ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΚΗΣ

Χημική χρωμοσωματική ακτινοευαισθητοποίηση καρκινικών κυττάρων A431 από το κιναζολινικό παράγωγο *N-{4-[(3-bromophenyl)amino]-quinazoline-6-yl}-2-chloroacetamide*

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Αλεξία Βαλάση

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 4

SUMMARY 5

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 6

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΙΟΝΤΙΖΟΥΣΑ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ – Η ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΥΛΗ ΚΑΙ ΒΑΣΙΚΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΜΕΓΕΘΗ ΠΟΥ ΤΗΝ ΑΦΟΡΟΥΝ 6

1.1. Διάσπαση β (beta decay) 6
1.2. Διάσπαση γ (gamma decay) 7
1.3. Στάδια αλληλεπίδρασης της ιοντίζουσας ακτινοβολίας με την ύλη 8
1.3.1. Χημικό στάδιο αλληλεπίδρασης της ιοντίζουσας ακτινοβολίας με την ύλη 9
1.3.2. Βιολογικό στάδιο αλληλεπίδρασης της ιοντίζουσας ακτινοβολίας με την ύλη 11

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΣΤΟΥΣ ΖΩΝΤΑΝΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ 12

2.1. Επιπτώσεις της ιοντίζουσας ακτινοβολίας στη ζώσα ύλη με βάση το επίπεδο βιολογικής οργάνωσης 12
2.1.1. Μοριακό και υποκυτταρικό επίπεδο 13
2.1.2. Κυτταρικό επίπεδο 14
2.1.3. Επίπεδο ιστών και οργάνων 14
2.2. Συνέπειες στην υγεία 15
2.2.1. Μη στοχαστικές συνέπειες στην υγεία 15
2.2.2. Στοχαστικές συνέπειες στην υγεία 15
2.3. Αλλοιώσεις του DNA 15
2.3.1. Μεταλλάξεις 15
2.3.2. Χρωμοσωματικές αλλοιώσεις 16

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΥΤΟΥ 19

3.1. Κυτταρικός κύκλος 19
3.1.1. Μεσόφαση 19
3.1.2. Φάση Μ 21
3.2. Σύστημα ελέγχου του κυτταρικού κύκλου 22
3.3. Κυτταρικός θάνατος και απόπτωση 24

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΚΤΙΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ – ΑΚΤΙΝΟΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ 25

4.1. Ακτινοθεραπεία 25
4.2. Ακτινοευαισθησία 26
4.3. Ακτινοευαισθησία στην Ακτινοθεραπεία 27
4.4. Η Μέθοδος μέτρησης G_2-χρωμοσωματικής ευαισθησίας (G_2-assay) 29

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: EGFR - ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ 31

5.1. Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF) 32
5.2. Υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) 32
5.3. Κιναζολινικά Παράγωγα ως μόρια στόχευσης 34

B. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ (ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6) 36

Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ (ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7) 38
7.1. Το κιναζολινικό παράγωγο 38
7.2. Η κυτταρική καρκινική σειρά A431 38
7.3. Κυτταροκαλλιέργειες 39
7.3.1. Υλικά και εξοπλισμός 40
7.3.2. Μέθοδος κυτταροκαλλιέργειας 41
7.4. Μέθοδος ακτινοβόλησης των δειγμάτων 44
7.5. Μέθοδος παρασκευής δειγμάτων για κυτταρογενετική ανάλυση 46
7.6. Πειραματική διαδικασία μέτρησης του δείκτη ακτινοευαισθησίας (RP) 48

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ 52

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ G_2 52

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ 55

Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 61

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ 64

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι κιναζολίνες είναι μόρια που χρησιμοποιούνται ως χημειοθεραπευτικά φάρμακα σε ασθενείς που υπερεκφράζουν στους όγκους τους τον Υποδοχέα του Επιδερμικού Αυξητικού Παράγοντα (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR). Ο EGFR είναι μόριο που χρησιμοποιείται ευρέως στη στοχευμένη αντικαρκινική θεραπεία, καθώς υπερεκφράζεται σε πολλούς τύπους καρκίνου και τα σηματοδοτικά μονοπάτια που συνδέονται με αυτόν σχετίζονται άμεσα με μηχανισμούς κεντρικούς στη διαδικασία της καρκινογένεσης, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, ο κυτταρικός κύκλος, η επιδιόρθωση του DNA, η απόπτωση, η μετάσταση κλπ. Ασθενείς που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα παρουσιάζουν αντίσταση σε πολλές μορφές θεραπείας. Όταν, η θεραπεία τους υπόκειται σε χημειοθεραπευτικά πρωτόκολλα με κιναζολινικά παράγωγα έχει παρατηρηθεί κλινικά και εργαστηριακά ότι ανταποκρίνονται καλύτερα στην ακτινοθεραπεία. Οι κιναζολίνες χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες ανάλογα με τον τρόπο δέσμευσής τους στον υποδοχέα. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν αυτές που συνδέονται με τον υποδοχέα αντιστρεπτά και στη δεύτερη αυτές που συνδέονται με τον υποδοχέα μη αντιστρεπτά. Ποια από τις δύο κατηγορίες έχει καλύτερη αντικαρκινική ή ακτινοευαισθητοποιό δράση και μέσω ποιων μηχανισμών δρουν τα μόρια αυτά δεν είναι ακόμα γνωστό.

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η *in vitro* μελέτη της ακτινοευαισθησίας που επάγει στα καρκινικά κύτταρα A431 το κιναζολινικό παράγωγο N-{4-[(3-βρωμοφαινυλ)αμινο]-κιναζολιν-6-υλ}-2-χλωροακεταμίδιο (**Γ**), το οποίο δεσμεύεται μη αντιστρεπτά με τον υποδοχέα, παρατηρώντας τις αλλοιώσεις που επάγει η ακτινοβολία στα χρωμοσώματά τους. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος μέτρησης της G_2-χρωμοσωματικής ευαισθησίας, δηλαδή της ευαισθησίας που παρατηρείται στα χρωμοσώματα όταν τα κύτταρα ακτινοβοληθούν στη φάση G_2 του κυτταρικού κύκλου (πριν εισέλθουν δηλαδή στη μίτωση και στη διαίρεση).

SUMMARY

Quinazolines are molecules that are used as chemotherapeutic drugs in patients with tumors over expressing the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR). EGFR is a molecule widely used in targeted cancer therapy, for the receptor is over expressed in many types of cancer and the signaling pathways linked to it are directly connected to mechanisms central to the process of carcinogenesis, such as cellular proliferation, cell cycle, DNA repair, apoptosis, metastasis etc. Patients over expressing the receptor appear to resist chemotherapy, but when the treatment is under chemotherapeutic protocols with quinazoline derivatives, it has been observed to have better response to radiation. Quinazolines are divided into two broad categories, depending on how they are committed to the receptor. In the first category those committed reversibly to the receptor are met and in the second those committed irreversibly. Which one of these categories has a better anticancer or radiosensitizing activity and through which mechanisms this molecules act, is not yet brought to knowledge.

The aim of this diploma is the *in vitro* study of the radiosensitivity delivered to the A431 cells by the quinazoline derivative N-{4-[(3-bromophenyl)amino]-quinazoline-6-yl}-2-chloroacetamide quinazoline (**Γ**), which is found to bound irreversibly to the receptor, through the observation of the alterations caused by radiation in chromosomes. For this purpose we used G_2-chromosomal radiosensitivity assay, that is the sensitivity which is observed in chromosomes when cells are irradiated in G_2 phase of the cell cycle (therefore before they enter mitosis and cell dividing).

Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΙΟΝΤΙΖΟΥΣΑ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ – Η ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΥΛΗ ΚΑΙ ΒΑΣΙΚΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΜΕΓΕΘΗ ΠΟΥ ΤΗΝ ΑΦΟΡΟΥΝ

Η ιοντίζουσα ακτινοβολία είναι μια μορφή ενέργειας που μεταδίδεται τόσο μέσα από το κενό, όσο και μέσα από υλικά σώματα, αλληλεπιδρά με την ύλη και προκαλεί ιοντισμούς και διεγέρσεις των ατόμων και των μορίων της (1).

Οι ιοντίζουσες ακτινοβολίες μπορεί να είναι *αμέσως ιοντίζουσες*, δηλαδή να αποτελούνται από σωματίδια με ηλεκτρικό φορτίο (όπως τα σωματίδια α, τα πρωτόνια και τα ηλεκτρόνια), τα οποία προκαλούν άμεσα ιοντισμούς, ή *εμμέσως ιοντίζουσες*, όταν αποτελούνται από σωματίδια άνευ φορτίου (όπως τα φωτόνια ακτινοβολίας γ, τα φωτόνια ακτινοβολίας Χ και τα νετρόνια), τα οποία προκαλούν ιοντισμούς εμμέσως, δηλαδή μέσω ηλεκτρονίων ή ανακρουόμενων πυρήνων ή άλλων φορτισμένων σωματιδίων που προσλαμβάνουν ενέργεια οπότε και προκαλούν ιοντισμούς κατά την αλληλεπίδραση της ύλης με αυτές (2).

Συνεπώς, η ιοντίζουσα ακτινοβολία μπορεί να είναι είτε ηλεκτρομαγνητική (ακτίνες γ και Χ) είτε σωματιδιακή (ηλεκτρόνια, νετρόνια, πρωτόνια κλπ), αν και σε αμφότερες μπορεί να αποδοθεί και κυματικός και σωματιδιακός χαρακτήρας (1).

1.1. Διάσπαση β (beta decay)

Με τον όρο διάσπαση β χαρακτηρίζονται τρεις διαφορετικοί τύποι πυρηνικών μετασχηματισμών:

- ✓ η εκπομπή ηλεκτρονίου από τον πυρήνα ή ***διάσπαση β⁻*** με γενική μορφή

$$ {}^{A}_{Z}X \rightarrow {}_{Z+1}^{A}\Psi + \beta^{-} + \bar{\nu}_e $$

όπου το ηλεκτρόνιο που εξέρχεται από τον πυρήνα δημιουργείται κατά τη στιγμή της διάσπασης σύμφωνα με την εξίσωση $n \rightarrow p + e^{-} + \bar{\nu}_e$,

- ✓ η εκπομπή ποζιτρονίου από τον πυρήνα ή ***διάσπαση β⁺*** με γενική μορφή

$$ {}^{A}_{Z}X \rightarrow {}_{Z-1}^{A}\Psi + \beta^{+} + \nu_e $$

όπου το ποζιτρόνιο που εξέρχεται από τον πυρήνα δημιουργείται κατά τη στιγμή της διάσπασης σύμφωνα με την εξίσωση $p \rightarrow n + e^{+} + \nu_e$ και

✓ η σύλληψη περιφερικών ηλεκτρονίων από τον πυρήνα ή ***διάσπαση EC*** (electron capture) με γενική μορφή

$$ {}^{A}_{Z}X + e^{-} \rightarrow {}_{Z-1}^{A}\Psi + \nu_e $$

για την οποία ισχύει $p + e^{-} \rightarrow n + \nu_e$.

Επειδή τα θυγατρικά άτομα πρέπει να είναι ηλεκτρικώς ουδέτερα, υπάρχουν μετακινήσεις των περιφερικών ηλεκτρονίων καθώς και αύξηση ή ελάττωση του αριθμού τους, με αποτέλεσμα οι β διασπάσεις να συνοδεύονται και από εκπομπή χαρακτηριστικών ακτινοβολιών X (2; 3).

Το ενεργειακό φάσμα των εκπεμπόμενων σωματιδίων β είναι συνεχές, αρχίζοντας από την ενεργειακή τιμή 0 μέχρι μια μέγιστη τιμή E_{max}, που αντιστοιχεί στη διαφορά των ενεργειών των πυρηνικών ενεργειακών καταστάσεων μεταξύ μητρικού και θυγατρικού πυρήνα. Η συνεχής κατανομή του ενεργειακού φάσματος των σωματιδίων β οφείλεται στο γεγονός της ισοπίθανης διανομής της ενέργειας E_{max} μεταξύ των παραγόμενων σωματιδίων (ηλεκτρονίου β^{-} και αντινετρίνου $\bar{\nu}_e$ ή ποζιτρονίου β^{+} και νετρίνου ν_e) (4).

1.2. Διάσπαση γ (gamma decay)

Η διάσπαση ενός πυρήνα που εκπέμπει σωμάτιο α ή β αφήνει συνήθως τον πυρήνα σε διεγερμένη κατάσταση. Επειδή, όμως, αφ' ενός μεν η ενέργεια που θα διέθετε ο πυρήνας για παραπέρα διάσπαση σε χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση δεν επαρκεί για να εκπεμφθεί άλλο ένα σωματίδιο, αφ' ετέρου δε η εκπομπή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας είναι πιο γρήγορο φαινόμενο, λαμβάνει τελικά χώρα η εκπομπή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας αντί ενός ακόμα σωματιδίου.

Στη διάσπαση γ ο πυρήνας μεταβαίνει από μια αρχική κατάσταση υψηλότερης ενέργειας (E_{α}) σε μια άλλη κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας (E_{τ}) και αποβάλλει σαν περίσσεια τη διαφορά ενέργειας $\Delta E = E_{\alpha} - E_{\tau}$ με εκπομπή (συνήθως) ακτινών γ. Ο πυρήνας είναι δυνατόν να εκπέμψει μία ή και περισσότερες ακτίνες γ πριν μεταβεί στη θεμελιώδη (βασική) του κατάσταση. Η ενέργεια ενός φωτονίου γ (E_{γ}) θα είναι $E_{\gamma} = h\nu = \Delta E = E_{\alpha} - E_{\tau}$.

Ο χρόνος ημίσειας ζωής των γ ραδιενεργών στοιχείων, που δεν είναι άλλος από το μέσο χρόνο ζωής της αντίστοιχης διεγερμένης στάθμης, είναι πολύ μικρότερος από τους αντίστοιχους χρόνους ημίσειας ζωής των α και β ραδιενεργών στοιχείων (5).

1.3. Στάδια αλληλεπίδρασης της ιοντίζουσας ακτινοβολίας με την ύλη

Κατά την αλληλεπίδραση των ιοντιζουσών ακτινοβολιών με την ύλη λαμβάνει χώρα μια σειρά διαδοχικών φαινομένων. Τα φαινόμενα αυτά περιλαμβάνουν φυσικούς μηχανισμούς αλληλεπίδρασης της ιοντίζουσας ακτινοβολίας με την ύλη, με τους οποίους αποδίδεται ενέργεια στην ύλη μέσω ιοντισμών και διεγέρσεων. Το φυσικό αυτό στάδιο αλληλεπίδρασης έχει σαν αποτέλεσμα χημικές μεταβολές στην ύλη [1.3.1], που οδηγούν τελικά σε βιολογικές επιπτώσεις σε αυτήν [1.3.2].

Έτσι, η ακτινοβόληση οποιουδήποτε βιολογικού υλικού προκαλεί μια αλληλουχία διαδικασιών με μεγάλες διαφορές στην κλίμακα του χρόνου εμφανίσεώς τους (2), όπως φαίνεται και στον πίνακα που ακολουθεί [Πίνακας 1-1].

Πίνακας 1-1: *Αλυσίδα φαινομένων που οδηγούν σε βλάβες λόγω αλληλεπίδρασης της ιοντίζουσας ακτινοβολίας με την ύλη* (6).

Φαινόμενο	**Χρονική κλίμακα**
<u>Αλληλεπίδραση με την ύλη</u> εμμέσως ιοντίζουσας ακτινοβολίας (γ, X, n) αμέσως ιοντίζουσας ακτινοβολίας (e, p, a)	 10^{-24} – 10^{-14} sec 10^{-16} – 10^{-14} sec
<u>Φυσικοχημικό στάδιο</u> (εναπόθεση ενέργειας)	10^{-12} – 10^{-8} sec
<u>Χημική βλάβη</u> (ελεύθερες ρίζες, διεγερμένα μόρια)	10^{-7} sec – ώρες
<u>Βιομοριακή βλάβη</u> (πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα κ.λπ.)	msec – ώρες
<u>Πρώιμα βιολογικά αποτελέσματα</u> (κυτταρικός θάνατος, ζωικός θάνατος	ώρες –εβδομάδες
<u>Όψιμα βιολογικά αποτελέσματα</u> (πρόκληση καρκίνου)	έτη – αιώνες

1.3.1. Χημικό στάδιο αλληλεπίδρασης της ιοντίζουσας ακτινοβολίας με την ύλη

Τα άτομα του βιολογικού υλικού τα οποία ακτινοβολήθηκαν κατά το φυσικό στάδιο, αντιδρούν με άλλα συστατικά των κυττάρων με ταχείες χημικές αντιδράσεις. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι ιοντισμοί και οι διεγέρσεις που συνέβησαν κατά το φυσικό στάδιο, προκαλούν ρήξη χημικών δεσμών και δημιουργία ελεύθερων ριζών (2).

Ελεύθερες ρίζες είναι άτομα ή μόρια ηλεκτρικά ουδέτερα που έχουν ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική στοιβάδα. Η ελεύθερη ρίζα σχηματίζεται από την επίδραση ακτινοβολίας, οπότε ένα ηλεκτρόνιο της εξωτερικής στοιβάδας είναι ασύζευκτο όσον αφορά το spin. Ο ιοντισμός έχει σπάσει τον ομοιοπολικό δεσμό και τα δύο τμήματα παρουσιάζουν έλλειμμα ηλεκτρονίων στις στοιβάδες τους. Οι ελεύθερες ρίζες είναι συνήθως πολύ δραστικές επειδή είτε έχουν την ισχυρή τάση να συζευχθούν με ένα μονήρες ηλεκτρόνιο ή με άλλη ελεύθερη ρίζα είτε προσπαθούν να απαλείψουν το μονήρες ηλεκτρόνιο.

Γενικά, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να δεχτούν ή να αποδώσουν ένα ηλεκτρόνιο.

Η ιοντίζουσα ακτινοβολία παράγει τυχαίες διεγέρσεις και ιοντισμούς, μέσα σε ένα πολύπλοκο βιολογικό σύστημα. Η πιθανότητα να συμβεί ένας ιοντισμός σε ένα μόριο είναι μεγαλύτερη εφ' όσον ο αριθμός των μορίων αυτών είναι σε περίσσεια σε σχέση με άλλο είδος μορίων. Εφ' όσον η ζώσα ύλη συνίσταται σε ποσοστό 75% από νερό, κατά την αλληλεπίδρασή της με την ακτινοβολία, το μεγαλύτερο ποσοστό της απορροφηθείσας ακτινοβολίας θα αποδοθεί σε μόρια νερού και θα προκαλέσει τη ραδιόλυση του νερού. Επομένως, είναι πολύ σημαντική τόσο η κατανόηση των ραδιοβιολογικών φαινομένων, όσο και η κατανόηση της ραδιοχημείας του νερού.

Όταν το νερό εκτίθεται σε ιοντίζουσα ακτινοβολία, το μόριο του νερού ιοντίζεται και παράγεται ένα ελεύθερο ηλεκτρόνιο (το οποίο εξακοντίζεται με υψηλή ταχύτητα) και ένα θετικά φορτισμένο μόριο νερού, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:

$$H_2O \xrightarrow{\alpha\kappa\tau\iota\nu o\beta o\lambda\acute{\iota}\alpha} H_2O^+ + e^-.$$

Το ηλεκτρόνιο (e^-) κατά τη διαδρομή του μέσα στο νερό αποδίδει προοδευτικά την ενέργειά του μέσω διαφόρων φαινομένων, έως ότου συλληφθεί από κάποιο μόριο νερού, το οποίο μετά τη σύλληψη μετατρέπεται σε αρνητικό ιόν:

$$e^- + H_2O \rightarrow H_2O^-$$

Είτε το θετικό είτε το αρνητικό ιόν του νερού διίσταται για να σχηματιστεί ένα ιόν και μια ελεύθερη ρίζα. Οπότε θα δημιουργηθούν ελεύθερες ρίζες υδρογόνου και ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου:

$$H_2O^+ \rightarrow H^+ + OH^\bullet$$

$$H_2O^- \rightarrow H^\bullet + OH^-$$

(Το σημείο • σημαίνει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο της ελεύθερης ρίζας.)

Οι ελεύθερες ρίζες είναι πολύ δραστικές, αντιδρούν εύκολα με παρακείμενα μόρια, τα οποία μεταβάλλουν επίσης σε ελεύθερες ρίζες και ο χρόνος ζωής τους είναι της τάξης των αρκετών εκατοντάδων μs. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδράσουν μεταξύ τους:

$$H^\bullet + H^\bullet \rightarrow H_2$$

$$OH^\bullet + OH^\bullet \rightarrow H_2O_2$$

$$H^\bullet + OH^\bullet \rightarrow H_2O$$

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδράσουν με μόρια νερού:

$$H_2O + H^\bullet \rightarrow H_2 + OH^\bullet$$

ή μπορεί να αντιδράσουν με τα προϊόντα της αντίδρασης:

$$H_2O_2 + OH^\bullet \rightarrow H_2O + HO_2 \ .$$

Αν συμβολίσουμε ως RH μια οργανική ένωση, τότε μια πιθανή αντίδραση είναι:

$$RH + OH^\bullet \rightarrow R^\bullet + H_2O$$

Η οργανική ελεύθερη ρίζα R• που προκύπτει είναι επίσης πολύ δραστική και μπορεί να αντιδράσει εύκολα με άλλο οργανικό μόριο προκαλώντας αλλοιώσεις στη χημική δομή του μορίου.

Οι πρωτογενείς και οι δευτερογενείς ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδράσουν με βιολογικά σημαντικά μόρια και να προκαλέσουν ακτινοβιολογικές βλάβες (6).

Το μοριακό οξυγόνο παρουσιάζει μεγάλη χημική συγγένεια με τις ελεύθερες ρίζες, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται επιπλέον δραστικά προϊόντα:

$$R^\bullet + O_2 \rightarrow RO_2^\bullet \ ,$$

ώστε τελικά η παρουσία του οξυγόνου στο περιβάλλον των κυττάρων να δρα προς την κατεύθυνση της μονιμοποίησης της βλάβης.

Οι βλάβες των κυττάρων που οφείλονται στη δράση των ελεύθερων ριζών αναφέρονται σαν *έμμεσος δράση* της ακτινοβολίας, ενώ οι βλάβες που οφείλονται στον απευθείας ιοντισμό των ατόμων ονομάζονται *άμεσος δράση*.

Το μεγαλύτερο μέρος των χημικών αντιδράσεων που πραγματοποιούνται στα κύτταρα εξ' αιτίας της ακτινοβολίας, έχουν ασήμαντο αποτέλεσμα σε ότι αφορά στην επιβίωση και τη λειτουργικότητα των κυττάρων. Οι σημαντικές αντιδράσεις είναι

εκείνες που αφορούν το DNA των κυττάρων, λόγω της μοναδικότητας που παρουσιάζουν για τη λειτουργία και την επιβίωση του κυττάρου τα διάφορα τμήματα αυτού του μορίου (2; 7).

