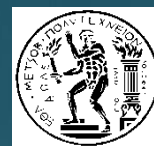


ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΚΗΣ



Σύγκριση χημικά επαγόμενης ακτινοευαίσθητοποιητικής
δράσης δύο κιναζολινικών παραγώγων σε καρκινικά
κύτταρα A431

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μαγγέλης Αναστάσιος

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή Ε.Μ. ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟΥ

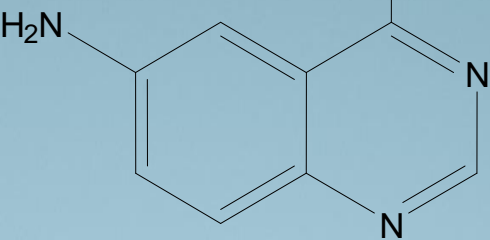
Υπεύθυνος: Καθ. Θεόδωρος Αλεξόπουλος

Καθ. Ευάγγελος Γαζής

Αν. Καθ. Γεώργιος Τσιπολίτης

Επιβλέπουσα: Μαρία Παραβατού Ερευνήτρια Β' ΕΚΕΦΕ «Δ»

ΑΘΗΝΑ 2011



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	6
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο	8
1.1 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΙΟΝΤΙΖΟΥΣΩΝ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΩΝ.....	8
1.1.1 Φυσικές πηγές Ιοντιζουσών Ακτινοβολιών.....	8
1.1.2 Τεχνητές πηγές ιοντιζουσών ακτινοβολιών	12
1.2 ΔΙΕΙΣΔΥΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΙΟΝΤΙΖΟΥΣΩΝ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΩΝ	12
1.3 ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΙΟΝΤΙΖΟΥΣΑΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ	13
1.3.1 Φυσικό στάδιο	14
1.3.2 Χημικό στάδιο.....	14
1.3.3 Βιολογικό στάδιο	15
1.4 ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ.....	16
1.4.1 Φάσεις του κυτταρικού κύκλου.....	16
1.4.2 Διάρκεια του κυτταρικού κύκλου.....	18
1.4.3 Έλεγχος του κυτταρικού κύκλου.....	19
1.5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΙΟΝΤΙΖΟΥΣΩΝ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΩΝ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	20
1.6 ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΙΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝΤΑΙ ΑΠΟ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ	22
1.7 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ - ΑΚΤΙΝΟΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ.....	23
1.8 ΑΚΤΙΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΙ Ο ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ.....	25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο : Ο ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΟΥ ΕΠΙΔΕΡΜΙΚΟΥ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ (EGFR)	28
2.1 ΔΟΜΗ ΤΟΥ EGFR.....	30
2.2 ΜΟΡΙΑ ΠΡΟΣΔΕΤΕΣ – ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ EGFR.....	32
2.3 ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΟΥ EGFR ΣΤΗΝ ΕΞΕΛΙΞΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΟΓΚΩΝ	35
2.3.1 Υπερέκφραση του EGFR και των αυξητικών παραγόντων του και ομο- και ετερο- διμερισμός.....	35
2.3.2 Μεταλλάξεις του EGFR	36
2.3.3 Εσωτερικοποίηση του EGFR	37
2.4 ΜΟΡΙΑ ΣΤΟΧΕΥΣΗΣ ΤΟΥ EGFR.....	37
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο : ΚΙΝΑΖΟΛΙΝΙΚΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ	40
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο : ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	44
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο : ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	46
5.1 ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	48
5.2 ΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ.....	49
5.3 ΑΠΟΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ	49

5.4	ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑ ΜΕ ΑΙΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΟ	49
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο : ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ		51
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο : ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ		51
7.1	ΥΠΟΤΟΝΙΚΟ ΣΟΚ	52
7.2	ΕΠΙΣΤΡΩΣΗ ΚΑΙ ΧΡΩΜΑΤΙΣΜΟΣ	52
7.3	ΧΡΩΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ	52
7.4	ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΤΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ	53
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο : ΜΕΘΟΔΟΣ G2-ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ		55
8.1	ΜΕΘΟΔΟΣ – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ G ₂ ASSAY	56
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9^ο : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΑΛΛΟΙΩΣΕΩΝ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΔΗΣ		59
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10^ο : ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ		62
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ		68
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....		71

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) αποτελεί ένα ελκυστικό «μόριο στόχο» στην ανάπτυξη στοχευμένης αντικαρκινικής θεραπείας. Οι κιναζολίνες είναι μόρια μικρού μοριακού βάρους, που διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη, δεσμεύονται αντιστρεπτά ή μη με τον EGFR και ανταγωνίζονται τις θέσεις δέσμευσης του ATP αναστέλλοντας με αυτόν τον τρόπο τη φωσφορυλίωσή του και κατά συνέπεια τα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία εμπλέκεται. Η υπερέκφραση του υποδοχέα συνδέεται με αντίσταση σε πολλές μορφές θεραπείας – και στην ακτινοθεραπεία. Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι κάποιοι ασθενείς που παίρνουν ως αντικαρκινικά φάρμακα αναστολείς της δράσης του EGFR ανταποκρίνονται καλύτερα στην ακτινοθεραπεία. Φαίνεται λοιπόν ότι οι κιναζολίνες έχουν δράση ακτινοευαισθητοποιητών.

Τα κιναζολινικά παράγωγα Α: 6-αμινο-4-[(3-βρωμοφαινυλ)αμινο]-κιναζολίνη και Γ: N-{4-[(3-βρωμοφαινυλ)αμινο]-κιναζολιν-6-υλ}-2-χλωροακεταμίδιο δεσμεύονται αντίστοιχα αντιστρεπτά και μη αντιστρεπτά στον EGFR και αναστέλλουν την φωσφορυλίωσή του σε κύτταρα A431 που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα. Χρησιμοποιώντας την Μέθοδο G2-χρωμοσωματικής ευαισθησίας και τα παράγωγα στην συγκέντρωση στην οποία αναστέλλουν το 50% της κυτταρικής αύξησης (δείκτης κυτταροταξικότητας) έχειδειχθεί ότι:

1. ο συνδυασμός ακτινοβολίας και παραγώγου Α αυξάνει σημαντικά τον αριθμό χρωματιδιακών αλλοιώσεων που παρατηρούνται στην μετάφραση σε σχέση με τον αριθμό των αλλοιώσεων που παρατηρείται στα χρωμοσώματα, απουσία του παραγώγου.
2. η αύξηση αυτή είναι μικρότερη όσον αφορά το κιναζολινικό παράγωγο Γ.

Δεδομένης του διαφορετικού τρόπου δέσμευσης των παραγώγων αυτών στον υποδοχέα, στόχος της παρούσας διπλωματικής ήταν η συγκριτική μελέτη της συμπεριφοράς των κυττάρων λίγες ώρες μετά την απομάκρυνση των παραγώγων από τις κυτταρικές καλλιέργειες με την Μέθοδο G2-χρωμοσωματικής ευαισθησίας.

Βρέθηκε ότι 8 ώρες μετά την απομάκρυνση των παραγώγων από τα κύτταρα η δράση του κιναζολινικού παραγώγου Α ελαχιστοποιείται και δεν είναι σημαντική. Για το παράγωγο Γ η μελέτη ήταν αδύνατη πιθανά γιατί το παράγωγο αναστατώνει τον κυτταρικό κύκλο.

ABSTRACT

The epidermal growth factor receptor (EGFR) is a rather attractive “target molecule” in the development of targeted cancer therapy. Quinazolines are molecules of low molecular weight, which can pass through the cell membrane, bound reversibly or irreversibly to EGFR and compete with ATP molecules for the binding sites, inhibiting thereby the phosphorylation of the receptor and therefore the signaling pathways, in which the receptor is involved. The over expression of the receptor is associated with resistance to many forms of treatment – also radiotherapy. Clinical studies have shown that some patients receiving inhibitors of EGFR activity as cancer treatment have better response to radiotherapy. Therefore, it appears that quinazolines have radio sensitizing activity.

Quinazoline derivatives A : 6-amino-4-[(3-bromophenyl)amino]-quinazoline and Γ : N-{4-[(3-bromophenyl)amino]-quinazoline-6-yl}-2-chloroacetamide t quinazoline bound respectively reversibly and irreversibly to EGFR and inhibit its phosphorylation in A431 cancer cells which over express the receptor. Using G2-chromosomal radio sensitivity assay and the derivatives in the consecration in which they inhibit 50% of cell growth (cytotoxicity index), it has been proven that:

1. The combination of radiation and derivative A significantly increases the number of chromosomal alterations observed in metaphase, compared to the number of alterations observed chromosomes, in the absence of the derivative.
2. This increase is lesser as far as derivative Γ is concerned.

Given the different mode of binding of these derivatives, the objective of the present diploma was the comparative study of the cells' behavior a few hours after the removal of the derivatives from cell cultures using G2-chromosomal radio sensitivity assay.

It has been found that 8 hours after removal, the activity of derivative A is minimized and is no longer significant. For derivative Γ , studying was impossible, probably because the derivative disrupts cell cycle.

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

1.1 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΙΟΝΤΙΖΟΥΣΩΝ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΩΝ

Η ιοντίζουσα ακτινοβολία είναι ακτινοβολία που έχει ενέργεια ικανή να αλληλεπιδράσει με την ύλη. Η αλληλεπίδραση αυτή μπορεί να είναι ο ιονισμός ατόμων, η διάσπαση χημικών δεσμών ή απλώς η διέγερση ατόμων σε ανωτέρα ενεργειακά επίπεδα. Στην αλληλεπίδραση της με την ύλη η ιοντίζουσα ακτινοβολία μπορεί να προκαλέσει βλάβες στους ζωντανούς οργανισμούς σε επίπεδο κυττάρου καθώς και σε επίπεδο οργάνων. Η ιοντίζουσα ακτινοβολία, από όπου και αν προέρχεται, αποτελείται είτε από φορτισμένα σωματίδια με μάζα, όπως φορτισμένα πρωτόνια και ηλεκτρόνια, είτε από κβάντα ενέργειας χωρίς μάζα, τα φωτόνια και τα νετρίνα (1).

Οι ιοντίζουσες ακτινοβολίες μπορεί να προέρχονται είτε από φυσικές πηγές είτε από τεχνητές.

1.1.1 Φυσικές πηγές Ιοντιζουσών Ακτινοβολιών

Κοσμική Ακτινοβολία

Η κοσμική ακτινοβολία είναι ακτινοβολία που προέρχεται από το διάστημα. Έχει την μορφή ελαφρών πυρήνων κυρίως σωματιδίων α (πυρήνες ηλίου), πρωτονίων και ηλεκτρονίων καθώς και νετρίνων και ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων. Για την γη, η πιο κοντινή πηγή τέτοιων κοσμικών ακτινοβολιών είναι ο ήλιος. Ένα μεγάλο ποσοστό των φορτισμένων ηλεκτρονίων και πρωτονίων που εισέρχονται στην ατμόσφαιρα της γης προέρχεται από τις ηλιακές εκρήξεις και τις ηλιακές κηλίδες που λαμβάνουν χώρα στην επιφάνεια του ηλίου. Τα σωματίδια αυτά, μόλις έρθουν σε επαφή με τα σωματίδια της ατμόσφαιρας της γης, προκαλούν την δημιουργία αντιδράσεων και άρα επανεκπομπή ακτινοβολίας και άλλων ανιχνεύσιμων σωματιδίων, όπως τα βραχύβια μεσόνια και λεπτόνια. Υπάρχουν επίσης και οι ακτινοβολίες που προέρχονται από το εσωτερικό του ηλίου, λόγω κυκλικών αντιδράσεων πυρηνικής σύντηξης, οι οποίες είναι νετρίνα υψηλής ενέργειας. Η ανίχνευση αυτής της ακτινοβολίας καθώς και η μέτρηση της ενεργειακής της κατανομής γίνεται από ειδικές ανιχνευτικές εγκαταστάσεις, οι οποίες βρίσκονται σε διάφορα ύψη, όπως πάνω από την ατμόσφαιρα με χρήση αερόστατων, δορυφόρων και

διαστημοπλοίων, αλλά ακόμα και από υποθαλάσσιες εγκαταστάσεις, κυρίως για ανίχνευση νετρίνων (π.χ. ανιχνευτής νετρίνων στην Πύλο ή υποβρύχιος ανιχνευτής ANTARES - εικόνα 1.1).

Πηγές του εδάφους

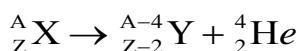
Μια δεύτερη φυσική πηγή ιοντιζουσών ακτινοβολιών είναι το έδαφος ή πιο ειδικά, ουσίες που βρίσκονται στο υπέδαφος και στις διάφορες ουσίες. Η πηγή αυτή βρέθηκε από τον Becquerel το 1896 όταν παρατήρησε εκπομπή ενέργειας από ορυκτά Ουρανίου. Οι πυρήνες Ουρανίου και των άλλων ραδιενεργών στοιχείων είναι βαρύνουσες πυρήνες, οι οποίοι διασπώνται σε άλλους ελαφρύτερους πυρήνες εκπέμποντας ακτινοβολία. Στο έδαφος και στα διάφορα πετρώματα περιέχονται κάποιες ποσότητες Ουρανίου και Θορίου μαζί με τα παράγωγα τους. Η συγκέντρωση αυτών των στοιχείων διαφέρει ανάλογα με το είδος του πετρώματος και στην ουσία αυτή καθορίζει το ποσό της ακτινοβολίας που εκπέμπει μια ουσία, δηλαδή το πόσο ραδιενεργή είναι. Οι ζωντανοί οργανισμοί είναι λοιπόν εκτεθειμένοι σε ραδιενέργεια, από τον αέρα που αναπνέουν έως τις τροφές και τα υλικά που βρίσκονται γύρω τους. Σε αυτό συμβάλλουν ιδιαίτερα τα αέρια προϊόντα μετάπτωσης του Ουρανίου και του Θορίου, το Ραδόνιο και το Θορόνιο αντίστοιχα. Τα αέρια αυτά διαχέονται στην ατμόσφαιρα και άρα εισέρχονται στον άνθρωπο και τα ζώα με την αναπνοή και την τροφή. Το ανθρώπινο σώμα περιέχει μικρές ποσότητες ισοτόπων Άνθρακα-14 (^{14}C) και Κάλιο-40 (^{40}K), εκ των οποίων το πρώτο προέρχεται από την ατμόσφαιρα ενώ το δεύτερο εμφανίζεται φυσικά στο σώμα. Η ακτινοβολία που προέρχεται από φυσικές πηγές διαχωρίζεται σε 3 είδη, την εκπομπή σωματιδίων α (πυρήνες ηλίου), σωματιδίων β (ηλεκτρόνια) και ακτινών γ.



Εικόνα 1.1: Ο υποθαλάσσιος ανιχνευτής νετρίνων ANTARES σε μια σχηματική αναπαράσταση.

Εκπομπή σωματιδίων α

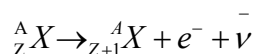
Η εκπομπή πυρήνων He δημιουργείται κατά την μετάπτωση βαρέων πυρήνων ραδιενεργών στοιχείων σε άλλους ελαφρότερους πυρήνες. Είναι ένα φαινόμενο το οποίο έχει την φυσική του ερμηνεία στο φαινόμενο σήραγγας, κατά το οποίο ένας πυρήνας ηλίου καταφέρνει να ξεπεράσει το δυναμικό Coulomb που δημιουργεί ο πυρήνας και διαφεύγει. Έτσι ο πυρήνας που προκύπτει είναι κατά 4 νουκλεόνια πιο ελαφρύς (2 πρωτόνια και 2 νετρόνια) άρα και πιο σταθερός. Η αντίδραση αυτή περιγράφεται σχηματικά ως εξής:



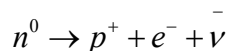
όπου X ονομάζεται ο μητρικός πυρήνας και Y ο θυγατρικός.

Εκπομπή σωματιδίων β

Η εκπομπή β περιγράφει ουσιαστικά δυο διασπάσεις την β⁺ διάσπαση και την β⁻ διάσπαση. Η β⁻ διάσπαση είναι μια πυρηνική αντίδραση κατά την οποία έχουμε μεταστοιχείωση ενός πυρήνα από ατομικό αριθμό N σε ατομικό αριθμό N+1, με ταυτόχρονη εκπομπή ενός ηλεκτρονίου. Η αντίδραση αυτή έχει την μορφή:



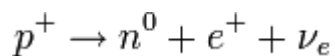
Παρατηρούμε ότι κατά την αντίδραση ο μαζικός αριθμός του ατόμου παραμένει σταθερός. Αυτό συμβαίνει διότι κατά την διάσπαση επί της ουσίας πραγματοποιείται η παρακάτω μετατροπή, δηλαδή η μετατροπή ενός νετρονίου σε ένα πρωτόνιο, ένα ηλεκτρόνιο και ένα αντινεutrino του ηλεκτρονίου:



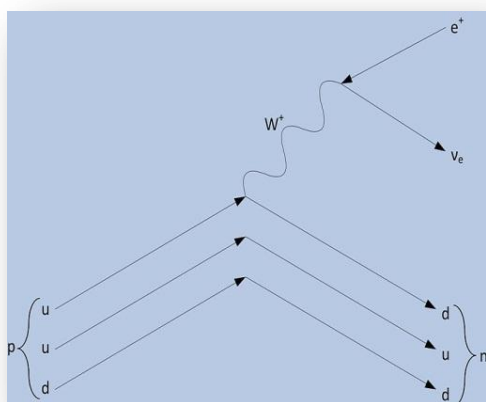
Η αντίδραση αυτή μάλιστα είναι και ο ουσιαστικός λόγος της εισαγωγής του νεutrino ως σωματίδιο στην θεωρία στοιχειωδών σωματιδίων από τον Pauli το 1930, στην προσπάθεια του να ερμηνεύσει την ενεργειακή διάφορα που πρόεκυπτε στις β διασπάσεις. Συγκεκριμένα, το

σωματίδιο β που εκπεμπόταν, σε αντίθεση με μια προσδοκώμενη σταθερή τιμή ενέργειας, παρουσίαζε ένα συνεχές φάσμα ενεργειών. Η ερμηνεία ήταν ότι θα έπρεπε να υπάρχει και κάποιο άλλο, μη ανιχνεύσιμο σωματίδιο που θα κάλυπτε την διάφορα ενέργειας και ορμής που παρατηρούνταν. Εν τέλει το νεutrίνο βρέθηκε και πειραματικά το 1956.

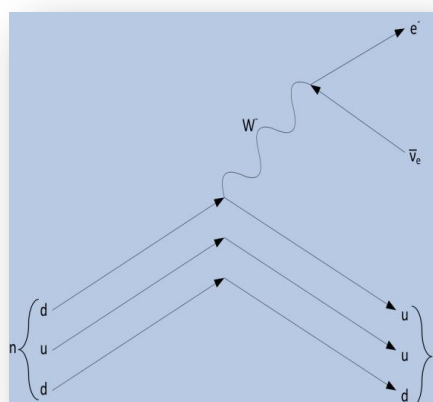
Κατά την διάσπαση β^+ έχουμε αντίστοιχα την μετατροπή ενός πρωτονίου του θυγατρικού πυρήνα σε ένα νετρόνιο, ένα ποζιτρόνιο και ένα νεutrίνο του ηλεκτρονίου αντίδραση που παίρνει σχηματικά την μορφή:



Στις παρακάτω εικόνες (Εικόνα 1.2, Εικόνα 1.3) φαίνονται τα διαγράμματα Feynman για τις διασπάσεις του πρωτονίου και του νετρονίου.



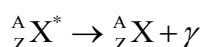
Εικόνα 1.2: Διάγραμμα Feynman της διάσπασης β^+ .



Εικόνα 1.3: Διάγραμμα Feynman της διάσπασης β^- .

Εκπομπή ακτινών γ

Εκπομπή ακτινών γ παρατηρείται κατά την αποδιέγερση ενεργειακά διεγερμένων πυρήνων. Η διαδικασία της πυρηνικής αυτοδιέγερσης συμβαίνει όταν διεγερμένοι πυρήνες εκπέμπουν ένα ποσοστό της ενέργειας που έχουν υπό την μορφή φωτονίων έτσι ώστε να επιστρέψουν σε μια λιγότερο διεγερμένη κατάσταση ή ακόμα και στην θεμελιώδη. Τα φωτόνια που εκπέμπονται κατά την διαδικασία ονομάζονται ακτινοβολία γ. Είναι φωτόνια υψηλής ενέργειας, που κυμαίνεται από 1MeV έως 1GeV. Οι πυρήνες που εκπέμπουν την ακτινοβολία γ είναι συνήθως πυρήνες οι οποίοι έχουν προέρθει από μια άλλη πυρηνική διάσπαση και κατά την διάρκεια της αυτοδιέγερσης δεν μεταστοιχειώνονται. Έτσι μπορούμε σχηματικά να περιγράψουμε την διαδικασία ως εξής:



όπου το X^* συμβολίζει τον πυρήνα σε διεγερμένη κατάσταση.

1.1.2 Τεχνητές πηγές ιοντιζουσών ακτινοβολιών

Ο άνθρωπος ανακάλυψε τεχνητές πηγές παραγωγής ακτινοβολιών κατά τα τέλη του 19^{ου} αιώνα. Έκτοτε η συστηματική έρευνα οδήγησε τόσο στην εκτεταμένη χρήση τους, όσο και στη λήψη μέτρων για την προστασία από τις ενδεχόμενες βλαβερές επιπτώσεις τους.

1.2 ΔΙΕΙΣΔΥΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΙΟΝΤΙΖΟΥΣΩΝ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΩΝ

Οι ιοντίζουσες ακτινοβολίες έχουν την ιδιότητα να εισχωρούν μέσα στην υλη, να αλληλεπιδρούν και να χάνουν ένα μέρος της ενέργειας τους, το οποίο απορροφά η υλη στην οποία εισήλθαν. Βέβαια, δεδομένων των χαρακτηριστικών κάθε ακτινοβολίας ο τρόπος αλληλεπίδρασης διαφέρει.

Η ακτινοβολία α είναι ακτινοβολία μικρής εμβέλειας. Αυτό συμβαίνει διότι είναι πολύ βαριά σωματίδια και κινούνται αργά μέσα από την ύλη με αποτέλεσμα η πιθανότητα αλληλεπίδρασης να είναι πολύ μεγάλη. Τα σωματίδια χάνουν έτσι πολύ γρήγορα όλη τους την ενέργεια άρα δεν μπορούν και να εισχωρήσουν σε μεγάλο βάθος. Δεν μπορούν να διαπεράσουν ένα φύλλο χαρτί, ούτε και το δέρμα μας, πράγμα που τις κάνει ακίνδυνες για τον

άνθρωπο. Παρόλα αυτά η ακτινοβολία είναι επικίνδυνη σε περιπτώσεις κατάποσης ή αν με οποιοδήποτε τρόπο εισέρθει στο ανθρώπινο σώμα.

Η ακτινοβολία β αποτελείται από ηλεκτρόνια ή ποζιτρόνια, άρα είναι πολύ πιο ελαφριά από την ακτινοβολία α, άρα αλληλεπιδρά λιγότερο με την ύλη. Αυτό την κάνει πιο διεισδυτική ακτινοβολία από την α, αφού μπορεί να διαπεράσει λίγα λεπτά φύλλα πλαστικού ή μετάλλου. Η διεισδυτικότητα της στα κύτταρα φτάνει το 1 cm, πράγμα που την καθιστά σχετικά ακίνδυνη για τον άνθρωπο, εκτός από περιπτώσεις όπου ένας β-εκπομπός εισέρθει στο σώμα.

Οι ακτινοβολίες γ και χ είναι ακτινοβολίες υψηλής ενέργειας, άρα και πολύ διεισδυτικές μέσα στην ύλη. Μπορούν να διασχίσουν μεγάλες αποστάσεις και έτσι θεωρούνται επικίνδυνες για τον άνθρωπο. Για την προστασία από τις ακτινοβολίες αυτές απαιτούνται αρκετά φύλλα μολύβδου ή κάποιο άλλο πυκνό μέσο.

Εξαιρετικά διεισδυτική και επικίνδυνη είναι η ακτινοβολία νετρονίων. Τα νετρόνια προέρχονται κατά κύριο λόγο από πυρηνικές διασπάσεις και χάνουν την ενέργεια τους με μια σειρά από αλληλεπιδράσεις. Για το λόγο αυτό χωρίζονται σε τουλάχιστον 3 κατηγορίες, τα θερμικά, τα γρήγορα και τα μεσαία. Η προστασία που απαιτείται είναι πολύ μεγάλη και επιτυγχάνεται συνήθως με πολλαπλά στρώματα μπετόν και ειδικά συστήματα ψύξης. (1)

1.3 ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΙΟΝΤΙΖΟΥΣΑΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ

Κατά την ακτινοβόληση έμβιας ύλης, η ενέργεια που απορροφάται επιφέρει αλλαγές στο βιολογικό υλικό. Οι βιολογικές αυτές μεταβολές κατηγοριοποιούνται στα εξής τρία στάδια:

- το φυσικό στάδιο, το οποίο έχει διάρκεια περίπου 10^{-13} sec,
- το χημικό στάδιο διάρκειας περίπου 10^{-10} sec και
- το βιολογικό στάδιο με διάρκεια που εκτείνεται από μερικά λεπτά έως και ολόκληρες γενεές κι εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, οι οποίοι θα αναλυθούν παρακάτω.

