hei, T.K., 2008. Radiation Induced Bystander Effect in vivo. *Acta Med. Nagasaki*. 53, S65–S69.
- Cooper, G.M., 2000. *The Development and Causes of Cancer. Cell Mol. Approach* 2nd Ed.
- Cordero, O.J., Sarandeses, C.S., López, J.L., Nogueira, M., 1992. Prothymosin alpha enhances human natural killer cell cytotoxicity: role in mediating signals for NK activity. *Lymphokine Cytokine Res.* 11, 277–285.
- Desouky, O., Ding, N., Zhou, G., 2015. Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation. *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* 8, 247–254. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2015.03.003>
- Dumont, E., Monari, A., 2015. Understanding DNA under oxidative stress and sensitization: the role of molecular modeling. *Front. Chem.* 3. <https://doi.org/10.3389/fchem.2015.00043>
- Evstafieva, A.G., Belov, G.A., Rubtsov, Y.P., Kalkum, M., Joseph, B., Chichkova, N.V., Sukhacheva, E.A., Bogdanov, A.A., Pettersson, R.F., Agol, V.I., Vartapetian, A.B., 2003. Apoptosis-related fragmentation, translocation, and properties of human prothymosin alpha. *Exp. Cell Res.* 284, 209–221. [https://doi.org/10.1016/S0014-4827\(02\)00047-2](https://doi.org/10.1016/S0014-4827(02)00047-2)
- Field-Smith, A., Morgan, G.J., Davies, F.E., 2006. Bortezomib (Velcade™) in the Treatment of Multiple Myeloma. *Ther. Clin. Risk Manag.* 2, 271–279.
- Freire, M., 2018. Prothymosin α , a protein implicated in the proliferation and survival of lymphocytes. *J. Immunol. Sci.* 2, 19–25. <https://doi.org/10.29245/2578-3009/2018/2.1130>
- Frey, B., Hehlgans, S., Rödel, F., Gaipl, U.S., 2015. Modulation of inflammation by low and high doses of ionizing radiation: Implications for benign and malign diseases. *Cancer Lett.* 368, 230–237. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.04.010>
- George, E.M., Brown, D.T., 2010. Prothymosin α is a component of a linker histone chaperone. *FEBS Lett.* 584, 2833–2836. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.065>
- Giglia-Mari, G., Zotter, A., Vermeulen, W., 2011. DNA Damage Response. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, a000745. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000745>
- Goldstein, A.L., 2007. History of the Discovery of the Thymosins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1112, 1–13. <https://doi.org/10.1196/annals.1415.045>
- Gorbunova, V., Seluanov, A., 2016. DNA double strand break repair, aging and the chromatin connection. *Mutat. Res.* 788, 2–6. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2016.02.004>
- Hall, E.J., Hei, T.K., 2003. Genomic instability and bystander effects induced by high-LET radiation. *Oncogene* 22, 7034–7042. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206900>

- Hei, T.K., 2006. Cyclooxygenase-2 as a signaling molecule in radiation-induced bystander effect. *Mol. Carcinog.* 45, 455–460. <https://doi.org/10.1002/mc.20219>
- Heidecke, H., Eckert, K., Schulze-Forster, K., Maurer, H.R., 1997. Prothymosin α effects in vitro on chemotaxis, cytotoxicity and oxidative response of neutrophils from melanoma, colorectal and breast tumor patients. *Int. J. Immunopharmacol.* 19, 413–420. [https://doi.org/10.1016/S0192-0561\(97\)00089-1](https://doi.org/10.1016/S0192-0561(97)00089-1)
- Hu, Y., Benedict, M.A., Ding, L., Núñez, G., 1999. Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *EMBO J.* 18, 3586–3595. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.13.3586>
- Ioannou, K., Derhovanessian, E., Tsakiri, E., Samara, P., Kalbacher, H., Voelter, W., Trougakos, I.P., Pawelec, G., Tsitsilonis, O.E., 2013. Prothymosin α and a prothymosin α -derived peptide enhance TH1-type immune responses against defined HER-2/neu epitopes. *BMC Immunol.* 14, 43. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-14-43>
- Ioannou, K., Samara, P., Livaniou, E., Derhovanessian, E., Tsitsilonis, O.E., 2012. Prothymosin alpha: a ubiquitous polypeptide with potential use in cancer diagnosis and therapy. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 61, 599–614. <https://doi.org/10.1007/s00262-012-1222-8>
- Jiang, X., Kim, H.-E., Shu, H., Zhao, Y., Zhang, H., Kofron, J., Donnelly, J., Burns, D., Ng, S.-C., Rosenberg, S., Wang, X., 2003. Distinctive roles of PHAP proteins and prothymosin-alpha in a death regulatory pathway. *Science* 299, 223–226. <https://doi.org/10.1126/science.1076807>
- Kamada, T., Tsujii, H., Blakely, E.A., Debus, J., De Neve, W., Durante, M., Jäkel, O., Mayer, R., Orecchia, R., Pötter, R., Vatnitsky, S., Chu, W.T., 2015. Carbon ion radiotherapy in Japan: an assessment of 20 years of clinical experience. *Lancet Oncol.* 16, e93–e100. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70412-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70412-7)
- Kano, H., Kondziolka, D., Niranjana, A., Flickinger, J.C., Lunsford, L.D., 2011. Gamma Knife Stereotactic Radiosurgery in the Management of Cluster Headache. *Curr. Pain Headache Rep.* 15, 118–123. <https://doi.org/10.1007/s11916-010-0169-8>
- Kappa, N., Williams, E., Ioannou, K., Samara, P., Tsitsilonis, O., 2013. Prothymosin α as a cancer biomarker and immunotherapeutic tool. *Arch. Hell. Med.* 30, 406–419.
- Karapetian, R.N., Evstafieva, A.G., Abaeva, I.S., Chichkova, N.V., Filonov, G.S., Rubtsov, Y.P., Sukhacheva, E.A., Melnikov, S.V., Schneider, U., Wanker, E.E., Vartapetian, A.B., 2005. Nuclear Oncoprotein Prothymosin α Is a Partner of Keap1: Implications for Expression of Oxidative Stress-Protecting Genes. *Mol. Cell. Biol.* 25, 1089–1099. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.3.1089-1099.2005>
- Kindt, T.J., Goldsby, R.A., Osborne, B.A., Kuby, J., 2007. *Kuby immunology*, 6th ed. New York : W.H. Freeman.
- Kinner, A., Wu, W., Staudt, C., Iliakis, G., 2008. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res.* 36, 5678–5694. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn550>