1.3.2. Βιολογικό στάδιο αλληλεπίδρασης της ιοντίζουσας ακτινοβολίας με την ύλη

Αμέσως μετά το χημικό στάδιο ακολουθεί το βιολογικό στάδιο αλληλεπίδρασης της ιοντίζουσας ακτινοβολίας με την ύλη. Το στάδιο αυτό αρχίζει με την εμφάνιση ενζυμικών μηχανισμών που δρουν επιδιορθωτικά στους μοριακούς σχηματισμούς που έχουν υποστεί βλάβη κατά το χημικό στάδιο. Η διάρκεια της επιδιόρθωσης διαρκεί κατά το κύριο μέρος της 15min - 1h, ενώ περίπου σε 4h έχει ολοκληρωθεί.

Το μεγαλύτερο μέρος των βλαβών που υφίστανται τα βιολογικά μόρια, όπως το μόριο του DNA, επιδιορθώνονται μέσα στο παραπάνω χρονικό διάστημα. Ορισμένες, όμως, βλάβες δεν επιδιορθώνονται και είναι αυτές που οδηγούν σε θάνατο των κυττάρων (2).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΣΤΟΥΣ ΖΩΝΤΑΝΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η ενέργεια που απορροφάται από τα κύτταρα όταν αυτά εκτίθενται σε ιοντίζουσες ακτινοβολίες προκαλεί αλλοιώσεις στα μόρια που απαρτίζουν τα κύτταρα αυτά.

Τα βιολογικά αποτελέσματα, ανάλογα με τη φύση τους και το χρόνο που θα παρέλθει από την έκθεση σε ακτινοβολία μέχρι την εμφάνισή τους, μπορούν να διακριθούν σε άμεσα (πρώιμα) ή απώτερα (όψιμα), σωματικά ή κληρονομικά, στοχαστικά και μη [2.2.1, 2.2.2] (8; 2).

2.1. Επιπτώσεις της ιοντίζουσας ακτινοβολίας στη ζώσα ύλη με βάση το επίπεδο βιολογικής οργάνωσης

Επιπλέον, μπορούμε να ταξινομήσουμε τις επιπτώσεις της ιοντίζουσας ακτινοβολίας στη ζώσα ύλη με βάση το επίπεδο βιολογικής οργάνωσης [Πίνακας 2-1]

Πίνακας 2-1: *Ταξινόμηση ραδιοβιολογικών βλαβών* (6).

Επίπεδο βιολογικής οργάνωσης	Επιδράσεις
Μοριακό	Βλάβες στα μακρομόρια (ένζυμα, DNA, RNA), στις μεταβολικές διεργασίες
Υποκυτταρικό	Βλάβες στις κυτταρικές μεμβράνες, στον κυτταρικό πυρήνα, στα χρωμοσώματα, στα μιτοχόνδρια, στα λυσοσώματα
Κυτταρικό	Βλάβες στην κυτταρική διαίρεση, κυτταρικός θάνατος, μετάπτωση σε κακοήθεια
Ιστός, όργανο	Βλάβες στο κεντρικό νευρικό σύστημα, στο μυελό των οστών, στο γαστρεντερικό σύστημα, πρόκληση καρκίνου
Οργανισμός	Θάνατος, μείωση χρόνου ζωής
Πληθυσμός	Μεταβολές στα γενετικά χαρακτηριστικά, λόγω γονιδιακών μεταλλάξεων και χρωμοσωματικών αλλοιώσεων.

2.1.1. Μοριακό και υποκυτταρικό επίπεδο

Η επίδραση της ακτινοβολίας στα μόρια γίνεται μέσω ιοντισμών, διεγέρσεων και χημικών μεταβολών [1.3.1]. Η επίδραση μπορεί να είναι είτε άμεση, μέσω ιοντισμών, είτε έμμεση, μέσω ελευθέρων ριζών. Οι βλάβες σε σημαντικά βιολογικά μόρια που οφείλονται σε χημικές διαφοροποιήσεις μπορεί να συμβούν μέσα σε χρόνους της τάξης των 10^{-6}sec, ενώ η εμφάνιση της βιολογικής βλάβης μπορεί να γίνει μετά από ώρες, μέρες, μήνες, χρόνια ή και δεκαετίες (6).

Το σημαντικότερο μόριο που μπορεί να αλλοιωθεί μέσα στο κύτταρο είναι το μόριο του DNA. Είναι το μόριο στο οποίο η πρόκληση αλλοιώσεων έχει τόσο σημαντική συνέπεια για την όλη δομή και λειτουργία του κυττάρου, ώστε η σημασία των αλλοιώσεων που προκαλούνται στα άλλα μόρια να ελαχιστοποιείται. Τα αμέσως μετά το DNA αξιόλογα μόρια, σε ό,τι αφορά τις συνέπειες έκθεσης σε ακτινοβολία, είναι οι εξειδικευμένες πρωτεΐνες, όπως τα ένζυμα ή οι πρωτεΐνες των μεμβρανών του κυττάρου (9). Η ακτινοβολία επιδρά επίσης στα λίπη, τους υδατάνθρακες, την κυτταρική μεμβράνη, το ενδοπλασματικό δίκτυο, τα λυσοσώματα και τα μιτοχόνδρια (6).

Το πιο ευαίσθητο τμήμα του DNA φαίνεται να είναι οι αζωτούχες βάσεις της πυριμιδίνης. Αυτές αντιδρούν εύκολα με τις ελεύθερες ρίζες του υδροξυλίου με αποτέλεσμα τη μετατροπή τους σε οργανικές ελεύθερες ρίζες και τελικά την πλήρη καταστροφή τους. Τέτοιες και άλλες παρόμοιες χημικές αντιδράσεις οδηγούν σε:

- ✓ καταστροφή των βάσεων,
- ✓ απελευθέρωση βάσεων,
- ✓ θραύση υδρογονικών δεσμών,
- ✓ διασταυρούμενες συνενώσεις στην ίδια έλικα πρωτεϊνικών και άλλων μορίων DNA,
- ✓ θραύση δεσμών μεταξύ των πολυνουκλεοτιδίων και της έλικας (6; 9).

Υπάρχουν δύο κατηγορίες θραύσεως της έλικας του DNA: η θραύση σε μια από τις δύο έλικες (Single Strand Break, SSB) και η θραύση και στις δύο έλικες (Double Strand Break, DSB) (2).

Μερικές από τις παραπάνω μεταβολές είναι αναστρέψιμες και μπορούν να διορθωθούν από το ίδιο το μόριο σαν αποτέλεσμα της αυστηρά ελικοειδούς διάταξης. Εάν συμβεί διαχωρισμός ή διασταυρούμενες συνδέσεις με άλλα νουκλεϊκά οξέα ή πρωτεΐνες, τότε η βλάβη είναι μη αναστρέψιμη, οπότε το μακρομόριο -και πιθανόν και το κύτταρο- πεθαίνει (6).

2.1.2. Κυτταρικό επίπεδο

Η επίδραση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας σε κυτταρικό επίπεδο σχετίζεται με τον τρόπο που αυτή επηρεάζει τον κυτταρικό κύκλο [3.1] και συγκεκριμένα τη μίτωση [3.1.2]. Οι ακτινοπροκλητές αλλαγές στη μίτωση διακρίνονται στις εξής περιπτώσεις:

➢ Καθυστέρηση στη γένεση της μίτωσης, που συνοδεύεται από φυσιολογική μίτωση. Η καθυστέρηση σημαίνει ότι έχει δημιουργηθεί κυτταρική βλάβη η οποία και αποκαταστάθηκε. Αυτό μπορεί να συμβεί εάν δοθεί μικρή δόση στη φάση της πρόφασης (πριν την έναρξη της μίτωσης). Η καθυστέρηση μπορεί να οφείλεται σε αναστολή της σύνθεσης DNA.

➢ Πλήρης αναστολή της μίτωσης, έτσι ώστε το κύτταρο να συνεχίζει να υπάρχει και να λειτουργεί μερικώς, χωρίς όμως να έχει τη δυνατότητα να διαιρεθεί. Τα «στείρα» αυτά κύτταρα ίσως αντιπροσωπεύουν τη λεγόμενη «στείρα υπολειπόμενη κακοήθη νόσο», που μπορεί να παρατηρηθεί κατά την ακτινοθεραπεία [4.1].

Έτσι, σε κυτταρικό επίπεδο, η ακτινοβολία μπορεί να προκαλέσει:

- θάνατο του κυττάρου,
- καταστολή της αύξησης (η ακτινοβολία διακόπτει τη μίτωση, οπότε διακόπτεται η αύξηση και μειώνεται ο αριθμός των κυττάρων),
- χρωμοσωματικές βλάβες [2.3.2],
- περιορισμό της κινητικότητας,
- αδενικές εκκρίσεις (6).

2.1.3. Επίπεδο ιστών και οργάνων

Η απόκριση κάθε οργάνου υπό την επίδραση ιοντίζουσας ακτινοβολίας ποικίλλει, παρά το γεγονός ότι οι επιδράσεις της ακτινοβολίας στους ιστούς είναι όμοιες (6).

Εξ’ αιτίας όλων των προαναφερθέντων επιπτώσεων της ακτινοβολίας, παρατηρούνται ακτινοπροκλητές επιδράσεις στους ζωντανούς οργανισμούς και κατ’ επέκταση στους πληθυσμούς.

Οι συνέπειες της έκθεσης των ανθρώπων σε ιοντίζουσα ακτινοβολία διακρίνονται σε στοχαστικές και μη στοχαστικές [2.2]. Οι όροι στοχαστικά και μη στοχαστικά φαινόμενα ενέχουν την έννοια της πιθανότητας. Τα στοχαστικά φαινόμενα είναι βέβαιο ότι θα συμβούν, αλλά θα εκδηλωθούν με κυμαινόμενη ένταση φαινομένων. Τα μη στοχαστικά φαινόμενα είναι πιθανολογικά και η εκδήλωση ή μη εκδήλωσή τους είναι «θέμα τύχης» (6).

2.2. Συνέπειες στην υγεία

2.2.1. Μη στοχαστικές συνέπειες στην υγεία

Η εμφάνιση των μη στοχαστικών συνεπειών είναι βέβαιη από κάποια δόση και πάνω και το μέγεθός τους συνδέεται άμεσα με την απορροφηθείσα δόση. Οι βλάβες οφείλονται σε εκτεταμένες καταστροφές βιολογικών δομικών κυττάρων ή λειτουργικών χημικών κυττάρων. Στις μη στοχαστικές συνέπειες κατατάσσονται σύνδρομα, όπως το υπεροξύ ακτινικό σύνδρομο, το αιμοποιητικό σύνδρομο, το γαστρεντερικό σύνδρομο και αυτό του κεντρικό νευρικού συστήματος. Επίσης, στις μη στοχαστικές συνέπειες μπορούν να συμπεριληφθούν και άλλες μικρότερης σημασίας, όπως η ακτινική πνευμονίτις και η δημιουργία καταρράκτη του φακού (6).

2.2.2. Στοχαστικές συνέπειες στην υγεία

Στην περίπτωση των στοχαστικών συνεπειών, η πιθανότητα εκδήλωσής τους σχετίζεται με τη δόση της ακτινοβολίας και όχι με το μέγεθος της συνέπειας. Οι βλάβες οφείλονται σε αλλοιώσεις του γενετικού κώδικα, δηλαδή σε μικροαλλοιώσεις των γονιδίων του DNA. Οι στοχαστικές συνέπειες δε συνδέονται με την ύπαρξη κατώτερης οριακής δόσης ακτινοβολίας, επομένως δεν υπάρχει κατώφλι δόσης. Η έλλειψη, όμως, κατώτερου ορίου δόσης ασφαλείας δε σημαίνει ότι οι στοχαστικές συνέπειες είναι ανεξάρτητες του μεγέθους της έκθεσης στην ακτινοβολία (6).

Οι στοχαστικές συνέπειες διακρίνονται σε:

- Χρόνια ή απώτερα σωματικά αποτελέσματα, όπως η μείωση του μέσου χρόνου ζωής, το πρόωρο γήρας και η ανάπτυξη καρκίνου.
- Κληρονομικές ανωμαλίες, δηλαδή αλλοιώσεις των χαρακτηριστικών που κληροδοτούνται από τους γονείς στους απογόνους. Οι κληρονομικές ανωμαλίες που προκαλούνται από ακτινοβολίες συνδέονται με την πρόκληση αλλοιώσεων στο DNA, αλλά και στα χρωμοσώματα. Έχει επικρατήσει η διάκριση των κληρονομικών ανωμαλιών σε μεταλλάξεις [2.3.1] και χρωμοσωματικές αλλοιώσεις [2.3.2] (9).

2.3. Αλλοιώσεις του DNA

2.3.1. Μεταλλάξεις

Μετάλλαξη ονομάζεται η αλλοίωση του γενετικού υλικού που περιέχεται στο DNA του πυρήνα ενός κυττάρου. Οι μεταλλάξεις που προκαλούνται από την ακτινοβολία οφείλονται σε μη θανατηφόρες για το κύτταρο μεταβολές της σειράς των

βάσεων στο DNA. Χαρακτηρίζονται από τοπικές βλάβες στο DNA (σημειακές μεταλλάξεις) και δεν συνοδεύονται από ορατές αλλοιώσεις στη δομή των χρωμοσωμάτων (6; 2; 10).

Οι μεταλλάξεις μπορεί να έχουν ποιοτικό χαρακτήρα (όταν προκαλείται εισαγωγή, εξαφάνιση ή μεταβολή των βάσεων) και ποσοτικό χαρακτήρα (όταν αυξάνεται ο αριθμός των γονιδίων). Αποτέλεσμα των μεταλλάξεων είναι είτε η εμφάνιση πρωτεϊνών που έχουν υποστεί μεταβολές είτε η αύξηση ή ελάττωση φυσιολογικών πρωτεϊνών (2).

Μια μετάλλαξη λαμβάνει χώρα με έναν από τους παρακάτω τρόπους:

- ✓ Ακρωτηριασμός (απώλεια ενός ή περισσοτέρων ζευγών βάσεων από τη διπλή έλικα του DNA)
- ✓ Αντιμετάθεση (αντικατάσταση ενός ζεύγους βάσεων από τις ίδιες βάσεις σε αντίστροφη θέση)
- ✓ Μετατόπιση (αντικατάσταση ενός ζεύγους βάσεων από ένα άλλο)
- ✓ Εισδοχή (είσοδος ενός επιπλέον ζεύγους βάσεων στο μόριο του DNA) (10).

2.3.2. Χρωμοσωματικές αλλοιώσεις

Οι χρωμοσωματικές αλλοιώσεις προκύπτουν από μη επιδιορθούμενες βλάβες των χρωμοσωμάτων και είναι συνήθως ορατές με το μικροσκόπιο. Αποτέλεσμα της βλάβης είναι τμήματα των χρωμοσωμάτων να χάνονται κατά τη διάρκεια της διαίρεσης του κυττάρου ή να προσκολλώνται σε άλλη θέση του χρωμοσώματος ή σε άλλα χρωμοσώματα (6).

Τα χρωμοσώματα, μετά την ακτινοβόληση, παρουσιάζουν μεταβολές στη φυσικοχημική κατάστασή τους, που καταλήγουν σε μια αυξημένη προσκόλληση των χρωματίδων στο στάδιο της ανάφασης, που εμποδίζει τον πλήρη αποχωρισμό τους. Έτσι, δημιουργούνται γέφυρες ανάμεσά τους. Τα κυριότερα, όμως, αποτελέσματα της ακτινοβολίας στα χρωμοσώματα είναι οι διασπάσεις τους, αποτέλεσμα των οποίων είναι μια μεγάλη ποικιλία μορφολογικών αλλοιώσεων. Διασπάσεις μπορούν να συμβούν σε ένα ή περισσότερα χρωμοσώματα του ίδιου κυττάρου, γεγονός που εξαρτάται από τη δόση της ακτινοβολίας.

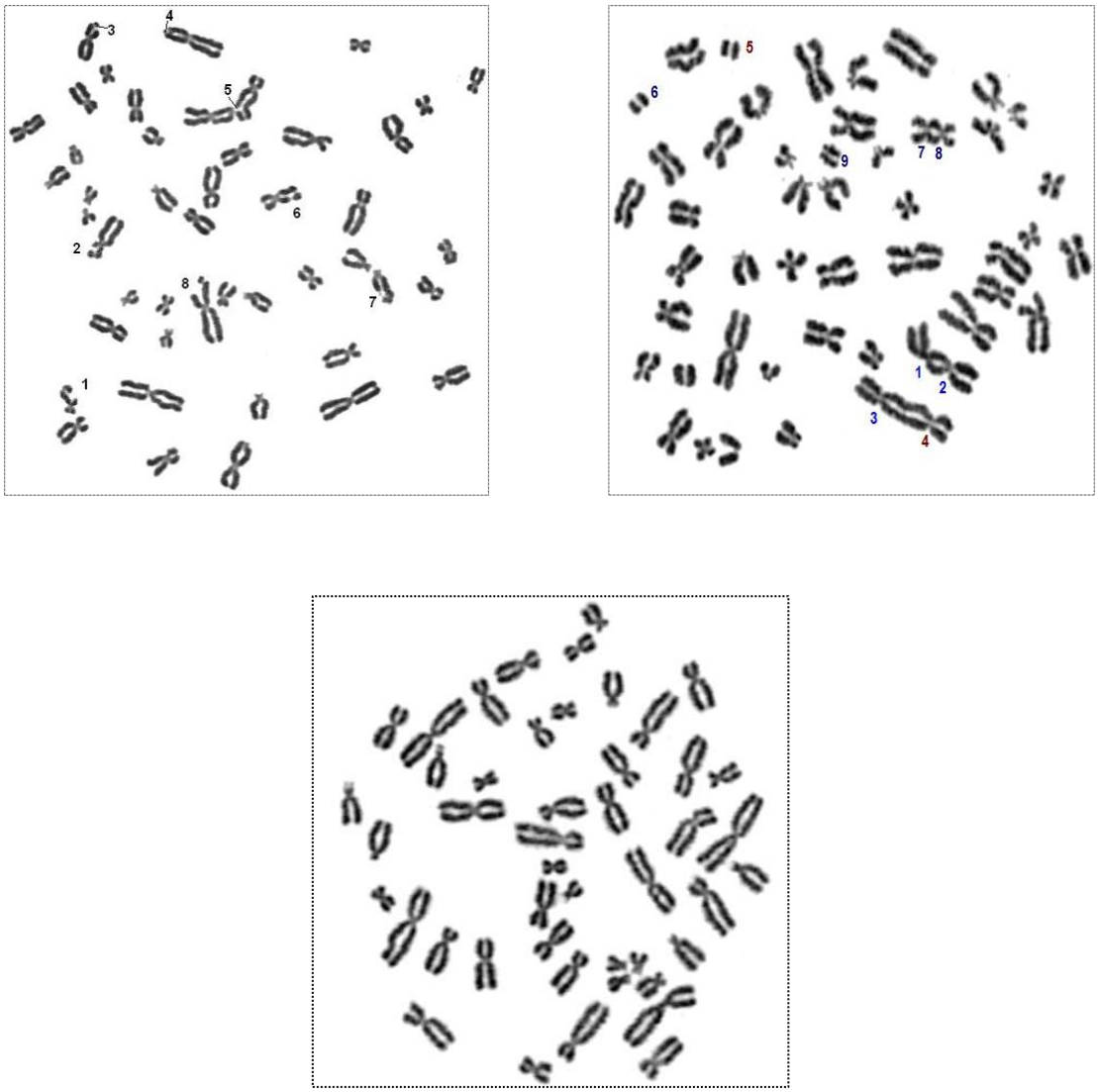
Σε πολλές περιπτώσεις, τα δύο άκρα του διασπασμένου χρωμοσώματος παραμένουν το ένα δίπλα στο άλλο και επανασυγκολλώνται αυτόματα. Εάν τα δύο άκρα του διασπασμένου χρωμοσώματος δεν επανασυγκολληθούν, μπορούν να προκύψουν ποικίλες μορφολογικές αλλοιώσεις που βασίζονται στους εξής δύο βασικούς μηχανισμούς:

- Το κεντρικό τεμαχίδιο του χρωμοσώματος, δηλαδή εκείνο που περιέχει το κεντρομερίδιο, επιζεί, και κατά την αναπαραγωγή του κυττάρου μεταδίδεται στα θυγατρικά κύτταρα. Το χρωμόσωμα αυτό φέρει μια έλλειψη γενετικού υλικού, μικροσκοπικά ορατή, που χαρακτηρίζεται ως διαγραφή (ή έλλειψη) (deletion). Το περιφερικό τεμαχίδιο του διασπασμένου χρωμοσώματος δε μπορεί κατά τη μίτωση να διαχωριστεί σε δύο τμήματα. Για το λόγο αυτό, είτε θα χαθεί κατά τη διάρκεια της μίτωσης, είτε θα μεταβιβαστεί μόνο στο ένα από τα δύο θυγατρικά κύτταρα. Τελικά, με τη συνέχιση των μιτώσεων είναι πολύ πιθανό να εξαφανιστεί.
- Τα τεμαχίδια στα οποία διασπάστηκε το χρωμόσωμα μπορούν να συνενωθούν μεταξύ τους ή με άλλα χρωμοσώματα, κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να δημιουργηθούν ανώμαλες μορφές χρωμοσωμάτων. Απαραίτητη προϋπόθεση σχηματισμού ανώμαλων χρωμοσωμάτων είναι η διάσπασή τους. Η διάσπαση των χρωμοσωμάτων έχει τυχαία κατανομή ως προς τη θέση στην οποία θα λάβει χώρα (1).

Οι αλλοιώσεις που παρατηρούνται στην μίτωση μπορούν να ταξινομηθούν σε χρωμοσωματικές ή χρωματιδικές. Η παρουσία τους φανερώνει τη φάση του κυτταρικού κύκλου [3.1] στην οποία βρίσκονταν τα κύτταρα την ώρα της ακτινοβόλησης (2; 1; 11).

Χρωμοσωματικές αλλοιώσεις παρατηρούνται, όταν η ακτινοβόληση του DNA πραγματοποιείται σε στάδια κατά τα οποία δεν έχει διπλασιαστεί το DNA, όπως η φάση G_1 [3.1.1]. Τέτοιου τύπου αλλοιώσεις είναι οι ελλείψεις (deletions, del), τα δικεντρικά χρωμοσώματα (dicentrics, dic), οι αντιμεταθέσεις (translocations, tr), οι δακτύλιοι (rings, r), οι αναστροφές (invertions, inv), και άλλες.

Χρωματιδικές αλλοιώσεις παρατηρούνται, όταν η ακτινοβόληση του DNA πραγματοποιείται μετά το διπλασιασμό του DNA, δηλαδή μετά τη φάση της σύνθεσης (S) [3.1.1]. Τέτοιου τύπου αλλοιώσεις είναι οι ασυνέχειες (gaps) και οι θραύσεις (breaks) (1; 12; 13).