Το φυσικό στάδιο και το βιολογικό έχουν μελετηθεί εκτενώς ενώ το χημικό όχι. Το σίγουρο είναι πως τα στάδια αυτά είναι διαδοχικά και αλληλένδετα καθώς και ότι οι βιολογικές επιδράσεις εξαρτώνται άμεσα από το φυσικό στάδιο, δηλαδή από παράγοντες όπως η δόση της ακτινοβολίας καθώς και από παράγοντες που σχετίζονται με την απορρόφησή της από την ύλη.

1.3.1 Φυσικό στάδιο

Κατά το στάδιο αυτό η ιοντίζουσα ακτινοβολία που εισχωρεί στην υλη, αποφέρει ενέργεια υπό την μορφή ιοντισμού ατόμων, δημιουργώντας δηλαδή ιόντα, και διεγέρσεων. Το ποσό της ενέργειας που αποτίθεται έχει να κάνει με το είδος της ακτινοβολίας και εξαρτάται από την ευθύγραμμη μετάδοση ενέργειας (L.E.T.). Η LET είναι ένα μέγεθος που μετρά την εναπόθεση μιας δέσμης ακτινοβολίας καθώς διέρχεται μέσα από την ύλη. Είναι ένα μέγεθος το οποίο περιγράφεται από την σχέση:

$$L = \frac{\Delta E}{\Delta l} \quad (\text{KeV/cm στο SI})$$

Όπου ΔE είναι η απώλεια ενέργειας της δέσμης που έχει διανύσει Δl απόσταση μέσα στην βιολογική υλη. Το ουσιαστικό κομμάτι του σταδίου αυτού είναι φυσικά οι ιοντισμοί που λαμβάνουν χώρα κατά μήκος της διαδρομής της ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Το εύρος του ιοντισμού του βιολογικού υποθέματος έχει να κάνει με τον δείκτη LET της ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Ακτινοβολίες με υψηλό LET προκαλούν αυξημένη συγκέντρωση ιοντισμών και διεγέρσεων. Αντίθετα ακτινοβολίες με χαμηλό δείκτη προκαλούν λίγους ιοντισμούς. Η σημασία των ιοντισμών στην επίδραση της ακτινοβολίας έχει να κάνει με τους χημικούς δεσμούς που δημιουργούνται ή σπάνε κατά την διαδικασία αυτή και θα αναλυθεί στην επομένη παράγραφο.
(2)

1.3.2 Χημικό στάδιο

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, στο προηγούμενο στάδιο της αλληλεπίδρασης δημιουργούνται ιοντισμένα άτομα και ελεύθερα ηλεκτρόνια στην έμβια ύλη. Όπως είναι γνωστό, η έμβια υλη αποτελείται σε ένα μεγάλο ποσοστό της, περίπου 60 – 80 %, από νερό. Άρα κατά κύριο λόγο με την επίδραση της ακτινοβολίας συντελείται η αντίδραση της ραδιόλυσης του νερού, η υδρόλυση. Κατά την υδρόλυση παράγονται ιόντα H_2O^\cdot και H_2O^+ σύμφωνα με τις παρακάτω αντιδράσεις:



Τα ιόντα αυτά διασπώνται σχεδόν αμέσως παρέχοντας ελεύθερες ρίζες υδρογόνου και υδροξυλίου οι οποίες είναι εξαιρετικά δραστικές και επιφέρουν μια πληθώρα αλληλεπιδράσεων.

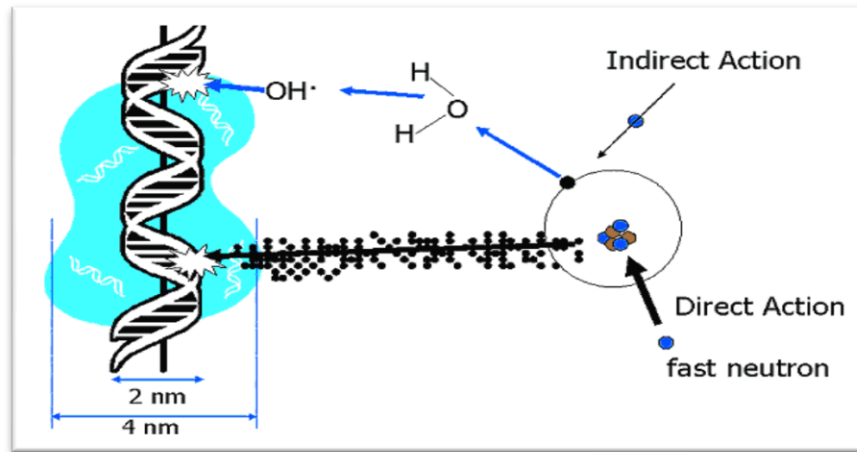
Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ελεύθερων ριζών, παράγουν προϊόντα όπως H_2O_2 , H_2O ή H_2 , ενώ οι αλληλεπιδράσεις ελεύθερων ριζών με τα παράγωγα τους μπορούν να παράξουν περαιτέρω ελεύθερες ρίζες. Ακόμα, δημιουργούνται αλληλεπιδράσεις των ελεύθερων αυτών ριζών με μόρια οργανικών ριζών με αποτέλεσμα την μετατροπή των μορίων αυτών σε εξαιρετικά δραστικές ελεύθερες ρίζες σύμφωνα με τις παρακάτω αντιδράσεις:



Όπου RH συμβολίζει ένα μόριο μεγαλομοριακής ουσίας. Οι βλάβες που προκαλούνται στα έμβια συστήματα από την δράση αυτή των ελεύθερων ριζών καλούνται *έμμεσο δράση* της ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Βέβαια οι βλάβες οι οποίες προκαλούνται από την έμμεσο δράση είναι μη επιβλαβείς, σε σχέση με τις βλάβες που προκαλούνται από τον απευθείας ιοντισμό των ατόμων, δηλαδή στην άμεσο δράση των ιοντίζουσών ακτινοβολιών, κατά την οποία συντελούνται αλλαγές λόγω ιοντισμού σε μακρομόρια όπως το DNA, τα οποία λόγω μοναδικότητας προκαλούν σημαντικές βλάβες στα κύτταρα. (2)

1.3.3 Βιολογικό στάδιο

Το βιολογικό στάδιο είναι αυτό που ακολουθεί τα δυο προηγούμενα. Πρόκειται για το στάδιο όπου μελετάται η επίδραση της ακτινοβολίας στην λειτουργία απλών και σύνθετων πολυκύτταρων οργανισμών. Ενώ τα προηγούμενα στάδια συμβαίνουν σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα, το βιολογικό στάδιο μπορεί να διαρκέσει από λίγα λεπτά έως και γενεές. Αυτό έχει να κάνει με την πολυπλοκότητα των βιολογικών συστημάτων και κυρίως με το ότι είναι ανοικτά συστήματα. Η αλλοίωση για παράδειγμα μιας πρωτεΐνης μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την ελλιπή της λειτουργία στην παρασκευή ενός ενζύμου, το οποίο ευθύνεται για μια συνολικότερη λειτουργία του οργανισμού. Αυτό βέβαια οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι αλλοιώσεις που συμβαίνουν σε επίπεδο μακρομορίων ή κυττάρων δρουν πολλαπλασιαστικά καθώς ανεβαίνουμε τα επίπεδα οργάνωσης ενός οργανισμού. Βέβαια κατά την διάρκεια αυτού του σταδίου ο κάθε οργανισμός θέτει σε λειτουργία επιδιορθωτικούς μηχανισμούς που είναι σε θέση να επιδιορθώσουν τις προσκληθείσες βλάβες. Η έκταση των βλαβών σε αυτό το επίπεδο, ακόμα και μετά την δράση των επιδιορθωτικών μηχανισμών, διαφέρει από ένα σύστημα σε ένα άλλο. Αυτό εξαρτάται από παράγοντες όπως η ένταση της ακτινοβολίας, η διάρκεια της έκθεσης σε αυτήν, καθώς και η ακτινοευαισθησία του συστήματος, ένας παράγοντας με τον οποίο απασχολείται η εργασία αυτή. (2)



Εικόνα 1.4: Άμεσος (Direct action) και Έμμεσος (Indirect action) δράση της ακτινοβολίας στο DNA των κυττάρων.

1.4 ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

Ο κυτταρικός κύκλος αποτελεί βασικό μηχανισμό με τον οποίο αναπαράγονται τα έμβια όντα, αναπτύσσονται οι πολυκύτταροι οργανισμοί, αντικαθίστανται τα νεκρά κύτταρα των ιστών και διανέμεται η γενετική πληροφορία στα θυγατρικά κύτταρα. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα ο κύκλος της κυτταρικής διαίρεσης χωρίζεται σε δύο περιόδους. Η μεσόφαση είναι η περίοδος κατά την οποία το κύτταρο αυξάνεται, προσλαμβάνοντας θρεπτικές ουσίες απαραίτητες για τον αναδιπλασιασμό του DNA και για την μίτωση. Η μίτωση είναι η περίοδος κατά την οποία το κύτταρο διαιρείται σε δύο ανεξάρτητα θυγατρικά κύτταρα.

1.4.1 Φάσεις του κυτταρικού κύκλου

Ο κυτταρικός κύκλος αποτελείται από τέσσερεις διακριτές φάσεις. Η φάση G_1 , η φάση S (σύνθεση) και η φάση G_2 αποτελούν τη μεσόφαση. Τελευταία φάση του κυτταρικού κύκλου είναι η M (μίτωση). Η φάση M αποτελείται από δύο διαδικασίες: τη μίτωση, στην οποία τα χρωμοσώματα του κυττάρου διανέμονται στα δύο θυγατρικά κύτταρα και την κυτταροκίνηση,

στην οποία το κυτταρόπλασμα του κυττάρου διαιρείται σχηματίζοντας δύο διακριτά κύτταρα. Η ενεργοποίηση της κάθε φάσης εξαρτάται από τη σωστή εξέλιξη και συμπλήρωση της προηγούμενης φάσης. Τα κύτταρα τα οποία προσωρινά ή αντιστρεπτά έχουν σταματήσει να διαιρούνται μπαίνουν σε μία κατάσταση ηρεμίας, την φάση G_0 . Μετά τη διαίρεση του κυττάρου, κάθε ένα από τα θυγατρικά κύτταρα ξεκινάει τη μεσόφαση ενός νέου κύκλου. Παρόλο που τα διάφορα στάδια της μεσόφασης συνήθως δεν διακρίνονται μορφολογικά, κάθε φάση του κυτταρικού κύκλου χαρακτηρίζεται από βιοχημικές διαδικασίες που προετοιμάζουν το κύτταρο για την έναρξη της κυτταρικής διαίρεσης.

Φάση αναμονής – ηρεμίας (Φάση G_0)

Τα κύτταρα που δεν πολλαπλασιάζονται στους πολυκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς μπαίνουν από τη φάση G_1 στην G_0 και μπορεί να παραμείνουν εκεί για μεγάλο χρονικό διάστημα, πιθανώς και επ' αόριστον όπως συχνά συμβαίνει στην περίπτωση των νευρώνων. Αυτό το γεγονός είναι πολύ συχνό για κύτταρα τα οποία είναι πλήρως διαφοροποιημένα (εξειδικευμένα να επιτελούν ένα έργο – π.χ. μυϊκά κύτταρα).

Μεσόφαση

Φάση G_1 : Η πρώτη φάση της μεσόφασης, από το τέλος της προηγούμενης φάσης M ως την αρχή της σύνθεσης του DNA ονομάζεται G_1 (G από την αγγλική λέξη Gap που σημαίνει χάσμα). Κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης οι βιοσυνθετικές διαδικασίες του κυττάρου, οι οποίες είχαν επιβραδυνθεί σημαντικά κατά τη διάρκεια της μίτωσης (φάσης M), συνεχίζουν με υψηλό ρυθμό. Αυτή η φάση χαρακτηρίζεται από τη σύνθεση διαφόρων ενζύμων κυρίως αυτών που χρειάζονται για την αντιγραφή του DNA, τα οποία είναι απαραίτητα για την φάση S. Η διάρκεια της φάσης αυτής διαφέρει πολύ, ακόμα και ανάμεσα σε διαφορετικά κύτταρα του ίδιου είδους.

Φάση Σύνθεσης (Φάση S): Η επόμενη φάση, φάση S, ξεκινάει όταν αρχίζει η σύνθεση του DNA. Μόλις ολοκληρωθεί, όλα τα χρωμοσώματα έχουν αντιγραφεί, δηλαδή κάθε χρωμόσωμα (πατρικό και μητρικό) έχει δύο αδερφές χρωματίδες. Έτσι κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης, η ποσότητα του DNA στο κύτταρο έχει διπλασιαστεί. Ο ρυθμός της μεταγραφής του RNA και της σύνθεσης των πρωτεϊνών, είναι πολύ αργός κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης. Η διάρκεια της φάσης S είναι σχετικά σταθερή ανάμεσα σε κύτταρα του ίδιου είδους.

Φάση G₂ : Το κύτταρο μετά την σύνθεση του DNA μπαίνει στην φάση G₂, η οποία διαρκεί μέχρι να μπει στη μίτωση. Και σε αυτή τη φάση πάλι, γίνεται η σύνθεση σημαντικών πρωτεϊνών, οι οποίες είναι απαραίτητες για τη διαδικασία της μίτωσης. Η αναστολή της σύνθεσης των πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια της φάσης G₂ εμποδίζει το κύτταρο να μπει στη μίτωση.

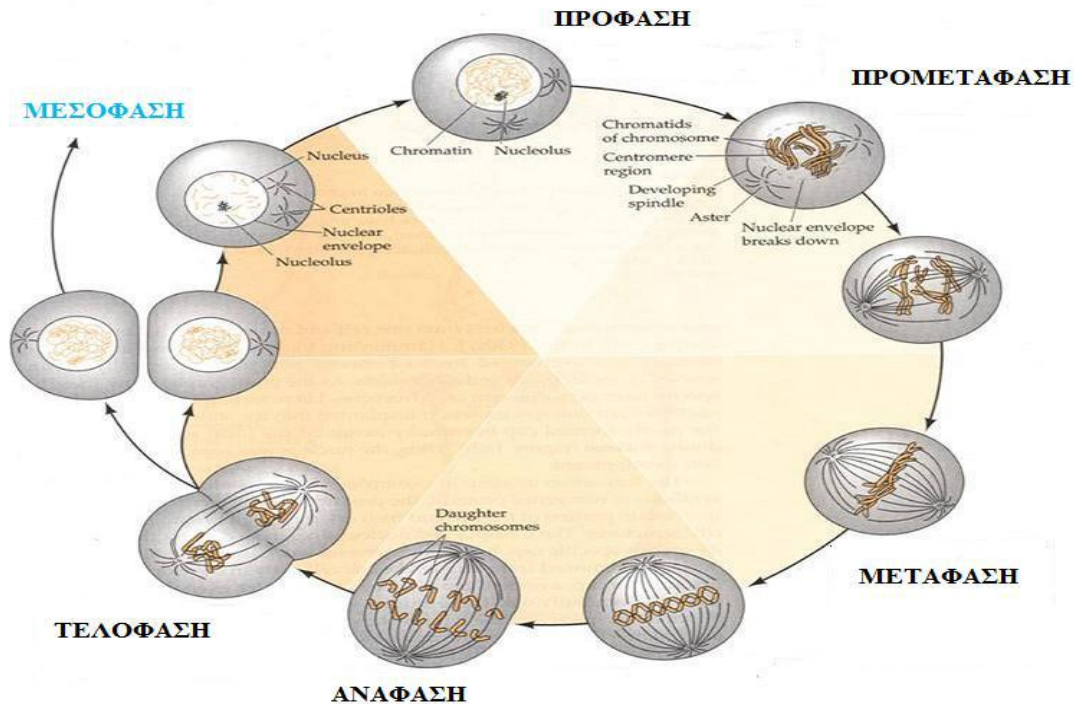
Μετάφαση (Φάση M)

Η φάση M διακρίνεται στη διαίρεση του πυρήνα (καρυοκίνηση) και στην κυτταροπλασματική διαίρεση (κυτταροκίνηση). Η φάση M διαιρείται επίσης σε διάφορες επιμέρους φάσεις που σχετίζονται με την συσπείρωση της χρωματίνης και την θέση των χρωμοσωμάτων, οι οποίες είναι γνωστές ως πρόφαση, προμετάφαση, μετάφαση, ανάφαση και τελόφαση που οδηγούν στην κυτταροκίνηση. Η M φάση είναι σχετικά σύντομη.

1.4.2 Διάρκεια του κυτταρικού κύκλου

Η διάρκεια του κυτταρικού κύκλου είναι διαφορετική για τους διάφορους οργανισμούς. Στα θηλαστικά ο κυτταρικός κύκλος διαρκεί περίπου 24 ώρες. Ο χρόνος του κυτταρικού κύκλου εξαρτάται επίσης και από το χρόνο που χρειάζεται το κύτταρο να επιδιορθώσει τυχόν βλάβες ώστε να μην μεταβιβαστούν στα θυγατρικά κύτταρα.

Η G₁ φάση του κυτταρικού κύκλου είναι η μεγαλύτερη και ποικίλει, διαρκεί περίπου 10-12 ώρες. Η S φάση διαρκεί περίπου 5-7 ώρες . Η G₂ φάση διαρκεί 3 με 4 ώρες και η φάση M μισή με 2 ώρες.



Εικόνα 1.5: Σχηματική αναπαράσταση των φάσεων του κυτταρικού κύκλου

1.4.3 Έλεγχος του κυτταρικού κύκλου

Για την διασφάλιση της αμιγούς μεταφοράς της γενετικής πληροφορίας στα θυγατρικά κύτταρα, αλλά και την επιβεβαίωση της επιτυχημένης ολοκλήρωσης της μίας κυτταρικής φάσης για την είσοδο στην άλλη, το κύτταρο διαθέτει μία σειρά από μηχανισμούς ελέγχου μεταξύ των διαδοχικών φάσεων του κυτταρικού κύκλου, **τα σημεία ελέγχου**.

Αναφορικά με την δομή της χρωματίνης στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου σωματικών κυττάρων, παρουσιάζεται με διαφορετικές μορφές ανάλογα με τον βαθμό συμπύκνωσης. Ο μέγιστος βαθμός συμπύκνωσης παρατηρείται στην φάση της μετάφασης όπου η χρωματίνη διοργανώνεται στα χρωμοσώματα για την διαίρεση του κυττάρου. Μετά το τέλος της κυτταρικής διαίρεσης τα χρωμοσώματα αποσυμπυκνώνονται και παίρνουν ξανά τη μορφή της χρωματίνης, προκειμένου να αντιγραφεί και να εκφραστεί η γενετική πληροφορία του DNA. Ο βαθμός συμπύκνωσης και αποσυμπύκνωσης της χρωματίνης ρυθμίζεται μέσω των φαινομένων φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης (δηλαδή της προσθήκης ή της αφαίρεσης φωσφορικής ομάδας) των ιστονών (H1 ιστόνη 1). Η H1 με την σειρά της ελέγχεται

από παράγοντες του κυτταρικού κύκλου (π.χ. συμπλέγματα **κυκλινών και κινασών**). Τα φαινόμενα αυτά της φωσφορυλίωσης λαμβάνουν χώρα καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και τη Μίτωση, κατά την οποία παρατηρούνται και τα υψηλότερα επίπεδα συμπύκνωσης της χρωματίνης και ενεργότητας του **παράγοντα που προωθεί τη μίτωση, MPF (mitosis promoting factor)**

Η επαγωγή χρωμοσωματικών αλλοιώσεων και γενικότερα αλλαγών στο γενετικό υλικό του κυττάρου προκαλεί ενεργοποίηση, ανάλογα με το είδος της γενετικής βλάβης, των κατάλληλων μηχανισμών επιδιόρθωσης με σκοπό τη διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος. Σε περίπτωση μη επιδιόρθωσης των βλαβών το κύτταρο οδηγείται ή στον κυτταρικό θάνατο ή επιβιώνει φέροντας συγκεκριμένες μεταλλάξεις ή χρωμοσωματικές αλλοιώσεις οι οποίες με την σειρά τους μπορούν να αποτελέσουν αίτιο καρκινογένεσης.

Τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου εμποδίζουν σε συγκεκριμένα σημεία την εξέλιξη του, όταν αυτό είναι αναγκαίο για το κύτταρο, επιτρέποντας έτσι την επαλήθευση της ολοκλήρωσης των απαραίτητων διαδικασιών της φάσης και την επιδιόρθωση των βλαβών του DNA. Το κύτταρο δε μπορεί να προχωρήσει στην επόμενη φάση μέχρι να ικανοποιηθούν οι απαιτήσεις του σημείου ελέγχου.

Υπάρχουν αρκετά σημεία ελέγχου για να επιβεβαιώνουν ότι το επιβλαβές ή το ατελές DNA δε θα περάσει στα θυγατρικά κύτταρα. Ενδεικτικά αναφέρονται δύο κύρια σημεία ελέγχου: το G₁/S και το G₂/M. Η G₁/S μετάβαση είναι γνωστό και ως περιοριστικό σημείο – σημείο χωρίς επιστροφή.

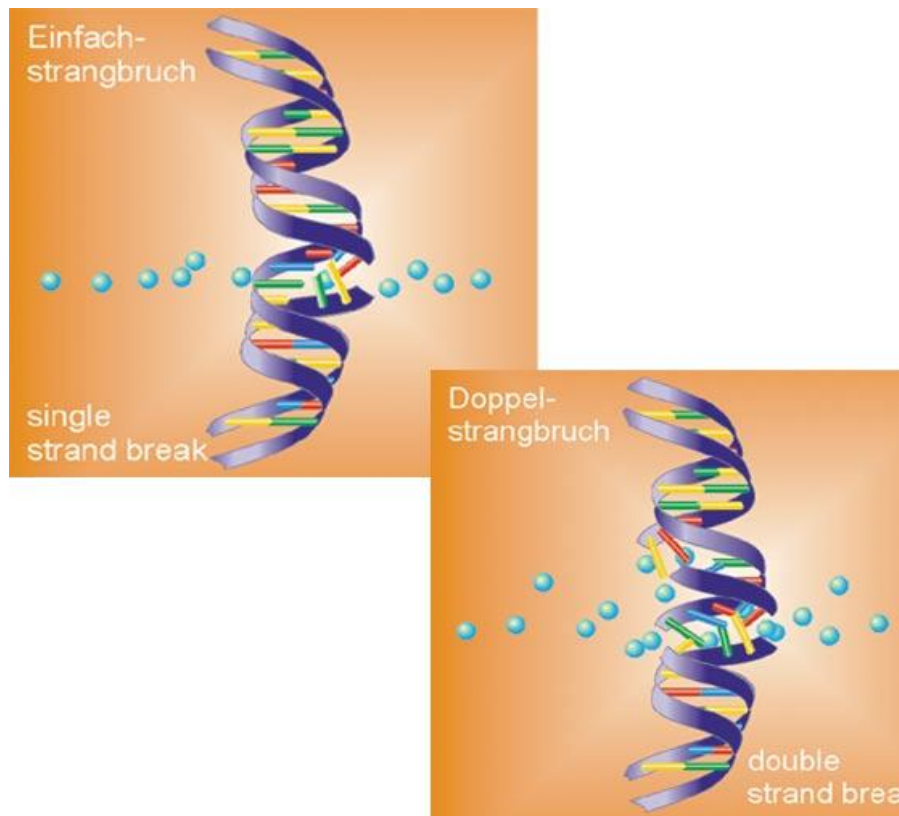
Τα κύτταρα αντιδρούν στις ιονίζουσες ακτινοβολίες και στις αλλοιώσεις του DNA ενεργοποιώντας τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Τα σημεία ελέγχου αναστέλλουν τον κυτταρικό κύκλο σε συγκεκριμένα σημεία και αφήνουν το κύτταρο να επιδιορθώσει τις βλάβες. Οι ιονίζουσες ακτινοβολίες μπορούν να προκαλούν αναστολή στην G₁, S και στην G₂ φάση του κυτταρικού κύκλου. (3)

1.5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΙΟΝΤΙΖΟΥΣΩΝ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΩΝ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα κύτταρα αποτελούν τις βασικές μονάδες δομής και λειτουργίας των κυττάρων. Συνεπώς η μελέτη της επίδρασης ακτινοβολίας στους οργανισμούς ξεκινά από το επίπεδο των κυττάρων. Όπως προαναφέρθηκε οι βλάβες που προκαλούνται από την ακτινοβολία χωρίζονται στις άμεσες και στις έμμεσες. Οι έμμεσες βλάβες, δηλαδή οι ιονισμοί και οι χημικές αντιδράσεις έχουν μικρότερη έκταση από τις άμεσες. Αυτό συμβαίνει διότι οι άμεσες βλάβες επιδρούν σε

μόρια όπως το δεσοξυριβονουκλεικό οξύ (DNA) το οποίο, λόγω μοναδικότητας και κομβικότητας της λειτουργίας του, έχει πολύ σοβαρές επιπτώσεις στα κύτταρα. Κατά συνέπεια η μελέτη στην επίδραση των ακτινοβολιών στα κύτταρα έχει επικεντρωθεί, και δικαίως, στις αλλοιώσεις που επιδρούν στο γενετικό υλικό. Συγκεκριμένα μπορεί να συμβεί α) σπάσιμο μιας έλικας (SSB, simple strand break) και β) σπάσιμο διπλής έλικας (DSB, double strand break) (Εικόνα 1.6). Οι ρήξεις αυτές είναι υπεύθυνες για τις χρωμοσωματικές αλλοιώσεις του γενετικού υλικού. Άλλες αλλοιώσεις που μπορούν να συμβούν είναι:

- Ενδομοριακή και διαμοριακή σύνδεση μεταξύ DNA ή μεταξύ DNA-πρωτεΐνης.
- Αλλοίωση των οργανικών βάσεων (π.χ. αλκυλίωση – συνήθως μεθυλίωση, οξειδωση, υδρόλυση).
- Σπάσιμο των δεσμών υδρογόνου που προκαλεί μόνιμη παραμόρφωση της δομής του DNA.
- Απώλειες βάσεων
- Αλλαγές βάσεων



Εικόνα 1.6: Σπάσιμο μονής και διπλής έλικας.