- Kumar, S.K., Rajkumar, V., Kyle, R.A., van Duin, M., Sonneveld, P., Mateos, M.-V., Gay, F., Anderson, K.C., 2017. Multiple myeloma. *Nat. Rev. Dis. Primer* 3, 17046. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.46>
- Large, M., Hehlhans, S., Reichert, S., Gaipf, U.S., Fournier, C., Rödel, C., Weiss, C., Rödel, F., 2015. Study of the anti-inflammatory effects of low-dose radiation: The contribution of biphasic regulation of the antioxidative system in endothelial cells. *Strahlenther. Onkol. Organ Dtsch. Röntgengesellschaft A1* 191, 742–749. <https://doi.org/10.1007/s00066-015-0848-9>
- Le Caër, S., 2011. Water Radiolysis: Influence of Oxide Surfaces on H₂ Production under Ionizing Radiation. *Water* 3, 235–253. <https://doi.org/10.3390/w3010235>
- Lin, Y.-T., Lu, H.-P., Chao, C.C.-K., 2015. Oncogenic c-Myc and prothymosin- α protect hepatocellular carcinoma cells against sorafenib-induced apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 93, 110–124. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.10.012>
- Little, J.B., 2006. Cellular radiation effects and the bystander response. *Mutat. Res.* 597, 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.12.001>
- Malicet, C., Giroux, V., Vasseur, S., Dagorn, J.C., Neira, J.L., Iovanna, J.L., 2006. Regulation of apoptosis by the p8/prothymosin α complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2671–2676. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508955103>
- Merrifield, M., Kovalchuk, O., 2013. Epigenetics in radiation biology: a new research frontier. *Front. Genet.* 4, 40. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00040>
- Mosoian, A., Teixeira, A., Burns, C.S., Sander, L.E., Gusella, G.L., He, C., Blander, J.M., Klotman, P., Klotman, M.E., 2010. Prothymosin- α inhibits HIV-1 via Toll-like receptor 4-mediated type I interferon induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 10178–10183. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914870107>
- Nikitaki, Z., Mavragani, I.V., Laskaratou, D.A., Gika, V., Moskvina, V.P., Theofilatos, K., Vougas, K., Stewart, R.D., Georgakilas, A.G., 2016. Systemic mechanisms and effects of ionizing radiation: A new “old” paradigm of how the bystanders and distant can become the players. *Semin. Cancer Biol.* 37–38, 77–95. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2016.02.002>
- Pan, L., Wan, M., Zheng, W., Wu, R., Tang, W., Zhang, X., Yang, T., Ye, C., 2019. Intra-beam Radiation Inhibits Proliferation, Migration, and Invasiveness and Promotes Apoptosis of MCF-7 Breast Cancer Cells. *Technol. Cancer Res. Treat.* 18. <https://doi.org/10.1177/1533033819840706>
- Pan, L.-X., Haritos, A.A., Wideman, J., Komiyama, T., Chang, M., Stein, S., Salvin, S.B., Horecker, B.L., 1986. Human prothymosin α : Amino acid sequence and immunologic properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 250, 197–201. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(86\)90717-4](https://doi.org/10.1016/0003-9861(86)90717-4)
- Qi, X., Wang, L., Du, F., 2010. Novel small molecules relieve prothymosin α -mediated inhibition of apoptosome formation by blocking its interaction with Apaf-1. *Biochemistry* 49, 1923–1930. <https://doi.org/10.1021/bi9022329>
- Quiñones, J.L., Demple, B., 2016. When DNA repair goes wrong: BER-generated DNA-protein crosslinks to oxidative lesions. *DNA Repair* 44, 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.05.014>