Εικόνα 2-1: *Αλλοιώσεις. Στην κάτω εικόνα φαίνονται τα υγιή κύτταρα έλεγχου (control), στις άνω φαίνονται χρωματιδικές (αριστερά) και χρωμοσωματικές (δεξιά) αλλοιώσεις*

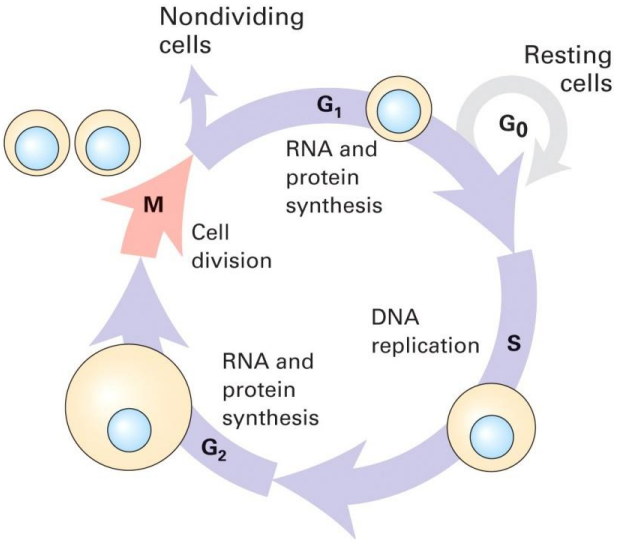
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΥΤΟΥ

3.1. Κυτταρικός κύκλος

Ένα κύτταρο αναπαράγεται διεκπεραιώνοντας μια ιεραρχική ακολουθία γεγονότων κατά τη διάρκεια των οποίων διπλασιάζει το περιεχόμενό του και στη συνέχεια διαιρείται στα δύο. Αυτός ο κύκλος διπλασιασμού και διαίρεσης, γνωστός ως κυτταρικός κύκλος είναι ο βασικός μηχανισμός με τον οποίο αναπαράγονται όλα τα έμβια όντα.

Ο κυτταρικός κύκλος των ευκαρυωτικών κυττάρων διαιρείται σε τέσσερις διαδοχικές φάσεις: τη φάση M, τη φάση G_1, τη φάση S και τη φάση G_2. Οι τρεις τελευταίες αποτελούν τη μεσόφαση. Η διάρκεια του κυτταρικού κύκλου ποικίλλει πολύ ανάλογα με το είδος του κυττάρου.



Εικόνα 3-1: *Κυτταρικός κύκλος ευκαρυωτικών κυττάρων*

3.1.1. Μεσόφαση

Κατά τη διάρκεια της μεσόφασης το κύτταρο αυξάνει σε μέγεθος και το DNA των χρωμοσωμάτων αντιγράφεται.

Συγκεκριμένα, το κύτταρο αντιγράφει το DNA του πυρήνα του κατά τη διάρκεια της φάσης S, ενώ κατά τη διάρκεια των φάσεων G_1 και G_2, που πλαισιώνουν την S, προσφέρεται επιπρόσθετος χρόνος στο κύτταρο προκειμένου αυτό να αυξηθεί σε μάζα και να διπλασιάσει τα κυτταροπλασματικά οργανίδιά του.

Επιπλέον, κατά τη διάρκεια των φάσεων G_1 και G_2 υπάρχουν συγκεκριμένα χρονικά σημεία όπου το κύτταρο αποφασίζει αν θα προχωρήσει στην επόμενη φάση της κυτταρικής διαίρεσης ή αν θα σταματήσει.

Πρόκειται για *σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (checkpoints)*, στα οποία το σύστημα ελέγχου της κυτταρικής διαίρεσης δεν πυροδοτεί το επόμενο βήμα του κύκλου αν προηγουμένως δεν ολοκληρωθεί το αμέσως προηγούμενο. Έτσι,

✓ στη φάση G_1, ένα σημείο ελέγχου του μεγέθους επιτρέπει στο σύστημα να σταματήσει και, αν χρειάζεται, δίνει στο κύτταρο τη δυνατότητα να αυξηθεί περισσότερο προτού πυροδοτηθεί ένας νέος γύρος αντιγραφής του DNA. Η αύξηση του κυττάρου εξαρτάται από τον επαρκή εφοδιασμό του σε θρεπτικές ουσίες και από άλλους παράγοντες από το εξωκυττάριο περιβάλλον. Το σημείο ελέγχου της φάσης G_1 επιτρέπει επίσης στο κύτταρο να εξακριβώσει αν το περιβάλλον ευνοεί τον πολλαπλασιασμό προτού δεσμευθεί στη φάση S.

✓ στη φάση G_2, ένα δεύτερο σημείο ελέγχου του μεγέθους επιτρέπει στο σύστημα να σταματά προτού πυροδοτήσει τη μίτωση. Επιπλέον, επιτρέπει στο κύτταρο να ελέγξει αν έχει ολοκληρωθεί η αντιγραφή του DNA προτού προχωρήσει στη μίτωση.

Τα σημεία ελέγχου έχουν σημασία και για έναν ακόμη λόγο: αποτελούν σημεία του κυτταρικού κύκλου στα οποία το σύστημα ελέγχου μπορεί να ρυθμιστεί από σήματα που προέρχονται από άλλα κύτταρα, όπως οι αυξητικοί παράγοντες [5.1] και άλλα εξωκυττάρια σηματοδοτικά μόρια ικανά να προαγάγουν ή να αναστείλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Η πιο δραστική απόφαση, την οποία πρέπει να επιβάλλει το σύστημα ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, είναι να αναγκάσει το κύτταρο να σταματήσει εντελώς να διαιρείται. Αυτό διαφέρει από το σταμάτημα στο μέσο ενός κύκλου (όταν το κύτταρο πρέπει να αντιμετωπίσει μια παροδική καθυστέρηση) και έχει ιδιαίτερη σημασία στους πολυκύτταρους οργανισμούς. Στην περίπτωση αυτή, ο κυτταρικός κύκλος σταματά σε ένα σημείο ελέγχου στη G_1 και περνά σε μια κατάσταση γνωστή ως $\mathbf{G_0}$. Τα κύτταρα μπορούν να παραμείνουν στην κατάσταση G_0 για μέρες, εβδομάδες ή και χρόνια πριν διαιρεθούν ξανά. Οι διαφορές ως προς την ταχύτητα διαίρεσης των κυττάρων του σώματός μας εξαρτώνται, σε μεγάλο βαθμό, από το διαφορετικό χρόνο παραμονής τους σε φάση G_0 ή G_1. Μόλις περάσει το σημείο ελέγχου της G_1, το κύτταρο συνήθως ολοκληρώνει τον υπόλοιπο κυτταρικό κύκλο αρκετά γρήγορα.

Τα δύο αντίγραφα κάθε χρωμοσώματος που δημιουργούνται παραμένουν ισχυρά συνδεδεμένα το ένα με το άλλο κατά τη φάση S, ενώ στη φάση G_2 συμπυκνώνονται σταδιακά. Τότε, στο φωτονικό μικροσκόπιο είναι ορατά σαν μακριές κλωστές, οι οποίες σταδιακά γίνονται βραχύτερες και παχύτερες. Αυτή η

συμπύκνωση αποτρέπει το μπέρδεμα των χρωμοσωμάτων και επομένως διευκολύνει το διαχωρισμό τους κατά τη φάση Μ που θα ακολουθήσει.

Τελικά, λοιπόν, η μεσόφαση αποτελείται από τις διαδοχικές φάσεις:

- **G_1**: είναι η φάση μεταξύ μίτωσης και φάσης S. Στη φάση αυτή γίνεται η συγκέντρωση των βασικών συστατικών του κυττάρου για να αρχίσει η σύνθεση του DNA. (Η διάρκειά της είναι μεταβλητή.)
- **S** : ακολουθεί τη φάση G_1. Το DNA ανά κύτταρο διπλασιάζεται για να ακολουθήσει η μίτωση. (Η διάρκειά της είναι 6-12 ώρες.)
- **G_2**: είναι μια μικρή φάση ηρεμίας. Στη φάση αυτή, πραγματοποιείται η προετοιμασία του κυττάρου για τη φάση της μίτωσης, γίνεται η διάταξη του κληρονομικού υλικού, εξαφανίζεται η πυρηνική μεμβράνη και αρχίζει να συναρμολογείται η λεγόμενη 'μιτωτική άτρακτος'. (Η διάρκειά της είναι 2-6 ώρες.) (14; 10)

3.1.2. Φάση Μ

Η φάση Μ του κυτταρικού κύκλου, που ακολουθεί μετά τη φάση G_2, ξεκινά με τη διαίρεση του πυρήνα του κυττάρου, που ονομάζεται μίτωση, και συνεχίζεται με τη διαίρεση ολόκληρου του κυττάρου (του κυτταροπλάσματός του), που ονομάζεται κυτταροκίνηση.

Η **μίτωση** περιλαμβάνει το διαχωρισμό των ήδη διπλασιασμένων χρωμοσωμάτων και την κατανομή ενός αντιγράφου κάθε χρωμοσώματος σε κάθε θυγατρικό κύτταρο. Η διαδικασία αυτή διεκπεραιώνεται με τη βοήθεια της δομής της μιτωτικής ατράκτου, η οποία βασίζεται σε μικροσωληνίσκους. Στη φάση της μίτωσης διακρίνουμε τα εξής επιμέρους στάδια:

- Πρόφαση, κατά την οποία κάθε διπλασιασμένο χρωμόσωμα (που αποτελείται από δύο αδελφές χρωματίδες) συμπυκνώνεται.
- Προμετάφαση, κατά την οποία το πυρηνικό περίβλημα αποδομείται, οπότε οι μικροσωληνίσκοι της ατράκτου μπορούν πλέον να έρθουν σε επαφή με τα χρωμοσώματα, να προσδεθούν σε αυτά (στους κινητοχώρους τους) και να τα μετακινήσουν.
- Μετάφαση, κατά την οποία τα χρωμοσώματα παρατάσσονται στον ισημερινό της ατράκτου, στο μέσον της απόστασης ανάμεσα στους πόλους της.
- Ανάφαση, κατά την οποία οι ζευγαρωμένες χρωματίδες διαχωρίζονται συγχρονισμένα ελκυόμενες από την άτρακτο στους δύο αντίθετους πόλους του κυττάρου, έτσι ώστε να σχηματιστούν δύο θυγατρικά χρωμοσώματα.

➢ Τελόφαση, κατά την οποία οι δύο ομάδες θυγατρικών χρωμοσωμάτων φτάνουν στους πόλους της ατράκτου και ανασυναρμολογείται γύρω από καθεμιά από αυτές ένα νέο πυρηνικό περίβλημα, ώστε να σχηματιστούν δύο πυρήνες.

Η **κυτταροκίνηση**, δηλαδή η ολοκλήρωση της διαίρεσης του κυττάρου σε δύο νέα κύτταρα, βασίζεται σε μια δομή που λέγεται συσταλτικός δακτύλιος. Η δομή αυτή αποτελείται κυρίως από νημάτια ακτίνης και μυοσίνης, συναρμολογείται προς το τέλος της μίτωσης γύρω από τον ισημερινό του κυττάρου (αμέσως κάτω από την κυτταρική μεμβράνη) και καθώς συστέλλεται, περισφίγγει το κύτταρο, έλκει τη μεμβράνη προς τα μέσα και τελικά διαιρεί το κύτταρο σε δύο θυγατρικά κύτταρα, καθένα από τα οποία έχει το δικό του πυρήνα (14).

3.2. Σύστημα ελέγχου του κυτταρικού κύκλου

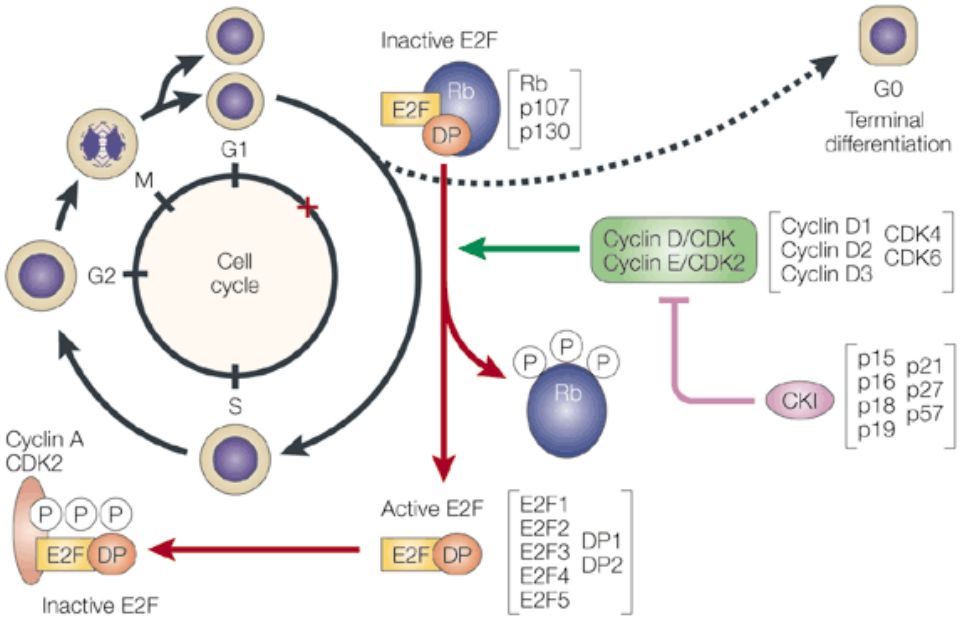
Η μετάβαση του κυττάρου από τη μια φάση στην επόμενη ελέγχεται αυστηρά και από πολλούς διαφορετικούς ρυθμιστές. Το σύστημα ελέγχου του κυτταρικού κύκλου βασίζεται σε πρωτεΐνες, όπως: οι κυκλίνες, οι κινάσες (πρωτεϊνικές κινάσες εξαρτώμενες από κυκλίνες, CDKs) και οι αναστολείς των κινασών (CKIs).

Οι κυκλίνες είναι πρωτεΐνες που εμφανίζουν κυκλικές μεταβολές της συγκέντρωσής τους κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Η αύξηση της συγκέντρωσης προκύπτει από σταδιακή σύνθεσή τους, ενώ, η αντίστοιχη μείωση, από ταχεία πρωτεόλυση. Τα μέλη της οικογένειας των κυκλινών γίνονται ενεργά σε διαφορετικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Ο ρόλος τους είναι να μετατρέπουν τις CDKs σε ενεργή διαμόρφωση.

Οι κινάσες που εξαρτώνται από κυκλίνες (CDKs) είναι πρωτεΐνες με δράση πρωτεϊνικής κινάσης και για την ενεργοποίησή τους απαιτείται η σύνδεσή τους με την αντίστοιχη κυκλίνη. Οι ενεργές κυκλινο-εξαρτώμενες πρωτεϊνικές κινάσες είναι συνεπώς ετεροδιμερή, όπου η κινάση διαθέτει την περιοχή με την καταλυτική δράση, ενώ η κυκλίνη είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση του μορίου και για την εξειδικευμένη δράση του.

Οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι βασικοί ρυθμιστές της βιολογίας του κυττάρου. Εμπλέκονται στη ρύθμιση της απόπτωσης, στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, στη διαφοροποίηση, στην ανάπτυξη, στην ανοσολογική απόκριση, στη λειτουργία του νευρικού συστήματος και στη μετάφραση. Τα ένζυμα αυτά ταξινομούνται ως κινάσες σερίνης/θρεονίνης και κινάσες τυροσίνης.

Οι CDKs μπορεί να εμφανίζονται τόσο σε ενεργή όσο και σε ανενεργή μορφή. Η μετάβαση ανάμεσα στις δύο μορφές ρυθμίζεται με διάφορους τρόπους. Η εξειδικευμένη φωσφορυλίωση και η αποφωσφορυλίωση είναι καθοριστικές στον έλεγχο της δραστικότητας των CDKs. Οι CDKs έχουν ειδικές θέσεις φωσφορυλίωσης για πρωτεϊνικές κινάσες, οι οποίες μπορεί να έχουν ενεργοποιητικό ή ανασταλτικό αποτέλεσμα. Με εξαίρεση τις CDK4 και CDK6, οι CDKs βρίσκονται ανενεργές σε μια σταθερή συγκέντρωση και συνήθως σε πολύ μεγαλύτερη ποσότητα από τις αντίστοιχες κυκλίνες τους. Συνεπώς, η ποσότητα των CDKs που θα ενεργοποιηθούν περιορίζεται από τη συγκέντρωση των κυκλινών. Για το λόγο αυτό, οι αλλαγές στη συγκέντρωση των κυκλινών είναι ένας ρυθμιστικός παράγοντας του κυτταρικού κύκλου. Πολλές πρωτεϊνικές κινάσες εμπλέκονται σε μηχανισμούς που οδηγούν σε κακοήθειες.



Εικόνα 3-2: *Κυτταρικός κύκλος και ρύθμιση αυτού*

Οι αναστολείς των κινασών που εξαρτώνται από τις κυκλίνες (CKIs) (cyclin-dependent kinase inhibitors) είναι μια οικογένεια πρωτεϊνών, που συνδέονται στις CDK ή στο σύμπλεγμα κυκλίνη-CDK με αναστρέψιμο τρόπο και αναστέλλουν τη δραστικότητα των CDK. Οι CKIs είναι σημαντικά σημεία εισόδου για σήματα που έχουν ως αποτέλεσμα το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου. Το ανασταλτικό αποτέλεσμα των CKIs εξαρτάται από την αναλογία της συγκέντρωσης CKIs/κυκλίνη, γι' αυτό η ρύθμιση των αναστολέων είναι πολύ μεγάλης σημασίας.

Στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου εμπλέκονται πολλά είδη κυκλινών και κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών. Διαφορετικά σύμπλοκα κυκλίνης-CDK πυροδοτούν διαφορετικά βήματα του κυτταρικού κύκλου.

Η σωστή πορεία του κυτταρικού κύκλου εξασφαλίζεται μέσω δύο διαδικασιών:

- των ρυθμιζόμενων αλλαγών στη δραστικότητα των CDKs και
- της πρωτεόλυσης που εξαρτάται από την ουβικουϊτίνη.

Και οι δυο διαδικασίες είναι συνδεδεμένες μεταξύ τους και βρίσκονται σε αμοιβαία αλληλεξάρτηση. Η επιλογή μιας πρωτεΐνης για ουβικουϊτινο-εξαρτώμενη πρωτεόλυση γίνεται μέσω των ενζύμων Ε3 του μονοπατιού της ουβικουϊτίνης, τα οποία καταλύουν τη σύνδεση της ουβικουϊτίνης με την πρωτεΐνη-στόχο. Η εξειδίκευση της σύνδεσης ουβικουϊτίνης-πρωτεΐνης καθορίζεται από τη φύση των ενζύμων Ε3, τα οποία αποτελούνται από αρκετές υπομονάδες. Η σύνθεση αυτού του συμπλόκου ποικίλει και μπορεί να μεταβληθεί ανάλογα με τις απαιτήσεις (14; 15; 16).

3.3. Κυτταρικός θάνατος και απόπτωση

Το κύτταρο, σε κάποιες περιπτώσεις, πεθαίνει φυσιολογικά. Ο θάνατος αυτός του κυττάρου επέρχεται με βάση έναν από τους παρακάτω μηχανισμούς:

- Μηχανισμός νέκρωσης:

Λόγω κυτταρικής βλάβης, το κύτταρο νεκρώνεται, δηλαδή διογκώνεται, στη συνέχεια λύεται και τελικά τα συστατικά του διασπείρονται στο χώρο προκαλώντας φλεγμονώδη αντίδραση.

- Μηχανισμός απόπτωσης ή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου:

Όταν ένα φυσιολογικό κύτταρο υποστεί μη αναστρέψιμη βλάβη του DNA, (λόγω π.χ. της επίδρασης ακτινοβολίας) ενεργοποιείται η διαδικασία της απόπτωσης προκειμένου να διακοπεί ο πολλαπλασιασμός του και η αντιγραφή ενός προβληματικού DNA, καθώς αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει σε μεταλλάξεις. Πρόκειται για μια μορφή κυτταρικού θανάτου στην οποία οδηγείται το κύτταρο μέσα από την έκφραση συγκεκριμένου γονιδιακού προγράμματος, το οποίο ενεργοποιείται με συγκεκριμένα σήματα κυτταρικού θανάτου που λαμβάνει το κύτταρο από το εξωτερικό ή το εσωτερικό περιβάλλον του (14; 17).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΑΚΤΙΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ – ΑΚΤΙΝΟΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ

4.1. Ακτινοθεραπεία

Η θεραπεία του καρκίνου στοχεύει στη θανάτωση ή την απομάκρυνση των καρκινικών κυττάρων και στην παύση του περαιτέρω πολλαπλασιασμού τους. Οι κύριοι τρόποι για την πραγματοποίηση του στόχου αυτού είναι: η Χειρουργική (με την εξαγωγή καρκινικών τμημάτων), η Χημειοθεραπεία (για τη θανάτωση και αδρανοποίηση των καρκινικών κυττάρων με χρήση φαρμάκων), η Ανοσοθεραπεία (με την ενίσχυση των αμυντικών μηχανισμών του οργανισμού), η Ραδιοθεραπεία (με εσωτερική χορήγηση φαρμάκων), η Ορμονοθεραπεία και η Ακτινοθεραπεία (1; 2).

Ακτινοθεραπεία είναι η επιστήμη αντικείμενο της οποίας είναι η θεραπεία διαφόρων νόσων με τη χρήση ιοντιζουσών ακτινοβολιών. Η ακτινοθεραπεία είναι, μετά τις χειρουργικές επεμβάσεις, η περισσότερο χρησιμοποιούμενη μέθοδος αντιμετώπισης του καρκίνου και παρουσιάζει τη μεγαλύτερη επιτυχία. Εφαρμόζεται σε περισσότερο από το 50% των πασχόντων από καρκίνο σήμερα, καθώς και σε πολλές περιπτώσεις καλοηθών όγκων.

Η ακτινοθεραπεία αποσκοπεί στην εναπόθεση, με τη χρήση δέσμης ακτινοβολίας υψηλής ενέργειας, της μέγιστης δυνατής δόσης στον όγκο-στόχο, ώστε να υπάρξει αναστολή της ανάπτυξης του όγκου και της περαιτέρω διαίρεσης των κυττάρων και εν τέλει πλήρης καταστροφή τους. Από την άλλη μεριά, οι ακτινοβολούμενοι όγκοι γειτνιάζουν συνήθως με υγιείς ιστούς, οι οποίοι πρέπει να προστατευτούν. Όλα αυτά δημιουργούν μια σύνθετη κατάσταση, όπου αφ' ενός απαιτείται μεγιστοποίηση της εναποτιθέμενης δόσης σε μια περιοχή-στόχο στο σώμα του ασθενούς με σκοπό τον τοπικό έλεγχο της νόσου, αφ' ετέρου δε ελαχιστοποίηση της δόσης σε γειτονικές δομές, έτσι ώστε η πιθανότητα κλινικά σημαντικής βλάβης λόγω θανάτωσης υγιών κυττάρων σε αυτές να διατηρηθεί σε αποδεκτό επίπεδο (8).