1.6 ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΙΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝΤΑΙ ΑΠΟ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ

Οι αλλοιώσεις γενικά χωρίζονται σε δυο κατηγορίες, οι οποίες έχουν να κάνουν με την φάση του κυτταρικού κύκλου που βρίσκεται το κύτταρο τη στιγμή της ακτινοβόλησης. *Χρωμοσωματικές αλλοιώσεις* καλούνται οι αλλοιώσεις που παρατηρούνται και στις δύο χρωματίδες του χρωμοσώματος και προκαλούνται όταν η ιοντίζουσα ακτινοβολία επιδράσει πριν από τη φάση της S της σύνθεσης (αναδιπλασιασμού) του DNA (G1 ή S). Όταν το DNA έχει αναδιπλασιαστεί (G2 ή S) η επίδραση της ακτινοβολίας επιφέρει αλλοιώσεις σε επίπεδο χρωματίνης που ονομάζονται *χρωματιδικές αλλοιώσεις* (Εικόνα 1.7).

Ανάμεσα στις χρωμοσωματικές αλλοιώσεις συγκαταλέγονται οι ακόλουθες:

- 1) Η τελική διαγραφή.
- 2) Σχηματισμός δικεντρικού χρωμοσώματος.
- 3) Σχηματισμός δακτυλίου.
- 4) Διπλή μετατόπιση ή αντιμετάθεση κ.α.

Οι χρωματιδικές αλλοιώσεις εμφανίζονται ως ασυνέχειες (gaps) και θραύσεις (breaks) (2).



Εικόνα 1.7: Αλλοιώσεις. Στην πρώτη εικόνα φαίνονται τα υγιή κύτταρα έλεγχου (control), στην δεύτερη φαίνονται χρωματιδικές αλλοιώσεις, ενώ στην τρίτη εικόνα φαίνονται χρωμοσωματικές αλλοιώσεις

1.7 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ - ΑΚΤΙΝΟΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ

Η ακτινοευαισθησία των κυττάρων εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, κυρίως από τον κυτταρικό κύκλο, τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης, τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, τους μηχανισμούς της απόπτωσης κ.α.

Έχει παρατηρηθεί ότι η ακτινοευαισθησία των κυττάρων εξαρτάται από τη φάση του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκεται κατά τη στιγμή της ακτινοβόλησης. Έχει αποδειχτεί, ότι το κύτταρο παρουσιάζει ελάχιστη ακτινοευαισθησία στην φάση G1 και την S, ενώ η μέγιστη ακτινοευαισθησία παρουσιάζεται στις φάσεις G2 και στην μίτωση. Ιδιαίτερη ευαισθησία στην ακτινοβολία παρουσιάζουν τα σημεία μετάβασης από την G2 στην M και από την G1 στην S.

Είναι επίσης γνωστό πως σε περίπτωση πρόκλησης βλάβης στο γενετικό υλικό ενεργοποιούνται μηχανισμοί επιδιόρθωσης των βλαβών που είναι εξέχουσας σημασίας για την επιβίωση του κυττάρου. Τέτοιοι μηχανισμοί είναι :

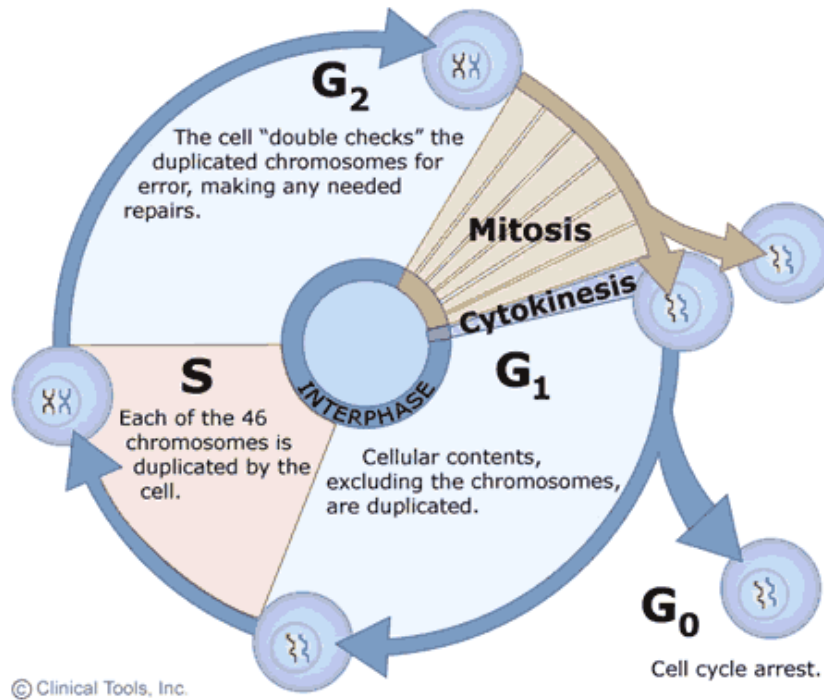
Μηχανισμοί επιδιόρθωσης βλαβών της μίας αλυσίδας του DNA (single strand breaks)

- **Mismatch repair (MMR):** Διορθώνει σφάλματα κατά την αντιγραφή του DNA τα οποία οδηγούν στην εισαγωγή μίας ή λίγων (2-4) λανθασμένων (αλλά όχι αλλοιωμένων) βάσεων
- **Base excision repair (BER):** Διορθώνει αλλοιώσεις μίας μόνο βάσης νουκλεοτιδίου (οξειδωση, μεθυλίωση, αποπουρίνωση ή απαμίνωση) και single strand breaks
- **Nucleotide excision repair (NER):** Διορθώνει αλλοιώσεις που εκτείνονται σε δύο ή περισσότερα νουκλεοτίδια (για παράδειγμα διμερή θυμίνης) και την προσθήκη ογκωδών μορίων

Μηχανισμοί επιδιόρθωσης διπλής αλυσίδας (ds breaks).

Είναι η πιο επικίνδυνη μορφή βλαβών του DNA. Αποτυχία στην επιδιόρθωση των ds breaks επιφέρει χρωμοσωμικές ελλείψεις, μετατοπίσεις ή διπλασιασμούς, δηλαδή αστάθεια του γονιδιώματος. Ένα από τα πρώτα στάδια αναγνώρισης της βλάβης είναι η φωσφορυλίωση της Ιστόνης H2AX από τις πρωτεΐνες ATM και ATR

- **Nonhomologous End-Joining:** Ενεργός κυρίως κατά την G1, συγκόλληση των σπασμένων άκρων του DNA, μηχανισμός γρήγορος αλλά επιρρεπής σε σφάλματα
- **Homologous Recombination:** Ενεργός κατά την G2 φάση του κυτταρικού κύκλου, πολύ ακριβής μηχανισμός, χρησιμοποιεί πληροφορία για την επιδιόρθωση από την αδελφή χρωματίδη



Εικόνα 1.8: Οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Φαίνονται τα στάδια διπλασιασμού του γενετικού υλικού σε κάθε μια φάση.

Κατά την διαδικασία επιδιόρθωσης των βλαβών στο DNA είναι δυνατόν να προκληθεί καθυστέρηση του κυτταρικού κύκλου ή και απόπτωση (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος).

Η διακύμανση της ακτινοευαισθησίας αποδόθηκε αρχικά στην οργάνωση της χρωματίνης χωρίς όμως αυτό να μπορεί να δώσει εξήγηση για την αυξημένη ευαισθησία στα σημεία μετάβασης από την G₁ στην S και από την G₂ στην M φάση του κυτταρικού κύκλου. Επίσης τα επίπεδα του αριθμού των θραυσμάτων διπλής έλικας που επάγονται από την ιοντίζουσα ακτινοβολία και οδηγούν στον σχηματισμό χρωμοσωματικών αλλοιώσεων είναι παρόμοια στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου.

Διατυπώθηκε η υπόθεση πως η διακύμανση της ακτινευαισθησίας στον κυτταρικό κύκλο βασίζεται στην διαφορετική επιδιορθωτική ικανότητα στις διάφορες φάσεις του κύκλου, όμως υπάρχουν ερευνητικές ομάδες που δεν συμμερίζονται αυτή την άποψη.

Άλλοι ερευνητές ισχυρίζονται ότι καθοριστικός παράγοντας στην επαγωγή χρωμοσωματικών αλλοιώσεων μετά από έκθεση σε γενετοξικούς παράγοντες είναι ο βαθμός φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών που καθορίζει την κίνηση της συμπύκνωσης ή αποσυμπύκνωση της χρωματίνης.

Ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει σημαντικά την ακτινοευαισθησία είναι το είδος του κυττάρου το οποίο ακτινοβολείται. Τα κύτταρα ενδογενώς παρουσιάζουν διαφορές στην ακτινοευαισθησία τους, ενώ αντίστοιχες διαφορές παρουσιάζονται μεταξύ οργάνων και μεταξύ οργανισμών. Σε αυτήν την κλίμακα, ρόλο μπορεί να παίζει το φύλο του οργανισμού, η ηλικία, ενδοκρινικοί και μεταβολικοί παράγοντες. Ακόμα, οι βιολογικές επιδράσεις της ακτινοβολίας επηρεάζονται από την ώρα της ακτινοβολήσης, το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται τα όργανα ή οι οργανισμοί, η διατροφή κ.α.

Επίσης, η μειωμένη οξυγόνωση των ιστών (υποξεία) ελαττώνει την κυτταρική ακτινοευαισθησία λόγω της απουσίας της καταλυτικής ιδιότητας του οξυγόνου στην παραγωγή ελευθέρων ριζών. Η κατανομή της απορροφούμενης ποσότητας ενέργειας από τους ιστούς εξαρτάται κυρίως από το είδος της ακτινοβολίας, δηλαδή αν είναι σωματιδιακή ή ηλεκτρομαγνητική και από την ενέργεια αυτής.

Η βιολογική δράση της ακτινοβολίας εξαρτάται όχι μόνο από τους παράγοντες που αναφέρθηκαν παραπάνω αλλά και από την συνολική δόση και τον τρόπο χορήγησης της ακτινοβολίας. Δηλαδή από τη χρονική περίοδο χορήγησης της συνολικής δόσης και την ημερησία κατανομή μίας ή περισσότερων επί μέρους δόσεων (4).

1.8 ΑΚΤΙΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΙ Ο ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ

Καρκίνος

Ο καρκίνος είναι μια πολυπαραγοντική νόσος. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η έκθεση σε εξωγενείς παράγοντες, όπως η ακτινοβολία, προκαλεί γονιδιακές αλλά και χρωμοσωματικές αλλοιώσεις και επάγει γονιδιωματική αστάθεια. Η καρκινογένεση είναι μία εξελικτική διαδικασία, χαρακτηρίζεται από μία πληθώρα γενετικών αλλοιώσεων (μοριακές μεταλλάξεις και χρωμοσωματικές αλλοιώσεις) που συσσωρεύονται κατά την εξέλιξη μίας μακράς διαδικασίας επιλογής κυτταρικών κλώνων. Η διαδικασία αυτή ολοκληρώνεται όταν το κύτταρο εξαλλάσσεται μετά από μία ή περισσότερες αλλοιώσεις που του δίνουν ένα γενναίο αυξητικό (proliferative) πλεονέκτημα.

Η παρουσία αυτή του όγκου δημιουργεί προβλήματα στην ομαλή λειτουργία του οργανισμού, αφού τα κύτταρα αφ' ενός δεν επιτελούν τις φυσιολογικές τους λειτουργίες ενώ αφ' ετέρου, ο όγκος ως ένα νέο και άρα ξένο ως προς τα φυσιολογικά κύτταρα σώμα, δυσχεραίνει την λειτουργία των υγιών κυττάρων. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν επίσης την δυνατότητα μετάστασης, την μεταφορά τους δηλαδή σε ένα άλλο όργανο ή ιστό και τη δημιουργία νέου όγκου εκεί. Αυτό συμβαίνει διότι τα καρκινικά κύτταρα που έχουν πολύ έντονο πολλαπλασιασμό διασπείρονται από την φυσιολογική τους θέση και εισβάλλουν σε άλλους γειτονικούς ιστούς ή μεταφέρονται μέσω του αίματος σε άλλες περιοχές του σώματος (5).

Η θεραπεία των καρκινικών κυττάρων επικεντρώνεται στην θανάτωση ή στην απομάκρυνση τους από το σώμα. Σε αυτό το στόχο, επιστρατεύονται πολλές ιατρικές τεχνικές όπως η χημειοθεραπεία, η χειρουργική θεραπεία ή η εσωτερική χορήγηση ραδιοφαρμάκων και η ακτινοθεραπεία. Στις περισσότερες των περιπτώσεων φυσικά, απαιτείται η συνδυαστική λειτουργία τέτοιων μεθόδων.

Η συμβολή της ακτινοθεραπείας

Η ακτινοθεραπεία είναι ο κλάδος εκείνος της ιατρικής ο οποίος ασχολείται με την θεραπεία ή την ανακουφιστική θεραπευτική αντιμετώπιση των μορφών καρκίνου και γενικά όλων των μορφών νεοπλασμάτων, έχοντας ως κύριο μέσο την χρήση ιοντιζουσών ακτινοβολιών. Η χρήση των ακτινοβολιών έχει ως στόχο τον θάνατο των κυττάρων του νεοπλασματος προκαλώντας βλάβες στην κυτταρική τους λειτουργία καθώς φυσικά και την συρρίκνωση τους. Η συρρίκνωση ή η καταστροφή του όγκου σε πολλές περιπτώσεις βοηθά στην επιμήκυνση της ζωής του ασθενούς καθώς και βελτίωση του επιπέδου ζωής του, αφού ελαφρύνει τον ασθενή από πόνους.

Μειονεκτήματα της χρήσης ακτινοθεραπείας

Βασικό ζήτημα και πρόβλημα για την ακτινοθεραπεία είναι να περιοριστεί όσο το δυνατόν περισσότερο η απορρόφηση της ακτινοβολίας από τα κύτταρα που βρίσκονται γύρω από την περιοχή του στόχου. Για όγκους ή νεοπλάσματα που βρίσκονται στο βάθος του σώματος αυτό είναι ένα σύνθετο ζήτημα που πολλές φορές απαιτεί την χρήση πολλαπλών πυλών εισόδου της ακτινοβολίας και με χαμηλή ένταση. Χρησιμοποιούνται ακτινοβολίες που δεν εξασθενούν γρήγορα, καθώς διέρχονται μέσω των υγιών ιστών. Αντίθετα, για νεοπλάσματα ή όγκους που βρίσκονται κοντά στο δέρμα απαιτείται χρήση τέτοιων ακτινοβολιών που να

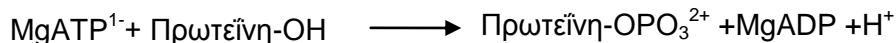
εξασθενούν σε πολύ μικρή απόσταση μετά την επαφή τους με το στόχο. Επίσης η χρήση ακτινοβολιών, καθώς και η χρήση βοηθητικών προς την ακτινοβολία ουσιών, παρουσιάζει σε πολλές περιπτώσεις τοξικότητα και για τα φυσιολογικά κύτταρα περιμετρικά του όγκου. Άρα μέχρι τώρα η ακτινοθεραπεία παρουσιάζει μια έλλειψη εξειδίκευσης προς τα καρκινικά κύτταρα, ένα ζήτημα που επηρεάζει σε τεράστιο ποσοστό την αποτελεσματικότητα της.

Σε πολλές δε περιπτώσεις, χρήση ακτινοβολίας επιφέρει σημαντικές παρενέργειες, ακόμα και δημιουργία δευτερογενούς καρκίνου. Επίσης έχει παρατηρηθεί σε ορισμένες περιπτώσεις ότι η ακτινοβολία βοηθά στην αύξηση του όγκου, όπως γίνεται σε κύτταρα που υπερεκφράζουν τον επιδερμικό υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα, EGFR. Η επίδραση του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα θα μελετηθεί παρακάτω, καθώς θα αποτελέσει αντικείμενο μελέτης της παρούσας διπλωματικής.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο :

Ο ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΟΥ ΕΠΙΔΕΡΜΙΚΟΥ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ (EGFR)

Ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermic Growth Factor Receptor - EGFR) είναι πρωτεΐνες που βρίσκονται στην επιφάνεια των υγιών, αλλά και των καρκινικών κυττάρων. Ο EGFR, είναι επίσης γνωστός και ως HER-1 ή ErbB, είναι μέλος μιας τετραμελούς οικογένειας πρωτεϊνών, η οποία με την σειρά της ανήκει στην οικογένεια των κινασών. Οι κινάσες είναι ένζυμα, τα οποία ρυθμίζουν την απόπτωση, την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, την διαδικασία της διαφοροποίησης, την αναλογική απάντηση των κυττάρων κ.α. Διαταραχή της λειτουργίας των κινασών μπορεί να προκαλέσει μια σειρά από σοβαρές παθήσεις στα κύτταρα, όπως καρκίνο, διαβήτη, καρδιακές διαταραχές και διαταραχές του νευρικού συστήματος. Οι πρωτεϊνικές κινάσες καταλύουν την ακόλουθη αντίδραση:



Δηλαδή, μεταφέρουν από το ATP σε μια πρωτεΐνη στόχο μία φωσφορική ομάδα στη θέση ενός -OH. Μια διαδικασία που ονομάζεται φωσφοριλίωση. (6) Όπως θα δούμε και στην συνέχεια, η διαδικασία αυτή είναι εξέχουσας σημασίας για την ενεργοποίηση του υποδοχέα και για την έναρξη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Η οικογένεια των ErbB υποδοχέων περιλαμβάνει τον EGFR, τον ErbB-2, τον ErbB-3 και τον ErbB-4. (7)

Το πρώτο μέλος της οικογένειας, αλλιώς και Erb-1, υπερεκφράζεται σε πολλές μορφές καρκίνου, όπως καρκίνος του μαστού, του εγκεφάλου, των νεφρών, των πνευμόνων και του προστάτη (Πίνακας 2.1). Με τη δομή και τις λειτουργίες του EGFR θα ασχοληθούμε ειδικότερα παρακάτω, καθώς η δράση του θα μας απασχολήσει στην παρούσα διπλωματική.

Είδος όγκου HER1/EGFR	Έκφραση (%)
Πλακώδες κεφαλής - τραχήλου	70-100
Μη μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα	50-90
Προστάτη	40-70
Γλοίωμα	15-50
Στομάχου	30-60
Μαστού	35-70
Παχέος εντέρου	25-80
Παγκρέατος	30-50
Ωοθηκών	35-60

Πίνακας 2.1 :Υπερέκφραση του EGFR σε διάφορα είδη καρκινικών όγκων

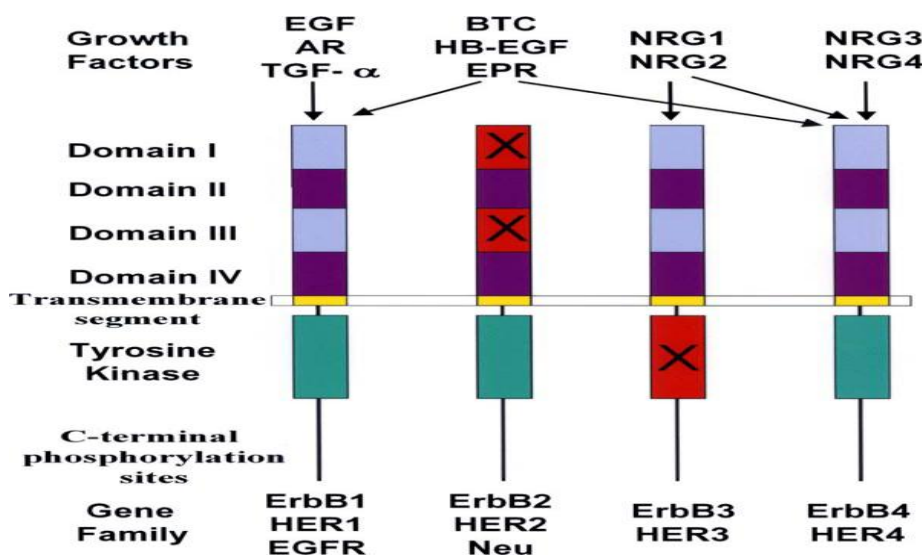
Το δεύτερο μέλος της οικογένειας είναι ο υποδοχέας ErbB-2. Ο ErbB-2 δημιουργεί ετεροδιμερή με κάθε ένα από τα άλλα μέλη της οικογένειας και αυτά τα ετεροδιμερή είναι ικανά να προσδέσουν αυξητικούς παράγοντες. Ο υποδοχέας υπερεκφράζεται στον καρκίνο του στήθους, του εντέρου, του ενδομητρίου, του παγκρέατος, του οισοφάγου και των πνευμόνων. (8)

Το τρίτο μέλος της οικογένειας των υποδοχέων είναι ο υποδοχέας ErbB-3. Παρότι ο υποδοχέας αυτός έχει πολλές ομοιότητες στην δομή της περιοχής της τυροσίνης με τα άλλα μέλη, η λειτουργία των κινασών είναι διαταραγμένη. Μπορεί και αυτός να διμεριστεί με όλα τα άλλα μέλη της οικογένειας, και λόγω έλλειψης της λειτουργίας των κινασών, η φωσφορυλίωση με τα άλλα μόρια είναι ο μόνος τρόπος για να μεταδώσει σήματα για τις διάφορες λειτουργίες. Ο υποδοχέας ErbB-3 υπερεκφράζεται στον καρκίνο του μαστού, του εντέρου, του προστάτη και του στομάχου.

Το τελευταίο μέλος της οικογένειας των ErbBs υποδοχέων είναι ο ErbB-4, ο οποίος υπερεκφράζεται στον καρκίνο του μαστού και στους κοκκιδείς καρκινικούς όγκους των ωοθηκών.