- Ramakrishnan, V., Mager, D.E., 2018. Network-Based Analysis of Bortezomib Pharmacodynamic Heterogeneity in Multiple Myeloma Cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 365, 734–751. <https://doi.org/10.1124/jpet.118.247924>
- Rodriguez, J., Lazebnik, Y., 1999. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev.* 13, 3179–3184. <https://doi.org/10.1101/gad.13.24.3179>
- Samara, P., Kalbacher, H., Ioannou, K., Radu, D.L., Livaniou, E., Promponas, V.J., Voelter, W., Tsitsilonis, O., 2013. Development of an ELISA for the quantification of the C-terminal decapeptide prothymosin α (100–109) in sera of mice infected with bacteria. *J. Immunol. Methods* 395, 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2013.06.011>
- Samara, P., Karachaliou, C.-E., Ioannou, K., E. Papaioannou, N., F. Voutsas, I., Zikos, C., Pirmettis, I., Papadopoulos, M., Kalbacher, H., Livaniou, E., E. Tsitsilonis, O., Voelter, W., 2017a. Prothymosin Alpha: An Alarmin and More... *Curr. Med. Chem.* 24. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170518110033>
- Samara, P., Miriagou, V., Zachariadis, M., Mavrofydi, O., Promponas, V.J., Dedos, S.G., Papazafiri, P., Kalbacher, H., Voelter, W., Tsitsilonis, O., 2017b. A fragment of the alarmin prothymosin α 3B1; as a novel biomarker in murine models of bacteria-induced sepsis. *Oncotarget* 8. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18149>
- Samara, P., Nikou, S.-A., Fortis, S., Voutsas, I., Baxevas, C., Tsitsilonis, O., 2014. New pharmaceutical formulations in the fight against cancer: How toll-like receptor (Tlr) agonists enhance the activity of anticancer vaccines. *Pharmakeftiki* 26, 111–114.
- Sedelnikova, O.A., Redon, C.E., Dickey, J.S., Nakamura, A.J., Georgakilas, A.G., Bonner, W.M., 2010. Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis. *Mutat. Res.* 704, 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.12.005>
- Siddiqui, M.S., François, M., Fenech, M.F., Leifert, W.R., 2015. Persistent γ H2AX: A promising molecular marker of DNA damage and aging. *Mutat. Res. Mutat. Res.* 766, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2015.07.001>
- Skopeliti, M., Iconomidou, V.A., Derhovanessian, E., Pawelec, G., Voelter, W., Kalbacher, H., Hamdrakas, S.J., Tsitsilonis, O.E., 2009. Prothymosin alpha immunoactive carboxyl-terminal peptide TKKQKTDEDD stimulates lymphocyte reactions, induces dendritic cell maturation and adopts a beta-sheet conformation in a sequence-specific manner. *Mol. Immunol.* 46, 784–792. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.09.014>
- Skopeliti, M., Voutsas I., Klimentzou P., Tsiatas M., Beck A., Bamias A., Moraki M., Livaniou E., Neagu M., Voelter W., Tsitsilonis O., 2006. The immunologically active site of prothymosin α is located at the carboxy-terminus of the polypeptide. Evaluation of its in vitro effects in cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother.*
- Spotheim-Maurizot, M., Davidková, M., 2011. Radiation damage to DNA in DNA-protein complexes. *Mutat. Res.* 711, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.02.003>

- Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E.S., 1998. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol. Cell* 1, 949–957. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80095-7](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80095-7)
- Sunder, S., 1998. Calculation of Radiation Dose Rates in a Water Layer in Contact with Used CANDU UO₂ Fuel. *Nucl. Technol.* 122, 211–221. <https://doi.org/10.13182/NT98-A2863>
- Temme, J., Bauer, G., 2013. Low-dose gamma irradiation enhances superoxide anion production by nonirradiated cells through TGF- β 1-dependent bystander signaling. *Radiat. Res.* 179, 422–432. <https://doi.org/10.1667/RR3161.2>
- Terzidis, M.A., Ferreri, C., Chatgililoglu, C., 2015. Radiation-induced formation of purine lesions in single and double stranded DNA: revised quantification. *Front. Chem.* 3. <https://doi.org/10.3389/fchem.2015.00018>
- Terzoudi, G.I., Donta-Bakoyianni, C., Iliakis, G., Pantelias, G.E., 2010. Investigation of Bystander Effects in Hybrid Cells by Means of Cell Fusion and Premature Chromosome Condensation Induction. *Radiat. Res.* 173, 789–801. <https://doi.org/10.1667/RR2023.1>
- Washington, C.M., Leaver, D.T., 2015. Principles and Practice of Radiation Therapy - E-Book. Elsevier Health Sciences.
- Yuan, S., Akey, C.W., 2013. Apoptosome structure, assembly and procaspase activation. *Struct. Lond. Engl.* 1993 21, 501–515. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.02.024>
- Zhang, Z., Zhang, H., Liu, F., Qiu, M., Tong, J., 2010. Effects of gamma radiation on bone-marrow stromal cells. *J. Toxicol. Environ. Health A* 73, 514–519. <https://doi.org/10.1080/15287390903523477>
- Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A., Wang, X., 1997. Apaf-1, a Human Protein Homologous to *C. elegans* CED-4, Participates in Cytochrome c-Dependent Activation of Caspase-3. *Cell* 90, 405–413. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80501-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80501-2)
- Zou, H., Li, Y., Liu, X., Wang, X., 1999. An APAF-1·Cytochrome c Multimeric Complex Is a Functional Apoptosome That Activates Procaspase-9. *J. Biol. Chem.* 274, 11549–11556. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.17.11549>
- Β.Σπυρόπουλος, 2015. Κεφάλαιο 6: Ακτινοθεραπεία, in: Το Σύγχρονο Νοσοκομείο.
- Ι.Ρ. Κουβάρης, 2007. Κεφάλαιο 30: Γενικές Αρχές Ακτινοθεραπείας, in: Κλινική Ογκολογία. pp. 495–526.
- Ράπτης, Β., Μπίκος, Α., Καπούλας, Σ., Raptis, V., Bikos, Α., Καρούλας, Σ., 2016. Πολλαπλό μυέλωμα, πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες. Ο ρόλος της μονοκλωνικής πρωτεΐνης στη νεφρική βλάβη - Multiple myeloma, plasma cell dyscrasias. The role of monoclonal protein in renal disease. *Ελληνική Νεφρολογία - Hell. Nephrol.* 28.
- Ψαρράκος Κ., 2009. ΙΑΤΡΙΚΗ ΦΥΣΙΚΗ - Τόμος Α' - Στοιχεία Ακτινοφυσικής και Εφαρμογές στην Ιατρική, Ακτινοβιολογία, Ακτινοπροστασία, Ε'. ed.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



ΙΑΤΡΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΑΘΗΝΩΝ
ΕΤΟΣ ΙΔΡΥΣΕΩΣ 1835

46^ο

ΕΤΗΣΙΟ ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΙΑΤΡΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ



19-20
ΙΟΥΝΙΟΥ
2020

ΔΙΑΔΙΚΤΥΑΚΗ
ΑΠ' ΕΥΘΕΙΑΣ
ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ

Πληροφορίες: ΙΑΤΡΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΑΘΗΝΩΝ, Μαιάνδρου 23, 115 28 Αθήνα
τηλ.: 210 7211845, 210 7243161 fax: 210 7215082 | email: iea@mednet.gr, mednet@mednet.gr
www.mednet.gr |  Ιατρική Εταιρεία Αθηνών-Athens Medical Society

Η ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΟΥ ΔΕΚΑΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΠΡΟΘΥΜΟΣΙΝΗ α(100-109) ΣΤΟ ΑΙΜΑ ΩΣ ΠΙΘΑΝΟΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗΣ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΣΤΗ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ Ή ΤΗΝ ΑΚΤΙΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

Α. Πασχάλης^{1,2}, Α. Μπιρμπίλης², Π. Σαμαρά², Ε. Καστρίτης³, Η. Kalbacher⁴, W. Voelter⁴, Μ.Α. Δημόπουλος³, Α.Γ. Γεωργακίλας¹, Ο. Τσιτσιλώνη²

¹Τομέας Φυσικής, Σχολή Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών ΕΜΠ, ²Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ, Αθήνα ³Θεραπευτική Κλινική ΓΝΑ «Αλεξάνδρα», Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ, Αθήνα ⁴Interfacultaeres Institut fuer Biochemie, Universitaet, Tuebingen

ΣΚΟΠΟΣ: Δείξαμε ότι η μαζική ανοσογονική απόπτωση ανοσοκυττάρων ποντικών μετά από βακτηριακή λοίμωξη επάγει την απελευθέρωση του ανοσοδραστικού δεκαπεπτιδίου της προθυμοσίνης α, προΤα(100-109), στο αίμα των πειραματόζων και σχετίζεται με τη βαρύτητα της λοίμωξης. Για τη μετάφραση αυτών των δεδομένων στον άνθρωπο, προσδιορίσαμε τα επίπεδα του προΤα(100-109) στο πλάσμα φυσιολογικών ατόμων, καθώς και ασθενών με καρκίνο μετά από 1^η γραμμής θεραπεία με παράγοντες που προκαλούν ανοσογονική απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα.

ΥΛΙΚΟ: Συλλέξαμε πλάσμα από 500 φυσιολογικούς δότες και ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα (ΠΜ) πριν και 24 h μετά τη χορήγηση του αναστολέα πρωτεασώματος bortezomib. Η επαγωγή απόπτωσης σε ανθρώπινες καρκινικές σειρές in vitro έγινε μετά από έκθεσή τους σε bortezomib, δοξορουμπικίνη ή μετά από ακτινοθεραπευτικές δόσεις, και τα ποσοστά της επιβεβαιώθηκαν με κυτταρομετρία ροής. Η συγκέντρωση του προΤα(100-109) μετρήθηκε με ανταγωνιστικού-τύπου ELISA.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: Η συγκέντρωση του προΤα(100-109) φυσιολογικά είναι 0,095 ng/mL πλάσματος. Η συγκέντρωση του προΤα(100-109) αυξήθηκε στο πλάσμα των περισσότερων ασθενών με ΠΜ, ενώ στα υπερκείμενα των in vitro καλλιέργειών ήταν ανάλογη του ποσοστού των καρκινικών κυττάρων που οδηγήθηκαν σε ανοσογονική απόπτωση.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ: Το ποσοστό αύξησης της συγκέντρωσης του προΤα(100-109) στο πλάσμα ασθενών με ΠΜ πριν και μετά τη θεραπεία με bortezomib δείχνει να συσχετίζεται με την ανταπόκριση των ασθενών στο συγκεκριμένο σκεύασμα. Η επιβεβαίωση αυτής της συσχέτισης στα υπερκείμενα καλλιέργειών καρκινικών κυττάρων in vitro, προτείνει τον πιθανό ρόλο του προΤα(100-109) ως ενός εν δυνάμει συμπληρωματικού προβλεπτικού βιοδείκτη της ανταπόκρισης των ασθενών στη χημειο- ή ακτινο-θεραπεία.