Η ακτινοθεραπευτική αγωγή διακρίνεται σε:

- *ριζική*, όταν στόχος της είναι να επιτύχει την ίαση του ασθενούς νεκρώνοντας όλα τα καρκινικά κύτταρα του συγκεκριμένου όγκου στη συγκεκριμένη περιοχή ή να καταστήσει τα κύτταρα ανήμπορα να επανακτήσουν την ικανότητα περαιτέρω κυτταρικής διαίρεσης και πολλαπλασιασμού,
- *παρηγορητική ή ανακουφιστική*, όταν δεν είναι δυνατόν να επιτευχθεί η πλήρης (ριζική) εξάλειψη της νόσου, λόγω της φύσης, θέσης ή έκτασης αυτής (10).

Οι προσπάθειες βελτίωσης του θεραπευτικού αποτελέσματος με παράλληλη μείωση των συνεπειών της ακτινοθεραπείας βασίζονται αφ' ενός μεν στην ανάπτυξη της ακτινοβιολογίας και αφ' ετέρου στην εξέλιξη της τεχνολογίας και της πληροφορικής κατά τα τελευταία χρόνια (10).

Σε πολλές περιπτώσεις, η ακτινοθεραπεία συνδυάζεται με άλλες θεραπευτικές αγωγές και συμπληρώνεται με συμπτωματική θεραπεία (π.χ. αναλγητικά) ή θεραπεία γενικής υποστήριξης του οργανισμού του καρκινοπαθούς (π.χ. μεταγγίσεις αίματος). (1) Στα πλαίσια αυτά, η ακτινοθεραπεία συνδυάζεται π.χ. με τη χημειοθεραπεία. Έχει παρατηρηθεί πως κάποιες από τις ουσίες με κυτταροτοξική δράση στα καρκινικά κύτταρα που χρησιμοποιεί η χημειοθεραπεία έχουν ταυτόχρονα ακτινοευαισθητοποιό δράση [4.2] στα κύτταρα αυτά. Συνεπώς, η χρήση των χημειοθεραπευτικών αυτών ουσιών θα ενίσχυε το αποτέλεσμα της ακτινοθεραπείας.

Επιπλέον, έμφαση δίνεται τα τελευταία χρόνια στη στοχευμένη θεραπεία [ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5] του καρκίνου.

4.2. Ακτινοευαισθησία

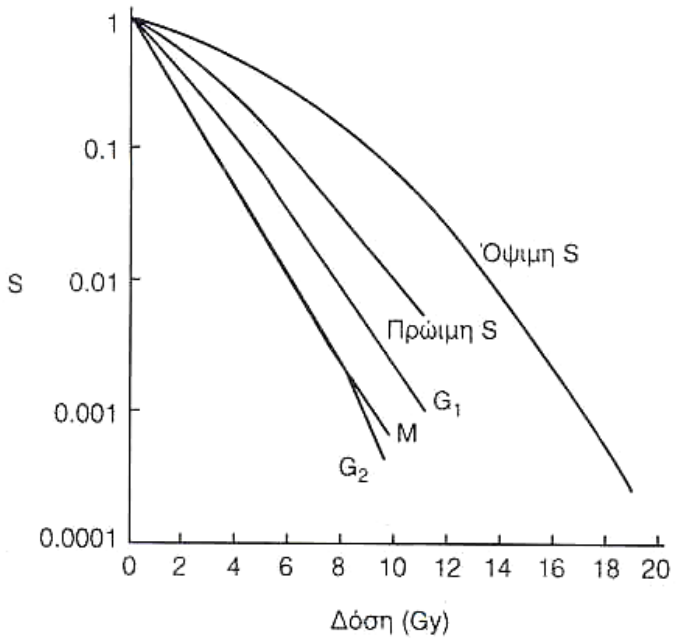
Όλα τα κύτταρα, υγιή ή μη, μπορούν να φονευθούν με την ιοντίζουσα ακτινοβολία. Οι δόσεις, όμως, διαφέρουν για τα διάφορα κύτταρα, καθώς αυτά παρουσιάζουν διαφορά στην ακτινοευαισθησία τους (2).

Συχνά, οι ιστοί και τα όργανα του σώματος, καθώς και τα διάφορα νεοπλάσματα χαρακτηρίζονται ως ακτινοευαίσθητα ή ακτινοανθεκτικά/ακτινοάντοχα. Η ανθεκτικότητα στην ακτινοβολία είναι σχετική έννοια, γιατί κανένα βιολογικό υλικό δεν είναι ανθεκτικό σε μεγάλες δόσεις ακτινοβολίας (1).

Το 1906 οι Bergonie και Tribondeau διατύπωσαν τους κανόνες ακτινοευαισθησίας των ιστών με κριτήριο τον αναπαραγωγικό θάνατο (που τροποποιήθηκαν αργότερα). Σύμφωνα με τα κριτήρια αυτά, η ακτινοευαισθησία των ιστών είναι:

- ✓ ανάλογη της μεταβολικής δραστηριότητας,
- ✓ ανάλογη του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων τους και του ρυθμού ανάπτυξης των ιστών,
- ✓ αντιστρόφως ανάλογη της διαφοροποίησης των κυττάρων τους και
- ✓ αντιστρόφως ανάλογη της ηλικίας των κυττάρων τους στον κυτταρικό κύκλο (6).

Η ακτινοευαισθησία των κυττάρων εξαρτάται από τη φάση του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκονται κατά τη στιγμή της ακτινοβόλησης. Η ακτινοευαισθησία είναι ελάχιστη στη φάση G_0 [3.1.1] και μέγιστη στις G_2 και μίτωση. (Βέβαια, αν χρησιμοποιήσουμε ως κριτήριο ακτινοευαισθησίας τη δημιουργία χρωμοσωματικών αλλοιώσεων, η ευαισθησία είναι αυξημένη στη φάση G_2 και μειώνεται κατά τη σειρά G_2>S>M>G_1, σε αντίθεση με την περίπτωση χρήσης του κριτηρίου του αναπαραγωγικού θανάτου, όπου η σειρά ακτινοευαισθησίας είναι M>G_2>G_1>S) (10).



Εικόνα 4-1: *Καμπύλη επιβίωσης κυττάρου στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Τα μιτωτικά κύτταρα καθώς και κύτταρα που διανύουν τη G2-φάση του κυτταρικού κύκλου παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη ακτινοευαισθησία.*

4.3. Ακτινοευαισθησία στην Ακτινοθεραπεία

Η θεραπεία των κακοήθων όγκων με ακτινοβολία στηρίζεται στη διαφορά της ακτινοευαισθησίας μεταξύ κακοήθων και υγιών κυττάρων. Ο κύριος λόγος της διαφοράς αυτής είναι το γεγονός ότι τα κύτταρα του όγκου είναι περισσότερο μιτωτικά ενεργά και λιγότερα διαφοροποιημένα.

Όσο μεγαλύτερη είναι η ακτινοευαισθησία ενός όγκου, τόσο ευκολότερος είναι ο έλεγχος της τοπικής νόσου ακτινοθεραπευτικά (6).

Το βιολογικό αποτέλεσμα της ιοντίζουσας ακτινοβολίας στα κύτταρα (καρκινικά και μη) εξαρτάται από την απορροφούμενη δόση. Για δεδομένη, λοιπόν, δόση απορρόφησης, η ακτινοευαισθησία των κυττάρων (άρα και οι επιπτώσεις της ακτινοβολίας στα κύτταρα, επομένως και η αποτελεσματικότητα της ακτινοθεραπείας) εξαρτάται από παράγοντες, όπως οι παρακάτω:

- ✓ *Φάση του κυτταρικού κύκλου*

όπως ειπώθηκε παραπάνω [4.2].

- ✓ *Πίεση του οξυγόνου*

Έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι όσο υψηλότερη είναι η πίεση του οξυγόνου σε ένα κύτταρο, τόσο μεγαλύτερη είναι η ευαισθησία του στην ακτινοβολία. Αυτό ενισχύεται και από την κλινική παρατήρηση ότι οι νεκρωτικοί όγκοι με φτωχή αιμάτωση και κατά συνέπεια με χαμηλή πίεση οξυγόνου, είναι εξαιρετικά ανθεκτικοί στην επίδραση της ακτινοβολίας. Η σημασία της ακτινοευαισθησίας με την ελάττωση της τάσης του οξυγόνου είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς σε πολλά νεοπλάσματα υπάρχουν ανοξικά κύτταρα και μάλιστα κυρίως στο κέντρο του όγκου.

- ✓ *Κλασματικός διαχωρισμός της δόσης*

Για τη διόρθωση των βλαβών, που προκαλούν οι ιοντίζουσες ακτινοβολίες στο DNA, το κύτταρο έχει αναπτύξει λιγότερο ή περισσότερο εξειδικευμένους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς. Σε περίπτωση, λοιπόν, τμηματικής χορήγησης διαδοχικών δόσεων, παρατηρείται κυτταρική ανάκαμψη ή επανόρθωση στις χρονικές περιόδους μεταξύ των δόσεων. Τα υγιή κύτταρα, όμως, διαθέτουν αποτελεσματικότερους μηχανισμούς επιδιόρθωσης των προκαλούμενων βλαβών σε σχέση με τα καρκινικά κύτταρα. Έτσι, περιορίζονται οι παρενέργειες της ιοντίζουσας ακτινοβολίας στον περιβάλλοντα τον όγκο υγιή ιστό. Επιπλέον, ο κλασματικός διαχωρισμός της δόσης συμβάλλει στην οξυγόνωση του όγκου και άρα στην αύξηση της ακτινοευαισθησίας του.

- ✓ *Ρυθμός χορήγησης της δόσης ακτινοβολίας*

Το βιολογικό αποτέλεσμα αυξάνεται με την αύξηση του ρυθμού χορήγησης της δόσης.

- ✓ *Ποιότητα ακτινοβολίας*

Οι ακτινοβολίες υψηλού συντελεστή γραμμικής εξασθένησης LET έχουν, συνήθως, μεγαλύτερη βιολογική επίδραση από τις αντίστοιχες μικρού LET.

- ✓ *Ακτινοβολούμενη περιοχή*

δηλαδή μέγεθος και θέση του όγκου.

- ✓ *Τύπος των κυττάρων του όγκου*

- ✓ *Τροποποιητικοί παράγοντες*

Είναι ουσίες που τροποποιούν την επίδραση της ακτινοβολίας στα κύτταρα (με τρόπο παρόμοιο με τη χορήγηση οξυγόνου ή με αλλαγή της μορφολογίας των κυττάρων).

- ✓ *Ακτινοευαισθητοποιές ουσίες*

Πρόκειται για χημειοθεραπευτικά φάρμακα, τα οποία αυξάνουν την ακτινοευαισθησία των κυττάρων (6; 10; 18).

Η πιθανή ακτινοευαισθητοποιός δράση της ουσίας N-{4-[(3-βρωμοφαινυλ)αμινο]-κιναζολιν-6-υλ}-2-χλωροακεταμίδιο σε χρωμοσωματικό επίπεδο είναι το αντικείμενο της παρούσας εργασίας.

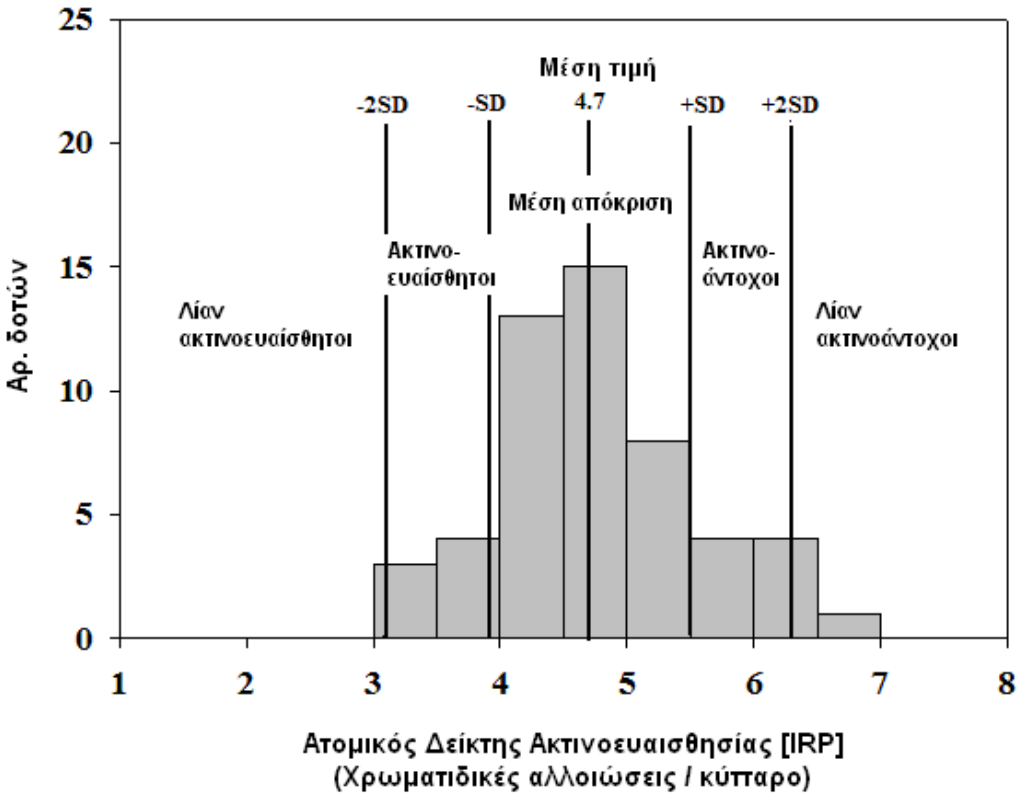
4.4. Η Μέθοδος μέτρησης G_2-χρωμοσωματικής ευαισθησίας (G_2-assay)

Η μέθοδος G_2-χρωμοσωματικής ευαισθησίας αναπτύχθηκε και δημοσιεύτηκε το 2009 από την ερευνητική ομάδα "*Georgia I. Terzoudi, et al"* του ΕΚΕΦΕ «Δ» στο *International Journal of Oncology (**35**: p. 1223-1230)*.

Με την εφαρμογή της νέας μεθόδου εκτίμησης ακτινοευαισθησίας, η τιμή των χρωματιδικών αλλοιώσεων με καφεΐνη για κάθε άτομο που προκύπτει αντιπροσωπεύει τη μέγιστη τιμή της G_2-χρωμοσωματικής ακτινοευαισθησίας. Η διαφορά μεταξύ αυτής της τιμής και της τιμής των χρωματιδικών αλλοιώσεων που προκύπτει απουσία καφεΐνης, αντικατοπτρίζει διαφορές σε μεταλλάξεις ή πολυμορφισμούς γονιδίων που ελέγχουν την επιδιόρθωση της ακτινοπροκληθείσας βλάβης στο DNA, την ενεργότητα των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και τη μετάβαση του κυττάρου από τη G2-φάση στη μετάφαση. Η διαφορά αυτή μεταξύ των δύο τιμών ορίζεται ως *Ατομικός Δείκτης Ακτινοευαισθησίας* (Individual Radiosensitivity Parameter, IRP). Στο Σχήμα 4-1, φαίνεται η διακύμανση της χρωμοσωματικής ακτινοευαισθησίας 52 υγιών δοτών μετά από εφαρμογή της νέας προτεινόμενης μεθόδου. Η μέση τιμή IRP υπολογίστηκε σε 4,7 χρωματιδικές αλλοιώσεις ανά κύτταρο με τυπική απόκλιση (SD, Standard Deviation) 0,8 και συντελεστή μεταβλητότητας [coefficient of variation(Waselenko et al.)] 17%. Μία θεωρητική κατάταξη βασιζόμενη στις μέσες τιμές (mean values, MV) και στις τυπικές

αποκλίσεις (standard deviations, SD) εφαρμόστηκε έτσι ώστε: ως μέσης απόκρισης να χαρακτηρίζονται οι δότες με τιμή IRP εύρους MV±SD, ως ακτινοευαίσθητοι όταν MV-2SD≤IRP<MV-SD, ως λίαν ακτινοευαίσθητοι όταν IRP<MV-2SD, ως ακτινοάντοχοι όταν MV+SD<IRP≤MV+2SD και ως λίαν ακτινοάντοχοι όταν IRP>MV+2SD. (19)

Στο σημείο αυτό, κρίνεται σκόπιμο να διευκρινιστεί πως για την αξιολόγηση των χρωματιδικών αλλοιώσεων υιοθετήθηκαν τα κριτήρια κατά Sanford (20) και πως στις μετρήσεις λήφθηκαν υπ' όψιν τα θραύσματα και όσες από τις ασυνέχειες χρωματίδης ήταν μεγαλύτερες από το πάχος της ίδιας της χρωματίδης.



Σχήμα 4-1: *Διακύμανση της χρωμοσωματικής ακτινοευαισθησίας μεταξύ 52 υγιών δοτών μετά από εφαρμογή της νέας προτεινόμενης μεθόδου G2-χρωμοσωματικής ακτινοευαισθησίας, βασιζόμενης στον υπολογισμό του Ατομικού Δείκτη Ακτινοευαισθησίας IRP. Η μέση τιμή IRP υπολογίστηκε σε 4,7 χρωματιδικές αλλοιώσεις / κύτταρο με τυπική απόκλιση 0,8. Μέσης απόκρισης χαρακτηρίζονται οι δότες με τιμή IRP εύρους 3,9-5,5, ως ακτινοευαίσθητοι όταν 3,1≤IRP<3,9, ως λίαν ακτινοευαίσθητοι όταν IRP<3,1, ως ακτινοάντοχοι όταν 5,5<IRP≤6,3 και ως λίαν ακτινοάντοχοι όταν IRP>6,3.*

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

EGFR - ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Όπως ήδη αναφέρθηκε [4.1], η επιστήμη έχει στη διάθεσή της και χρησιμοποιεί πολλές διαφορετικές μεθόδους στην προσπάθεια για καταπολέμηση των νεοπλασμάτων. Μάλιστα, πολλές φορές, προτιμάται πια ο συνδυασμός περισσοτέρων της μιας μεθόδων, έναντι της μονοθεραπείας που εφαρμοζόταν άλλοτε.

Παρά τα θετικά, όμως, αποτελέσματα των θεραπευτικών μεθόδων στην καταπολέμηση του καρκίνου, παρατηρούνται συνήθως και προβλήματα. Τα κυριότερα από αυτά είναι αφ' ενός η χρονοεξαρτώμενη αύξηση της αντίστασης στις θεραπείες (όπου μετά την 3η-4η εβδομάδα ακτινοθεραπείας παρατηρείται σε ορισμένους ασθενείς το φαινόμενο της επανεποίκισης, δηλαδή απότομη αύξηση του πληθυσμού καρκινικών κυττάρων) (4) και αφ' ετέρου η εμφάνιση παρενεργειών. Μια από τις κυριότερες αιτίες εμφάνισης των -περισσότερο ή λιγότερο σοβαρών- παρενεργειών στον πάσχοντα είναι η έλλειψη εξειδίκευσης των θεραπευτικών μεθόδων για τα καρκινικά κύτταρα. Αυτό σημαίνει πως κατά την αντιμετώπιση των νεοπλασμάτων π.χ. με χρήση ιοντίζουσας ακτινοβολίας η κυτταροκτόνος δράση της ακτινοβολίας δεν περιορίζεται στα καρκινικά κύτταρα, αλλά επηρεάζει και τα φυσιολογικά.

Για την επίλυση των παραπάνω προβλημάτων η επιστημονική κοινότητα στρέφεται προς τη στοχευμένη θεραπεία του καρκίνου. Έτσι, αναζητούνται θεραπευτικά σχήματα που στοχεύουν αποτελεσματικά τα νεοπλάσματα, καταστρέφοντάς τα, ενώ παράλληλα έχουν περιορισμένες τοξικές επιπτώσεις στους περιβάλλοντες υγιείς ιστούς.

Για τη στοχευμένη θεραπεία απαιτείται κατά κύριο λόγο ο καθορισμός του στόχου (μόρια που διαφοροποιούν τα καρκινικά από τα φυσιολογικά κύτταρα) και ο καθορισμός της φαρμακοφόρου ομάδας (μόριο ικανό να βρει τον στόχο και να έχει την ζητούμενη δράση). (21) Ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) [5.2] αποτελεί καλό μόριο-στόχο στην ανάπτυξη στοχευμένης θεραπείας για λόγους που εξηγούνται παρακάτω [5.2], ενώ το κιναζολινικό παράγωγο *N-{4-[(3-βρωμοφαινυλ)αμινο]-κιναζολιν-6-υλ}-2-χλωροακεταμίδιο* είναι η φαρμακοφόρος ομάδα που εξετάζεται στην παρούσα εργασία για την ακτινοευαισθητοποιό δράση της.

5.1. Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF)

Ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF, Epidermal Growth Factor) συνιστά το χαρακτηριστικότερο αντιπρόσωπο της μεγάλης οικογένειας των αυξητικών παραγόντων που ρυθμίζουν την κυτταρική διαίρεση κατά την εμβρυική ανάπτυξη, αλλά και κατά την ενήλικη περίοδο των ζωικών οργανισμών (22).

5.2. Υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR)

Ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor) είναι ένας υποδοχέας της οικογένειας ErbB. Οι υποδοχείς της οικογένειας ErbB ανήκουν στη μεγάλη οικογένεια των πρωτεϊνικών κινασών και μάλιστα στην οικογένεια των υποδοχέων με δραστικότητα κινάσης τυροσίνης (Receptor Tyrosine Kinases, RTK). Η οικογένεια των ErbB (HER) υποδοχέων περιλαμβάνει εκτός από τον EGFR (ErbB-1 ή HER-1), τους ErbB-2 (HER-2), ErbB-3 (HER-3) και ErbB-4 (HER-4).

Πρόκειται για μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη, που αποτελείται από τρεις περιοχές:

- την εξωκυτταρική περιοχή, δηλαδή ένα γλυκοζυλιωμένο αμινοτελικό ($-NH_2$) τμήμα, στο οποίο δεσμεύεται ο αντίστοιχος αυξητικός παράγοντας,
- τη διαμεμβρανική περιοχή, δηλαδή ένα υδρόφοβο τμήμα, που ευθύνεται για τη συγκράτηση του υποδοχέα στην κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων και
- την ενδοκυτταρική περιοχή, δηλαδή ένα καρβοξυτελικό (-COOH) τμήμα εντός του κυτταροπλάσματος με δραστικότητα κινάσης τυροσίνης, που είναι υπεύθυνο για την ενδοκυτταρική μεταγωγή σημάτων.