Τα φυσιολογικά κύτταρα μεγαλώνουν, διαιρούνται και πεθαίνουν σε έναν φυσιολογικό κύκλο. Κατά την διάρκεια αυτού του κύκλου, τα κύτταρα δέχονται σήματα από το εξωτερικό

περιβάλλον με την μορφή χημικών ενώσεων. Οι χημικοί αυτοί αγγελιοφόροι, όπως είναι και ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας EGF, δένονται στο εξωτερικό του κυττάρου πάνω στους ειδικούς υποδοχείς όπως ο EGFR. Καθώς δένονται στον υποδοχέα, αυτός ενεργοποιείται, φωσφορυλιώνεται, το σήμα μεταφέρεται στο εσωτερικό του κυττάρου και καταλήγει στον πυρήνα όπου αρχίζουν να λαμβάνουν χώρα οι διαδικασίες πολλαπλασιασμού. Συνήθως, ο EGFR βοηθά στην ρύθμιση του πολλαπλασιασμού πολλών διαφορετικών κυττάρων στο σώμα. Όμως, χάρη σε αυτήν την ιδιότητα του, βοηθά και στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, καθώς σε ορισμένες καρκινικές σειρές κυττάρων ο υποδοχέας αυτός βρίσκεται σε πολύ μεγαλύτερο αριθμό στην επιφάνεια των κυττάρων, από ότι στα φυσιολογικά. Επιπλέον σε πολλές μορφές καρκίνου, ο EGFR είτε υπερεκφράζεται είτε οι διαδικασίες που συνήθως ενεργοποιούν την διαδικασία πολλαπλασιασμού είναι συνεχώς εν λειτουργία. Και οι δυο αυτές διαταραχές οδηγούν στον ανεξέλεγκτο και έντονο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. (9)



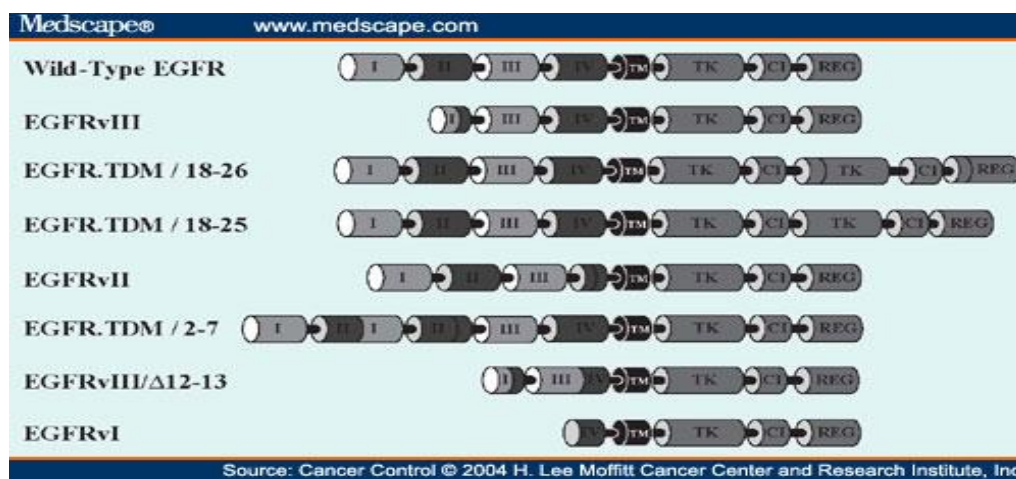
Εικόνα 2.1: Αναπαράσταση της οικογένειας των ERB υποδοχέων

2.1 ΔΟΜΗ ΤΟΥ EGFR

Ο EGFR αποτελείται από μια μονοκλωνική, πολυπεπτιδική αλυσίδα 1186 αμινοξέων, με μοριακό βάρος 170 KDa (7). Όπως ήδη αναφέρθηκε, ο υποδοχέας αποτελείται από 3 βασικές περιοχές, την εξωκυτταρική περιοχή σύνδεσης, την εσωκυτταρική περιοχή με κινάσες της

τυροσίνης και μια ενδομεμβρανιακή περιοχή με μια μονή υδρόφοβη αλληλουχία σύνδεσης με την οποία ο υποδοχέας προσδένεται στην μεμβράνη του κυττάρου (10). Ειδικότερα, η δομή της κάθε περιοχής έχει ως εξής:

1. Εξωκυτταρική περιοχή (ligand binding domain): Η περιοχή εκείνη της πρωτεΐνης η οποία βρίσκεται έξω από το κύτταρο και περιέχει την περιοχή όπου λαμβάνει χώρα η ένωση του υποδοχέα με τους αυξητικούς παράγοντες, όπως ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF) ή ο μετατρεπτός αυξητικός παράγοντας άλφα (TGF- α). Η εξωκυτταρική περιοχή μπορεί να διαχωριστεί στις περιοχές I έως IV, με τις περιοχές I και III να είναι υπεύθυνες για την πρόσδεση των μορίων συνδετών (ligand binding region). Οι περιοχές II και IV είναι πλούσιες σε κυστεΐνες και καθεμιά από αυτές περιέχει περίπου 10 δυσουφλιδικές συνδέσεις. Επίσης η περιοχή II είναι υπεύθυνη για τις ενώσεις που λαμβάνουν χώρα μεταξύ των υποδοχέων (11). Από αυτήν την περιοχή εξέρχει ένα άκρο του υποδοχέα, το οποίο είναι ικανό να συνδεθεί με ένα αντίστοιχο άκρο ενός δευτέρου υποδοχέα. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται διμερισμός. Σε πολλές περιπτώσεις, η διάλυση ή η μετάλλαξη του διμερισμένου μορίου, εμποδίζει την ενεργοποίηση του υποδοχέα από τα μόρια συνδέτες (12). Η παραπάνω δομή για το εξωτερικό τμήμα των ErbB υποδοχέων βρέθηκε σε μη ενεργοποιημένους υποδοχείς, σε pH 5 και σε υποδοχέα ErbB-3, χωρίς ο τελευταίος να έχει υποστεί διμερισμό. Η πρόσδεση των μορίων συνδετών αλλάζει τις σχετικές θέσεις των περιοχών II και III, όχι όμως τον σχετικό προσανατολισμό των περιοχών I και II. Σε έναν μη ενεργοποιημένο υποδοχέα, η περιοχή II προσδένεται με την περιοχή IV και το άκρο διμερισμού κρύβεται με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η πρόσδεση του με γειτονικούς υποδοχείς (13).

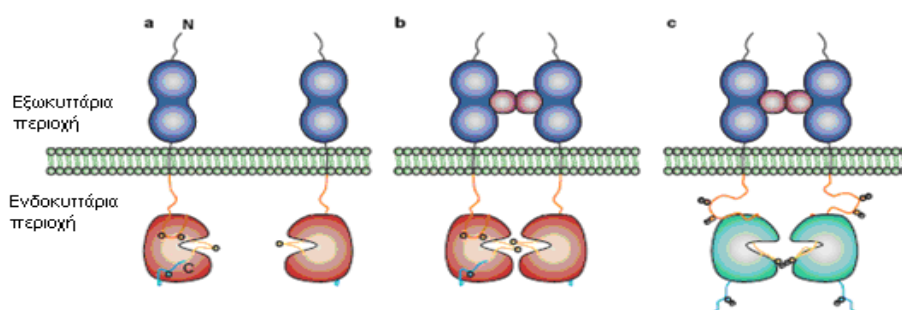


Εικόνα 2.2: Αναπαράσταση της δομής διαφόρων τύπων του EGFR.

2. Διαμεμβρανιακή περιοχή: Είναι η περιοχή του υποδοχέα το οποίο βρίσκεται στο εσωτερικό της κυτταρικής μεμβράνης και σταθεροποιεί τον υποδοχέα μέσα στην κυτταρική μεμβράνη.

3. Εσωκυτταρική περιοχή: Είναι το τμήμα εκείνο που προβάλλεται στην ενδοκυτταρική περιοχή. Το τμήμα αυτό είναι υπεύθυνο για την μεταφορά σημάτων στο εσωτερικό του κυττάρου. Η περιοχή αυτή, γνωστή κι ως περιοχή κινάσης της τυροσίνης, έχει ακριβώς την ίδια χαρακτηριστική δομή που παρατηρείται σε όλες τις πρωτεϊνικές κινάσες. (12)

Από όλους τους υποδοχείς της οικογένειας των ErbBs μόνο ο EGFR και ο ErbB-4 μπορούν και να συνδεθούν με τους αυξητικούς παράγοντες και να έχουν δράση κινάσης της τυροσίνης. Όλοι οι υποδοχείς της οικογένειας ErbBs ενεργοποιούνται φυσιολογικά με πρόσδεση σε ένα μόριο πρόσδεσης σε αναλογία 1:1, με συνέπεια το διμερισμό και στη συνέχεια τη φωσφορυλίωση τους (Εικόνα 2.3).

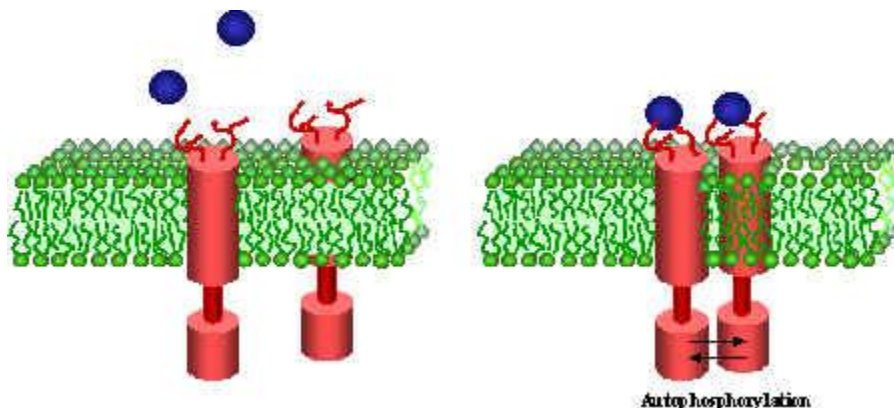


Εικόνα 2.3: **a)** Με την απουσία μορίου προσδέτη η ενδοκυττάρια περιοχή με δράση TK έχει χαμηλή δραστηριότητα (κόκκινο χρώμα), **b)** Μετά την πρόσδεση του μορίου-συνδέτη (μοβ χρώμα) στην εξωκυττάρια περιοχή οι υποδοχείς διμερίζονται και φωσφορυλιώνονται, **c)** Μετά την φωσφορυλίωση οι περιοχές με δράση TK είναι ενεργές (πράσινο χρώμα).

2.2 ΜΟΡΙΑ ΠΡΟΣΔΕΤΕΣ – ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ EGFR

Όπως ήδη αναφέρθηκε τα μόρια προσδέτες είναι μόρια τα οποία προσδένονται στο εξωκυτταρικό τμήμα του υποδοχέα και τον ενεργοποιούν. Υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία προσδετών (ligands) με τους κυριότερους να είναι ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF), ο μετατρεπτός αυξητικός παράγοντας άλφα (TGF- α), η αμφιρεγουλίνη, η βητακυταρίνη (14). Τα δυο πρώτα μόρια είναι οι συνηθέστεροι και οι πιο σημαντικοί προσδέτες για τον EGFR. Η πρόσδεση των μορίων στους υποδοχείς (ligand binding) οδηγεί στον ομοδιμερισμό ή τον

ετεροδιμερισμό του υποδοχέα στην επιφάνεια του κυττάρου, που ακολουθείται από την εισαγωγή στο κύτταρο του διμερισμένου υποδοχέα (Εικόνα 2.4).



Εικόνα 2.4: Διμερισμός του EGFR

Ο ομοδιμερισμός ή ο ετεροδιμερισμός αυτός πυροδοτεί τη φωσφορυλίωση στην περιοχή κινάσης της τυροσίνης. Η φωσφορυλιωμένη κινάση λειτουργεί ως συνδετικό σημείο για την επικόλληση ενεργοποιητών των εσωτερικών υποστρωμάτων του κυττάρου, οι οποίοι τότε διεγείρουν ένα εσωκυτταρικό σηματοδοτικό μονοπάτι. (15)

Τέτοια σηματοδοτικά μονοπάτια ρυθμίζουν πολλαπλές βιολογικές διεργασίες, όπως είναι η έκφραση γονιδίων, η απόπτωση κ.α. Διέγερση αυτών των μονοπατιών του EGFR έχει βρεθεί ότι ευνοεί την εμφάνιση καρκίνου, τη μετάσταση, την αγγειογέννεση κ.α. (16) Ειδικότερα για τον EGFR, μετά την ενεργοποίηση του πυροδοτούνται διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια, η πορεία των οποίων εξαρτάται από το μόριο προσδέτη, άρα και από την πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται.

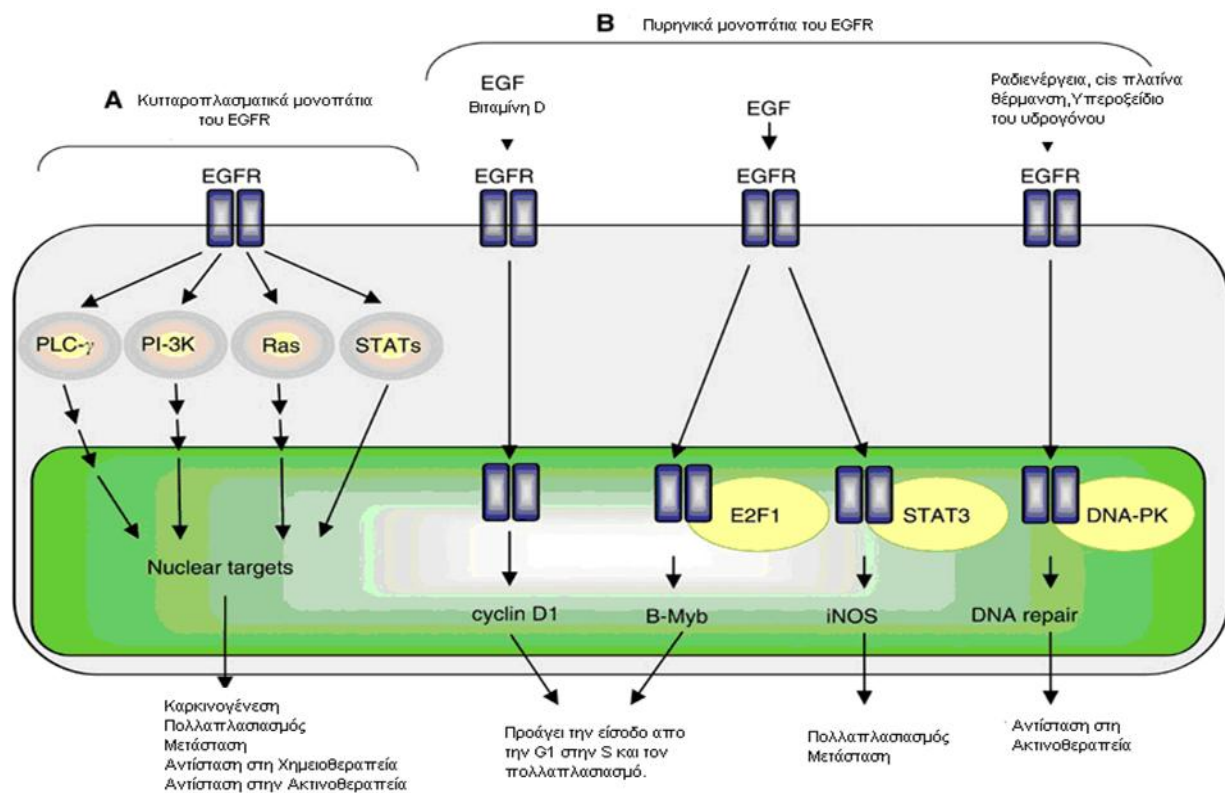
Τα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία εμπλέκεται ο EGFR είναι κυταροπλασματικά και πυρηνικά (Εικόνα 2.5). Τα κυριότερα και καλύτερα χαρακτηρισμένα είναι τα κυταροπλασματικά:

A) Το σηματοδοτικό μονοπάτι Ras-Erk1/2 ή καταρράκτης Ras-Raf-MAPK. Το μονοπάτι αυτό ενεργοποιείται από το μιτογόνο σύμπλοκο ras/raf (MAPK) (Ras/Raf/mitogen –activated protein kinase pathway).

B) Το σηματοδοτικό μονοπάτι της φωσφατιδυλο ινοσιτόλης 3 κινάση (PI3K) και της πρωτεϊνικής κινάσης Akt (phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway) ή καταρράκτης PI-3K-Akt-GSK.

Γ) Το σηματοδοτικό μονοπάτι της φωσφολιπάσης C (Phospholipase C, PLC) και της κινάσης C ή καταρράκτης phospholipase Cγ-protein kinase.

Δ) Το σηματοδοτικό μονοπάτι STAT μεταγωγέων σήματος. (17)



Εικόνα 2.5 : Κυτταροπλασματικά και πυρηνικά μονοπάτια του EGFR

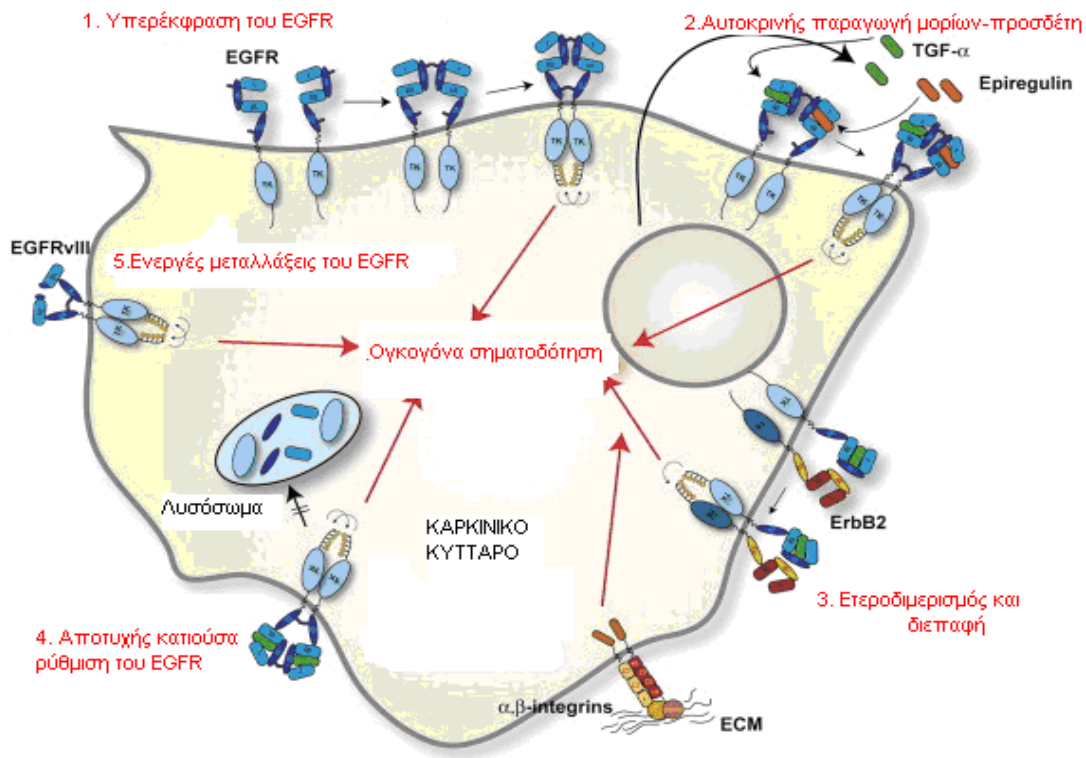
Στοχεύοντας τον EGFR μπορούμε να επιτύχουμε πολλούς τρόπους καταπολέμησης του καρκίνου όπως:

- Αύξηση των κυτταρικών θανάτων και της απόπτωσης
- Αναστολή τη ανάπτυξης καρκίνου των αιμοφόρων αγγείων
- Μείωση της επίπτωσης των μεταστάσεων
- Αναστολή της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου (18)

2.3

ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΟΥ EGFR ΣΤΗΝ ΕΞΕΛΙΞΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΟΓΚΩΝ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η δράση του υποδοχέα EGFR έχει συσχετιστεί με την ογκογένεση. Οι σημαντικότεροι μηχανισμοί φαίνονται στην εικόνα 2.6 και αναλύονται στην συνέχεια.



Εικόνα 2.6 : Μηχανισμοί ογκογόνας σηματοδότησης του EGFR

2.3.1 Υπερέκφραση του EGFR και των αυξητικών παραγόντων του και ομο- και ετερο-διμερισμός

Η υπερέκφραση του EGFR όμως σε πολλές περιπτώσεις είναι αποτέλεσμα γενετικής αλλαγής, όπως συμβαίνει για παράδειγμα στους όγκους του εγκεφάλου ή στο 40% των γλοιωμάτων και σχετίζεται με υψηλά ποσοστά πολλαπλασιασμού και μειωμένη επιβίωση (19). Εργαστηριακές μελέτες έχουν καταδείξει μια στενή συσχέτιση μεταξύ αυξημένων επιπέδων έκφρασης του EGFR και καρκινογένεσης. Σε ορισμένες περιπτώσεις δε, οι αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης είναι από μόνες τους ικανές να προκαλέσουν καρκίνο καθώς ο υποδοχέας μπορεί να

ομοδιμεριστεί ή να ετεροδιμεριστεί με άλλους υποδοχείς της ίδιας ή άλλης οικογένειας υποδοχέων.

Η υπερέκφραση του EGFR έχει συσχετισθεί επίσης με χαμηλό προσδόκιμο επιβίωσης σε συμπαγείς όγκους, όπως των καρκίνων της κεφαλής και του τραχήλου (head and neck), της ουροδόχου κύστης, των ωοθηκών, της μήτρας και του οισοφάγου (20), ενώ στο καρκίνωμα του παχέος εντέρου η προγνωστική αξία του EGFR δεν είναι ιδιαίτερα σημαντική. (21)

Έχει αποδειχθεί ότι η υπέρ-ενεργοποίηση του EGFR από ειδικούς προσδέτες παίζει σημαντικό ρόλο στην ογκογένεση λόγω της επίδρασης του σε βασικές κυτταρικές οδούς όπως της Akt/PKB κινάσης, της MAPK/ERK κινάσης, του STAT και άλλων.

Ένας άλλος ισχυρός μηχανισμός ενεργοποίησης του EGFR που υφίσταται στα καρκινικά κύτταρα είναι η αυτοκρινής παραγωγή μορίων προσδετών των υποδοχέων. Αποτελέσματα αρκετών μελετών υποδηλώνουν ότι οι αυξητικοί παράγοντες έχουν ένα σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση. Πολλοί συμπαγείς όγκοι, όπως το μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα, εκφράζουν αυξημένα επίπεδα τόσο του υποδοχέα EGFR όσο και του αυξητικού παράγοντα EGF. Αυτό έχει ως κύρια συνέπεια την αύξηση του ρυθμού εξάπλωσης του όγκου καθώς και την προστασία του από κυτταροτοξικές δράσεις, γεγονός που προκαλεί επιθετικότερη μορφή της νόσου. (22)

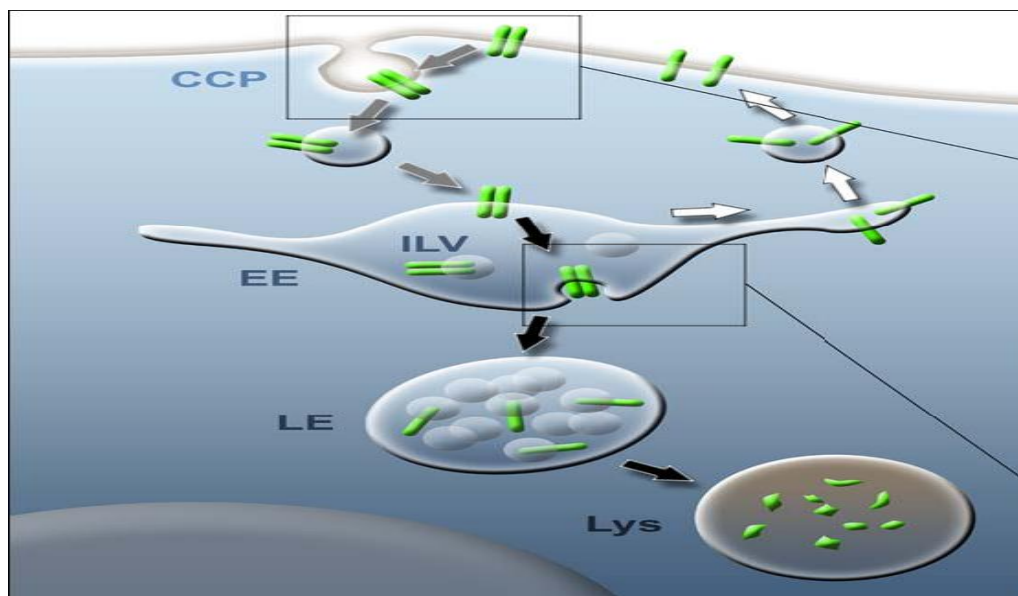
2.3.2 Μεταλλάξεις του EGFR

Σε αξιοσημείωτο αριθμό όγκων, οι γονιδιακή ενίσχυση συνοδεύεται από γονιδιακές ανακατατάξεις. Η πιο συνηθισμένη μετάλλαξη στο γονίδιο του EGFR (type III) προκαλεί την διαγραφή μέρους της εξωκυτταρικής περιοχής (extracellular domain) παράγοντας με αυτόν τον τρόπο ένα συνεχώς ενεργό υποδοχέα. Πρόσφατες μελέτες έχουν ταχτοποιήσει μια ίδια μετάλλαξη σε καρκινώματα του πνεύμονα, του στήθους και των ωοθηκών, υποδηλώνοντας ότι η μετάλλαξη αυτή έχει μια ευρύτερη επίπτωση στον ανθρώπινο καρκίνο (23). Η συνεχής ενεργοποίηση του EGFR σχετίζεται και με την υπερέκφραση, με γονιδιακές μεταλλάξεις στην περιοχή των κινασών του γονιδίου του υποδοχέα (εξώνια 18-21).