Η ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΟΥ ΔΕΚΑΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΠΡΟΘΥΜΟΣΙΝΗ Α(100-109) ΣΤΟ ΑΙΜΑ ΩΣ ΠΙΘΑΝΟΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗΣ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΣΤΗ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ Ή ΤΗΝ ΑΚΤΙΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ



A. Πασχάλης^{1,2}, Α. Μπριμπιλής², Π. Σαμαρά², Ε. Καστρίτης³, Η. Καϊβαλής⁴, W. Voelter⁴, M.A. Δημόπουλος³, Α. Γεωργακιάς¹, Ο. Τσιτσιλιώνη²
¹Τομέας Φυσικής, Σχολή Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών ΕΜΠ, ²Τμήμα Βιολογίας ΕΚΠΑ, ³Θεραπευτική Κλινική ΓΝΑ «Αλεξάνδρα», ⁴Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ, ⁵Interfacultäres Institut fuer Biochemie, Universitaet Tuebingen, Germany

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ανθρώπινη προθυμωσίνη α (προτα) είναι ένα δξίνο πολυπεπίδιο μήκους 109-110 αμινοξέων¹. Ο ρόλος της, βάσει των έως σήμερα μελετών, είναι διπλός. Ενδοκυτταρικά, συμβάλλει στη ρύθμιση ποικίλων κυτταρικών μηχανισμών όπως ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση^{2,3}, ενώ εξωκυτταρικά δρα ανοσορυθμιστικά^{4,5}. Το ανοσοδραστικό κέντρο του μορίου εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό του άκρο, και συγκεκριμένα στο δεκαπεπίδιο προτα(100-109)⁷.

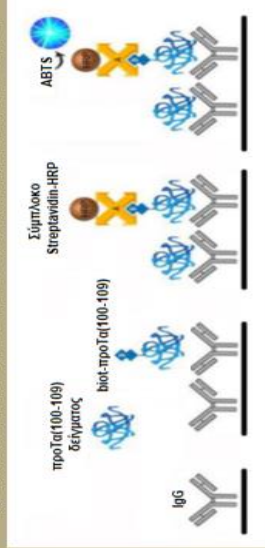
In vivo μελέτες έδειξαν ότι κατά την απόπτωση, η προτα θραύεται από τις ενεργοποιημένες κασπάσες (κυρίως την κασπάση 3), με αποτέλεσμα την παραγωγή του προτα(100-109)^{8,9}. Παράλληλα, *in vitro* μελέτες της ομάδας μας, έδειξαν συσχέτιση της αύξησης της συγκέντρωσης του προτα(100-109) με την επαγωγή μαζικού αποπτωτικού θανάτου σε κυτταρικούς πληθυσμούς, ως συνέπεια της ενδοκυτταρικής παραγωγής και εξωκυττάρωσής του.

ΣΚΟΠΟΣ

Με βάση την παραπάνω συσχέτιση, σκοπός μας ήταν η μελέτη του εν δυνάμει ρόλου του προτα(100-109) ως βιοδείκτης αντανόκρισης καρκινοπαθών στη χημειοθεραπεία ή την ακτινοθεραπεία. Αναλυτικότερα, προσδιορίσαμε τη συγκέντρωση του προτα(100-109) τόσο στον ορό υγιών ατόμων, ώστε να υπολογίσουμε τις φυσιολογικές τιμές, όσο και στον ορό ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα (ΠΜ), οι οποίοι έλαβαν θεραπευτικά τον αναστολέα πρωτεασώματος, bortezomib. Παράλληλα προσδιορίσαμε τη συγκέντρωση του προτα(100-109) σε υπερκείμενα καλλιέργειών καρκινικών κυττάρων, τα οποία οδηγήθηκαν σε απόπτωση: α) με χορήγηση χημικών παραγόντων, και β) μετά από έκθεση σε ακτινοβολία φωτονίων και συγκεκριμένα σε ακτίνες-γ.