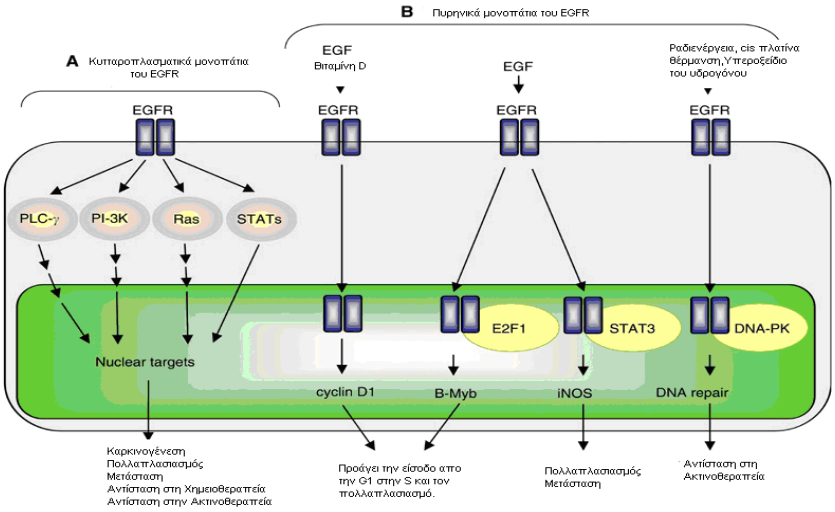
Τα γεγονότα που λαμβάνουν χώρα κατά την ενεργοποίηση του EGFR είναι τα εξής:

- Ο EGFR συνδέεται επιλεκτικά με κάποιο μόριο προσδέτη, όπως για παράδειγμα τον EGF.
- Το προσδενόμενο μόριο επάγει τον ομο- ή ετερο-διμερισμό του EGFR.
- Ο EGFR αυτοφωσφορυλιώνεται.
- Ενεργοποιείται η περιοχή του EGFR με δραστικότητα κινάσης τυροσίνης.
- Ενεργοποιούνται σηματοδοτικά μόρια και σηματοδοτικά μονοπάτια.

Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που συνδέονται με τον EGFR σχετίζονται με σημαντικές βιολογικές διεργασίες, καθώς καταλήγουν στην έκφραση γονιδίων που αφορούν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην απόπτωση, στην επιβίωση των κυττάρων, στη διαφοροποίηση των κυττάρων κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, στο νευρικό σύστημα, στην καρδιά κλπ. Τα κυτταροπλασματικά μονοπάτια είναι τα κυριότερα και καλύτερα χαρακτηρισμένα σηματοδοτικά μονοπάτια του EGFR. Τέτοια μονοπάτια είναι τα εξής:

- ✓ το σηματοδοτικό μονοπάτι Ras-Raf-MAPK,
- ✓ το σηματοδοτικό μονοπάτι της κινάσης της 3-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PI3K) και της πρωτεϊνικής κινάσης Akt (phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway),
- ✓ το σηματοδοτικό μονοπάτι της φωσφολιπάσης C (Phospholipase C, PLC) και
- ✓ το σηματοδοτικό μονοπάτι STAT.

Ο EGFR εμπλέκεται όμως και σε πυρηνικά μονοπάτια, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα [Εικόνα 5-1].

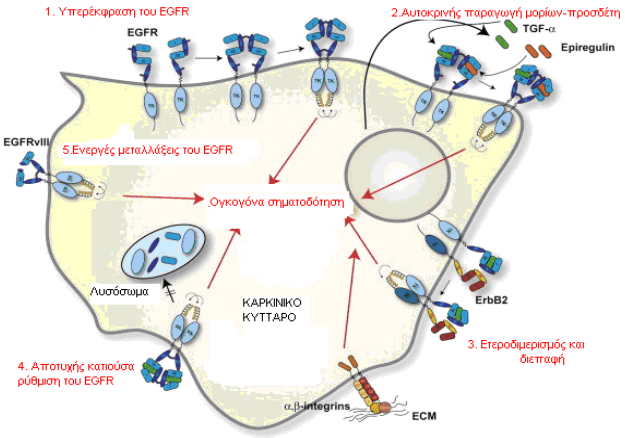


Εικόνα 5-1: *Σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία ενεργοποιούνται από τον EGFR.*

Ένας μηχανισμός ρύθμισης της σηματοδότησης είναι η ενδοκυττάρωση του ενεργοποιημένου EGFR, ενώ απορύθμιση της σηματοδότησης μπορεί να οδηγήσει σε ογκογόνο σηματοδότηση και καρκινογένεση.

Γενικά, μηχανισμοί που απορυθμίζουν το σύστημα EGFR-προσδενόμενο μόριο και οδηγούν σε ογκογόνο σηματοδότηση είναι [Εικόνα 5-2]:

- η αυξημένη παραγωγή προσδενόμενων μορίων,
- τα υψηλά επίπεδα EGFR (υπερέκφρασή του),
- οι μεταλλαγμένες ενεργές δομές του EGFR,
- η ατελής καθοδική ρύθμιση του EGFR και
- ο ετεροδιμερισμός και η διεπικοινωνία (cross-talk) του EGFR με υποδοχείς που δεν ανήκουν στην οικογένεια ErbB.



Εικόνα 5-2: *Μηχανισμοί που απορρυθμίζουν το σύστημα EGFR-προσδενόμενο μόριο και οδηγούν σε ογκογόνο σηματοδότηση.*

Ο υποδοχέας του EGF (EGFR) υπερεκφράζεται σε πολλούς τύπους καρκίνου. Η υπερέκφραση των υποδοχέων στις μεμβράνες των καρκινικών κυττάρων προσδίδει στα κύτταρα αυτά γνωρίσματα, τα οποία τα διαφοροποιούν από τα υπόλοιπα -φυσιολογικά- κύτταρα. Για το λόγο αυτό, ο EGFR μπορεί να αποτελέσει μόριο-στόχο κατά την ανάπτυξη αντικαρκινικών φαρμάκων στα πλαίσια της στοχευμένης θεραπείας νεοπλασμάτων. (22; 23; 24; 25; 26; 27; 28; 29)

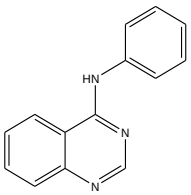
Η στόχευση του EGFR, και των υποδοχέων ErbB γενικότερα, γίνεται με τρεις κατηγορίες φαρμάκων: μονοκλωνικά αντισώματα (mAbs), μικρού μοριακού βάρους μόρια που δρουν ως αναστολείς της δραστικότητας της κινάσης τυροσίνης που διαθέτει ο EGFR (αναστολείς ΤΚ) -όπως τα κιναζολινικά παράγωγα- και πεπτίδια ανάλογα του αυξητικού παράγοντα EGF (30).

5.3. Κιναζολινικά Παράγωγα ως μόρια στόχευσης

Πρόκειται για μόρια μικρού μοριακού βάρους τα οποία είναι αναστολείς της δραστικότητας της κινάσης τυροσίνης των υποδοχέων των κυττάρων. Συγκεκριμένα,

έχουν την ικανότητα να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη ενός κυττάρου, να εισέρχονται στο κυτταρόπλασμά του και να στοχεύουν το ενδοκυτταρικό τμήμα του υποδοχέα, δεσμευόμενα –αντιστρεπτά ή μη αντιστρεπτά- σε αυτό. Με τον τρόπο αυτό, επιτυγχάνουν τελικά την αναστολή της φωσφορυλίωσης του υποδοχέα, οπότε επιδρούν και στην ενεργοποίηση των σηματοδοτικών του μονοπατιών (31; 32).

Με βάση τα παραπάνω, γίνεται κατανοητός ο λόγος για τον οποίο επιχειρείται η αξιοποίηση των κιναζολινικών παραγώγων που δρουν ως αναστολείς της δραστικότητας της κινάσης τυροσίνης του EGFR, για την παρασκευή φαρμάκων με αντικαρκινική δράση. Οι δομές που μελετώνται περισσότερο για το σκοπό αυτό είναι οι ανιλινοκιναζολίνες (anilinoquinazolines) [Σχήμα 5-1], οι ανιλινοκινολίνες (anilinoquinolines) και οι ανιλινοπυριδοπυριμιδίνες (anilinopyridopirimidines).



Σχήμα 5-1: *Δομή 4-ανιλινοκιναζολινών*

Τα τελευταία χρόνια έχουν σχεδιαστεί και βρίσκονται σε διάφορα στάδια μελέτης πάνω από 30 μόρια αναστολείς της δραστικότητας τυροσινικής κινάσης των υποδοχέων ErbB. Μετά από κλινικές μελέτες, κάποια από αυτά τα μόρια έχουν αναγνωρισθεί ως θεραπευτικά φάρμακα για συγκεκριμένους τύπους καρκίνου. Το Lapatinib, το Gefitinib και το Erlotinib, τα οποία είναι αντιστρεπτοί αναστολείς της δραστικότητας τυροσινικής κινάσης και ανήκουν στην τάξη των ανιλινοκιναζολινών, έχουν εγκριθεί για κλινική χρήση, ενώ πολλά άλλα βρίσκονται σε διάφορα στάδια ανάπτυξης.

Πιο πρόσφατες προκλινικές και κλινικές μελέτες έδειξαν ότι μη αντιστρεπτοί αναστολείς της δραστικότητας τυροσινικής κινάσης του EGFR, όπως το Canertinib και το EKB-569 παρακάμπτουν την αντίσταση στη θεραπεία, γεγονός το οποίο σημαίνει ότι η συγκεκριμένη ομάδα αναστολέων παρουσιάζει πλεονεκτήματα τα οποία αξίζει να μελετηθούν (33; 34).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε για τη στόχευση του EGFR το κιναζολινικό παράγωγο:

N-{4-[(3-βρωμοφαινυλ)αμινο]-κιναζολιν-6-υλ}-2-χλωροακεταμίδιο,

το οποίο δεσμεύεται στον υποδοχέα με μη αντιστρεπτό τρόπο.

Β. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

Η εργασία αυτή αποτελεί μέρος ενός ευρύτερου πεδίου ερευνητικών δραστηριοτήτων που αναπτύσσεται στο Ι/Ρ-ΡΠ του ΕΚΕΦΕ «Δ» και αφορά στη **σύγκριση των δύο μεγάλων τάξεων των κιναζολινών, αυτών της αντιστρεπτής και αυτών της μη αντιστρεπτής δέσμευσης, στα πλαίσια**

- **της μελέτης της δράσης τους και**
- **της ανάπτυξης νέων φαρμάκων και ραδιοφαρμάκων**

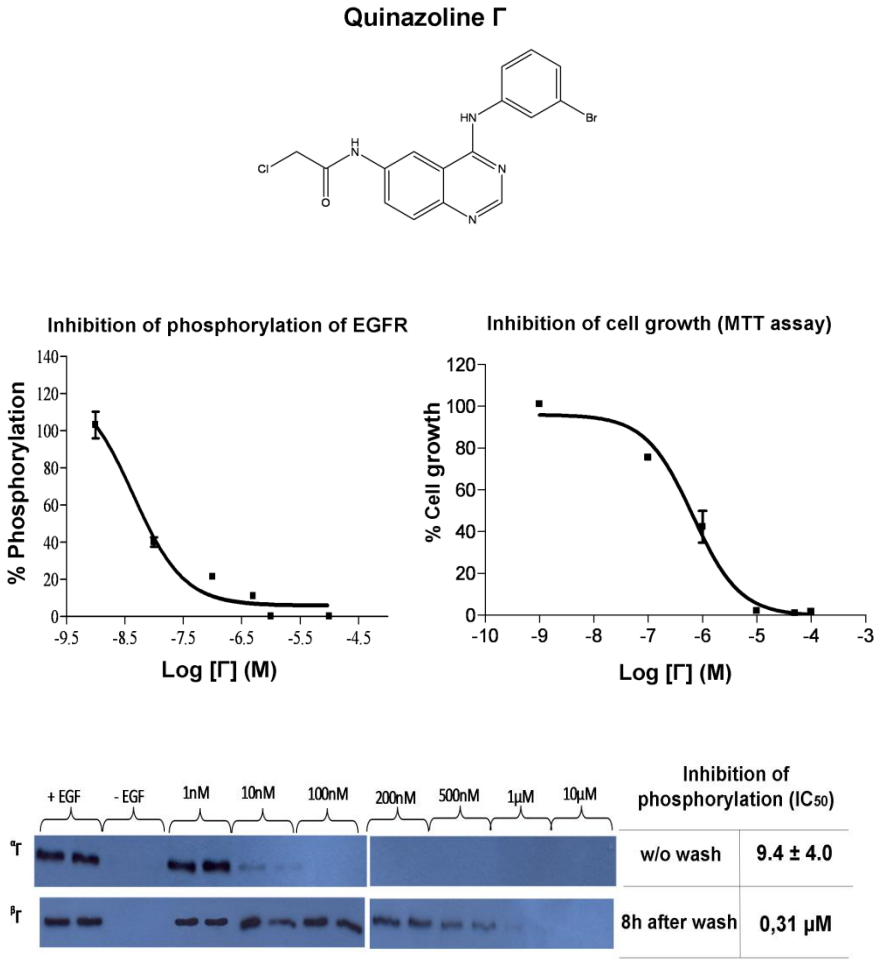
με απώτερο στόχο τη χρήση τους σε συνδυαστικές θεραπείες, όπως χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία και ραδιοθεραπεία.

Ορισμένα κιναζολινικά παράγωγα έχουν την ικανότητα να ανταγωνίζονται, λόγω παραπλήσιας δομής, το μόριο της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) για τη θέση δέσμευσης αυτής 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 πρόσδεσή τους στον αυξητικό παράγοντα, καθώς η χημική τους δομή δεν τους επιτρέπει να συνδεθούν με τον υποδοχέα με κάποιο χημικό δεσμό. Έτσι, οι αναστολείς αυτοί αποδεσμεύονται από τον υποδοχέα. Σε μεγάλες συγκεντρώσεις, η σύνδεση και η αποσύνδεσή τους γίνονται με ένα σταθερό ρυθμό, με αποτέλεσμα να αναστέλλουν σημαντικά τη δράση των μορίων ATP. Οι μη αντιστρεπτοί παράγοντες, εκτός από την παρόμοια δομή με τα μόρια ATP, έχουν και την ικανότητα να αλκυλιώνουν τη Σερίνη 773 του EGFR, με αποτέλεσμα τη μη αντιστρεπτή πρόσδεσή τους σε αυτόν αλλά και τη μόνιμη αναστολή της δράσης του.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε το κιναζολινικό παράγωγο Γ: *N-{4-[(3-βρωμοφαινυλ)αμινο]-κιναζολιν-6-υλ}-2-χλωροακεταμίδιο* (Εικόνα 6-1). Το παράγωγο αυτό συντέθηκε στο εργαστήριο Ραδιοφαρμακευτικής Χημείας του Ι/Ρ-ΡΠ του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» και αποτέλεσε βάση σύνθεσης νέων ραδιοφαρμάκων Re και Tc99m με απώτερο στόχο την απεικόνιση όγκων που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα. Στην Εικόνα 6-1 φαίνεται η κυτταροτοξική δράση του παραγώγου, η οποία εκφράζει το ποσοστό αναστολής της ενζυμικής δράσης της αναπνοής των κυττάρων -που σχετίζεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ενός κυτταρικού πληθυσμού-, σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του παραγώγου στο

περιβάλλον του κυτταρικού αυτού πληθυσμού. Η τιμή IC_{50} (0,65 μM) είναι ένας δείκτης κυτταροτοξικότητας που εκφράζει τη συγκέντρωση στην οποία αναστέλλεται το 50% του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Στην ίδια εικόνα [Εικόνα 6-1] φαίνεται, ακόμα, η τιμή IC_{50} που εκφράζει τη συγκέντρωση στην οποία το παράγωγο αναστέλλει το 50% της φωσφορυλίωσης του υποδοχέα (2 nM). Επιπλέον, τα αποτελέσματα της δοκιμασίας που φανερώνουν τη μη αντιστρεπτή δέσμευση του παραγώγου Γ στον υποδοχέα.



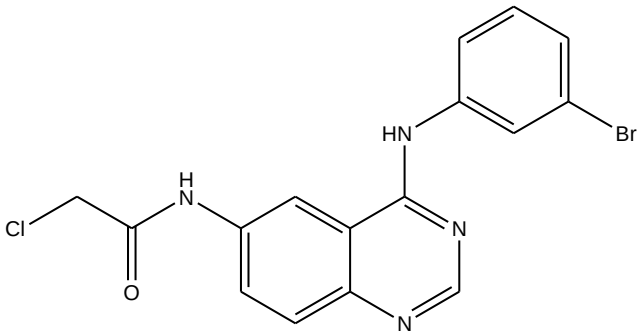
Εικόνα 6-1: *Χημική δομή του παραγώγου **Γ**, διαγράμματα φωσφορυλίωσης και κυτταροτοξικότητάς, καθώς και δοκιμασία αντιστρεπτής δέσμευσης.*

Συγκεκριμένα, στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της πιθανής G_2-χρωμοσωματικής ευαισθησίας που επάγει το -μη αντιστρεπτής δέσμευσης στον υποδοχέα- κιναζολινικό παράγωγο Γ, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο μέτρησης G_2-χρωμοσωματικής ευαισθησίας που έχει αναπτυχθεί στο ΕΚΕΦΕ «Δ» από τους *G.Terzoudi et al.(2009)* (19).

Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

7.1. Το κιναζολινικό παράγωγο



Σχήμα 7-1: *Χημική δομή του κιναζολινικού παραγώγου N-{4-[(3-βρωμοφαινυλ)αμινο]-κιναζολιν-6-υλ}-2-χλωροακεταμίδιο*

7.2. Η κυτταρική καρκινική σειρά A431

Τα κύτταρα της καρκινικής σειράς A431 έχουν απομονωθεί από τα γεννητικά όργανα μιας ογδονταπεντάχρονης γυναίκας. Πρόκειται για επιθηλιακά κύτταρα επιδερμικού καρκίνου, τα οποία δε διαθέτουν το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί έναν ισχυρό μεταγραφικό παράγοντα (πρωτεΐνη p53), η ενεργοποίηση του οποίου καταστέλλει τη μεταγραφή μια ομάδας γονιδίων που σχετίζονται με την επαγωγή της κυτταρικής διαίρεσης και επάγει τη μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου. Έτσι, π.χ. μετά από ακτινοβόληση, η p53 ενεργοποιείται με αποτέλεσμα είτε την απόπτωση κυττάρων που έχουν υποστεί σοβαρές αλλοιώσεις στο γενετικό τους υλικό, είτε την αναστολή του κυτταρικού κύκλου αυτών των κυττάρων και, παράλληλα, την ενεργοποίηση μηχανισμών επιδιόρθωσης του γενετικού τους υλικού. Όπως ήδη αναφέρθηκε, τα κύτταρα A431 δε διαθέτουν το συγκεκριμένο γονίδιο (35; 2).

Επιπλέον, τα κύτταρα αυτά υπερεκφράζουν τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR).

Τα κύτταρα της σειράς αυτής

✓ παραλαμβάνονται από συνθήκες βαθειάς ψύξης, καθώς διατηρούνται στο υγρό άζωτο στους -196°C,

✓ καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό D-MEM (Dulbecco's Minimal Essential Medium) εμπλουτισμένο με εμβρυικό ορό μόσχου, L-γλουταμίνη και αντιβιοτικά (πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη),

✓ αναπτύσσονται σε επωαστικό κλίβανο που τροφοδοτείται με αέριο CO_2 σε ποσοστό 5%, στους 37°C και σε κορεσμένη με υγρασία ατμόσφαιρα,

✓ καλλιεργούνται προσκολλημένα σε επίπεδες πλαστικές φιάλες (adherent) και όχι σε εναιώρημα και

✓ ανακαλλιεργούνται κάθε 2-3 μέρες

σύμφωνα με τις μεθόδους που περιγράφονται παρακάτω [7.3.2].

7.3. Κυτταροκαλλιέργειες

Κυτταρική καλλιέργεια ονομάζεται η μέθοδος που επιδιώκει την -υπό ελεγχόμενες συνθήκες- ανάπτυξη και αναπαραγωγή κυττάρων σε ένα εργαστήριο. Έτσι, κύτταρα που έχουν απομονωθεί από κάποιον οργανισμό διατηρούνται ‘εν ζωή’ μακριά από τον οργανισμό αυτόν και πολλαπλασιάζονται in vitro, μέσα σε αποστειρωμένα δοχεία (π.χ. τρυβλία ή φιάλες κυτταροκαλλιεργειών) που περιέχουν αποστειρωμένα θρεπτικά υλικά.

Το θρεπτικό υλικό είναι το άμεσο περιβάλλον των κυττάρων, μέσα ή πάνω στο οποίο ζουν. Συνεπώς, πρέπει να περιέχει τα απαραίτητα συστατικά όχι μόνο για να τραφούν αυτά, αλλά και για να τους εξασφαλίζει κατάλληλες συνθήκες pH και ωσμωτικής πίεσης. Επιπλέον, τα κύτταρα πρέπει να διατηρούνται σε σταθερή θερμοκρασία και κορεσμένες συνθήκες υγρασίας, παρουσία CO_2. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται επωαστικός κλίβανος.

Τα επωαζόμενα κύτταρα παρατηρούνται καθημερινά στο μικροσκόπιο προκειμένου να ελέγχονται για τυχόν μολύνσεις και να παρακολουθείται η ανάπτυξή τους. Το θρεπτικό υλικό ανανεώνεται κάθε φορά που αυτό κρίνεται αναγκαίο, ενώ όταν τα κύτταρα πολλαπλασιαστούν σε τέτοιο βαθμό ώστε να καλύψουν το 80-90% του δοχείου καλλιέργειας, γίνεται ανακαλλιέργειά τους [0].

Όλες οι εργασίες που αφορούν μια κυτταρική καλλιέργεια πρέπει να διεκπεραιώνονται κάτω από άσηπτες συνθήκες. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιούνται σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, ο οποίος είναι εφοδιασμένος με υπεριώδη (UV) λυχνία και φίλτρα αέρος. Τα υλικά και τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται στις διάφορες διαδικασίες της κυτταρικής καλλιέργειας είναι επίσης

αποστειρωμένα και διατίθενται στο εμπόριο, ενώ η καταμέτρηση των κυττάρων [0] γίνεται με τη χρήση του αιματοκυτταρομέτρου Neubauer.