Σε διάφορες άλλες περιπτώσεις μπορεί να υπάρξει αλλαγή σε τμήματα γονιδίων που αφορούν την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών. Τέτοια περίπτωση είναι το μονοπάτι K-ras, του οποίου η μετάλλαξη οδηγεί στην ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση του από τον EGFR. (24), (23)

2.3.3 Εσωτερικοποίηση του EGFR

Είναι ένας μηχανισμός ρύθμισης της δράσης του υποδοχέα. Ο ενεργοποιημένος EGFR (πράσινο χρώμα) μετατοπίζεται στις κοιλότητες που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη και εσωτερικοποιείται (Εικόνα 2.7). Μετά την μεταφορά του στα πρώιμα ενδοσωμάτια (EE), είτε ανακυκλώνεται πίσω στην κυτταρική μεμβράνη (άσπρα βέλη) είτε εγκολπώνεται σε ενδοαυλιακά κυστίδια (ILVs). Τα EE ωριμάζουν σε όψιμα ενδοσώματα (LE), και ο EGFR τελικά αποικοδομείται στα λυσοσώματα (Lys) (μαύρα βέλη).



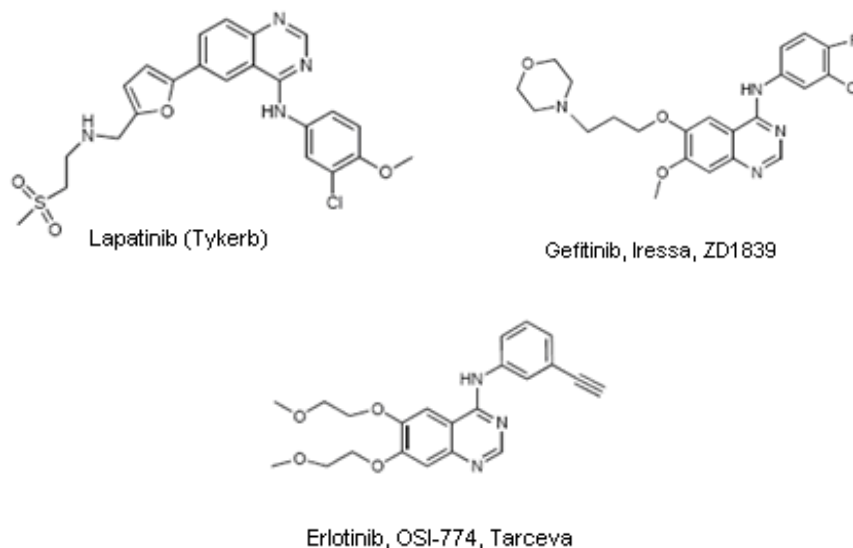
Εικόνα 2.7: Εσωτερικοποίηση του EGFR.

2.4 ΜΟΡΙΑ ΣΤΟΧΕΥΣΗΣ ΤΟΥ EGFR

Όπως αναλύθηκε παραπάνω, στην διαδικασία της καρκινογένεσης συντελεί η αυξημένη λειτουργία ή δυσλειτουργία του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGFR ή των μορίων συνδετών του. Χρόνιες μελέτες πάνω στην δομή και την λειτουργία αυτής της διαδικασίας πρόσδεσης-ενεργοποίησης έχουν αποδώσει την δημιουργία αντισωμάτων, δηλαδή την δημιουργία αντίστοιχων μακρομορίων, συναφούς δομής και λειτουργίας με τα μόρια συνδέτες. Τα μακρομόρια αυτά είναι ικανά να παρεμποδίσουν την λειτουργία των μορίων συνδετών αφού έχουν ίδιες ιδιότητες πρόσδεσης στους υποδοχείς, μπορούν δηλαδή να αντιδράσουν ανοσολογικά με αυτούς, μπλοκάροντας έτσι τις διαδικασίες ενεργοποίησης των σηματοδοτικών μονοπατιών ή και την ίδια την λειτουργία των σηματοδοτικών μονοπατιών.

Η στόχευση των υποδοχέων γίνεται με τρεις κατηγορίες μορίων: τα μονοκλωνικά αντισώματα, τα μικρού μοριακού βάρους μόρια που δρουν ως αναστολείς της δράσης κινάσης της τυροσίνης του EGFR (αναστολείς TK) και πεπτιδία ανάλογα του EGFR. Στο εμπόριο κυκλοφορούν ήδη φάρμακα τα οποία έχουν ως βάση μονοκλωνικά αντισώματα και αναστολείς TK. Παρότι τα μονοκλωνικά αντισώματα έδειξαν αρχικά πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα στις κλινικές μελέτες και αργότερα σε *in vitro* και *in vivo* μελέτες (25), στην συνέχεια αποδείχτηκαν πολύπλοκα και σύνθετα μόρια όσον αφορά στις βιολογικές τους ιδιότητες και την χρήση τους στην θεραπεία.

Οι αναστολείς της δράσης TK, έχουν την ιδιότητα να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και να προσδένονται στην περιοχή της φωσφορυλίωσης του υποδοχέα, δηλαδή την περιοχή πρόσδεσης των μορίων ATP. Η δράση τους αυτή έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της φωσφορυλίωσης του υποδοχέα, καθιστώντας τα ικανά μόρια για στόχευση του υποδοχέα. Τα τελευταία χρονιά έχουν σχεδιαστεί πάνω από 30 μόρια αναστολείς TK, ενώ αρκετά από αυτά έχουν αναγνωρισθεί και κλινικά ως φάρμακα για θεραπεία σε συγκεκριμένους τύπους καρκίνου. Κάποια τέτοια εγκεκριμένα φάρμακα είναι το Lapatinib, το Gefitinib και το Erlotinib (Εικόνα 2.8). Τα παράγωγα των κιναζολινών μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τα παράγωγα που δεσμεύονται αντιστρεπτά στον υποδοχέα και η δεύτερη τα παράγωγα που δεσμεύονται μη αντιστρεπτά. Η αντιστρεπτή και η μη αντιστρεπτή δράση των κιναζολινικών αυτών παραγώγων θα σχολιαστεί εκτενεστέρα σε επόμενο κεφάλαιο.



Εικόνα 2.8: Χημικές δομές αναστολέων της δράσης TK που έχουν εγκριθεί για κλινική χρήση.

Β. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

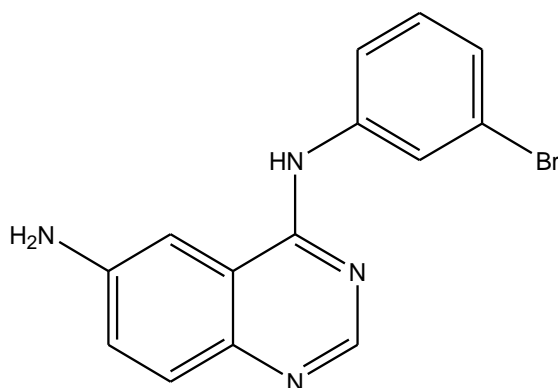
ΚΙΝΑΖΟΛΙΝΙΚΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ

Η εργασία αυτή αποτελεί μέρος ενός ευρύτερου πεδίου ερευνητικών δραστηριοτήτων που αναπτύσσεται στο I/P-ΡΠ του ΕΚΕΦΕ «Δ» και αφορά στην σύγκριση των δύο μεγάλων αυτών τάξεων των κιναζολινών αντιστρεπτής και μη αντιστρεπτής δέσμησης στην ανάπτυξη νέων φαρμάκων και ραδιοφαρμάκων με απώτερο στόχο την χρήση του σε συνδυαστικές θεραπείες – χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία, ραδιοθεραπεία, καθώς και η μελέτη της δράσης τους.

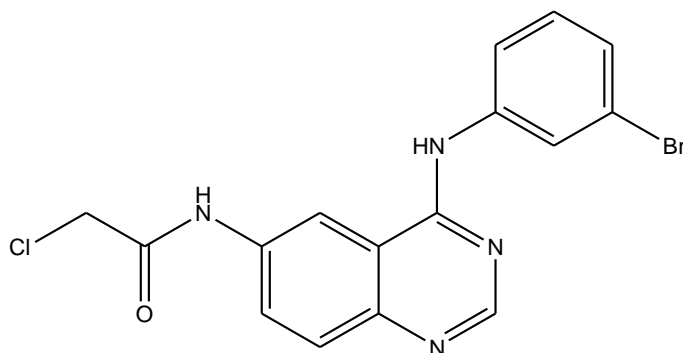
Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα κιναζολινικά παράγωγα:

Α: 6-αμινο-4-[(3-βρωμοφαινυλ)αμινο]-κιναζολίνη (Εικόνα 3.1) και

Γ: N-{4-[(3-βρωμοφαινυλ)αμινο]-κιναζολιν-6-υλ}-2-χλωροακεταμίδιο. (Εικόνα 3.2)



Εικόνα 3.1: Χημική δομή του κιναζολινικού παραγώγου 6-αμινο-4-[(3-βρωμοφαινυλ)αμινο]-κιναζολίνη.

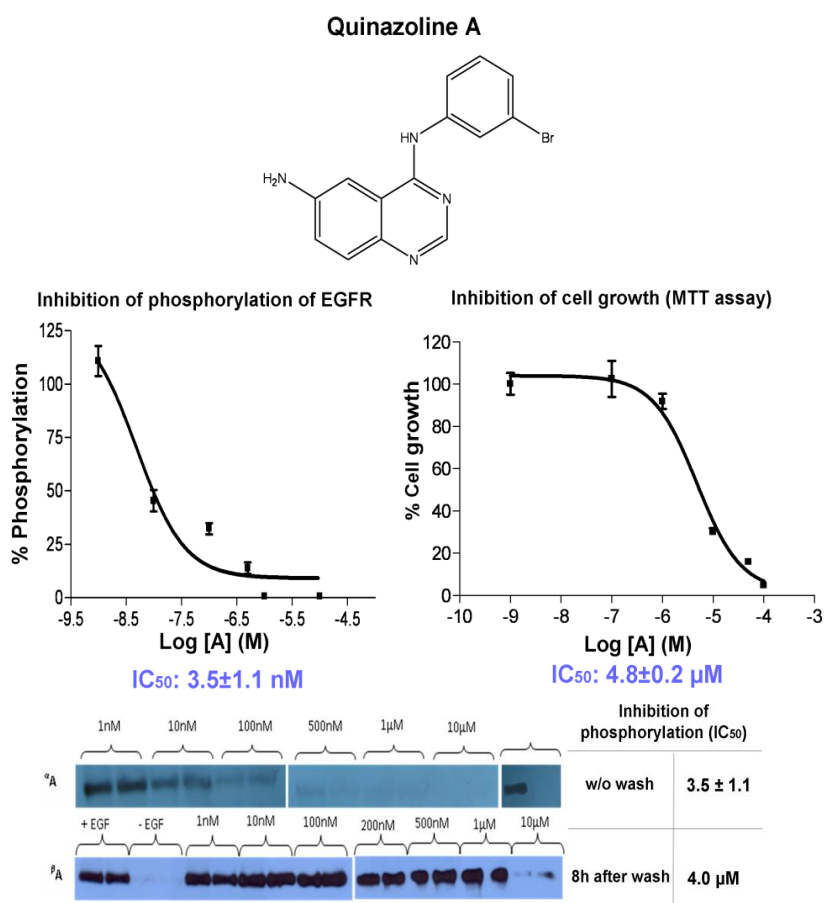


Εικόνα 3.2: Χημική δομή του κιναζολινικού παραγώγου N-{4-[(3-βρωμοφαινυλ)αμινο]-κιναζολιν-6-υλ}-2-χλωροακεταμίδιο.

Τα παράγωγα αυτό συντέθηκαν στο εργαστήριο Ραδιοφαρμακευτικής Χημείας του Ι/ΡΡΠ του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» και απετέλεσαν βάση σύνθεσης νέων ραδιοφαρμάκων Re και Tc99m με απώτερο στόχο την απεικόνιση όγκων που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα.

Όπως έχουμε ήδη αναφέρει ορισμένα κιναζολινικά παράγωγα έχουν την ικανότητα, λόγω παραπλήσιας δομής, να ανταγωνίζονται στην δέση δέσμευσης της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) στην ενδοκυττάρια περιοχή του EGFR με δράση κινάσης της τυροσίνης και να αναστέλλουν τα σηματοδοτικά μονοπάτια που πυροδοτεί η ενεργοποίηση του υποδοχέα.

Υπάρχουν **δύο κατηγορίες αναστολέων ΤΚ**, αυτοί με αντιστρεπτή δράση (reversible) και αυτοί χωρίς αντιστρεπτή δράση (irreversible). Οι αναστολείς με αντιστρεπτή δράση, απλώς ανταγωνίζονται με τα μόρια ATP, ως προς την πρόσδεση τους στον αυξητικό παράγοντα, καθώς η χημική τους δομή δεν τους επιτρέπει να συνδεθούν με τον υποδοχέα με κάποιο χημικό δεσμό. Οι αναστολείς αυτοί αποδεσμεύονται από τον υποδοχέα. Σε μεγάλες συγκεντρώσεις, η σύνδεση και η αποσύνδεση γίνονται με ένα σταθερό ρυθμό, με αποτέλεσμα να αναστέλλουν σημαντικά την δράση των μορίων ATP. Τέτοιος αναστολέας είναι το κιναζολινικό παράγωγο A.

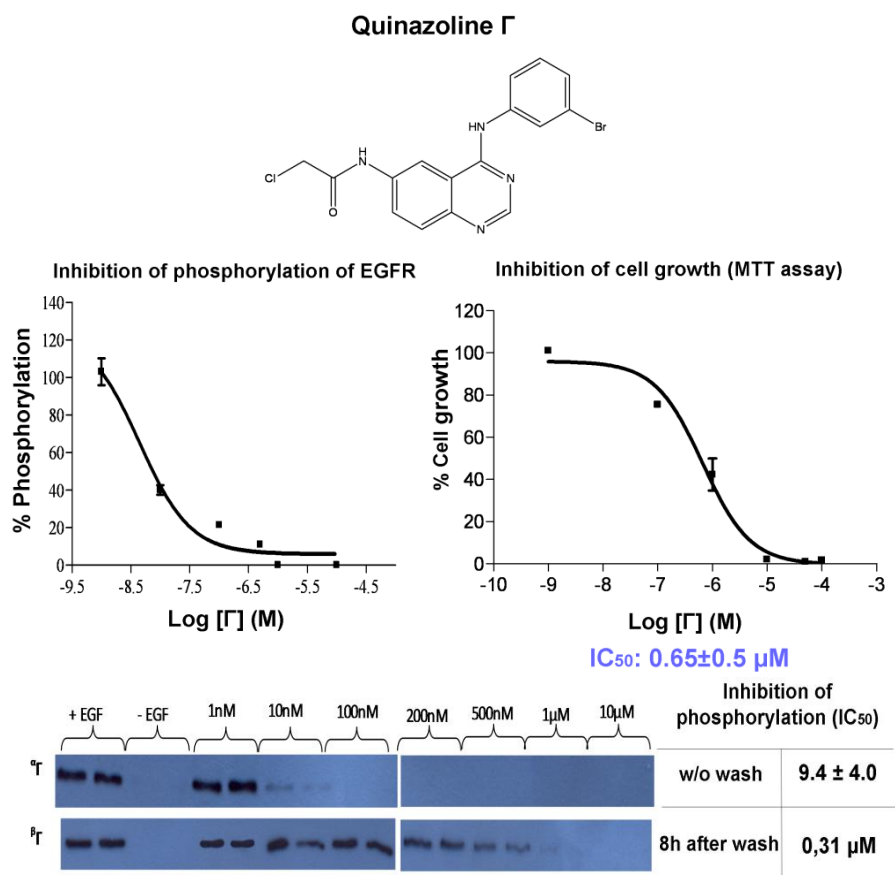


Εικόνα 3.3: Διαγράμματα φωσφορυλίωσης και κυτταροτοξικότητας του κιναζολινικού παραγώγου A καθώς και δοκιμασία αντιστρεπτής δέσμευσης

Στην Εικόνα 3.3 φαίνεται η κυτταροτοξική δράση του παραγώγου, που εκφράζει το ποσοστό αναστολής της ενζυμικής δράσης της αναπνοής του σχετίζεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ενός κυτταρικού πληθυσμού, σε αναλογία με την συγκέντρωση του παραγώγου στο περιβάλλον του πληθυσμού αυτού. Η τιμή IC_{50} (4,8 μ M) είναι ένας δείκτης που εκφράζει την συγκέντρωση στην οποία αναστέλλεται το 50% της κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

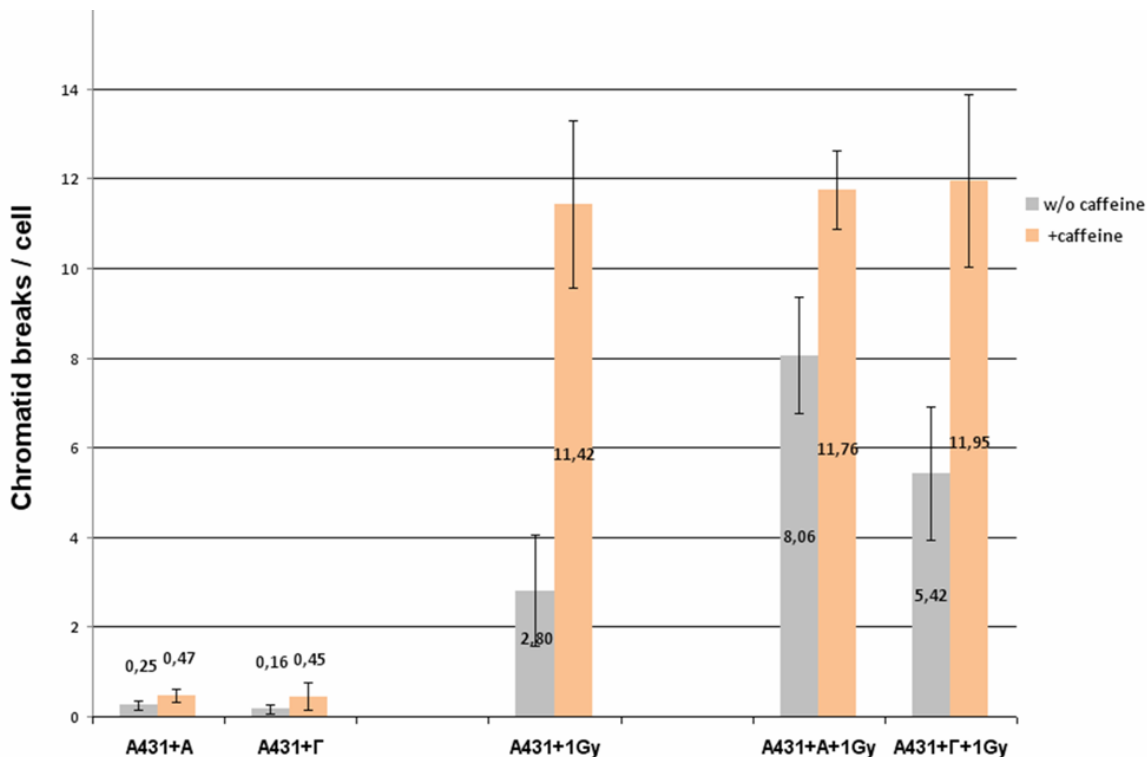
Επίσης, στην παραπάνω εικόνα, παρουσιάζεται η τιμή IC_{50} (3,5 nM) που εκφράζει την συγκέντρωση του παραγώγου που αναστέλλει το 50% της φωσφορυλίωσης του υποδοχέα. Τέλος, τα αποτελέσματα της δοκιμασίας που φανερώνουν την αντιστρεπτή δέσμευση του παραγώγου Α στον υποδοχέα.

Οι μη αντιστρεπτοί παράγοντες, εκτός από την παρόμοια δομή με την ATP, έχουν την ικανότητα να αλκυλιώνουν την Σερίνη 773 του EGFR, με αποτέλεσμα τη μη αντιστρεπτή πρόσδεση τους σε αυτόν αλλά και την μόνιμη αναστολή της δράσης του. Τέτοιος αναστολέας είναι το κιναζολινικό παράγωγο Γ. Στην Εικόνα 3.4 φαίνεται αντίστοιχα όπως και για το παράγωγο Α, η δράση του παραγώγου Γ στα κύτταρα A431.



Εικόνα 3.4 : Διαγράμματα φωσφορυλίωσης και κυτταροτοξικότητας του κιναζολινικού παραγώγου Α καθώς και δοκιμασία αντιστρεπτής δέσμευσης

Η δράση των παραγώγων Α και Γ έχει μελετηθεί και στο παρελθόν στο I/P-ΡΠ (Εικόνα 3.5). Τα παράγωγα αυτά χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα χρωμοσωματικής ευαισθησίας στην συγκέντρωση που αναστέλλουν το 50% της κυτταρικής επιβίωσης – συγκέντρωση που σχετίζεται με την δοσολογία των φαρμάκων στους ασθενείς.



Εικόνα 3.5 : Δράση των παραγώγων Α και Γ στην ακτινοευαισθητοποίηση των κυττάρων A431

Πιο συγκεκριμένα, η δράση του κιναζολινικού παραγώγου Α έχει μελετηθεί στην διπλωματική εργασία της Μαρίας Μπέλλα «Επίδραση του κιναζολινικού παραγώγου 6-αμινο-4-[(3-βρωμοφαινυλ)αμινο]-κιναζολίνη στην ακτινοευαισθησία κυττάρων A431, ΑΘΗΝΑ 2010» που πραγματοποιήθηκε στο ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος το 2010. Συγκεκριμένα μελετήθηκε ο αριθμός των χρωμοσωματικών αλλοιώσεων των κυττάρων που ακτινοβολήθηκαν στη G₂ φάση του κυτταρικού κύκλου, παρουσία και απουσία του κιναζολινικού παραγώγου Α. Το κιναζολινικό παράγωγο δεν επάγει σημαντικό αριθμό αλλοιώσεων (0.25 αλλοιώσεις ανά κύτταρο) από μόνο του, ενώ η ακτινοβολία επάγει κατά μέσο όρο 2.80 αλλοιώσεις ανά κύτταρο. Ο συνδυασμός όμως, ένωσης και ακτινοβολίας επάγει κατά μέσο όρο 8.06 αλλοιώσεις/κύτταρο, προκαλεί δηλαδή σχεδόν 3-πλάσιο κατά μέσο όρο αριθμό αλλοιώσεων/κύτταρο απ' ότι η ακτινοβολία μόνη της. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το παράγωγο Α επάγει σημαντική G₂-χρωμοσωματική ευαισθητοποίηση.

Παρόμοιο πείραμα έγινε και από την Αλεξία Βαλάση, στην διπλωματική της εργασία πάνω στην ακτινοευαίσθητοποιητική δράση του κιναζολινικού παραγώγου Γ, που πραγματοποιήθηκε στο ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος το 2010. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο συνδυασμός της δράσης κιναζολινικού παραγώγου Γ στην συγκέντρωση που αναστέλλει το 50% της κυτταρικής αύξησης και ακτινοβολίας αυξάνουν, όμως όχι σημαντικά, την χρωμοσωματική ακτινοευαίσθησία των κυττάρων.