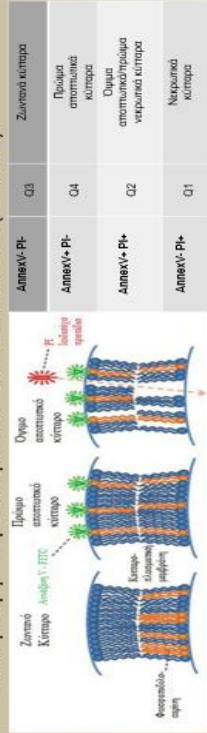
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

➤ ο ποσοτικός προσδιορισμός του προτα(100-109) πραγματοποιήθηκε με χρήση in-house μεθόδου ELISA ανταγωνιστικού τύπου¹⁰ (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: ELISA ανταγωνιστικού τύπου. Το ελεύθερο προτα(100-109) στο δείγμα, ανταγωνίζεται τις θέσεις πρόσδεσης στο ειδικό αντίσωμα με το βιοτυλιωμένο προτα(100-109). Το έγχρωμο σήμα προκύπτει από τη σύνδεση βιοτίνης-στυρεπταβιδίνης-HRP μετά την πρόσδεση του υποστρώματος ABTS. Όσο ασθενέστερο το σήμα, τόσο μεγαλύτερη η συγκέντρωση του προτα(100-109) στο υπό μελέτη δείγμα.

➤ τα ποσοστά επιπέδων απόπτωσης καρκινικών κυττάρων μετά τη χορήγηση χημικών παραγόντων/ακτινοβολίας προσδιορίστηκαν με κυτταρομετρία ροής και συγκεκριμένα με το πρωτόκολλο Annexin V – PI (Εικόνα 2).

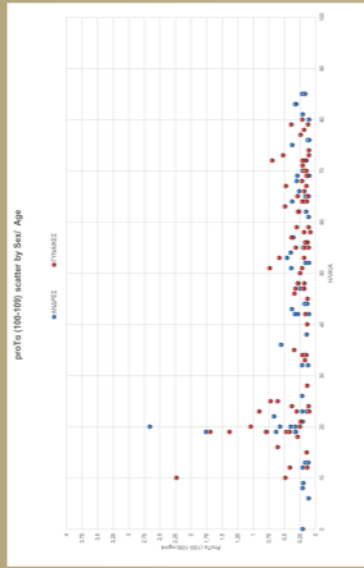


Εικόνα 2: Κατά την κυτταρική απόπτωση, το μεμβρανικό φωσφολιπίδιο φωσφατιδυλοσερίνη (PS) μετατοπίζεται και ελιθεται στο εξωτερικό μέρος της κυτταρικής μεμβράνης. Στην πρώτη απόπτωση, η ανιχνείν V - FITC, συνδέεται ειδικά με την PS, ενώ το PI δεν μπορεί να εισέλθει στον πυρήνα λόγω ακεραιότητας της μεμβράνης. Στα όψιμα αποπτωτικά και νεκρωτικά, η μεμβράνη διαρρηγνύεται με αποτέλεσμα τη δέσμευση του PI στο DNA.

Η ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΟΥ ΔΕΚΑΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΠΡΟΘΥΜΟΣΙΝΗ Α(100-109) ΣΤΟ ΑΙΜΑ ΩΣ ΠΙΘΑΝΟΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗΣ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΣΤΗ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ Ή ΤΗΝ ΑΚΤΙΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

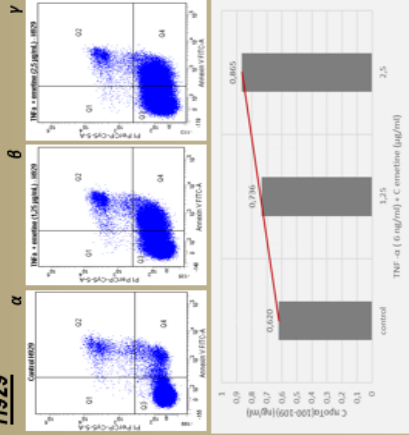
✓ Προσδιορισμός της συγκέντρωσης προΤα(100-109) στο πλάσμα υγιών δοτών



Εικόνα 3: Προσδιορισμός της φυσιολογικής συγκέντρωσης του προΤα(100-109) στο πλάσμα 147 υγιών ατόμων ανά φύλο και ηλικία. Μετά από αφαίρεση των σφαιρών τιμών, η μέση τιμή της συγκέντρωσης του προΤα(100-109) στο σύνολο του δείγματος είναι 0,342 pg/mL. Στους άνδρες η μέση τιμή υπολογίστηκε σε 0,344 pg/mL, ενώ στις γυναίκες σε 0,343 pg/mL.

✓ Προσδιορισμός της συγκέντρωσης προΤα(100-109) στα υπερκείμενα κυτάρων καρκινικών σεβρών μετά τη επίδραση με συνδυασμό TNF-α και εμετίνης

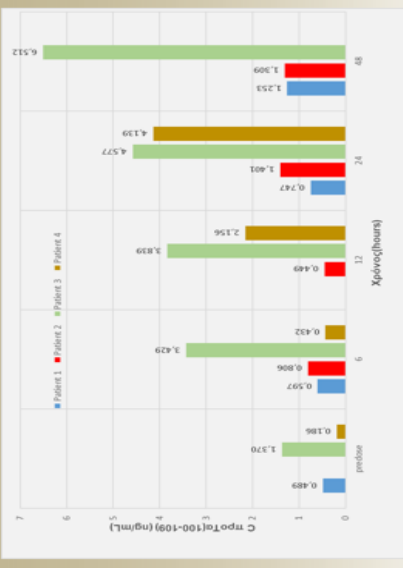
H929



Εικόνα 5: Καλλιέργειες ανδρώπων κυττάρων H929 (PM) επώστηκαν με το συνδυασμό παραγόντων TNF-α + εμετίνης για 4 ώρες και ελεγχθηκαν ως προς τα επίπεδα απόπτωσης με κυτταρομετρία ροής. Παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού των πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων (Q4) στις καλλιέργειες που επώστησαν με TNF-α + εμετίνη [6 ng/ml + 1,25 μg/ml (β) και 6 ng/ml + 2,5 μg/ml (γ)], με ποσοστά 31,7% και 40,5% αντίστοιχα, σε σχέση με τον μάρτυρα (α), όπου τα ποσοστά παρέμειναν χαμηλά, στο 3,6%.