7.3.1. Υλικά και εξοπλισμός

- Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής (Laminar Flow), ELMED
- Επωαστικός κλίβανος με παροχή CO_2 (Incubator), Format Scientific
- Φυγόκεντρος, Heraeus Christ
- Μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης, Axiovert 25 Zeiss
- Αιματοκυτταρόμετρο Neubauer
- Δοχείο υγρού αζώτου, Forma
- Ψυγείο, για τη διατήρηση των καλλιεργητικών μέσων

- Θρεπτικό υλικό: D-MEM HIGH GLUCOSE, PAA Laboratories
- Ορός εμβρυικού μόσχου(FBS) , PAA Laboratories
- Διάλυμα L-γλουταμίνης 200mm, PAA Laboratories
- Διάλυμα πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης 100Units/ml και 10mg/ml, PAA Laboratories
- Εμπλουτισμένο θρεπτικό υλικό: D-MEM HIGH GLUCOSE (10% FBS, 1% L-Glutamine, 1% Penicilin/Streptomycin)
- DMSO, Sigma
- Διάλυμα ψύξης: 10% DMSO σε ορό μόσχου
- Ισοτονικό ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών-χλωριούχων αλάτων (PBS), pH=7,4, Orange Scientific
- Διάλυμα θρυψίνης/EDTA: 0,05% / 0,02% σε PBS χωρίς Ca^{2+}, Mg^{2+}, Biochrom AG

- Φιάλη κυτταροκαλλιεργειών 75cm^3, Orange Scientific
- Φιάλη κυτταροκαλλιεργειών 100cm^3, Orange Scientific
- Πιπέττες, Gilson
- Σιφώνια ακριβείας, Orange Scientific
- Ακροφύσια, Gilson
- Ειδικά κρυάντοχα σωληνάρια ψύξης κυττάρων των 2mL (cryotubes), Orange Scientific
- Σωληνάρια φυγοκέντρησης, Orange Scientific

7.3.2. Μέθοδος κυτταροκαλλιέργειας

Απόψυξη κυτταρικής σειράς

Οι κυτταρικές σειρές παραλαμβάνονται από συνθήκες βαθειάς ψύξης, όπου διατηρούνται σε cryotubes (ειδικά κρυάντοχα σωληνάρια ψύξης) των 2mL. Κάθε cryotube διαθέτει 10^7 κύτταρα ανά mL διαλύματος ψύξης. Για να καλλιεργηθούν, τα κύτταρα αυτά πρέπει πρώτα να αποψυχθούν, σύμφωνα με την παρακάτω διαδικασία:

- Τα κύτταρα παραλαμβάνονται -μέσα σε cryotubes- από το δοχείο υγρού N_2 (-196 ^oC) ή από ειδικά ψυγεία φύλαξης κυττάρων (-80 ^oC).
- Τα cryotubes μεταφέρονται αμέσως σε υδατόλουτρο στους 37^oC.
- Το περιεχόμενο μεταφέρεται σε σωληνάρια φυγοκέντρησης που περιέχουν εμπλουτισμένο θρεπτικό υλικό (προθερμασμένο στους 37^oC) και φυγοκεντρούνται για 10min στα 1100rpm (rounds per minute).
- Το υπερκείμενο αποχύνεται.
- Το ίζημα επαναιωρείται σε θρεπτικό υλικό.
- Το τελικό εναιώρημα μεταφέρεται σε φιάλες καλλιέργειας, οι οποίες τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο σε οριζόντια θέση.

Καλλιέργεια κυττάρων

Όπως ειπώθηκε και παραπάνω, για την καλλιέργεια των κυττάρων A431 χρησιμοποιούμε θρεπτικό υλικό D-MEM (Dulbecco's Minimal Essential Medium) εμπλουτισμένο με εμβρυικό ορό μόσχου, L-γλουταμίνη και αντιβιοτικά (πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη). Έτσι,:

- Τα -τοποθετημένα σε φιάλες καλλιέργειας παρουσία εμπλουτισμένου θρεπτικού υλικού- κύτταρα διατηρούνται, αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται σε επωαστικό κλίβανο στους 37^oC, παρουσία CO_2 σε ποσοστό 5%, και σε κορεσμένη με υγρασία ατμόσφαιρα.

Ανακαλλιέργεια κυττάρων

Τα καλλιεργούμενα κύτταρα παρατηρούνται καθημερινά στο μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης. Υγιή θεωρούνται τα κύτταρα που βρίσκονται κολλημένα στον πυθμένα του δοχείου καλλιέργειας. Όταν παρατηρηθεί πως αυτά έχουν καλύψει το 80-90% της επιφάνειας του πυθμένα του δοχείου καλλιέργειας, ανακαλλιεργούνται σύμφωνα με την μέθοδο που ακολουθεί:

- Οι φιάλες καλλιέργειας μεταφέρονται σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, προκειμένου να εξασφαλιστούν άσηπτες συνθήκες εργασίες.
- Αφαιρείται το θρεπτικό υλικό από τις φιάλες καλλιέργειας.

- Τα κύτταρα ξεπλένονται με διάλυμα θρυψίνης/EDTA, ώστε να απομακρυνθούν ίχνη θρεπτικού υλικού (αφού ο ορός που περιέχεται σε αυτό, αναστέλλει τη δράση της θρυψίνης που θα χρησιμοποιηθεί αμέσως μετά).
- Προστίθενται 2mL διαλύματος θρυψίνης/EDTA σε κάθε φιάλη, προκειμένου τα κύτταρα να αποκολληθούν από τον πυθμένα της φιάλης.
- Οι φιάλες τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο για περίπου 3-5min. (Η θρυψίνη είναι ένζυμο και άρα δρα στους 37°C.)
- Κύτταρα που βρίσκονται σε εκθετική φάση ανάπτυξης αποκολλούνται από τον πυθμένα της φιάλης. Η πορεία της αποκόλλησής των κυττάρων παρακολουθείται στο μικροσκόπιο. (Η θρυψίνη είναι πρωτεολυτικό ένζυμο. Συνεπώς, παραμονή των κυττάρων στην θρυψίνη για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο από το απαραίτητο προκαλεί διαταραχές στη δομή της κυτταρικής τους μεμβράνης.)
- Όταν τα κύτταρα αποκολληθούν πλήρως, οι φιάλες μεταφέρονται ξανά στο θάλαμο νηματικής ροής. Το εναιώρημα που περιέχουν υφίσταται διαδοχικές αναρροφήσεις-εκροφήσεις με τη χρήση πιπέττας, ώστε να επιτευχθεί η ολοκληρωτική αποκόλληση των κυττάρων που βρίσκονται με τη μορφή συσσωματώματος.
- Το εναιώρημα χωρίζεται σε 2-3 φιάλες.
- Σε κάθε φιάλη προστίθεται εμπλουτισμένο καλλιεργητικό υλικό D-MEM.
- Οι φιάλες τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο σε οριζόντια θέση.

(Τα διαλύματα που αναφέρθηκαν διατηρούνται στο ψυγείο, αλλά χρησιμοποιούνται στη θερμοκρασία των 37°C.)

Συλλογή των κυττάρων

Για τη συλλογή των κυττάρων ακολουθείται η εξής πειραματική πορεία:

- Αποκόλληση των κυττάρων από τον πυθμένα της φιάλης, όπως αυτή περιγράφηκε στη διαδικασία της *ανακαλλιέργειας*.
- Προσθήκη εμπλουτισμένου θρεπτικού υλικού στις φιάλες, το οποίο αναστέλλει τη δράση της θρυψίνης.
- Μεταφορά του εναιωρήματος σε σωληνάρια φυγοκέντρησης και φυγοκέντρησή του για 10min στα 1100rpm.
- Το υπερκείμενο αποχύνεται (με μια κίνηση), τα κύτταρα επαναιωρούνται σε PBS και φυγοκεντρούνται με την ίδια διαδικασία άλλες δυο φορές.

Το ίζημα που απομένει στο σωληνάριο φυγοκέντρησης αποτελεί τα υγιή κύτταρα που συλλέχθηκαν.

Ψύξη κυττάρων

Η διατήρηση μιας κυτταρικής σειράς για μεγάλο χρονικό διάστημα καθίσταται εφικτή με την ψύξη μιας ποσότητας κυττάρων και τη διατήρησή τους σε υγρό άζωτο (-196 ^{o}C). Η απαιτούμενη διαδικασία για το σκοπό αυτό είναι η εξής:

- Τα κύτταρα αποκολλούνται από τον πυθμένα της φιάλης, όπως περιγράφηκε στη διαδικασία της *ανακαλλιέργειας*.
- Προστίθεται στις φιάλες εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο D-MEM, ώστε να ανασταλεί η δράση της θρυψίνης.
- Το εναιώρημα μεταφέρεται σε σωληνάρια φυγοκέντρησης και φυγοκεντρείται για 10min στα 1100rpm.
- Το υπερκείμενο θρεπτικό υλικό αποχύνεται.
- Τα κύτταρα, δηλαδή το ίζημα που απομένει στα σωληνάρια φυγοκέντρησης, επαναιωρούνται σε 1mL ανά?? διαλύματος ψύξης (10% DMSO σε ορό μόσχου).
- Το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρεται σε ειδικά κρυάντοχα σωληνάρια ψύξης (cryotubes).
- Σε κάθε σωληνάριο σημειώνεται το όνομα της κυτταρικής σειράς που περιέχει και η ημερομηνία ψύξης της.
- Τα cryotubes τοποθετούνται σε ειδικά ψυγεία φύλαξης κυττάρων και τελικά στο δοχείο υγρού αζώτου.

Η βιωσιμότητα των κυττάρων σχετίζεται άμεσα με τον τρόπο ψύξης και απόψυξής τους. Έτσι, ενώ αποψύχονται απότομα, η ψύξη τους πρέπει να πραγματοποιηθεί σταδιακά. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα τοποθετούνται διαδοχικά στους 4 ^{o}C για 1 ώρα, στους -20 ^{o}C για 4 ώρες, στους -70 ^{o}C για 12 ώρες και τελικά στο υγρό άζωτο, όπου θα παραμείνουν έως ότου παραστεί ανάγκη χρησιμοποίησης - άρα και *απόψυξής*- τους.

Μέτρηση κυττάρων σε εναιώρημα με χρήση αιματοκυτταρομέτρου

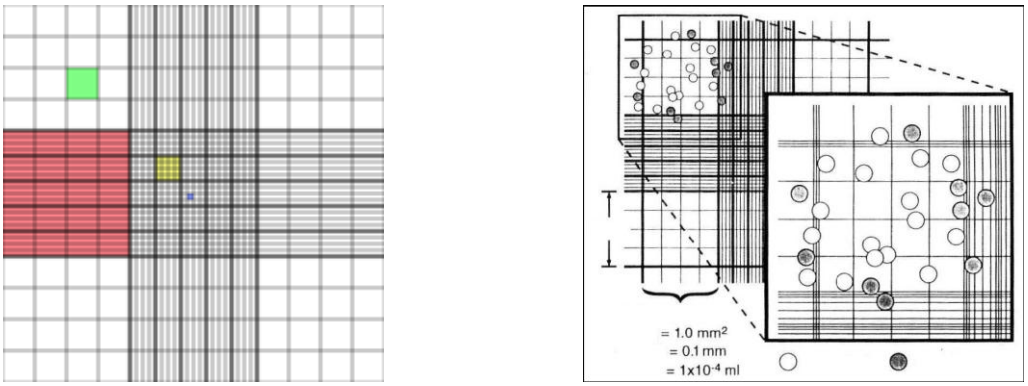
Το αιματοκυτταρόμετρο είναι μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρος πλάκα με δύο κατάλληλα επεξεργασμένες επιφάνειες. Η κάθε επιφάνεια αποτελείται από εννέα μεγάλα τετράγωνα σε μορφή πλέγματος [Εικόνα 7-1]. Τα τέσσερα τετράγωνα στις γωνίες χωρίζονται σε δεκαέξι μικρότερα τετράγωνα το καθένα. Το κάθε μεγάλο τετράγωνο (κόκκινο στην Εικόνα 7-1) έχει επιφάνεια 1 mm^2, έτσι ώστε όταν καλύπτεται με καλυπτρίδα συγκεκριμένου βάρους, 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 συγκέντρωσή

τους. Οπότε, η μέτρηση κυττάρων σε εναιώρημα με αιματοκυτταρόμετρο είναι μια άμεση και εύκολη μέθοδος προσδιορισμού του αριθμού των κυττάρων σε εναιώρημα γνωστού όγκου.

Η διαδικασία που ακολουθείται προκειμένου να μετρήσουμε τα κύτταρα με το αιματοκυτταρόμετρο είναι η εξής: τοποθετούμε στο αιματοκυτταρόμετρο μια καλυπτρίδα και με πιπέττα Pasteur τοποθετούμε ~10 μl από το κυτταρικό εναιώρημα στην άκρη της καλυπτρίδας. Η κατάλληλα επεξεργασμένη επιφάνεια του αιματοκυτταρομέτρου καλύπτεται τότε με το εναιώρημα λόγω του τριχοειδούς φαινομένου. Στη συνέχεια, μετρούμε στο οπτικό μικροσκόπιο τα κύτταρα που βρίσκονται στα τέσσερα ακριανά τετράγωνα [Εικόνα 7-1]. Τελικά, ο αριθμός των κυττάρων ανά ml αρχικού εναιωρήματος δίνεται από τη σχέση: Μέσος όρος των κυττάρων στα τέσσερα τετράγωνα x 10^4.

$$\text{Αριθμός των κυττάρων/ml αρχικού εναιωρήματος} = \frac{\text{Μέσος όρος των κυττάρων στα τέσσερα τετράγωνα}}{\text{ml αρχικού εναιωρήματος}}\, x10^4$$



Εικόνα 7-1: *Αιματοκυτταρόμετρο (αριστερά) και περιοχή μέτρησης κυττάρων (δεξιά).*

7.4. Μέθοδος ακτινοβόλησης των δειγμάτων

Η ακτινοβόληση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε μονάδα κοβαλτίου (^{60}Co) GammaCell 220 Irradiator (Atomic Energy of Canada Ltd, Ottawa, Canada, Ιανουαρίου 1974) σε θερμοκρασία δωματίου.

Η μονάδα κοβαλτίου GammaCell 220 Irradiator είναι ένας ακτινοβολητής κατηγορίας Ι, δηλαδή ένας ακτινοβολητής στον οποίο η πηγή βρίσκεται σε σταθερή

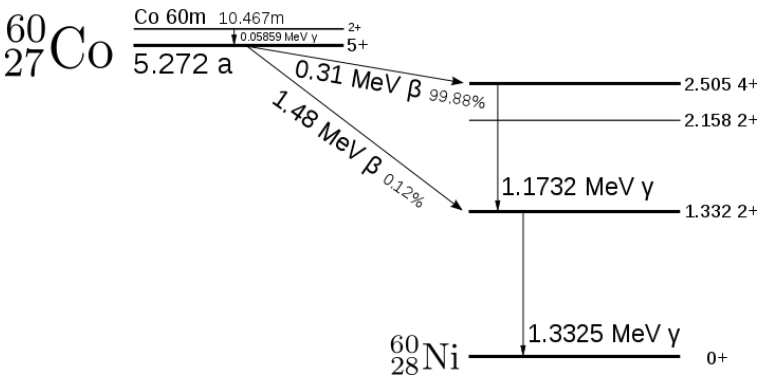
θέση και τα προς ακτινοβόληση δείγματα κατευθύνονται προς αυτήν. Ο συγκεκριμένος ακτινοβολητής διαθέτει ως πηγή ποσότητα του ραδιοϊσοτόπου $^{60}_{27}Co$ εγκλεισμένη σε διπλό χαλύβδινο σωλήνα και θωρακισμένη με χρήση μολύβδου (36).

Εικόνα 7-2: *Μονάδα κοβαλτίου GammaCell 220 Irradiator.*

Το ραδιενεργό νουκλίδιο $^{60}_{27}Co$ προκύπτει από το σταθερό ισότοπο του κοβαλτίου $^{59}_{27}Co$ με νετρονική ενεργοποίηση, έχει χρόνο ημιζωής $t_{1/2}$=5,2714y και μεταστοιχειώνεται σε Ni σύμφωνα με την εξής β-διάσπαση:

$$^{60}_{27}Co \rightarrow {}^{60}_{28}Ni + e^{-} + \bar{\nu}_e$$

Κατά τη διάσπαση του $^{60}_{27}Co$ παράγονται και ακτίνες-γ. Μάλιστα, από το διάγραμμα διάσπασης του $^{60}_{27}Co$ [Σχήμα 7-2] παρατηρούμε πως παράγονται κυρίως ηλεκτρόνια μικρής ενέργειας και ακτίνες-γ με ενέργεια της τάξης των 1,17MeV και 1,33MeV. Οι ακτίνες β και γ αλληλεπιδρούν με την ύλη με μηχανισμούς που περιγράφονται στο κεφάλαιο 1.



Σχήμα 7-2: *Διάγραμμα διάσπασης του $^{60}_{27}Co$.*

Προκειμένου, λοιπόν, να ακτινοβοληθούν τα δείγματα, αυτά μεταφέρονται στο χώρο που βρίσκεται η μονάδα GammaCell 220 Irradiator (ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος) και τοποθετούνται με ομοιόμορφο -κατά το δυνατόν- τρόπο σε κατάλληλη θέση στο εσωτερικό της. Πριν την ακτινοβόληση πραγματοποιείται μέτρηση του ρυθμού δόσης με την βοήθεια φορητού δοσιμέτρου (Condenser r-meter της εταιρίας Victoreen), που τοποθετείται στο σημείο που θα ακτινοβοληθούν τα δείγματα.

Μετά από βαθμονόμηση της πηγής, η οποία πραγματοποιήθηκε από τη Δρ. Γ. Τερζούδη (ΕΚΕΦΕ «Δ») υπολογίστηκε ο χρόνος έκθεσης των κυττάρων, ώστε να δεχθούν δόση 1Gy. Ο χρόνος αυτός είναι 1,5 min.

7.5. Μέθοδος παρασκευής δειγμάτων για κυτταρογενετική ανάλυση

Για την κυτταρογενετική ανάλυση κάποιου δείγματος απαιτείται η συλλογή κυττάρων που βρίσκονται στη μετάφαση και η επεξεργασία τους κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να καθίσταται τελικά δυνατή η παρατήρηση και μελέτη χρωμοσωματικών αλλοιώσεων στο μικροσκόπιο. Η διαδικασία που ακολουθείται για το σκοπό αυτό είναι η εξής:

Συλλογή των μεταφάσεων

Για να πετύχουμε τη συλλογή των μεταφάσεων, επωάζουμε τα κύτταρα σε διάλυμα κολσεμιδίου (colcemid, ή κολχικίνη). Η ένωση αυτή, έχει την ιδιότητα να αναστέλλει τον πολυμερισμό της τουμπουλίνης, οπότε και να εμποδίζει το σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου [3.1.2] κατά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Με τον τρόπο αυτόν, η κυτταρική διαίρεση όλων των κυττάρων σταματά στη μετάφαση. Όμως, ο κυτταρικός πληθυσμός σε μια φιάλη δεν είναι συγχρονισμένος ως προς τη φάση του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκεται κάθε κύτταρο. Οπότε, κρίνεται σκόπιμο να δώσουμε στα κύτταρα το χρονικό περιθώριο να 'προλάβουν' να φτάσουν στη μετάφαση.

Έτσι, προσθέτουμε στις φιάλες καλλιέργειας των κυττάρων 5μL κολσεμίδιο ανά 5mL φρέσκου καλλιεργητικού μέσου και τοποθετούμε τις φιάλες σε επωαστικό κλίβανο με θερμοκρασία 37°C παρουσία CO_2 σε συγκέντρωση 5% για 1 ώρα και 30 λεπτά. Στη συνέχεια μεταφέρουμε τις φιάλες στο θάλαμο κάθετης νηματικής ροής προκειμένου να συλλέξουμε τα κύτταρα και άρα τις 'μεταφάσεις'. Αφαιρούμε, λοιπόν, το θρεπτικό μέσο και ξεπλένουμε με διάλυμα PBS, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν ίχνη ορού, καθώς αυτά θα απενεργοποιούσαν τη δράση της θρυψίνης που

προστίθεται αμέσως μετά. Προσθέτουμε 2mL διαλύματος θρυψίνης/EDTA ανά φιάλη και επανατοποθετούμε τις φιάλες στον κλίβανο για να επέλθει η αποκόλληση τους. Η πορεία της αποκόλλησης των κυττάρων ελέγχεται στο μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης. Όταν η αποκόλληση ολοκληρωθεί, συλλέγουμε τα κύτταρα και τα τοποθετούμε σε tubes φυγοκέντρησης.

Υποτονικό σοκ

Προσθέτουμε στο δείγμα διάλυμα KCl συγκέντρωσης 0,75M,το οποίο προκαλεί διόγκωση των κυττάρων, λόγω της διαφοράς στην ωσμωτική πίεση μεταξύ του ενδο- και εξωκυττάριου χώρου. Τα κύτταρα υφίστανται, λοιπόν, υποτονικό σοκ και για να εξισώσουν τις διαφορετικές πιέσεις συλλαμβάνουν νερό με τη βοήθεια της ημιδιαπερατής τους μεμβράνης.

Το δείγμα φυγοκεντρείται σε 500g για 7min. Ακολουθεί απόχυση του υπερκείμενου και επαναιώρηση των κυττάρων σε υποτονικό γι' αυτά διάλυμα KCl συγκέντρωσης 0,75M.

Μονιμοποίηση του δείγματος

Μετά το πέρας του υποτονικού σοκ το δείγμα φυγοκεντρείται ξανά (σε 500g για 7min). Αποχύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε στο tube φυγοκέντρησης σταγόνες μονιμοποιητή (fixative) μέχρι αυτό να γεμίσει. Για τη μονιμοποίηση του δείγματος χρησιμοποιήθηκε ως μονιμοποιητής παγωμένο διάλυμα Μεθανόλης-Οξικού οξέος σε αναλογία 3:1.

Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 7min σε 500g και απόχυση του υπερκείμενου. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται συνολικά 2 φορές. Μετά την τελευταία απόχυση το ίζημα επαναιωρείται σε 3-5 σταγόνες μονιμοποιητή, προκειμένου να μικρύνει η συγκέντρωση των κυττάρων στο δείγμα.

Επίστρωση των παρασκευασμάτων σε αντικειμενοφόρους πλάκες

Για την επίστρωση των παρασκευασμάτων σε αντικειμενοφόρους πλάκες, αρχικά εμβαπτίζουμε την αντικειμενοφόρο πλάκα σε υπερκαθαρό νερό και στη συνέχεια τοποθετούμε πάνω σε αυτή 2 σταγόνες των 20μL (η κάθε μία) από το εναιώρημα. Οι επιστρωμένες με το παρασκεύασμα πια πλάκες αφήνονται να στεγνώσουν στον αέρα.

Χρώση των παρασκευασμάτων

Για την παρατήρηση και τον ευκρινή προσδιορισμό στο μικροσκόπιο πιθανών αλλοιώσεων στα χρωμοσώματα, προβαίνουμε σε χρώση των χρωμοσωματικών παρασκευασμάτων σε διάλυμα χρώσης Giemsa. Χρησιμοποιούμε το φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα Sörensen (0,06M pH6,5) και προσθέτουμε σε αυτό και σε

συγκέντρωση 2%V/V τη φωτοευαίσθητη χρωστική Giemsa, η οποία δεσμεύεται στις πρωτεΐνες των χρωματίδων και των πυρήνων.

Η διαδικασία που ακολουθείται για τη χρώση των παρασκευασμάτων είναι η εξής: εμβαπτίζουμε τις αντικειμενοφόρους πλάκες στο διάλυμα της χρωστικής για 7 λεπτά, ξεπλένουμε τις πλάκες κι από τις δύο πλευρές -αρχικά με τρεχούμενο και έπειτα με υπερκαθαρό νερό- και αφήνουμε τα παρασκευάσματα να στεγνώσουν στον αέρα. Όταν τα δείγματα στεγνώσουν καλά, προσκολλάται στην αντικειμενοφόρο πλάκα μια καλυπτρίδα (με χρήση δύο σταγόνων κόλλας Entellan New). Τα δείγματα είναι πλέον έτοιμα για παρατήρηση και ανάλυση στο μικροσκόπιο.