Καθώς η δόση του φαρμάκου που χορηγείται στους ασθενείς για χημειοθεραπευτική χρήση καθορίζεται από την κυτταροτοξικότητα ίσως δεν είναι απαραίτητα η βέλτιστη για την ακτινοευαίσθητοποιητική της δράση. Τα δύο κιναζολινικά παράγωγα διαφέρουν πολύ ως προς τον δείκτη αυτό (κυτταροτοξικότητα), 0,65 μ M για την Γ και 4,4 μ M για την Α.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4° : **ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

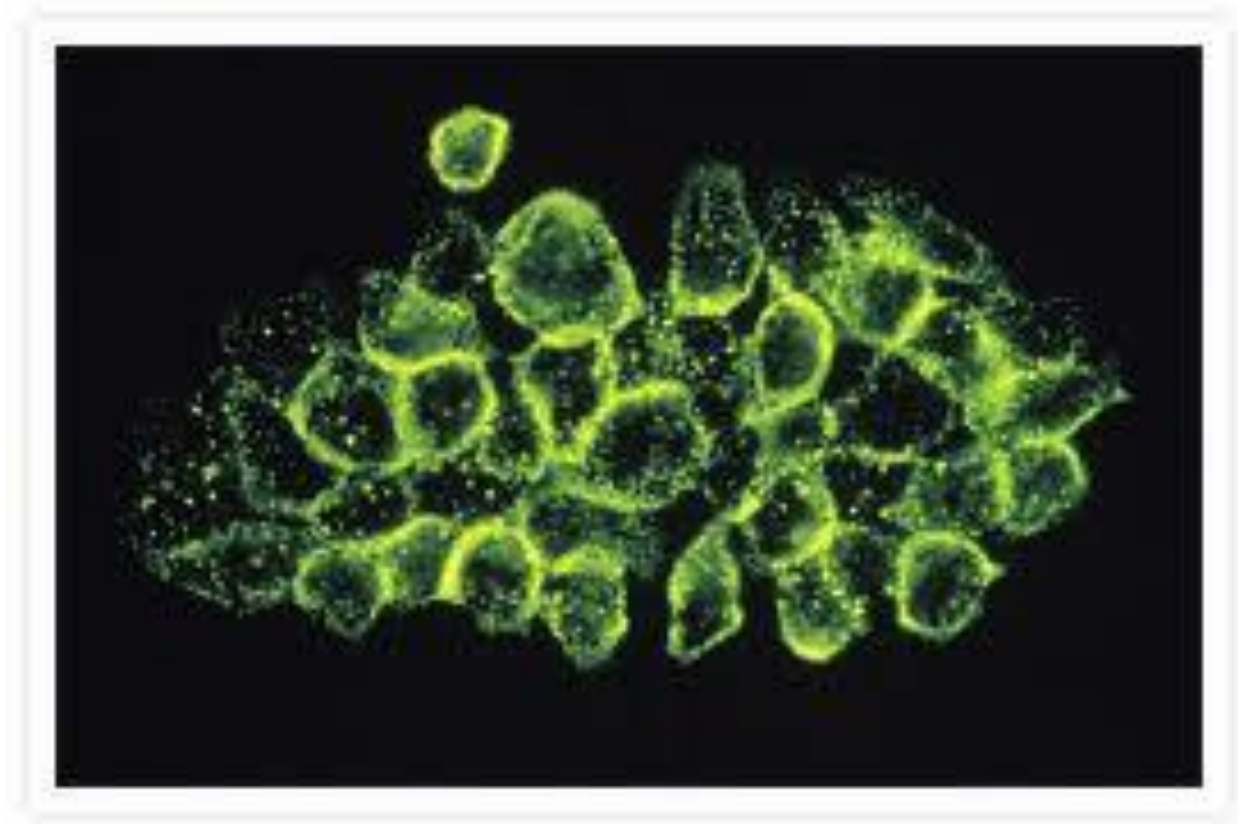
Για την μελέτη της δράσης μιας φαρμακευτικής ουσίας, είναι απαραίτητο να μελετηθεί η κινητική του φαρμάκου μέσα στον οργανισμό στον χρόνο, και οι μεταβολές της δράσης του σε σχέση με τον χρόνο. Οι κιναζολίνες είναι φάρμακα τα οποία έχουν το πλεονέκτημα να αποβάλλονται εύκολα από την κυκλοφορία. Εφόσον το κιναζολινικό παράγωγο Γ δεσμεύεται μη αντιστρεπτά στον υποδοχέα, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι ακόμα και μετά την αποβολή του φαρμάκου από την κυκλοφορία του οργανισμού, η δράση του παραμένει και μετά την απομάκρυνση του από την κυκλοφορία.

Δεδομένου του διαφορετικού τρόπου δέσμευσης των δύο παραγώγων στον υποδοχέα ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής είναι η μελέτη της απόκρισης της καρκινικής σειράς A431, η οποία υπερεκφράζει τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGFR μετά από την απομάκρυνση των κιναζολινικών παραγώγων από την καλλιέργεια. Συγκεκριμένα στόχος ήταν η μελέτη 8 ώρες μετά την απομάκρυνσή τους. Για την πραγματοποίηση του στόχου, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος G2-χρωμοσωματικής ευαισθησίας σε κύτταρα A431.

Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο : ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Η κυτταρική σειρά η οποία χρησιμοποιήθηκε στην διεξαγωγή του πειράματος είναι η A431 – επιδερμικό καρκίνωμα θήλεος. Η κυτταρική σειρά υπερεκφράζει τον EGFR (Εικόνα 5.1).



Εικόνα 5.1 : Υπερέκφραση του υποδοχέα EGFR σε καρκινικά κύτταρα A431. Οι περιοχές με κίτρινο χρώμα δείχνουν την συγκέντρωση του υποδοχέα

Κυτταρική καλλιέργεια είναι η διαδικασία κατά την οποία γίνεται ελεγχόμενη ανάπτυξη κύτταρων σε συνθήκες εργαστηρίου. Ο σκοπός της διαδικασίας αυτής είναι η αναπαραγωγή και άρα η μελέτη της ζωής του κύτταρου, αναφορικά με τον κυτταρικό κύκλο αλλά και διαφορές άλλες λειτουργίες και συμπεριφορές. Είναι μια διαδικασία που βοήθησε και βοηθά εξαιρετικά στην μελέτη της λειτουργίας ανθρωπίνων κύτταρων και ιστών απαλλαγμένα από *in vivo* αλληλεπιδράσεις που θα είχαν στο περιβάλλον του οργανισμού από το οποίο προήλθαν.

Όλες οι διαδικασίες που αφορούν στην κυτταρική καλλιέργεια πραγματοποιούνται σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής (Εικόνα 5.2). Ο θάλαμος διαθέτει λάμπα UV ακτινοβολίας και ειδικό σύστημα κάθετου εξαερισμού το οποίο του επιτρέπει να διατηρεί άσηπτες συνθήκες εργασίας. Τα κύτταρα στα χρονικά διαστήματα ανάμεσα στις διαφορές εργασίες, επωάζονται στον επωαστικό κλίβανο (incubator) στους 37 °C σε κορεσμένες συνθήκες υγρασίας και παρουσία CO₂ 5% (Εικόνα 5.3). Τα υλικά και τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για τις κυτταρικές καλλιέργειες βρίσκονται διαθέσιμα στο εμπόριο. Παρακάτω ακολουθεί μια αναγραφή των μηχανημάτων και των υλικών που χρησιμοποιούνται κατά την διάρκεια των κυτταρικών καλλιεργειών.



Εικόνα 5.2: Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής.

Υποδομές και υλικά

- Μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης, Axiovert 25 Zeiss
- Επωαστικός κλίβανος με παροχή CO₂, Format Scientific
- Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής (Laminar flow), ELMED
- Δοχείο υγρού αζώτου, Forma
- Φιάλες κυτταροκαλλιεργειών 75 cm³, Orange Scientific
- Φιάλη κυτταροκαλλιεργειών 100 cm³, Orange Scientific
- Σιφώνια ακριβείας, Orange Scientific
- Ειδικά κρυοάντοχα σωληνάρια ψύξης κυττάρων των 2 mL, Orange Scientific
- Πιππέτες, Gilson

- Φυγόκεντρος, Heraeus Christ
- DMSO, Sigma
- Θρεπτικό υλικό: D-MEM HIGH GLUCOSE, PAA Laboratories.
- Διάλυμα πενικιλίνης / στρεπτομικίνης 100 Units/mL και 10mg/ mL, PAA Laboratories
- Διάλυμα θρυψίνης/EDTA: 0,05% / 0,02 % σε PBS χωρίς Ca²⁺, Mg²⁺, Biochrom AG
- Εμπλουτισμένο θρεπτικό υλικό: D-MEM HIGH GLUCOSE (10% FBS, 1% L-Glutamine, 1% Penicillin/Streptomycin)
- Διάλυμα ψύξης: 10% DMSO σε ορό μόσχου



Εικόνα 5.3: Επωαστικός κλίβανος.

5.1 ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω τα κύτταρα καλλιεργούνται μέσα σε φιάλες ή τριβλία. Όταν τα κύτταρα καλύψουν ένα 80-90% της επιφάνειας της φιάλης, τότε πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια. Το ποσοστό αυτό κρίνεται κάθε φορά από την παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης.

Στην ουσία η ανακαλλιέργεια είναι η διαδικασία κατά την οποία ένα μέρος των κυττάρων μεταφέρεται σε νέα φιάλη, ενώ αντικαθίσταται και το θρεπτικό υλικό των κυττάρων. Για την πραγματοποίηση της ανακαλλιέργειας εργαζόμαστε στο θάλαμο κάθετης νηματικής ροής. Αρχικά αφαιρούμε το ήδη υπάρχων θρεπτικό υλικό και ξεπλένουμε τη φιάλη με διάλυμα PBS. Αυτό βοηθά στο να καθαρίσει πλήρως η φιάλη από το θρεπτικό υλικό. Αφού αφαιρέσουμε το διάλυμα PBS προσθέτουμε στην φιάλη 5 ml θρυψίνης. Η θρυψίνη είναι μια ουσία που έχει την ιδιότητα να λύει τους δεσμούς των κυτταρικών μεμβρανών, άρα και να βοηθά στην αποκόλληση

των ταπήτιων κυττάρων από τη βάση της φιάλης. Έπειτα η φιάλη με την θρυψίνη τοποθετείτε στον κλίβανο για περίπου 3 - 5 λεπτά ενώ ανά τακτά χρονικά διαστήματα παρατηρείται στο μικροσκόπιο η πορεία της αποκόλλησης. Η παρατεταμένη δράση της θρυψίνης μπορεί να επιφέρει και την λύση των κυττάρων. Έπειτα το εναιώρημα χωρίζεται σε 3-4 φιάλες και προσθέτουμε ίδια ποσότητα θρεπτικού υλικού σε κάθε μια (10 ml).

5.2 ΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ

Η ψύξη κυτταρικής σειράς έχει ως στόχο την διατήρηση των κυττάρων της σειράς αυτής για μελλοντική χρήση. Κύτταρα τα οποία κατά την διαδικασία της κυτταρικής καλλιέργειας στην διάρκεια ενός πειράματος δεν είναι στην άμεση ανάγκη του εργαστηρίου, ψύχονται, έτσι ώστε οποιαδήποτε στιγμή κριθεί σκόπιμο, να ξαναχρησιμοποιηθούν .

Τα κύτταρα αρχικά ανακαλλιεργούνται σύμφωνα με την διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Έπειτα το εναιώρημα υπόκειται σε φυγοκέντρηση στα 500 g. Κατά της διάρκεια της φυγοκεντρικής τα κύτταρα δημιουργούν ένα ίζημα στο κάτω μέρος της φιάλης το οποίο μας επιτρέπει να αφαιρέσουμε το υπερκείμενο θρεπτικό υλικό και να απομονώσουμε τα κύτταρα. Στην ίδια την φιάλη φυγοκεντρικής προστίθεται 1 ml διαλύματος ψύξης.

Έπειτα το διάλυμα αυτό μεταφέρεται σε ειδικό σωληνάριο ψύξης το οποίο ψύχεται διαδοχικά στους -4°C για μία ώρα, στους -20°C για 4 ώρες, στους -70°C για 12 ώρες και τέλος μεταφέρονται στο υγρό άζωτο στους -186°C .

5.3 ΑΠΟΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ

Οι κυτταρικές σειρές συνήθως παραλαμβάνονται από συνθήκες βαθιάς ψύξης, από άζωτο στους -186°C ή από τα ειδικά ψυγεία φύλαξης που λειτουργούν στους -70°C .

Τα κύτταρα μεταφέρονται από τις συνθήκες ψύξης στο θάλαμο νηματικής ροής όπου και γίνεται αμέσως προσθήκη θρεπτικού υλικού (ήδη προθερμασμένου στους 37°C). Τα κύτταρα μετά την απόψυξη τοποθετούνται σε τριβλία ή φιάλες σε 10ml διαλύματος θρεπτικού υλικού. Έπειτα τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο όπου συνεχίζεται η καλλιέργεια τους.

5.4 ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑ ΜΕ ΑΙΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΟ

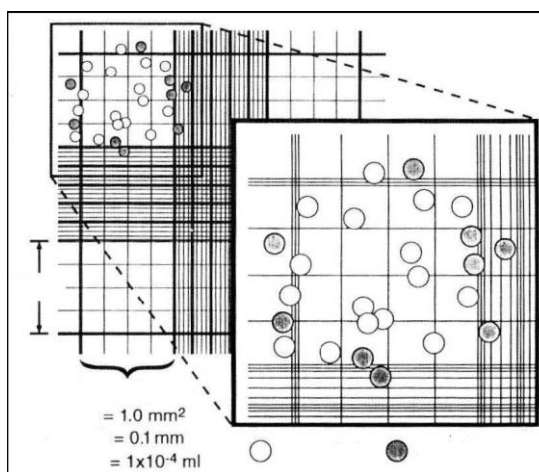
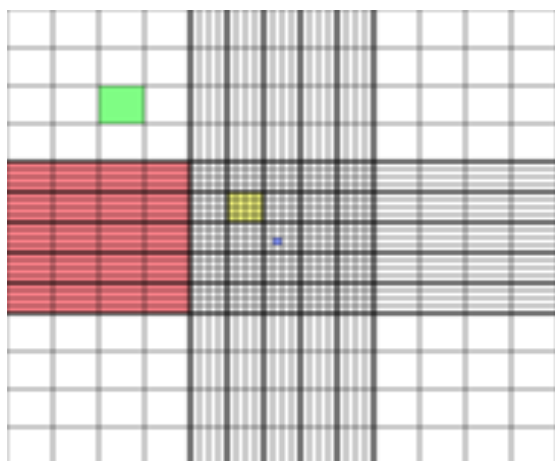
Το αιματοκυτταρόμετρο είναι μια σχετικά απλή διαδικασία με την οποία μπορούμε να μετρήσουμε προσεγγιστικά τον αριθμό κυττάρων σε ένα δείγμα γνωστού όγκου. Το

αιματοκυτταρόμετρο είναι μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρος πλάκα με δυο κατάλληλα επεξεργασμένες επιφάνειες. Η κάθε επιφάνεια αποτελείται από εννέα μεγάλα τετράγωνα σε μορφή πλέγματος (Εικόνα 5.3). Κάθε ένα από τα τέσσερα τετράγωνα στις γωνίες χωρίζεται σε δεκαέξι μικρότερα τετράγωνα. Κάθε μεγάλο τετράγωνο (κόκκινο τετράγωνο) έχει επιφάνεια 1mm^2 , έτσι ώστε όταν καλύπτεται με καλυπτρίδα ο όγκος του υγρού σε κάθε τετράγωνο να είναι 10^{-4}mL . Γνωρίζοντας τον όγκο του κυτταρικού εναιωρήματος και μετρώντας τα κύτταρα σε ένα τετράγωνο μπορεί να προσδιορισθεί ο αριθμός και η συγκέντρωση τους.

Τοποθετείται η καλυπτρίδα στο αιματοκυτταρόμετρο και με πιπέττα Pasteur τοποθετούνται $10\mu\text{L}$ από το κυτταρικό εναιώρημα στην άκρη της καλυπτρίδας, έτσι ώστε να καλυφθεί η κατάλληλα επεξεργασμένη επιφάνεια λόγω του τριχοειδούς φαινομένου. Τα κύτταρα που βρίσκονται στα τέσσερα ακριανά τετράγωνα μετρώνται στο οπτικό μικροσκόπιο (Εικόνα 5.4).

Ο αριθμός των κυττάρων ανά mL αρχικού εναιωρήματος δίνεται από τον τύπο:

$$\text{Αριθμός κυττάρων/}mL \text{ αρχικού εναιωρήματος} = \frac{\text{Μέσος όρος των κυττάρων στα τέσσερα}}{mL \text{ αρχικού εναιωρήματος}} \times 10^4$$



Εικόνα 5.3: Αιματοκυτταρόμετρο, μια ειδικά τροποποιημένη, αντικειμενοφόρος πλάκα

Εικόνα 5.4: Μέτρηση κυττάρων σε αιματοκυτταρόμετρο

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6° : ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Μέθοδος

Η ακτινοβόληση των δειγμάτων έγινε με πηγή κοβαλτίου (^{60}Co) Gamma Cell 220 Irradiator (Atomic Energy of Canada Ltd, Ottawa, Canada, Ιανουαρίου 1974) σε θερμοκρασία δωματίου. Πριν την ακτινοβόληση έγινε μέτρηση του ρυθμού δόσης με την βοήθεια φορητού δοσίμετρου, που τοποθετείται στο σημείο που θα ακτινοβοληθούν τα δείγματα (Δρ. Γ. Τερζούδη, ΕΚΕΦΕ «Δ»). Ύστερα από βαθμονόμηση της πηγής βρέθηκε ότι τη στιγμή που έγινε η ακτινοβόληση χρειάζονταν 1 min και 45 sec για να δεχτούν τα κύτταρα ακτινοβολία 1 Gy.

Gy ή Grey είναι μια μονάδα μέτρησης της ακτινοβολίας που δέχεται ένα σώμα από ιοντίζουσες ακτινοβολίες. Ισοδύναμα, ένα Gy εκφράζει την απορρόφηση ενός Joule ενέργειας από ένα κιλό μάζας. Δηλαδή $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/Kg}$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7° ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Το πρώτο και σημαντικότερο στάδιο στην κυτταρογενετική μελέτη είναι η απομόνωση και συλλογή κυττάρων, των οποίων ο κυτταρικός κύκλος βρίσκεται στο στάδιο της μετάφασης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται η ουσία colcemid (κολχικίνη ή κολσεμίδιο), μια ένωση που εμποδίζει το σχηματισμό της ατράκτου κατά την κυτταρική διαίρεση, εμποδίζοντας έτσι τα κύτταρα να προχωρήσουν πέρα από το στάδιο της μίτωσης.

Στο πείραμα μας, η αναλογία που χρησιμοποιήθηκε ήταν 5 μL κολχικίνης στα 5 mL του καλλιεργητικού υλικού. Έπειτα από την προσθήκη αυτή, οι φιάλες με το καλλιεργητικό υλικό μεταφέρονται στον επωαστικό κλίβανο, δηλαδή σε συνθήκες 37°C παρουσία 5% CO_2 για περίπου μια ώρα και τριάντα λεπτά. Στο διάστημα αυτό το διάλυμα κολχικίνης απορροφάται από τα κύτταρα που βρίσκονται στο καλλιεργητικό υλικό. Στην συνέχεια οι φιάλες μεταφέρονται στον θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, όπου αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα ξεπλένονται με διάλυμα PBS. Όπως έχουμε ήδη αναφέρει τα κύτταρα A431 καλλιεργούνται σε

ταπήτιο – δηλαδή προσκολλώνται στον πυθμένα της φιάλης, άρα απαιτείται η χρήση διαλύματος θρυψίνης/EDTA (2mL ανά φιάλη των 5 mL) έτσι ώστε τα κύτταρα να αποκολληθούν και ώστε να περάσουν έπειτα στην διαδικασία του υποτονικού σοκ, που θα αναλυθεί στην συνέχεια. Για την δράση της θρυψίνης απαιτείται η παραμονή των φιαλών στον θάλαμο επώασης για περίπου 20 λεπτά. Η πορεία της αποκόλλησης των κυττάρων παρακολουθείται από το μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης.

7.1 ΥΠΟΤΟΝΙΚΟ ΣΟΚ

Η διαδικασία του υποτονικού σοκ περιλαμβάνει την εναιώρηση των κυττάρων σε υποτονικό, για τα κύτταρα διάλυμα KCL συγκέντρωσης 0,75 M. Το διάλυμα KCL εισάγεται στο δείγμα έπειτα από φυγοκέντρηση διάρκειας 10 min στις 1300 rpm και απόχυση του υπερκείμενου.

7.2 ΕΠΙΣΤΡΩΣΗ ΚΑΙ ΧΡΩΜΑΤΙΣΜΟΣ

Η διαδικασία της επίστρωσης των δειγμάτων στις αντικειμενοφόρους πλάκες, έπεται της διαδικασίας της μονιμοποίησης. Για την μονιμοποίηση χρησιμοποιείται παγωμένο διάλυμα μεθανόλης και οξικού οξέος, σε αναλογία 3/1. Όπως ήδη αναφέρθηκε, μετά το υποτονικό σοκ, το δείγμα φυγοκεντρείται και ακολουθεί απόχυση του εναιωρήματος. Το διάλυμα μεθανόλης/οξικού οξέος (fixative) προστίθεται στο σωλήνα φυγοκέντρησης, μέχρι να γεμίσει το τελευταίο. Ακολουθεί πάλι φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 1300 rpm, ενώ η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλη μια φορά. Μετά την τελευταία απόχυση το ίζημα επαναιωρείται σε λίγες σταγόνες διαλύματος fixative, ώστε να μειωθεί η πυκνότητα των κυττάρων.

Σειρά έχει η τοποθέτηση των κυττάρων πάνω στις αντικειμενοφόρους πλάκες. Σε κάθε μια πλάκα, τοποθετούνται 2 σταγόνες του εναιωρήματος, περίπου 40 μ L δηλαδή. Στην συνέχεια τα πλακάκια αφήνονται να στεγνώσουν στον αέρα, και ακολουθεί η διαδικασία της χρώσης τους.

7.3 ΧΡΩΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ

Για την χρώση των πλακών χρησιμοποιείται η χρωστική ουσία Giemsa (26). Η συγκεκριμένη χρωστική είναι φωτοευαίσθητη και έχει την ικανότητα να δεσμεύεται από τις πρωτεΐνες από τις οποίες αποτελούνται οι χρωματίδες και ο πυρήνας του κύτταρου. Οι πλάκες

βυθίζονται στο διάλυμα της ουσίας με περιεκτικότητα 2 % v/v, για 8-10 λεπτά και στην συνέχεια ξεπλένονται με νερό βρύσης. Αμέσως μετά οι πλάκες ξεπλένονται με αποσταγμένο νερό και αφήνονται να στραγγίσουν στον αέρα, για περίπου μια ώρα. Έπειτα, μόλις στεγνώσουν καλά, τοποθετούνται πάνω στις πλάκες ειδικές καλύπτρες, οι οποίες προσκολλούνται με χρήση της ειδικής κόλλας Endelan. Στην συνέχεια οι πλάκες είναι έτοιμες για μελέτη στο μικροσκόπιο.

7.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΤΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ

Τα δείγματα αναλύθηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο (Εικόνα 7.1). Οι μεταφάσεις αποθηκεύθηκαν στον ηλεκτρονικό υπολογιστή και η επεξεργασία τους έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος Ikaros.



Εικόνα 7.1: Οπτικό μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης.



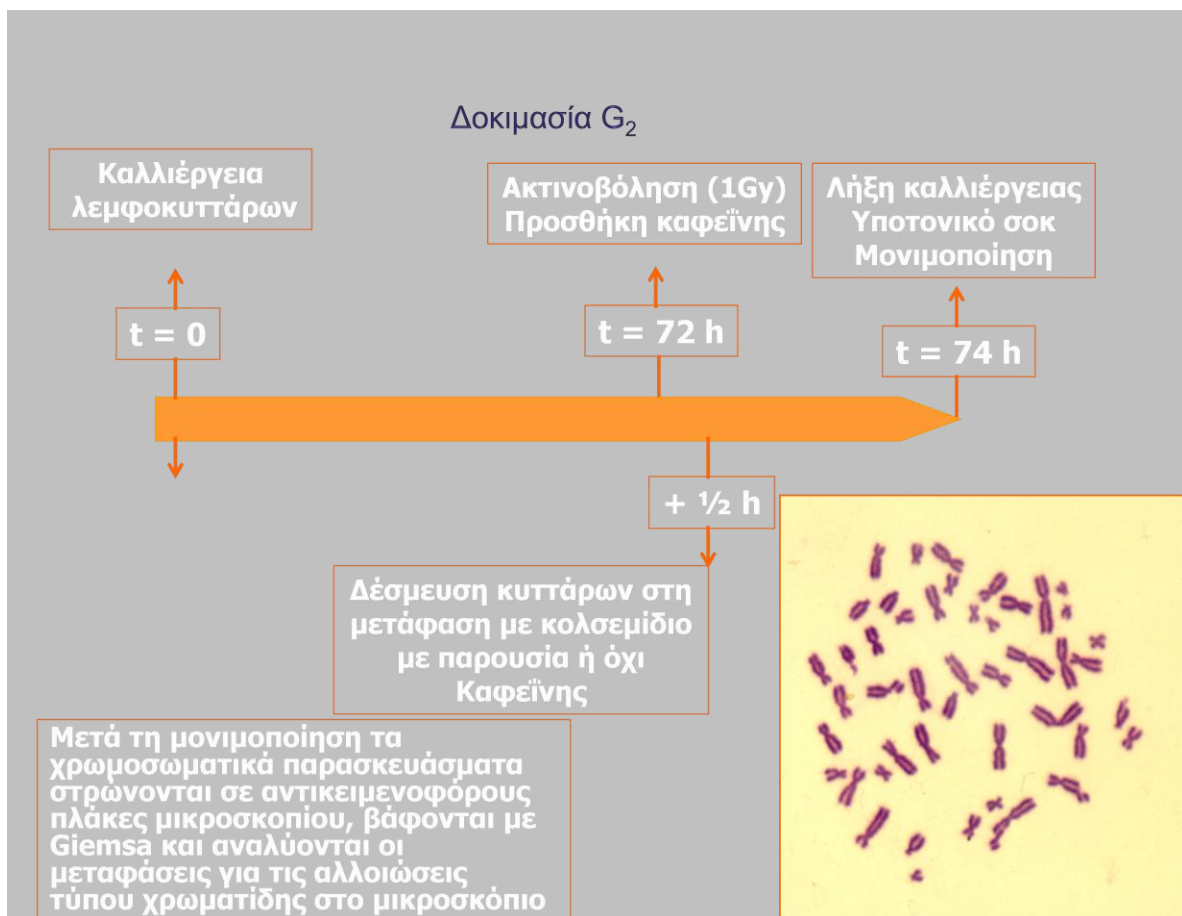
Εικόνα 7.2 : Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, τραβηγμένη από το πρόγραμμα IKAROS

Δ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8° :
ΜΕΘΟΔΟΣ G₂-ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ

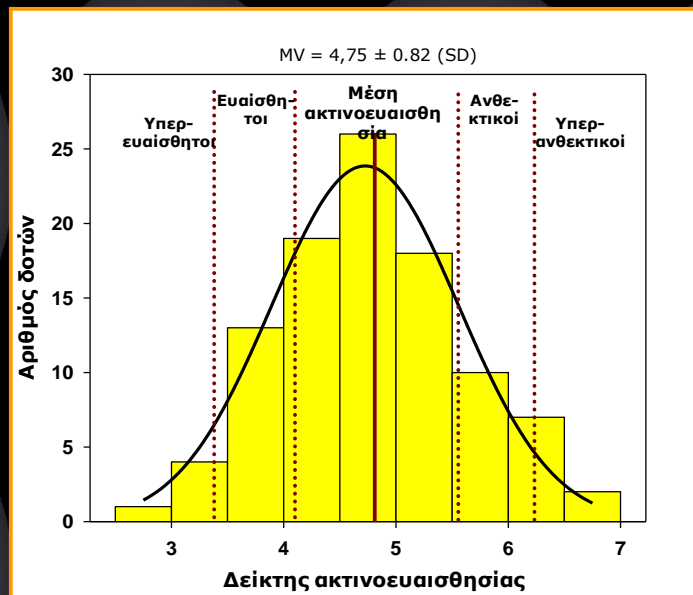
Η μέθοδος G₂χρωμοσωματικής ευαισθησίας (G₂ – assay) είναι μια διαδικασία που επιτρέπει την αξιολόγηση της ενδογενούς χρωμοσωματικής ακτινοευαισθησίας βάσει ενός δείκτη, τον δείκτη ακτινοευαισθησίας. Η δοκιμασία αυτή δημοσιεύτηκε από την ερευνητική ομάδα *Georgia I. Terzoudi, et al, International Journal of Oncology 2009. 35: p. 1223-1230* του Ε.Κ.Φ.Ε «Δ».