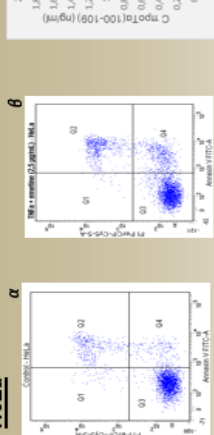
Εικόνα 6: Στα υπερκείμενα των παραπάνω καλλιέργειών προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του προΤα(100-109) με χρήση της ELISA. Παρατηρήθηκε βελτιωσία αύξησης της συγκέντρωσης του πεπτιδίου κατά 18,6% και 63,7% στα κύτταρα που επώστησαν με TNF-α + εμετίνη (6 ng/ml + 1,25 μg/ml και 6 ng/ml + 2,5 μg/ml) αντίστοιχα, σε σχέση με τον μάρτυρα.

✓ Προσδιορισμός της συγκέντρωσης προΤα(100-109) στο πλάσμα ασθενών με PM πριν και μετά τη χορήγηση bortezomib



Εικόνα 4: Κινητική μελέτη της συγκέντρωσης του δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109) στο πλάσμα ασθενών με PM μετά από χορήγηση bortezomib. Οι δειγματοληψίες έγιναν πριν και 6, 12, 24 και 48 ώρες μετά τη χορήγηση bortezomib. Σε όλους τους ασθενείς οι υψηλότερες συγκέντρωσεις του δεκαπεπτιδίου παρατηρήθηκαν στις 24 και 48 ώρες μετά τη χορήγηση bortezomib, όπου σημειώθηκε αύξηση ως και 375,3% (ασθενής #3), συγκριτικά με την αρχική συγκέντρωση του προΤα(100-109) στο πλάσμα, πριν τη χορήγηση bortezomib.

HeLa



Εικόνα 7: Καλλιέργειες κυττάρων HeLa (καρκίνος τραχήλου της μήτρας) επώστησαν με το συνδυασμό παραγόντων TNF-α + εμετίνης [6 ng/ml + 2,5 μg/ml (β) για 4 ώρες. Παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού των πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων (Q4), με ποσοστό 15,3% σε σχέση με τον μάρτυρα (α), όπου το ποσοστό παρέμεινε χαμηλό, στο 4,7%.

Εικόνα 8: Στα υπερκείμενα των παραπάνω καλλιέργειών πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της συγκέντρωσης του προΤα(100-109) με χρήση της ELISA. Παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης του πεπτιδίου στα κύτταρα που επώστησαν με TNF-α + εμετίνη (6 ng/ml + 2,5 μg/ml) κατά 159,7% σε σχέση με το μάρτυρα.

Η ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΟΥ ΔΕΚΑΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΠΡΟΘΥΜΟΣΙΝΗ $\alpha(100-109)$ ΣΤΟ ΑΙΜΑ ΩΣ ΠΙΘΑΝΟΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗΣ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΣΤΗ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ Ή ΤΗΝ ΑΚΤΙΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Μετά από ανάλυση δειγμάτων πλάσματος 147 υγιών ατόμων (68 άνδρες, 79 γυναίκες) η μέση τιμή της φυσιολογικής συγκέντρωσης του προΤα(100-109) υπολογίστηκε στα 0,342 ng/mL στο σύνολο του πληθυσμού. Η συλλογή και η ανάλυση επιπέδων δειγμάτων υγιών ατόμων συνεχίζεται προκειμένου να τεθούν με μεγαλύτερη ακρίβεια τα όρια των φυσιολογικών τιμών.

Παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης του προΤα(100-109) στο πλάσμα ασθενών με ΠΜ που έλαβαν θεραπευτικά bortezomib, ιδιαίτερα 24 και 48 ώρες μετά τη χορήγηση, υποδηλώνοντας πιθανή συσχέτιση των επιπέδων της ανοσογονικού τύπου απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων με τα επίπεδα συγκέντρωσης του δεκαπεπτιδίου. Ταυτόχρονα, παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης του προΤα(100-109) σε κύτταρα καρκινικών σερών που οδηγήθηκαν σε απόπτωση μετά από χορήγηση του συνδυασμού TNF- α + εμετίνης, καταδεικνύοντας πιθανή συσχέτιση των αυξημένων επιπέδων συγκέντρωσης του δεκαπεπτιδίου με την αύξηση του ποσοστού των πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων.