Ανάλυση στο μικροσκόπιο

Η κυτταρογενετική ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιείται στο οπτικό μικροσκόπιο. Κατά την παρατήρηση των αντικειμενοφόρων πλακών, σαρώνουμε μεταφάσεις και τις αποθηκεύουμε στον ηλεκτρονικό υπολογιστή. Η επεξεργασία των μεταφάσεων διευκολύνεται με χρήση του προγράμματος Ikaros.

7.6. Πειραματική διαδικασία μέτρησης του δείκτη ακτινοευαισθησίας (RP)

Στην παρούσα εργασία μετρήθηκε ο δείκτης ακτινοευαισθησίας της καρκινικής κυτταρικής σειράς A431, τόσο παρουσία, όσο και απουσία του παραγώγου *N-{4-[(3-βρωμοφαινυλ)αμινο]-κιναζολιν-6-υλ}-2-χλωροακεταμίδιο* (ένωση Γ).

Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε απόψυξη κυττάρων της καρκινικής σειράς, σπορά τους σε μία μεγάλη φιάλη κυτταροκαλλιέργειας με 30mL θρεπτικό υλικό, και επώασή τους στον κλίβανο για 24 ώρες. Στη συνέχεια, η αρχική φιάλη διαχωρίστηκε σε 24 μικρές φιάλες με τη μέθοδο της ανακαλλιέργειας. Από αυτές, 12 φιάλες θα χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό του RP των κυττάρων A431 παρουσία της ένωσης Γ και 12 για τον υπολογισμό του RP των κυττάρων χωρίς προσθήκη της ένωσης.

Έτσι, στις 12 φιάλες καλλιέργειας προσθέτουμε το κιναζολινικό παράγωγο Γ στη συγκέντρωση όπου αναστέλλεται το 50% της κυτταρικής επιβίωσης. Από πειράματα της Δρ Α. Μπούρκουλα (ΕΚΕΦΕ «Δ») γνωρίζουμε ότι η τιμή IC_{50} για την αναστολή της κυτταρικής επιβίωσης είναι (0,65 ± 0,5)μM. Τα κύτταρα τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο σε θερμοκρασία 37°C παρουσία CO_2 σε συγκέντρωση 5% και μετά από 24 ώρες προβαίνουμε σε αλλαγή του θρεπτικού υλικού σε όλες τις φιάλες.

Ακολουθεί η ακτινοβόληση των καλλιεργειών. Ακτινοβολούμε 6 από τις φιάλες που περιέχουν το παράγωγο και άλλες 6 από αυτές που δεν υπέστησαν προσθήκη του παραγώγου. Οι φιάλες που δε χρήζουν ακτινοβόλησης μεταφέρονται μαζί με τις υπόλοιπες στο σημείο της ακτινοβόλησης, καθώς επιδιώκουμε ίδιες συνθήκες περιβάλλοντος για όλα τα δείγματα. Η ακτινοβόληση πραγματοποιήθηκε με ραδιενεργό πηγή ^{60}Co και η δόση της ακτινοβολίας ήταν 1Gy.

Αμέσως μετά την ακτινοβόληση, τα δείγματα μεταφέρονται στο θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, ώστε να προστεθεί σε κάποια από αυτά ποσότητα καφεΐνης. Προσθέτουμε 200μL καφεΐνης ανά 5mL καλλιέργειας στις φιάλες που είναι απαραίτητο, δηλαδή σε 3 από τις 6 φιάλες καθενός από τα 4 είδη καλλιεργειών που έχουν δημιουργηθεί (κύτταρα A431, ακτινοβολημένα κύτταρα A431, επωασμένα στο παράγωγο Γ κύτταρα A431 και επωασμένα στο παράγωγο Γ και ακτινοβολημένα κύτταρα A431). Με τον τρόπο αυτό, δημιουργούμε τα εξής 8 είδη δειγμάτων κυτταρικών καλλιεργειών A431:

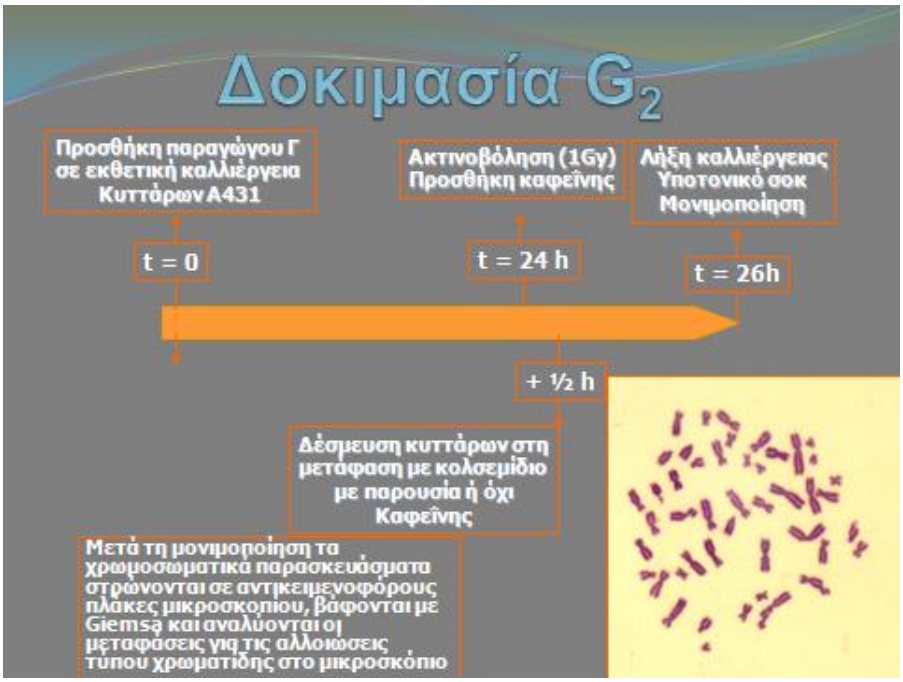
κύτταρα A431 (*A431*)	κύτταρα A431 παρουσία καφεΐνης (*A431* **+ *Caff***)
ακτινοβολημένα κύτταρα A431 (*A431 + 1Gy*)	ακτινοβολημένα κύτταρα A431 παρουσία καφεΐνης (*A431 + 1Gy* **+ *Caff***)
επωασμένα στο παράγωγο Γ κύτταρα A431 (*A431* **+ *Γ***)	επωασμένα στο παράγωγο Γ κύτταρα A431 παρουσία καφεΐνης (*A431* **+ *Γ* + *Caff***)
επωασμένα στο παράγωγο Γ και ακτινοβολημένα κύτταρα A431 (*A431* **+ *Γ*** *+ 1Gy*)	επωασμένα στο παράγωγο Γ και ακτινοβολημένα κύτταρα A431 παρουσία καφεΐνης (*A431* **+ *Γ*** *+ 1Gy* **+ *Caff***)

Σε κάθε είδος καλλιέργειας διαθέτουμε τρεις φιάλες, οι οποίες ονομάζονται *καλλιέργεια A*, *B* και *C*.

Οι 24 καλλιέργειες τοποθετούνται στον κλίβανο επώασης για 30 λεπτά. Έπειτα προσθέτουμε σε αυτές 5μL κολσεμίδιου ανά 5mL θρεπτικού υλικού, επωάζουμε τα κύτταρα για άλλη 1ώρα και 30 λεπτά στους 37°C παρουσία 5% CO_2,

αποκολλούμε τα κύτταρα από τις φιάλες με τη βοήθεια θρυψίνης/EDTA και τα φυγοκεντρούμε προκειμένου να συλλέξουμε τις μεταφάσεις.

Θα ακολουθήσει το υποτονικό σοκ των κυττάρων, η μονιμοποίηση των δειγμάτων, η επίστρωση των παρασκευασμάτων σε αντικειμενοφόρους πλάκες, η χρώση τους καθώς και τελικά η κυτταρογενετική ανάλυση των μεταφάσεων στο οπτικό μικροσκόπιο.



Εικόνα 7-3: *Σχηματική αναπαράσταση της Μεθόδου μέτρησης της G2-χρωμοσωματικής ευαισθησίας της καρκινικής σειράς A431 παρουσία ή απουσία του κιναζολινικού παραγώγου Γ.*

Στο μικροσκόπιο, μελετάμε -με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή και του προγράμματος Ikaros- 20 μεταφάσεις από κάθε φιάλη καλλιέργειας του ίδιου δείγματος κυττάρων (*A*, *B* και *C*), άρα 60 μεταφάσεις για καθένα από τα 8 είδη δειγμάτων κυτταροκαλλιεργειών που έχουμε δημιουργήσει. Η μελέτη των μεταφάσεων έγκειται στη μέτρηση των χρωματιδικών αλλοιώσεων (θραύσεις και ασυνέχειες χρωματίδων), η οποία, όπως προαναφέρθηκε, πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τα κριτήρια κατά Sanford (20), ενώ λήφθηκαν υπ' όψιν τα θραύσματα και όσες από τις ασυνέχειες χρωματίδης ήταν μεγαλύτερες από το πάχος της ίδιας της χρωματίδης.

Κατά τη μέτρηση, όμως, των αλλοιώσεων στις μεταφάσεις των κυττάρων παρατηρούμε πως δεν είναι πάντα σταθερός ο αριθμός των χρωμοσωμάτων ανά μετάφαση. Κι αυτό, γιατί οι καρκινικές κυτταρικές σειρές είναι πολυκλωνικές και κάθε κλώνος τους είναι δυνατό να διαθέτει διαφορετικό αριθμό χρωμοσωμάτων.

Για την αξιοποίηση, λοιπόν, των μετρήσεων, θα πρέπει να γίνει αναγωγή του μετρηθέντος αριθμού χρωματιδικών αλλοιώσεων ανά κύτταρο στον αντίστοιχο αριθμό αλλοιώσεων μιας μετάφασης συγκεκριμένου αριθμού χρωμοσωμάτων (μετάφαση αναφοράς). Επιπλέον, και λόγω του γεγονότος ότι η παρούσα εργασία εντάσσεται στα πλαίσια μιας ευρύτερης μελέτης που γίνεται στο Ι/Ρ-ΡΠ του ΕΚΕΦΕ «Δ» σε σχέση με τη δράση κιναζολινικών παραγώγων στην ακτινοευαισθητοποίηση κυττάρων, κρίνεται απαραίτητο τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας να είναι συγκρίσιμα με αποτελέσματα άλλων μελετών που αφορούν την ακτινοευαισθητοποίηση των κυττάρων Α431. Για τους λόγους αυτούς, και με βάση την επεξεργασία των μετρήσεων που έχει πραγματοποιηθεί σε προηγηθείσες μελέτες του ΕΚΕΦΕ «Δ» (37), επιλέγεται ως μετάφαση αναφοράς μια μετάφαση 59 χρωμοσωμάτων.

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ G_2

Η μέση τιμή των χρωματιδικών αλλοιώσεων ανά μετάφαση 59 χρωμοσωμάτων για καθένα από τα διαφορετικά δείγματα παρουσιάζεται, μαζί με το σφάλμα που υπολογίστηκε για αυτή, στον πίνακα που ακολουθεί [Πίνακας 8-1].

Πίνακας 8-1: *Μέση τιμή χρωματιδικών αλλοιώσεων ανά κύτταρο 59 χρωμοσωμάτων για διαφορετικά δείγματα. Στον πίνακα, συμβολίζονται A431: η καρκινική κυτταρική σειρά, +Γ: η προσθήκη του κιναζολινικού παραγώγου Γ, +1Gy: η χορήγηση ακτινοβολίας δόσης 1Gy, w/o Caff: η απουσία καφεΐνης, +Caff: η παρουσία καφεΐνης.*

Δείγμα	**Χρωματιδικές αλλοιώσεις / κύτταρο**	
	w/o Caff	***+ Caff***
A431 **+ *Γ***	0.16 ± 0.09	0.45 ± 0.29
A431 + 1Gy	2.80 ± 1.24	11.42 ± 1.87
A431 **+ *Γ*** *+ 1Gy*	5.42 ± 1.49	11.95 ± 1.92

Στη συνέχεια παρατίθενται ραβδογράμματα [Σχήμα 8-1] των παραπάνω αποτελεσμάτων που διευκολύνουν τη συγκριτική μελέτη τους.

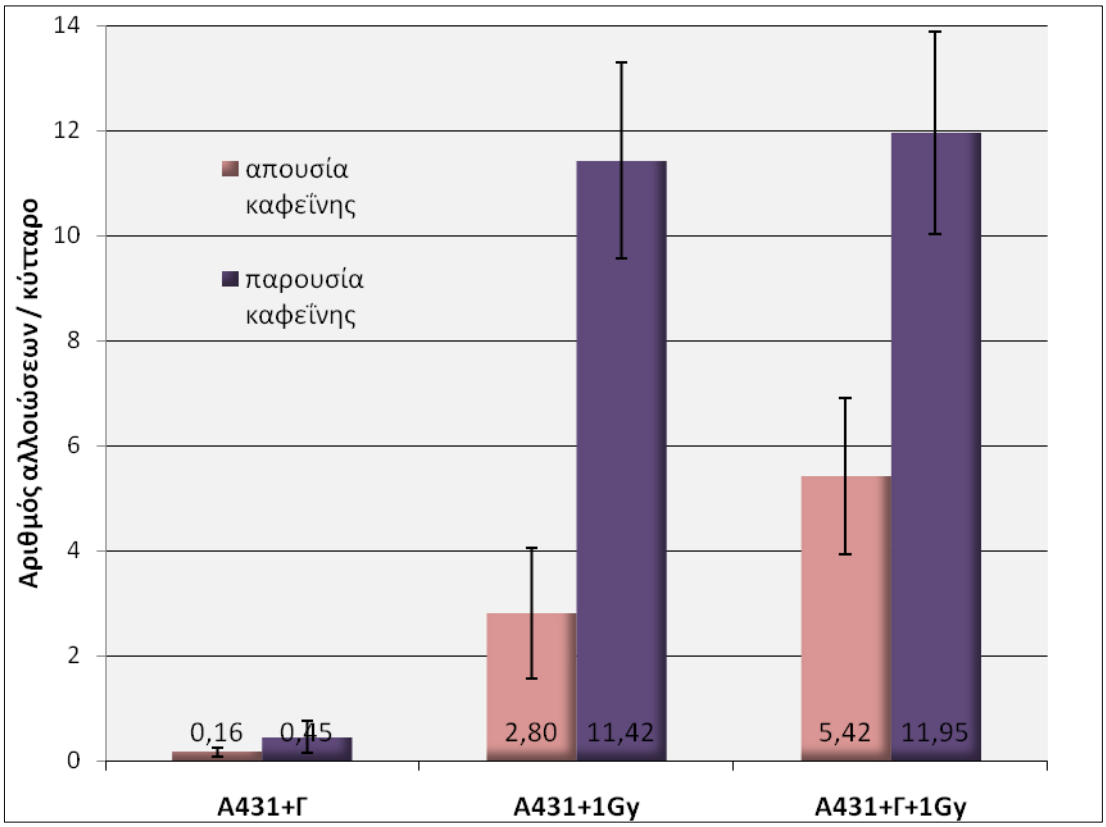
Όπως αναπτύχθηκε σε σχετική ενότητα [4.4], ο δείκτης ακτινοευαισθησίας προσδιορίζεται από τη διαφορά του αριθμού χρωματιδικών αλλοιώσεων ανά κύτταρο σε καλλιέργειες απουσία καφεΐνης από τον αντίστοιχο αριθμό σε καλλιέργειες παρουσία καφεΐνης.

Αξιοποιώντας, λοιπόν, τις μετρήσεις του Πίνακα 8.1 που αφορούν ακτινοβοληθέντα δείγματα, θα προσδιορίσουμε το δείκτη ακτινοευαισθησίας. Συγκεκριμένα,

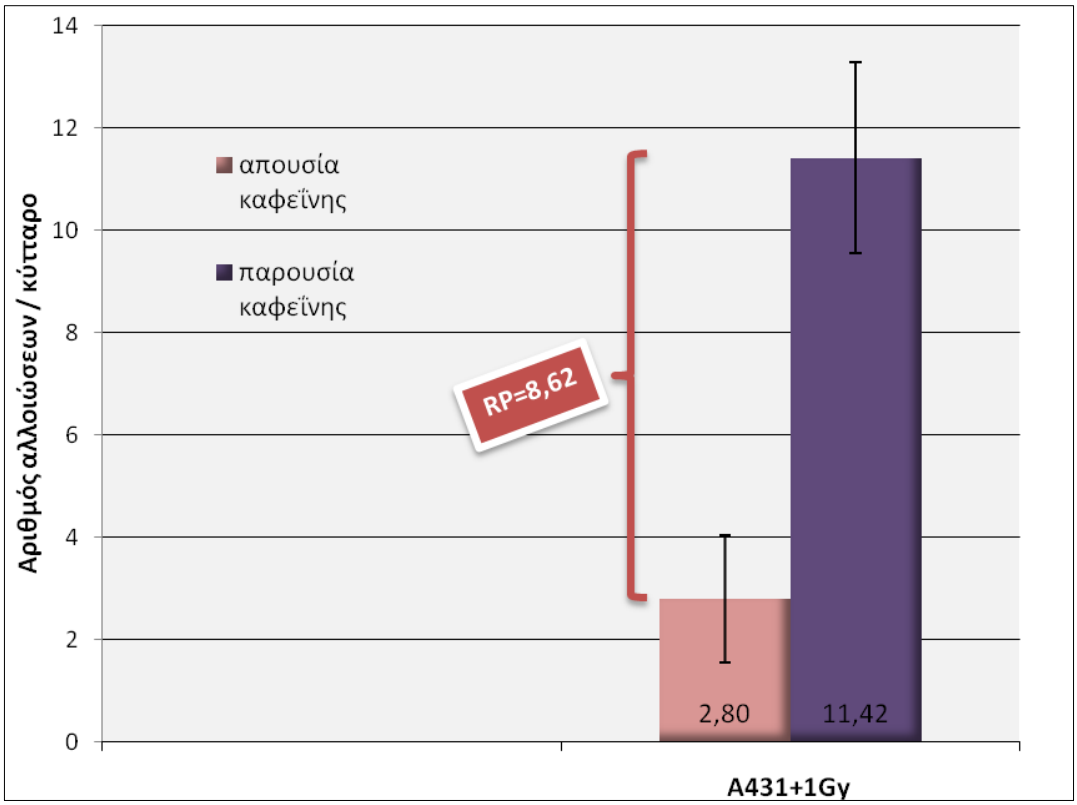
- όπως φαίνεται και στο Σχήμα 8-2, ο δείκτης ακτινοευαισθησίας της καρκινικής κυτταρικής σειράς A431 είναι περίπου 8.6. Η τιμή αυτή επιβεβαιώνεται και

από προηγούμενες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στο ΕΚΕΦΕ «Δ» για τη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά (37).

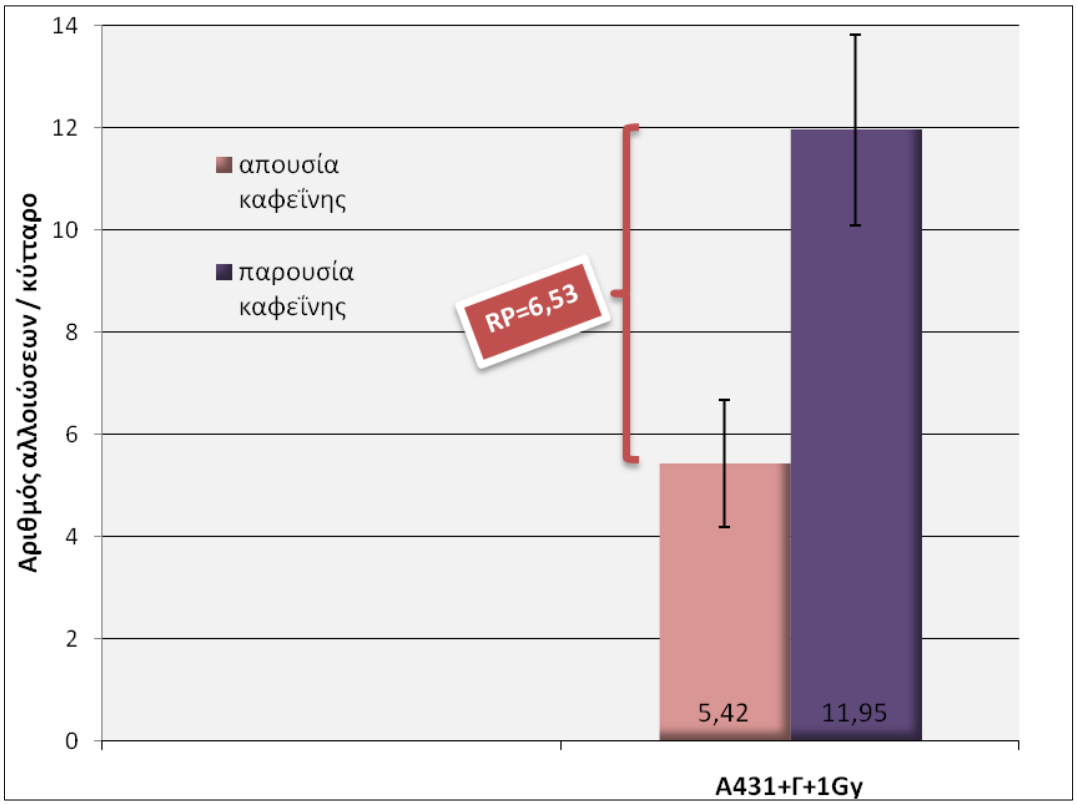
- στο Σχήμα 8-3, παρουσιάζεται ο δείκτης ακτινοευαισθησίας της καρκινικής κυτταρικής σειράς A431 παρουσία του κιναζολινικού παραγώγου Γ, για τον οποίο προκύπτει τιμή περίπου ίση με 6.5.



Σχήμα 8-1: *Αριθμός χρωματιδικών αλλοιώσεων ανά κύτταρο στα δείγματα A431+Γ, A431+1Gy, A431+Γ+1Gy.*



Σχήμα 8-2: *Δείκτης ακτινοευαισθησίας της κυτταρικής σειράς Α431.*



Σχήμα 8-3: *Δείκτης ακτινοευαισθησίας της κυτταρικής σειράς Α431 παρουσία του παραγώγου Γ.*

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

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

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η δράση του κιναζολινικού παραγώγου *N-{4-[(3-βρωμοφαινυλ)αμινο]-κιναζολιν-6-υλ}-2-χλωροακεταμίδιο* (ένωση **Γ**) στην ακτινοευαισθησία κυττάρων Α431.

Για το σκοπό αυτό, με βάση τη μέθοδο μέτρησης της G_2-χρωμοσωματικής ευαισθησίας ακτινοβολήσαμε τα κύτταρα με δόση 1Gy και μετρήσαμε τον **αριθμό των χρωματιδικών αλλοιώσεων ανά κύτταρο** παρουσία και απουσία του παραγώγου **Γ**.