Ο ατομικός δείκτης ακτινοευαισθησίας προσδιορίζεται από τον αριθμό των αλλοιώσεων παρουσία καφεΐνης αν αφαιρέσουμε τον αριθμό των αλλοιώσεων απουσία καφεΐνης. Η παρουσία της καφεΐνης στις κυτταροκαλλιέργειες αίρει το μπλόκ στην G₂. Τα κύτταρα δεν σταματούν για να επιδιορθώσουν τις βλάβες που επάγει η ακτινοβολία και μπαίνουν στο στάδιο της μίτωσης.



Εικόνα 8.1 : Δοκιμασία G₂ χρωμοσωματικής ευαισθησίας

ΔΕΙΚΤΗΣ ΑΚΤΙΝΟΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ



Georgia I. Terzoudi, et al, *International Journal of Oncology* 2009, **35**: p. 1223-1230.

Εικόνα 8.2: Υπολογισμός της ακτινοευαισθησίας κυττάρων, με βάση την θέση του δείκτη ακτινοευαισθησίας στην παραπάνω κανονική κατανομή

Αφού εξαχθεί ο δείκτης ακτινοευαισθησίας και με βάση τη θέση του στην κατανομή κατατάσσεται το άτομο σε μία από τις κατηγορίες που φαίνονται στην Εικόνα 8.2

8.1 ΜΕΘΟΔΟΣ – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ G₂ ASSAY

Καλλιέργειες της καρκινικής σειράς A431 επώαστηκαν για 24 ώρες στον επωαστικό κλίβανο στους 37⁰ C παρουσία 5% CO₂, σε φιάλη με 30 mL θρεπτικού υλικού. Έπειτα διαχωρίσαμε το περιεχόμενο της φιάλης σε 24 μικρές φιάλες που χωριστήκαν σε 2 ομάδες των 6 φιαλών η κάθε μια. Αυτή η διαδικασία έγινε 2 φορές, καθώς έπρεπε να παρασκευαστούν 2 ομάδες των 6 φιαλών για κάθε ένα από τα κινζολινικά παράγωγα Α και Γ, άρα δημιουργήθηκαν 4 ομάδες καλλιεργείων, 2 για κάθε παράγωγο. Παρακάτω παρατίθενται συνοπτικά οι ομάδες αυτές.

ΠΑΡΑΓΩΓΟ Α - ΟΜΑΔΑ Α1

ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ
3	Κύτταρα A431
3	Κύτταρα A431 + ακτινοβολία
3	Κύτταρα A431 + Α
3	Κύτταρα A431 + Α + ακτινοβολία

ΠΑΡΑΓΩΓΟ Α - ΟΜΑΔΑ Α2

ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ
3	Κύτταρα A431 + καφεΐνη
3	Κύτταρα A431 + ακτινοβολία + καφεΐνη
3	Κύτταρα A431 + Α + καφεΐνη
3	Κύτταρα A431 + Α + ακτινοβολία + καφεΐνη

ΠΑΡΑΓΩΓΟ Γ - ΟΜΑΔΑ Γ1

ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ
3	Κύτταρα A431
3	Κύτταρα A431 + ακτινοβολία
3	Κύτταρα A431 + Γ
3	Κύτταρα A431 + Γ + ακτινοβολία

ΠΑΡΑΓΩΓΟ Γ - ΟΜΑΔΑ Γ2

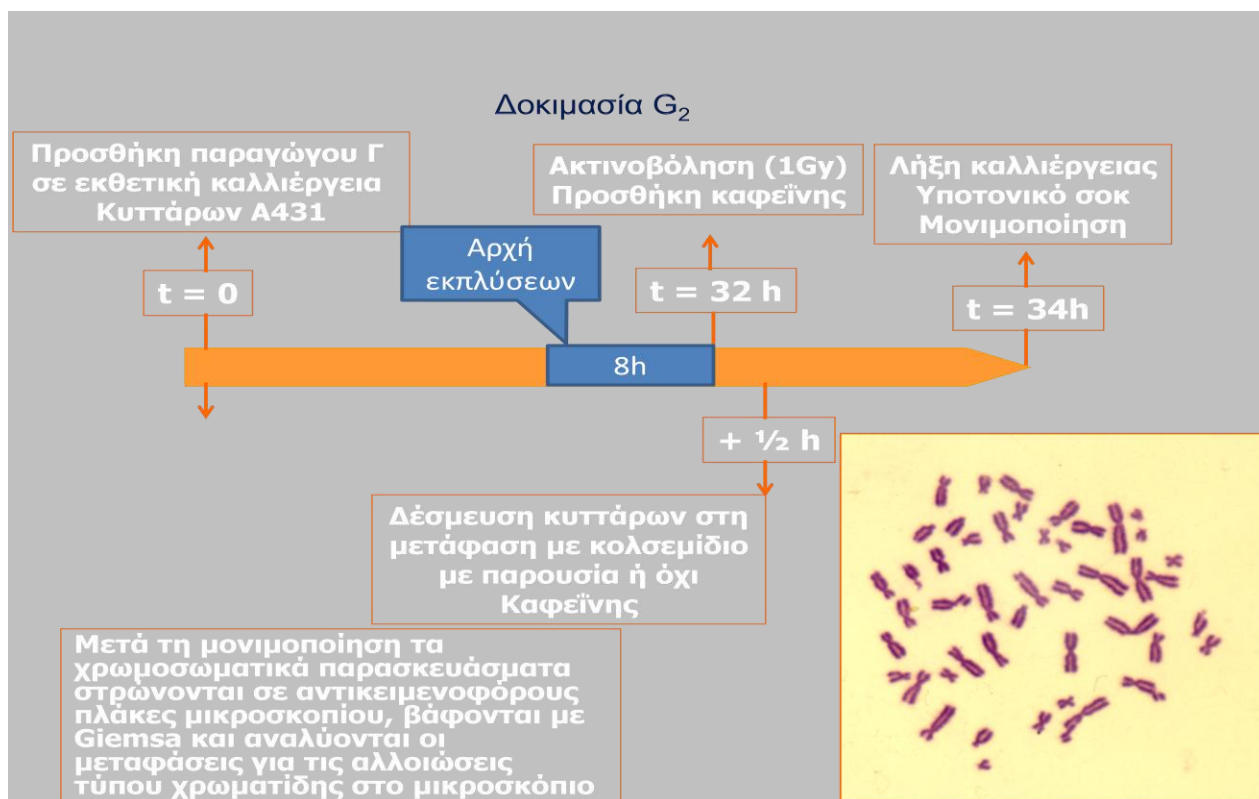
ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ
3	Κύτταρα A431 + καφεΐνη
3	Κύτταρα A431 + ακτινοβολία + καφεΐνη
3	Κύτταρα A431 + Γ + καφεΐνη
3	Κύτταρα A431 + Γ + ακτινοβολία + καφεΐνη

Στη συνέχεια του πειράματος προστέθηκαν στις μισές φιάλες κάθε ομάδας τα κινολογινικά παράγωγα Α και Γ αντίστοιχα, όπως φαίνεται στον πίνακα, στη συγκέντρωση όπου αναστέλλεται το 50% της κυτταρικής επιβίωσης ($IC_{50} = 4.80 \mu M$ για το παράγωγο Α και $IC_{50} = 0,65 \mu M$ για το Γ) ($t=0$). Έπειτα από 24 ώρες επώασης με τα κινολογινικά παράγωγα, έγινε αλλαγή του θρεπτικού υλικού σε όλες τις φιάλες. Σε όλες τις φιάλες, ακόμα και σε αυτές που δεν

περιείχαν τα κιναζολινικά παράγωγα. Η διαδικασία της έκπλυσης πραγματοποιήθηκε άλλες δυο φορές με στόχο να απομακρυνθούν πλήρως τα κιναζολινικά παράγωγα από το εξωκυτταρικό περιβάλλον των καλλιιεργειών. Στις φιάλες χωρίς παράγωγα, οι εκπλύσεις πραγματοποιήθηκαν, ώστε τα κύτταρα σε κάθε δείγμα να υποστούν ακριβώς την ίδια διεργασία και να επιτευχθούν κατά το δυνατόν ίδιες συνθήκες περιβάλλοντος. Στην συνέχεια ($t=32$ h) έγινε ακτινοβολήση 12 καλλιιεργειών από κάθε ομάδα (ομάδες Α και Γ). Η ακτινοβολήση, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, πραγματοποιήθηκε σε πηγή ^{60}Co , με δόση ίση με 1Gy.

Στη συνέχεια του πειράματος τα κύτταρα μεταφέρθηκαν στον θάλαμο κάθετης νηματικής ροής όπου στα κύτταρα των υποομάδων Α2 και Γ2 προστεθήκαν 4 mM καφεΐνης και επωάστηκαν για 30 λεπτά μέσα στον επωαστικό κλίβανο. Έπειτα προστέθηκαν 0,5μL διαλύματος κολσεμίδιου σε κάθε φιάλη που περιείχε 5mL θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα επωάστηκαν για $1^{1/2}$ ώρες στους 37°C παρουσία CO_2 5%.

Τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από της φιάλες με θρυψίνη και μεταφέρθηκαν σε σωλήνες φυγοκέντρησης σε χρόνο $t = 34$ h και ακολουθήθηκε η διαδικασία της μονιμοποίησης, της επίστρωσης και της χρώσης, όπως περιγράφηκε. Τέλος, ακολούθησε η εξαιρετικά επίπονη και χρονοβόρα διαδικασία της χρωμοσωματικής ανάλυσης των μεταφάσεων στο οπτικό μικροσκόπιο.

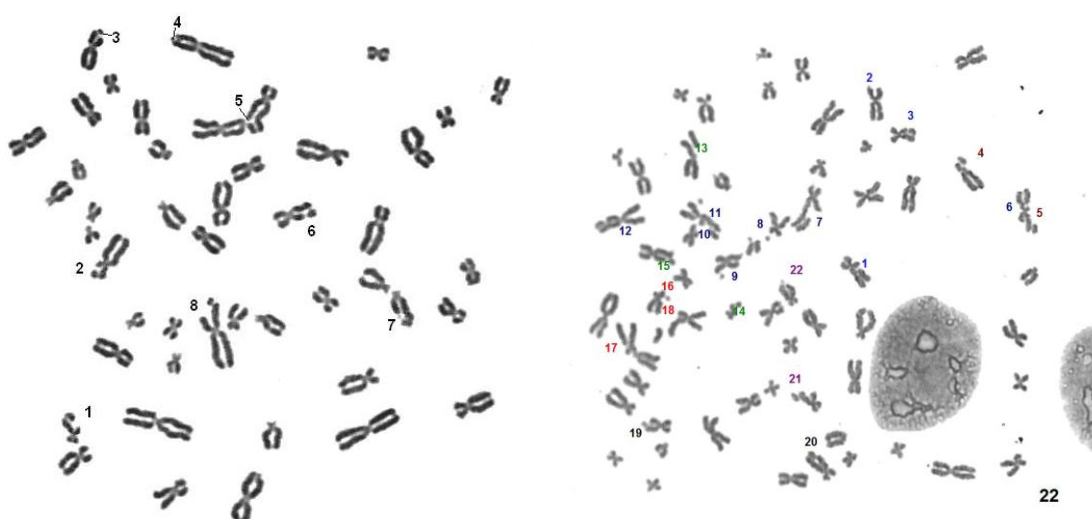


Εικόνα 8.2: Συνοπτική παρουσίαση της πειραματικής διαδικασίας

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9° :

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΑΛΛΟΙΩΣΕΩΝ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΔΗΣ

Μετά το πέρας των πειραμάτων, πραγματοποιήθηκε στο οπτικό μικροσκόπιο η ανάλυση των παρασκευασμάτων. Για κάθε πειραματικό σημείο αναλύθηκαν 60 μεταφάσεις. Σε αυτές τις μεταφάσεις, μετρήθηκε ο αριθμός των χρωματιδιακών αλλοιώσεων, δηλαδή οι ασυνέχειες και οι θραύσεις που είχαν υποστεί οι χρωματίδες κατά την ακτινοβόληση καθώς και ο αριθμός των χρωμοσωμάτων της κάθε μετάφασης. Παρακάτω παρατίθενται ενδεικτικά, κάποιες εικόνες όπως τις λάβαμε από το οπτικό μικροσκόπιο.

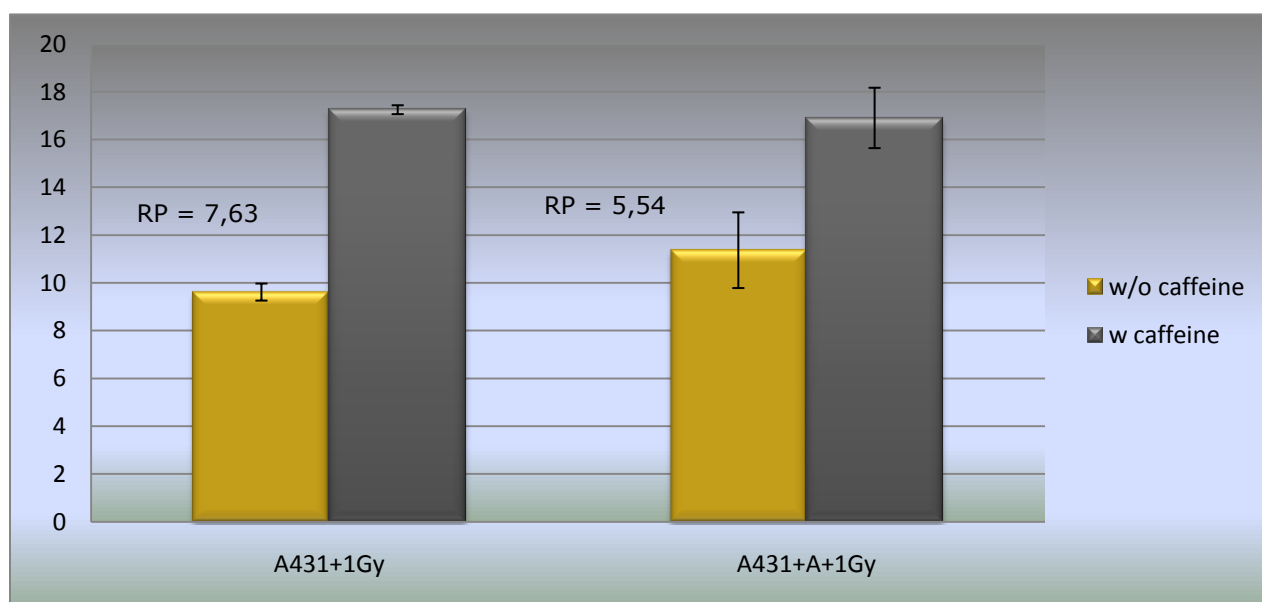


Εικόνα 10.1: Μεταφάσεις όπως τις είδαμε στο οπτικό μικροσκόπιο

Κατά την ανάλυση των δειγμάτων διαπιστώθηκε ότι παρουσία του παραγώγου Γ ο μιτωτικός δείκτης ήταν σχεδόν μηδενικός – δηλαδή δεν βρέθηκαν αρκετές μεταφάσεις. Έγινε επανάληψη του πειράματος άλλες δύο φορές. Όμως και στις δύο επαναλήψεις παρουσιάστηκε το ίδιο πρόβλημα. Τα αποτελέσματα που παρατίθενται συγκεντρωμένα στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1) είναι οι μέσοι όροι των τιμών των δύο πρώτων πειραμάτων. Δίπλα από τις τιμές εμφανίζεται η τυπική απόκλιση των μέσων τιμών των δύο πειραμάτων. Στην τελευταία στήλη καταγράφεται ο RP, ο δείκτης ακτινοευαισθησίας, όπως αυτός ορίζεται στο άρθρο των *Georgia I. Terzoudi et al, International Journal of Oncology 35: 1223-1230, 2009.*

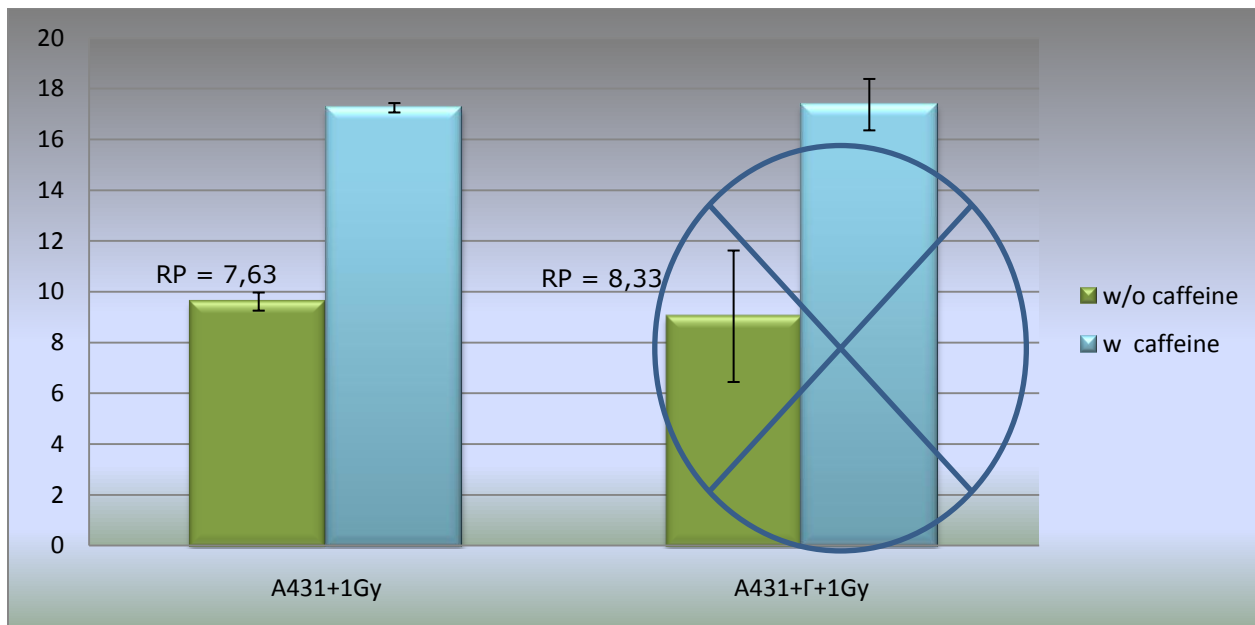
	w/o caffeine			+caffeine			IRP
A431+A	0,250	±	0,090	0,470	±	0,140	
A431+Γ	0,162	±	0,090	0,451	±	0,294	
A431+1Gy	9,62	±	0,36	17,25	±	0,19	7,63
A431+A+1Gy	11,37	±	1,58	16,91	±	1,26	5,54
A431+Γ+1Gy	9,04	±	2,59	17,37	±	1,01	8,33

Από τις τιμές του Πίνακα 1 κατασκευάστηκαν τα παρακάτω ραβδόγραμμα, στα οποία φαίνεται σχηματικά η δράση των κιναζολινικών παραγώγων. Στο Ραβδόγραμμα 1 εμφανίζεται ο αριθμός αλλοιώσεων μετά τις πλύσεις, έπειτα από ακτινοβόληση, με και χωρίς καφεΐνη. Φαίνεται ότι η ελάχιστη αύξηση του αριθμού των αλλοιώσεων που παρατηρείται μετά την απομάκρυνση του παραγώγου A δεν είναι σημαντική. Η παρατήρηση αυτή είναι αναμενόμενη καθώς το παράγωγο αυτό δεσμεύεται αντιστρεπτά στον υποδοχέα και με τις εκπλύσεις απομακρύνεται.



Ραβδόγραμμα 1 : Υπολογισμός της ακτινοευαισθησίας των A431 με επώαση και πλύση του κιναζολινικού παραγώγου A.

Στο Ραβδόγραμμα 2 εμφανίζεται ο αριθμός των αλλοιώσεων μετά τις εκπλύσεις του παραγώγου Γ, έπειτα από ακτινοβόληση με και χωρίς καφεΐνη. Υπενθυμίζουμε ότι τα δείγματά μας παρουσία του παραγώγου Γ είναι ελλιπή – αναλύθηκαν μόνο 18 μεταφάσεις, 9 από κάθε πείραμα.



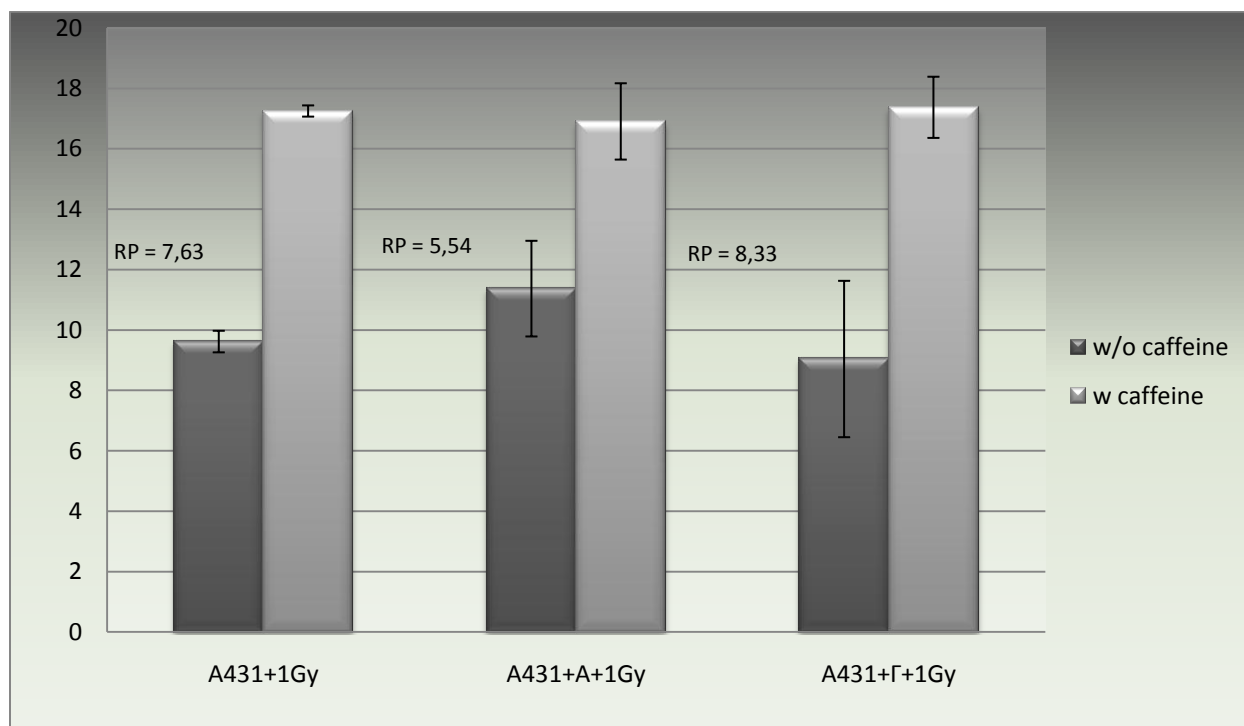
Ραβδόγραμμα 2 : Υπολογισμός της ακτινοευαισθησίας των A431 με επώαση και έκπλυση του κινολογικού παραγώγου Γ.