Ανάλογα αποτελέσματα αναμένονται και μετά από έκθεση καρκινικών σερών σε ακτινοθεραπευτικές δόσεις γ -ακτινοβολίας, καθώς η ιονίζουσα ακτινοβολία επιδρά στα κύτταρα, οδηγώντας τόσο σε σχηματισμό ελεύθερων ριζών (κυρίως OH \cdot και H $_2$ O $_2$), όσο και σε επαγωγή δίκλωνων θραύσεων του DNA (DSBs). Στην ακτινοθεραπεία οι DSBs είναι οι πλέον επιθυμητές, καθώς έχει δεχθεί ότι επάγουν την κυτταρική γήρανση η οποία αλλοιώνει την κυτταρική λειτουργία με τελικό αποτέλεσμα την ανοσογονική απόπτωση¹¹⁻¹³.

Βάσει των παραπάνω, περαιτέρω μελέτη της συσχέτισης της συγκέντρωσης του προΤα(100-109) με την επαγωγή ανοσογονικού τύπου απόπτωσης, προκαλούμενης από τη χρήση και άλλων φαρμακευτικών σκευασμάτων ή ακτινοβολιών, θα επιβεβαιώσει το ρόλο του προΤα(100-109) ως ενός εν δυνάμει προγνωστικού βιοδεικτη της αποτελεσματικότητας σχημάτων αντικαρκινικής θεραπείας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Samara P, Ioannou K, & Tsiatsionis OE. (2016). Prothymosin Alpha and Immune Responses: Are We Close to Potential Clinical Applications? *Vitamins and Hormones*, 102, 179–207.
2. Samara P, Karachaliou CE, Ioannou K, Papaioannou E, Voutsas NF, Zikos I, Pirmettis C, Papadopoulos IM, Kalbacher H, Livaniou E, Tsiatsionis O, & Voeller W. (2017). Prothymosin Alpha: An Alarmin and More... *Current Medicinal Chemistry*, 24(17).
3. Karachaliou CE, Kalbacher H, Voeller W, Tsiatsionis OE, & Livaniou E. (2019). In vitro immunodetection of prothymosin alpha in normal and pathological conditions. *Current Medicinal Chemistry*.
4. Ioannou K, Demetrianessian E, Tsakiri E, Samara P, Kalbacher H, Voeller W, Trougatos JP, Pavelec G, Tsiatsionis OE. (2013). Prothymosin α and a prothymosin α -derived peptide enhance T(H)-1-type immune responses against defined HER-2/neu epitopes. *BMC Immunol*, Sep 22;14:43.
5. Samara P, Ioannou K, Neagu M, Armojanaki N, Ardavanis A, Voeller W, & Tsiatsionis O. (2013). The C-terminal decapeptide of prothymosin α is responsible for its stimulatory effect on the functions of human neutrophils in vitro. *International Immunopharmacology*, 15(1), 50–57.
6. Birmplis AI, Karachaliou CE, Samara P, Ioannou K, Selemenakis P, Kostopoulos IV, Kavrochoritanou N, Kalbacher H, Livaniou E, Haralambous S, Kotsinas A, Frazaneh F, Trougatos JP, Voeller W, Dimopoulos MA, Barmias A, & Tsiatsionis O. (2019). Antitumor Reactive T-Cell Responses Are Enhanced In Vivo by DAMP Prothymosin Alpha and Its C-Terminal Decapeptide. *Cancers*, 11(11).
7. Skopeliti M, Voutsas JF, Klimentzou P, Tsiatas ML, Beck A, Barmias A, Moraki M, Livaniou E, Neagu M, Tsiatsionis OE. (2006). The immunologically active site of prothymosin alpha is located at the carboxy-terminus of the polypeptide. Evaluation of its in vitro effects in cancer patients. *Cancer Immunol Immunother*, 55:1247–1257
8. Eystafieva AG, Belov GA, Rubstov YP, Kalkum M, Joseph B, Chichkova NV, Subbacheva EA, Bogdanov AA, Peltersson RF, Agol VI, Vartapetian AB. (2003). Apoptosis-related fragmentation, translocation, and properties of human prothymosin alpha. *Exp Cell Res*, 284:211–223
9. Samara P, Mitzogou V, Zachariadis M, Mavrofydi O, Promponas VJ, Dedos SG, Papazafiri P, Kalbacher H, Voeller W, Tsiatsionis O. (2017). A fragment of the alarmin prothymosin α as a novel biomarker in murine models of bacteria-induced sepsis. *Oncotarget*, Jul 25;8(30):46635–46649.
10. Samara P, Kalbacher H, Ioannou K, Radu DL, Livaniou E, Promponas VJ, Voeller W, Tsiatsionis O. (2013). Development of an ELISA for the quantification of the C-terminal decapeptide prothymosin $\alpha(100-109)$ in sera of mice infected with bacteria. *J Imm Meth*, 395:54–62
11. Kinner A, Wu W, Slautt C, & Iliakis G. (2008). Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Research*, 36(17), 5678–5694.
12. Dumont E, & Monari A. (2015). Understanding DNA under oxidative stress and sensitization: The role of molecular modelling. *Frontiers in Chemistry*, 3.
13. Buck EC, Wittman RS, Skomurski FN, Cantrell K.J, McLamara BK, & Soderquist CZ. (2012). Radiolysis Process Model (PNNL-21554). Pacific Northwest National Lab. (PNNL), Richland, WA (United States).