Παρουσία καφεΐνης ο αριθμός των αλλοιώσεων δεν διαφέρει σημαντικά μεταξύ των δειγμάτων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10^ο : ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η παρούσα εργασία εντάσσεται, όπως προαναφέρθηκε, στα πλαίσια μιας ευρύτερης μελέτης που γίνεται στο I/P-RΠ του ΕΚΕΦΕ «Δ» και πιο συγκεκριμένα στη συγκριτική μελέτη της δράσης κινζολινικών παραγώγων που παρουσιάζουν αντιστρεπτή και μη αντιστρεπτή δέσμευση με τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα στην ακτινοευαισθητοποίηση κυττάρων που τον υπερεκφράζουν.

Στην εργασία αυτή, δεδομένης του διαφορετικού τρόπου δέσμευσης των παραγώγων Α και Γ στα κύτταρα, μετρήσαμε τον αριθμό των αλλοιώσεων που επάγεται από την ακτινοβολία μετά την απομάκρυνσή τους από τις κυτταροκαλλιέργειες. Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα της σειράς A431 καλλιεργήθηκαν, επώαστηκαν με τις ουσίες Α, Γ και έπειτα οι ουσίες απομακρύνθηκαν από το κυτταρικό περιβάλλον. Μετά από 8 ώρες επώασης ακολούθησε η δοκιμασία G2 σε φιάλες με A431 και ακτινοβολία, σε φιάλες με A431 παράγωγο Α και ακτινοβολία και σε φιάλες με A431 παράγωγο Γ και ακτινοβολία. Τα πειράματα έγιναν με και χωρίς καφεΐνη σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις. Ακολουθήθηκε η όλη διαδικασία της μέτρησης των αλλοιώσεων στο μικροσκόπιο.



Ραβδόγραμμα 10.1: Αριθμός αλλοιώσεων / κύτταρο στα δείγματα

Σε γενικές γραμμές φαίνεται στο Ραβδόγραμμα 1 ότι η ακτινοευαισθητοποιητική δράση και των δύο παραγώγων χάνεται μετά την απομάκρυνσή τους από το υπερκείμενο των καλλιέργειών. 8 ώρες μετά την απομάκρυνσή του Α από τις καλλιέργειες, ο αριθμός των αλλοιώσεων ανά κύτταρο του δείγματος είναι μεγαλύτερος από αυτόν του μάρτυρα (κύτταρα και ακτινοβολία) όμως, η αύξηση που παρατηρείται δεν είναι σημαντική.

Το παράγωγο Γ, 8 ώρες μετά την απομάκρυνσή του από τις καλλιέργειες χάνει τελείως την μικρή ακτινοευαισθητοποιητική του δράση που είχε αμέσως μετά την χορήγηση του (διπλωματική εργασία Αλεξίας Βαλάση, ΣΕΜΦΕ, 2011). Δεδομένου του είδους της δέσμησης, αντιστρεπτή και μη αντιστρεπτή, θα περίμενε κανείς ότι η δράση του παραγώγου Γ (μη αντιστρεπτής δέσμησης) θα ήταν σαφώς μεγαλύτερη μετά από εκπλύσεις, αφού μετά την δέσμηση του στον υποδοχέα το παράγωγο αυτό δεν μπορεί να απομακρυνθεί από αυτόν. Παρόλα αυτά ο αριθμός αλλοιώσεων ανά κύτταρο για το παράγωγο Α είναι 11,37 ενώ για το Γ είναι 9,04 **στις λίγες μεταφάσεις που μπορέσαμε να αναλύσουμε.**

Κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψαν αρκετές παρατηρήσεις ενδιαφέρουσες για συζήτηση και περαιτέρω διερεύνηση. Οι παρατηρήσεις αυτές ανοίγουν δρόμους διερεύνησης των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στη δράση των κινάζολινικών παραγώγων Α και Γ.

Ο σχεδόν μηδενικός μιτωτικός δείκτης που παρουσιάζεται στα δείγματα που έχουν προεπασθεί με το παράγωγο Γ, ακόμα και παρουσία καφεΐνης, φανερώνει ότι, 8 ώρες μετά την απομάκρυνση του παραγώγου στις καλλιέργειες, πολύ μικρό μέρος του πληθυσμού βρίσκεται στην G2 φάση του κυτταρικού κύκλου. Το πρόβλημα αυτό παρατηρήθηκε και κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων της Αλεξίας Βαλάση, όμως βρέθηκε ο απαιτούμενος αριθμός μεταφάσεων που ολοκλήρωνε την ανάλυση. Για να φωτίσουμε το πρόβλημα μελετήσαμε την δράση των παραγώγων στον κυτταρικό κύκλο με την μέθοδο κυτταρομετρίας ροής (Εικόνα 10.1). Το πείραμα εκτελέστηκε από την ερευνήτρια του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος, Δρ. Βάσια Χατζή.

Η συσσώρευση του κυτταρικού πληθυσμού στην G0/G1 που φαίνεται να επέρχεται μετά από 24ωρη παρουσία του παραγώγου Γ στις κυτταροκαλλιέργειες (Εικόνα 10.1), δίνει μια πιθανή εξήγηση: Ή συσσωρεύεται σταδιακά ένας κυτταρικός πληθυσμός στην G0 (εκτός κυτταρικού κύκλου) ή μπλοκάρονται στο σημείο ελέγχου μεταξύ της μετάβασης από τη G1 στην S. Στην δεύτερη περίπτωση μπορούμε να υποθέσουμε ότι το Γ δρα μέσω του πυρηνικού μονοπατιού που σχετίζεται με το γονίδιο B Myb και ο μπλοκαρισμένος από το παράγωγο EGFR δεν προάγει την είσοδο από την G1 στην S (Εικόνα 10.2). Επίσης αξιοσημείωτο είναι το ότι το παράγωγο Γ, μετά την απομάκρυνσή του από το κυτταρικό περιβάλλον, διατηρεί την δράση του

και συνεχίζει να συσσωρεύει τα κύτταρα στην G0/G1 φάση και να μειώνει αντίστοιχα τον πληθυσμό στην S.

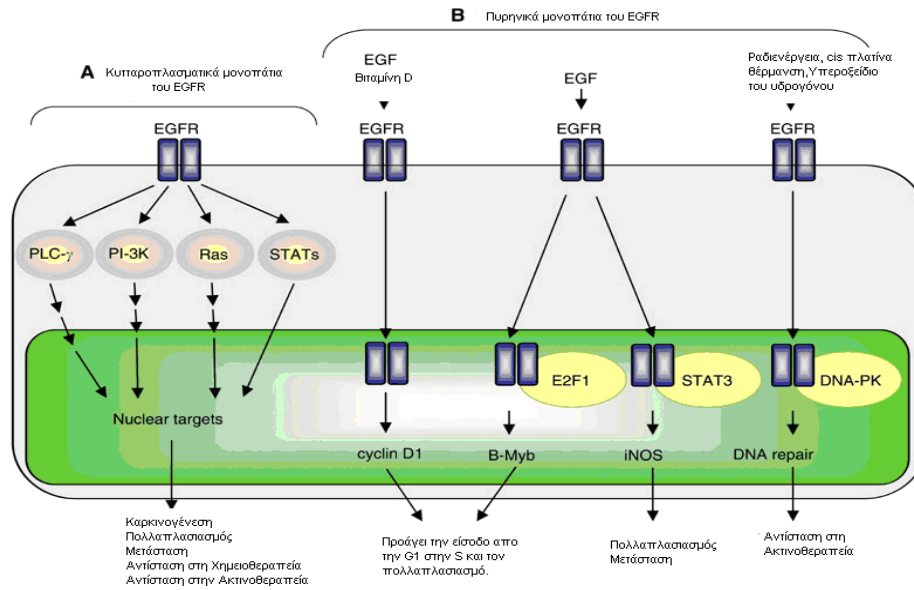
2 καλλιέργειες	<G0/ G1> %		<S> %		<G2/M> %	
Control	30,1	± 1,5	57,4	± 0,6	12,5	± 1,0
Control + wash	30,4	± 1,8	52,9	± 3,9	16,6	± 2,4
A	43,4	± 1,4	46,9	± 2,5	9,7	± 1,1
A + wash	43,6	± 0,9	45,0	± 1,9	11,4	± 1,4
Γ	50,2	± 2,4	37,0	± 3,7	12,8	± 1,9
Γ + wash	56,2	± 1,1	27,5	± 1,2	16,3	± 1,0

Εικόνα 10.1 : Αποτελέσματα του πειράματος με την μέθοδο κυτταρομετρίας ροής

Η παρουσία πληθυσμού στην φάση G2 ακόμα και έπειτα από εκπλύσεις, δείχνει ότι κατά την καλλιέργεια μας θα έπρεπε να εντοπιστούν κύτταρα στην μετάφαση. Δεδομένου του ότι το πείραμα κυτταρομετρίας ροής έγινε χωρίς ακτινοβολία των κυττάρων, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η συνδυαστική δράση παραγωγού και ακτινοβολίας ίσως επάγει ένα block στην G2 φάση του κυτταρικού κύκλου. Το block αυτό, θα είναι άλλο από αυτό της καφεΐνης εφόσον και οι πληθυσμοί που επώαστηκαν με καφεΐνη δεν παρουσίασαν κύτταρα στην μετάφαση. Η υπόθεση αυτή πρέπει να ελεγχθεί στο μέλλον.

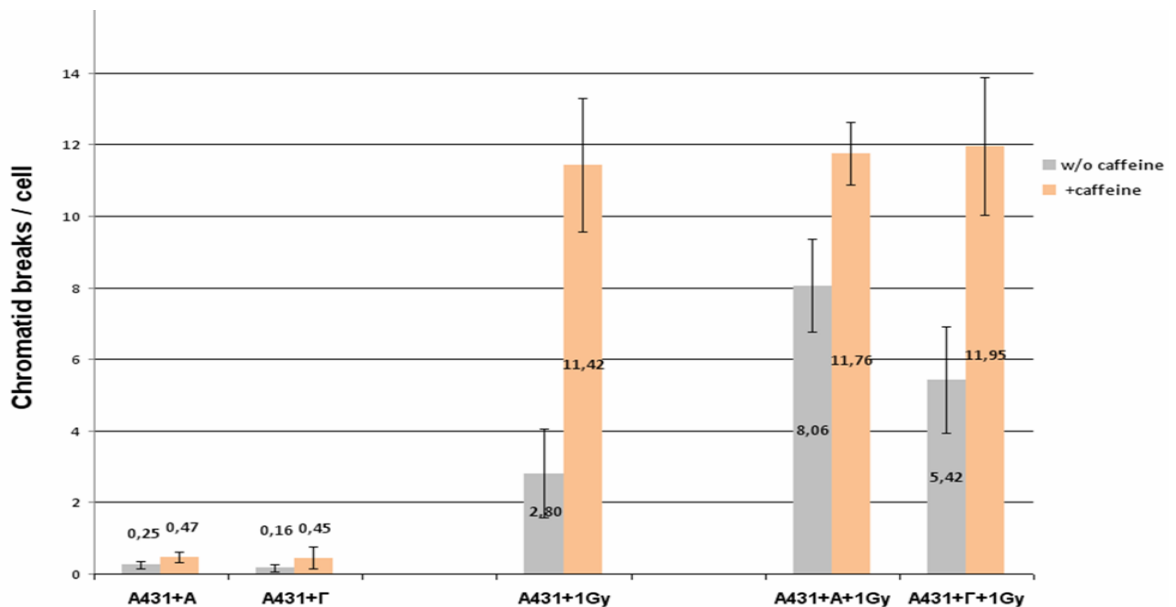
Στην περίπτωση του παραγωγού A, παρατηρείται επίσης μια αύξηση του πληθυσμού στην G0/G1 φάση του κύκλου, πράγμα το οποίο μας μαρτυράει ότι ίσως και το παράγωγο A επάγει κάποιο block σε αυτές τις φάσεις.

Οι λίγες μεταφάσεις που βρίσκουμε μπορεί να είναι κύτταρα που διέφυγαν της δράσης του παραγωγού. Το πρόβλημα αυτό εμφανίστηκε αλλά σε μικρότερο βαθμό και στο πείραμα της Αλεξίας Βαλάση.



Εικόνα 10.2: Κυτταροπλασματικά και πυρηνικά μονοπάτια του EGFR

Η δράση του Γ μέσω του μονοπατιού που εμπλέκει το γονίδιο B Myb δεν αποκλείει την υπόθεση της Αλεξίας Βαλάση που πιθανολογεί μια δράση του παραγώγου Γ και μέσω της αναστολής του πυρηνικού μονοπατιού που σχετίζεται με επιδιορθωτικούς μηχανισμούς (Εικόνα 10.3)



Εικόνα 10.3: Διάγραμμα χρωμοσωματικών αλλοιώσεων ανά κύτταρο, για κύτταρα A431 επωασμένα με παράγωγα Α και Γ

Ως προς την χρήση της μεθόδου μέτρησης G2-χρωμοσωματικής ευαισθησίας στην για την μέτρηση χρωμοσωματικής ευαισθησίας καρκινικών σειρών: Όπως είπαμε και στην εισαγωγή η μεθοδολογία αυτή έχει αναπτυχθεί για τη μέτρηση της ακτινοευαισθησίας ατόμων ενός ανθρώπινου πληθυσμού και τα δείγματα παρασκευάζονται από περιφερικό αίμα που λαμβάνεται από τα άτομα αυτά. Η χρήση της στην μέτρηση της ακτινοευαισθησίας μιας καρκινικής σειράς μας οδηγεί να κάνουμε μία σειρά αποδοχών.

Η καρκινικές σειρές είναι ένας ποικιλόμορφος πληθυσμός ως προς τον αριθμό των χρωμοσωμάτων ανά κύτταρο. Επειδή ο αριθμός των χρωμοσωμάτων στα κύτταρα της καρκινικής σειράς δεν είναι σταθερός όπως στα λεμφοκύτταρα, (46 χρωμοσώματα) ανάγουμε τον αριθμό των αλλοιώσεων ανά κύτταρο στο μέσο όρο των χρωμοσωμάτων ανά κύτταρο της σειράς (59 χρωμοσώματα). Επίσης οι καρκινικές σειρές όπως και οι συμπαγείς όγκοι είναι ένα ποικιλόμορφος πληθυσμός που αποτελείται από πολλούς κυτταρικούς κλώνους. Η απόκριση των διαφορετικών κλώνων στους παράγοντες που μελετάμε θα είναι και αυτή ποικιλόμορφη και οι αποκλίσεις μεταξύ των κλώνων μπορεί να είναι και μεγάλες.

Τέλος παρατηρούμε ότι κατά τις μετρήσεις μας έχουμε μεγάλες αποκλείσεις και θα πρέπει να αυξήσουμε το μέγεθος του δείγματος - δεν μπορούμε να εργαζόμαστε όπως με την μέτρηση της ακτινοευαισθησίας στα δείγματα των λεμφοκυττάρων. Με τη μέθοδο αυτή μπορούμε να δούμε μια μετατόπιση του συστήματός μας ως προς τον μάρτυρα προς μικρότερους δείκτες, δηλαδή μεγαλύτερη ακτινοευαισθησία χωρίς όμως να μπορούμε να έχουμε ακριβείς μετρήσεις – ο μάρτυράς μας είναι εκτός καμπύλης.

Η συγκριτική μελέτη του δείκτη ακτινοευαισθησίας με την μέθοδο G2-χρωμοσωματικής ευαισθησίας μας δίνει μία εικόνα της ακτινοευαισθητοποιητικής δράσης των παραγώγων αυτών στα κύτταρα A431, όμως μένει να μελετηθεί και η δράση τους στην απόπτωση αλλά και στην ικανότητά τους να αναστέλλουν την δημιουργία αποικιών στις κυτταρικές καλλιέργειες και άλλα.

Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Γαζής, Ευάγγελος.** *Ιοντίζουσες Ακτινοβολίες.* Αθήνα : Εκδόσεις Παπασωτηρίου, 2002.
2. **Προυκάκης, Χαράλαμπος.** *Ιατρική Ακτινοφυσική.* Αθήνα : Εκδόσεις Παρισιάνου, 2004. Τόμ. 1.
3. **Γεωργίου, Ευάγγελος.** *Ιατρική Φυσική.* s.l. : Εκδόσεις Πασχαλίδης, 2008.
4. **Σπαντίδος, Δημήτρης.** *Μοριακή Ογκολογία.* s.l. : Εκδόσεις Λυχνία, 1984.
5. **P., Cohen.** *The role of protein phosphorylation in human health and disease.* s.l. : Eur. J. Biochem, 2001. 5001-5010.
6. **Carpender G, Cohen S.** *Epidermal growth factor.* s.l. : J Biol Chem, 1990. 265: 7709-12.
7. **D. Graus-Porta, R.R. Beerli, J.M. Daly, N.E. Hynes.** *The preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling.* s.l. : EMBO J., 1997. 1647 - 1655.
8. **A, Gschwind A/Fischer OM/Ullrich.** *The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy.* s.l. : Nat Rev Cancer, 2004. 5:361-70.
9. **Μπουλουγούρης Π., Κωνσταντουδάκης Γ.,Χριστοδούλου Σ.,Γιαννόπουλος Γ.,Πετροπούλου, Σαμπάνης, Σαφιολέας.** *Εκφραση υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα και επίδραση ενδοπεριτονιακής εγχυσης στην ανάπτυξη ορθοκολικού καρκίνου.* s.l. : Athens Medical Society, 2008.
10. **T.P.J. Garrett, N.M. McKern, M. Lou, T.C. Elleman, T.E.Adams, G.O. Lovrecz, H.J. Zhu, F. Walker, M.J. Frenkel, P.A.Hoyne, R.N. Jorissen, E.C. Nice, A.W. Burgess, C.W. Ward.** *Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor-a,.* s.l. : Cell 110, 2002. 763-773.
11. **Rowinsky, EK.** *The erbB family: targets for therapeutic development against cancer and therapeutic strategies using monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors.* s.l. : Annu Rev Med, 2004. 55:433-57.
12. **R., Roskoski.** *The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer.* s.l. : Department of Biochemistry and Molecular Biology, Louisiana State University Health Sciences Center, 2004.
13. **Salomon DS, Brandt R., Ciardiello F.** *Epidermal growth factor- related peptides and their receptors in human malignancies.* s.l. : Crit Rev Oncol Rematol, 1995. 183-232.

14. **Roy, Herbst.** *Review of epidermal growth factor receptor biology.* s.l. : Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys., 2004.
15. **Chan To, Rittenhouse S., Tsihchlis P.** *AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: Kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation.* 1999.
16. **Z., Αντωνόπουλος.** «ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟΥΣ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΟΥ ΕΠΙΔΕΡΜΙΚΟΥ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ. s.l. : Αριστοτελο πανεπιστημιο θεσσαλονικης, 2011.
17. **Kang SS, Kwon T, Kwon DY, Do SI.** AKT protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit. *J Biol Chem.* 2000, 274 .
18. **Castillo L, Etienne-Grimaldi MC, Fischel JL, Formento P, Magne N, Milano G.** *Pharmacological Background of EGFR targeting.* s.l. : Annals of oncology, 2004. 15:1007-1012.
19. **Nicholson R.I., Gee J. M. and Harper M. E.** *EGFR and cancer prognosis.* s.l. : Eur J. Cancer, 2001. 59-15.
20. **Μπόμπος Μ., Κωστόπουλος Ι., Παπαδημητρίου Σ.Κ., Βρεττού Ε.** *Συγκριτική μελέτη της έκφρασης του EGFR σε πρωτεϊνικό και γονιδιακό επίπεδο με ανοσοϊστοχημεία και FISH σε καρκινώματα του παχέος εντέρου.* s.l. : Αρχεία Παθολογικής Ανατομικής , 2006.
21. **Ki Hong, Axel Ullrich μφ. Φώτης Βλαστός.** *Ο ρόλος του υποδοχέα αυξητικού παράγοντα (EGFR) στην παθοφυσιολογία συμπαγών όγκων.* s.l. : Oncologie Biotherapeutics, 2001.
22. **Wikstrand, C.J., Reist, C.J., Archer, G.E., Zalutsky, M.R., Bigner, D.D.** The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFRvIII): characterization and utilization as an immunotherapeutic target. *J. Neurovirology.* 1998, 4.
23. **Moscattello D.K., Holgado-Madruga M., Godwin A.K., Ramirez G., Gunn G., Zoltick P.W., Biegel J.A., Hayes R.L., Wong A.J.** Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res.* . 55, 5536 - 5539.
24. **I. Überall, Z. Kolář, R. Trojanec, J. Berkovcová, M. Hajdúch.** The status and role of ErbB receptors in human cancer. *ScienceDirect.* 2008.
25. **Kohler G, Milstein C.** Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* . 1975, 256: 475-7.
26. **RJ, Kreitman.** Immunotoxins in cancer. *Current Op Immunol* 1999;11:570-. 1999, 11:570-8.
27. **Williams LE, Liu A, Wu AM, Maryon T, Chai A, Raubitschek AA, Wong J.** Figures of merit (FOMs) for imaging and therapy using monoclonal antibodies. *Med Phys.* 1995, 22: 2025-7.

28. **Garnett MC, Embleton MJ, Jacobs E, Baldwin RW.** Studies in the mechanism of action of an antibody–targeted drug–carrier conjugate. *Anticancer Drug Des* . 1985, 1: 3-12.
29. **Bagshawe KD, Sharma SK, Burke PJ, Melton, Knox RJ.** Developments with targeted enzymes in cancer therapy. *Current Op Immunol*. 1999, σσ. 11: 579 - 83.
30. **Georgia I. Terzoudi, et al.** G2 - assay. *International Journal of Oncology*. 2009, 35 : p.1223-1230.
31. **Μαργαρίτης, Λουκάς.** ΡΑΔΙΟΒΙΟΛΟΓΙΑ. ΑΘΗΝΑ : s.n., 1996.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ τον Υπεύθυνο Καθ. κ. Θ. Αλεξόπουλο καθώς επίσης τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τους καθηγητές μου Καθ. κ. Ε. Γαζή και Αν. Καθ. κ. Γ. Τσιπολίτη για την ουσιαστική και πολύτιμη συμβολή τους στην εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Ευχαριστώ τον Διευθυντή του Ινστιτούτου Ραδιοϊσοτόπων – Ραδιοδιαγνωστικών Προϊόντων του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» Δρ. Γ. Παντελιά που με προθυμία μου έδωσε την δυνατότητα να εκπονήσω την διπλωματική μου εργασία στα πλαίσια του Ινστιτούτου.

Ευχαριστώ την Επιβλέπουσα Δρ. Μ. Παραβατού για την καθοδήγηση, την ουσιαστική συμβολή της καθώς και την υπομονή που έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας.

Ευχαριστώ τον Δρ. Γ. Παντελιά και την Δρ. Γ. Τερζούδη για την εποικοδομητική κριτική και τις χρήσιμες υποδείξεις τους καθώς και την ουσιαστική συμβολή κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Ευχαριστώ την Δρ. Β. Χατζή για την αμέριστη βοήθεια, την προσφορά και την συνεργασία της, τόσο κατά την εκμάθηση των τεχνικών για την υλοποίηση του πειραματικού μέρους, όσο και για την εποικοδομητική κριτική και για τις υποδείξεις της κατά το γράψιμο της παρούσας εργασίας.

Ευχαριστώ την Δρ. Νάνσυ Μπούρκουλα, την Ηρώ Τριαντοπούλου και την Μαρία Μπέλλα, για τη φιλία τους και τη συνεργασία τους.

Ευχαριστώ την Αλεξία Βαλάση, για την φιλία της, την πολύτιμη συνεργασία και την άψογη συνεννόηση κατά την εκπόνηση της εργασίας αυτής.

Ευχαριστώ τους φίλους μου, Ιωάννα Παπαζάνη, Σίσσυ και Μαρία Μανουσάκη, Μαρία Καστριώτου και Λευτέρη Σκορδή για τη φιλία τους, την υπομονή τους και τη συμπαράσταση που μου έδειξαν σε όλο το διάστημα της εκπόνησης της εργασίας αυτής.

Ευχαριστώ πάνω απ' όλους τους γονείς μου και την αδερφή μου, για την πολύτιμη αγάπη τους και την συμπαράστασή τους όλα τα χρόνια των σπουδών μου.