Κατά την ανάλυση των μεταφάσεων στο μικροσκόπιο, λόγω της δυσκολίας που συναντήσαμε στην εύρεση μεταφάσεων, μετρήσαμε το **μιτωτικό δείκτη** (Πίνακας 9-1), δηλαδή τον αριθμό των μεταφάσεων ανά 100 κύτταρα. Βρήκαμε ότι ο δείκτης αυτός είναι πολύ μικρός στην περίπτωση παρουσίας του παραγώγου **Γ**, γεγονός που δυσχέρανε την πειραματική διαδικασία. Για να προσδιοριστεί η αιτία που προκαλεί αυτό το φαινόμενο πρέπει να μελετηθεί η δράση του παραγώγου στον κυτταρικό κύκλο με κυτταρομετρία ροής. Η κυτταρομετρία ροής είναι μία μέθοδος που μας επιτρέπει να δούμε την κατανομή των κυττάρων ενός κυτταρικού πληθυσμού στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Παρουσία καφεΐνης δεν παρατηρήθηκε το φαινόμενο του μικρού μιτωτικού δείκτη παρουσία του παραγώγου **Γ**.

Πίνακας 9-1: *Μιτωτικός δείκτης των παρασκευασμάτων.*

Δείγμα	**Μιτωτικός Δείκτης (%)**	
	w/o Caff	***+ Caff***
A431	1.3	3.8
A431 **+ *Γ***	**0.1**	0.7
A431 **+ *Γ*** *+ 1Gy*	**0.1**	1.8

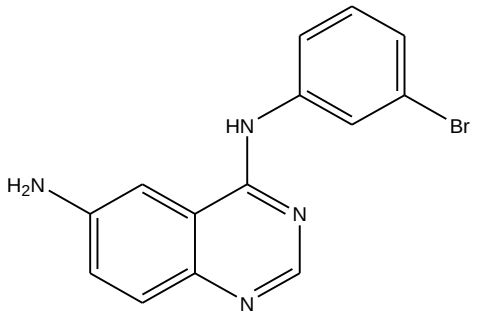
Από το Σχήμα 8-1 βλέπουμε πως

- παρουσία καφεΐνης εμφανίζονται περισσότερες αλλοιώσεις ανά κύτταρο, απ' ότι απουσία καφεΐνης. Η παρατήρηση αυτή σχετίζεται με το γεγονός ότι η καφεΐνη αναστέλλει το μπλοκ της G_2 και μας δίνει μια ένδειξη για τον αριθμό των αλλοιώσεων που επάγει στα κύτταρα η ακτινοβολία. Απουσία καφεΐνης λαμβάνουμε τον αριθμό των αλλοιώσεων ανά κύτταρο που έφτασαν στη μίτωση μετά από τη δράση των επιδιορθωτικών μηχανισμών κατά το μπλοκ της G_2.
- σε κύτταρα που δεν έχουν υποστεί την επίδραση ακτινοβολίας, ο αριθμός χρωματιδικών αλλοιώσεων ανά κύτταρο είναι ιδιαιτέρως μικρός, γεγονός που σημαίνει ότι το παράγωγο δεν είναι κλαστογόνο, δηλαδή πως η παρουσία του δεν επάγει αλλοιώσεις στο γενετικό υλικό των κυττάρων. Αντίθετα, βλέπουμε πως η ακτινοβολία επάγει -όπως είναι αναμενόμενο- αλλοιώσεις στα κύτταρα.
- *απουσία καφεΐνης* επάγονται περισσότερες αλλοιώσεις ανά κύτταρο παρουσία του παραγώγου **Γ** από ότι απουσία του. Στις κλασικές μεθόδους μέτρησης της G2-χρωμοσωματικής ακτινοευαισθησίας, αποφαινόμαστε για την ακτινοευαισθησία κυττάρων συγκρίνοντας τον αριθμό χρωματιδικών αλλοιώσεων που επάγει στο γενετικό υλικό των κυττάρων τους η συνδυαστική δράση ακτινοβολίας και παραγώγου με τον αντίστοιχο αριθμό αλλοιώσεων που επάγει η δράση ακτινοβολίας απουσία του παραγώγου. Βλέπουμε ότι η διαφορά στον αριθμό των αλλοιώσεων ανά κύτταρο μεταξύ των δύο δειγμάτων καλλιεργειών που προαναφέρθηκαν **δεν είναι στατιστικά σημαντική**. Η επιλογή μεγαλύτερου δείγματος κατά τη διεξαγωγή του πειράματος θα έδινε ίσως σαφέστερα αποτελέσματα για το πόσο σημαντική είναι στατιστικά η αύξηση του αριθμού των αλλοιώσεων παρουσία του παραγώγου.
- η τυπική απόκλιση του αριθμού χρωματιδικών αλλοιώσεων ανά κύτταρο είναι μεγάλη σε όλα τα δείγματα. Αυτός είναι άλλος ένας λόγος για τον οποίο ενδείκνυται η αύξηση του δείγματος στο μέλλον. Μάλιστα, οι ευρεθείσες τυπικές αποκλίσεις είναι μεγαλύτερες από αυτές που συναντώνται στην περίπτωση χρήσης της μεθόδου στα λεμφοκύτταρα. Αυτό ενδεχομένως οφείλεται στο γεγονός ότι τα λεμφοκύτταρα διαθέτουν 46 χρωμοσώματα, ενώ τα κύτταρα A431 είναι καρκινική σειρά και άρα ένας πολυκλωνικός πληθυσμός, όπου κάθε κλώνος έχει πολύ διαφορετικό αριθμό χρωμοσωμάτων από τους υπόλοιπους. Αυτό, όπως έχει ήδη ειπωθεί μας οδήγησε στην παραδοχή ότι όλα τα κύτταρα έχουν συγκεκριμένο αριθμό χρωμοσωμάτων, ίσο με το μέσο όρο χρωμοσωμάτων που μετρήθηκαν στις μελετηθείσες μεταφάσεις. Επιπλέον, τα κύτταρα ενός πολυκλωνικού πληθυσμού αναμένεται να έχουν ποικιλόμορφη απόκριση σε διάφορους παράγοντες. Άρα, τα

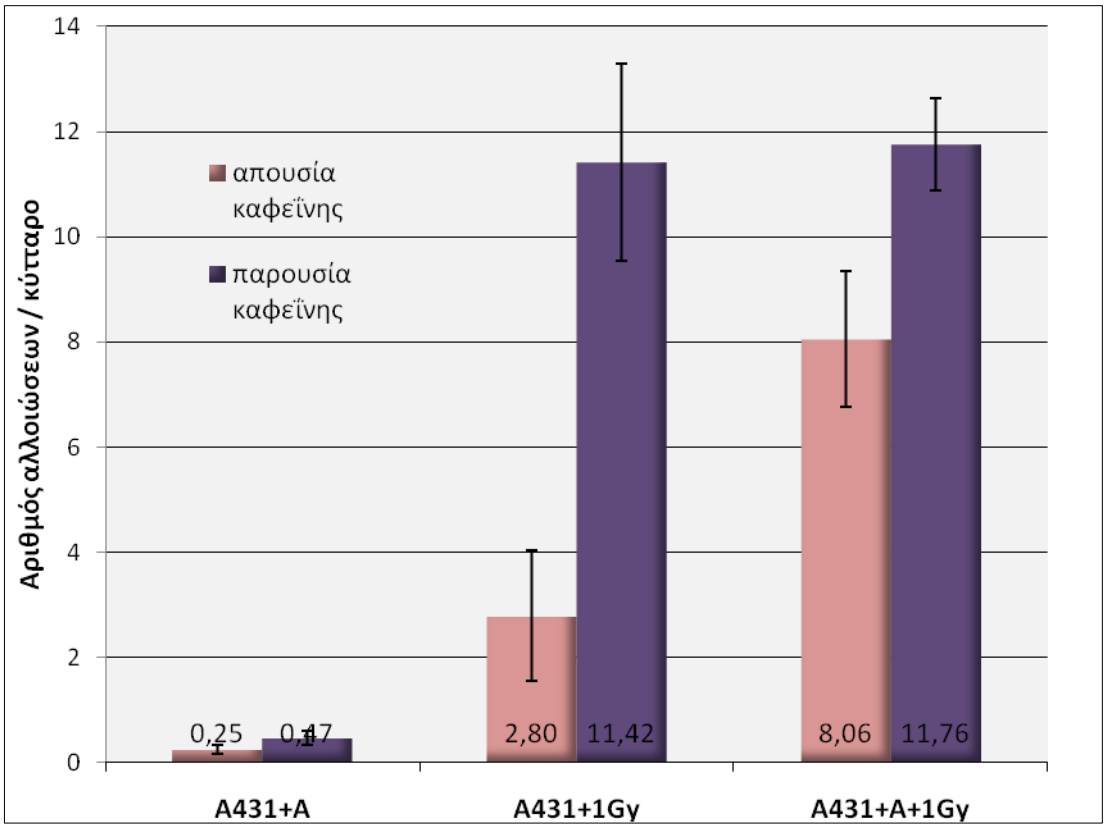
αποτελέσματά μας σχετίζονται με ένα γενικό 'προφίλ' της καρκινικής σειράς ως προς την απόκρισή της στους προς μελέτη παράγοντες, ενώ στην πραγματικότητα κάθε κλώνος της σειράς είναι δυνατό να συμπεριφέρεται με εντελώς διαφορετικό τρόπο.

Υπολογίζοντας το **δείκτη ακτινοευαισθησίας RP** της καρκινικής κυτταρικής σειράς A431 απουσία [Σχήμα 8-2] και παρουσία [Σχήμα 8-3] του παραγώγου **Γ**, έχουμε μια ένδειξη για αύξηση της ακτινοευαισθησίας που επάγει το παράγωγο στα κύτταρα. Αν επιχειρήσουμε να συγκρίνουμε τους υπολογισθέντες RP με την πρότυπη καμπύλη ακτινοευαισθησίας [Σχήμα 4-1], βλέπουμε πως ο RP της κυτταρικής σειράς βρίσκεται 'εκτός του πεδίου καμπύλης' (δηλαδή τα κύτταρα A431 φαίνεται να είναι πιο ακτινοάντοχα από αυτά που απεικονίζονται στην καμπύλη), ενώ η παρουσία του παραγώγου 'οδηγεί' την καρκινική σειρά 'εντός του πεδίου' της καμπύλης. Συνεπώς, δε μπορούμε να αποφανθούμε για το βαθμό ακτινοευαισθητοποίησης της κυτταρικής σειράς A431 που επάγει το παράγωγο **Γ** με βάση την πρότυπη καμπύλη ακτινοευαισθησίας. Αυτό συμβαίνει, γιατί η πρότυπη καμπύλη ακτινοευαισθησίας έχει κατασκευαστεί στα πλαίσια της εφαρμογής της μεθόδου G_2 στα λεμφοκύτταρα του ανθρώπινου πληθυσμού, χωρίς να υπάρχει κάποια πρόβλεψη για χρήση της σε πολυκλωνικούς πληθυσμούς και καρκινικές σειρές.

Στα πλαίσια της ευρύτερης μελέτης που διεξάγεται στο Ι/Ρ-ΡΠ του ΕΚΕΦΕ «Δ» σε σχέση με τη δράση κιναζολινικών παραγώγων στην ακτινοευαισθητοποίηση κυττάρων, μελετήθηκε από τη Μαρία Μπέλλα το κιναζολινικό παράγωγο *6-αμινο-4-[(3-βρωμοφαινυλ)αμινο]-κιναζολίνη* (στο εξής: *ένωση **Α***) για την πιθανή ακτινοευαισθητοποιό δράση του στα κύτταρα A431. Το παράγωγο αυτό δεσμεύεται αντιστρεπτά στον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα των κυττάρων (EGFR). Η δομή του παρουσιάζεται στο Σχήμα 9-1 και τα αποτελέσματα της Μαρίας Μπέλλα απεικονισμένα με τη βοήθεια ραβδογραμμάτων στο Σχήμα 9-2.



Σχήμα 9-1: *Χημική δομή του παραγώγου Α.*



Σχήμα 9-2: *Αριθμός χρωματιδικών αλλοιώσεων ανά κύτταρο στα δείγματα A431+A, A431+1Gy, A431+A+1Gy.*

Από το Σχήμα 9-2 βλέπουμε πως όπως το παράγωγο **Γ**, έτσι και το **Α** δεν έχει κλαστογόνο επίδραση στο γενετικό υλικό των κυττάρων. Το παράγωγο **Α**, όμως, προκαλεί -σε αντίθεση με το **Γ**- στατιστικά σημαντική αύξηση του αριθμού των χρωματιδικών αλλοιώσεων ανά κύτταρο στην περίπτωση που προστίθεται σε ακτινοβολημένα κύτταρα σε σχέση με την περίπτωση απουσίας του. Με βάση τα δεδομένα αποτελέσματα [Σχήμα 9-2] είχε υποτεθεί πως ένας πιθανός **μηχανισμός δράσης του παραγώγου** που μπορεί να ενοχοποιηθεί γι' αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να είναι η αναστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού που σχετίζεται με τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου. Αυτό σημαίνει πως η ακτινοβολία ενεργοποιεί τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του κυττάρου μέσω ενός πυρηνικού μονοπατιού του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) κι έτσι το κύτταρο επιδιορθώνει κατά το μπλοκ της G_2 σημαντικό ποσοστό των αλλοιώσεων από αυτές που επάγει η ακτινοβολία, οπότε η καρκινική σειρά καθίσταται ακτινοάντοχη. Στην περίπτωση, όμως, που προσθέτουμε στα κύτταρα το παράγωγο πριν τα ακτινοβολήσουμε, αυτό δεσμεύεται στον υποδοχέα και αναστέλλει τη φωσφορυλίωση άρα και την ενεργοποίησή του με συνέπεια να αίρεται εν μέρει η

ενεργοποίηση των μηχανισμών επιδιόρθωσης. Έτσι, μειώνεται ο αριθμός των επιδιορθωθεισουσών αλλοιώσεων.

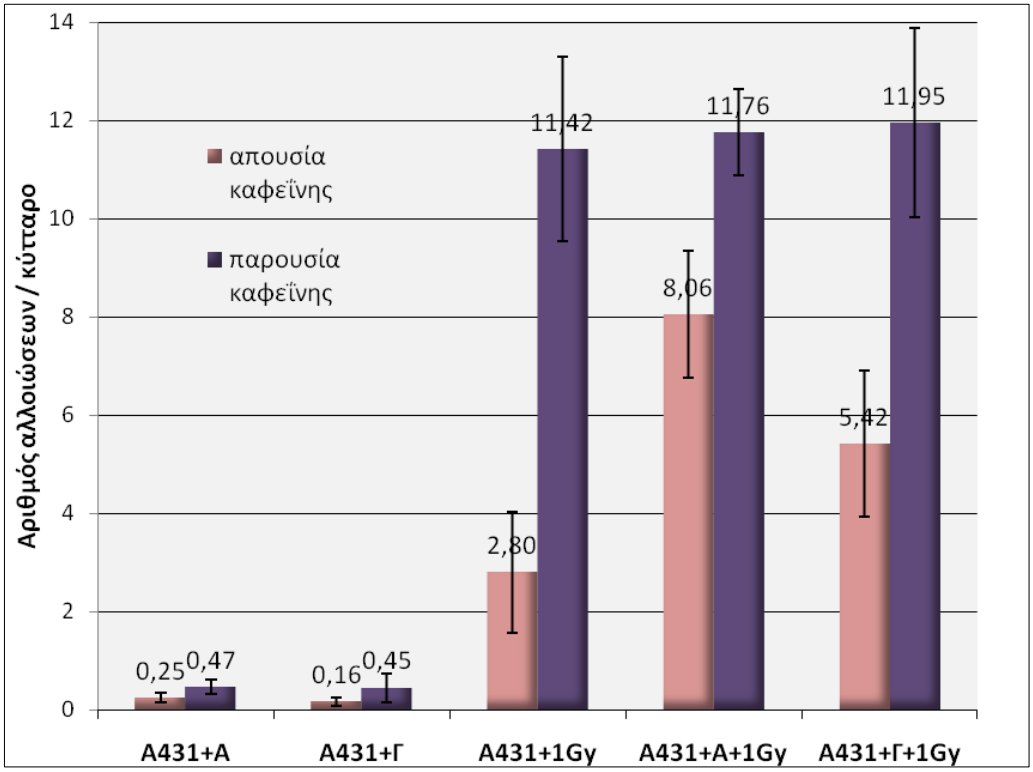
Εφ' όσον και για την περίπτωση του παραγώγου **Γ** αποδειχθεί -μετά από αύξηση του δείγματος- στατιστικά σημαντική η τάση αύξησης του αριθμού των αλλοιώσεων ανά κύτταρο παρουσία της συνδυαστικής δράσης αυτού και της ακτινοβολίας σε σχέση με τον αριθμό αλλοιώσεων απουσία του παραγώγου, μπορούμε να υποθέσουμε πως ίσως και αυτό το παράγωγο δρα με τον προαναφερθέν τρόπο.

Στην περίπτωση των καλλιεργειών *παρουσία καφεΐνης*, δεν είναι δυνατή κάποια αντίστοιχη παρατήρηση, καθώς -όπως προαναφέρθηκε- η καφεΐνη άρει την αναμονή των κυττάρων στο σημείο ελέγχου πριν τη μίτωση, οπότε τα κύτταρα δε σταματούν την κίνηση της χρωματίνης, ώστε να είναι αποτελεσματικοί οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης και να είναι εμφανές το αποτέλεσμα της δράσης των παραγώγων στους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου.

Στα ραβδογράμματα του Σχήματος 9-3 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα για τα παράγωγα **Α** και **Γ**. Όπως βλέπουμε, το παράγωγο Γ επάγει μικρότερο αριθμό αλλοιώσεων ανά ακτινοβολημένο κύτταρο σε σχέση με το παράγωγο Α, αν και κατά το σχεδιασμό του πειράματος αναμέναμε το αντίθετο. Κι αυτό, γιατί το παράγωγο Α δεσμεύεται στον υποδοχέα αντιστρεπτά, ενώ το Γ μη αντιστρεπτά. Αυτή η συμπεριφορά των δύο παραγώγων είναι δυνατόν να οφείλεται σε διαφορετική κινητική των μορίων τους. Μπορεί, όμως, να σχετίζεται με το γεγονός ότι τα δύο παράγωγα δε χρησιμοποιήθηκαν στην ίδια συγκέντρωση κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

Αυτό συνέβη, επειδή επιλέχθηκε η προσθήκη των παραγώγων στις κυτταροκαλλιέργειες στη συγκέντρωση που αυτά αναστέλλουν το 50% της κυτταρικής επιβίωσης, καθώς οι συγκεντρώσεις αυτές σχετίζονται με τις δόσεις των φαρμάκων που χορηγούνται στους ασθενείς. Τα δύο κιναζολινικά παράγωγα διαφέρουν πολύ ως προς τον δείκτη αυτό (κυτταροτοξικότητα). Συγκεκριμένα, το Γ αναστέλλει κατά 50% την κυτταρική επιβίωση -και άρα χρησιμοποιήθηκε- σε συγκέντρωση 0,65μΜ, ενώ το Α σε συγκέντρωση 4,8μΜ. Συστήνεται, λοιπόν, η επανάληψη του πειράματος με χρήση των δύο παραγώγων στην ίδια συγκέντρωση.

Με δεδομένο πως η δόση του φαρμάκου που χορηγείται στους ασθενείς για χημειοθεραπευτική χρήση καθορίζεται από την κυτταροτοξικότητά του (κυτταροστατική δράση), δεν είναι απαραίτητο η συγκέντρωση βέλτιστης κυτταροτοξικότητας των παραγώγων να είναι ταυτόχρονα και η συγκέντρωση στην οποία τα παράγωγα έχουν τη βέλτιστη ακτινοευαισθητοποιό τους δράση.



Σχήμα 9-3: *Αριθμός χρωματιδικών αλλοιώσεων ανά κύτταρο στα διάφορα δείγματα.*

Κρίνεται, λοιπόν, αναγκαία η επανάληψη του πειράματος και σε διαφορετική δοσολογία. Επιπλέον, απαιτείται μελέτη της δράσης των μηχανισμών επιδιόρθωσης σε μοριακό επίπεδο. Μελλοντικά, θα μελετηθούν ακόμα ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η απαγωγή της απόπτωσης, που είναι και το επιθυμητό αποτέλεσμα της ακτινοθεραπείας, καθώς η ακτινοευαισθησία εξαρτάται και από αυτούς τους παράγοντες.

Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Προυκάκης, Χαράλαμπος Χ.** *Ιατρική Ακτινοφυσική.* Αθήνα : Παρισιάνου Α.Ε., 2004.

2. **Κυριάκος Ψαρράκος, Ε. Μολυβδά - Αθανασοπούλου, Άννα Γκοτζαμάνη - Ψαρράκου, Αναστάσιος Σιούντας.** *Ιατρική Φυσική.* Θεσσαλονίκη : University Studio Press, 2009.

3. **W. N. Cottingham, D. A. Greenwood.** *Εισαγωγή στην Πυρηνική Φυσική.* [μεταφρ.] Κ. Σαρηγιάννης. Αθήνα : τυπωθήτω, 2002.

4. **Γαζής, Ευάγγελος Ν.** *Ιοντίζουσες Ακτινοβολίες.* Αθήνα : Παπασωτηρίου, 2003.

5. **Παπαστεφάνου, Κων. Φ.** *Φυσική Ακτινοβολιών και Εφαρμογές Ραδιοϊσοτόπων.* Θεσσαλονίκη : Ζήτη, 2001.

6. **Γ. Τσακίρης, Ν. Θρουβαλας, Γ. Κυργιας.** *Ακτινοθεραπευτική Ογκολογία.* Αθήνα : Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, 2000.

7. **Μαργαρίτη, Λουκά Χ.** *Ραδιοβιολογία - Ακτινοβολίες και ζωή.* 1996.

8. **Γεωργίου, Ευάγγελος.** *Ιατρική Φυσική.* Αθήνα : Π.Χ.Πασχαλίδης, 2008.

9. **Αντώνης Βεργανελάκης, Παναγιώτης Κρητίδης, Λευτέρης Οικονόμου, Γιάννης Παπάζογλου, Ευθύμιος Παπανικολάου, Λευτέρης Σιδέρης, Θανάσης Σιμόπουλος.** *Εμείς και η Ραδιενέργεια.* Ηράκλειο : Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 1989.

10. **Πάρις Α. Κοσμίδης, Γεώργιος Τσακίρης.** *Ογκολογία - Ραδιοβιολογία.* Αθήνα : Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, 2003.

11. **Hall, E.J.** *Radiobiology for the Radiologist.* Philadelphia : J.B. Lippincott Company, 1988.

12. **Harnden D.G., Klinger H.P., Jensen J.T., Kaelbling M.** *An international system for Human Cytogenetic Nomenclature - Report of the Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature .* s.l. : Cytogenetics and Cell Genetics, 1985.

13. **Thomson M.W., Mcinnes R.R., Willard H.F.** *Ιατρική Γενετική.* Ηράκλειο : Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2001.

14. **Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.** *Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας - Εισαγωγή στη Μοριακή Βιολογία του κυττάρου.* Αθήνα : Π.Χ.Πασχαλίδης, 2000.

15. **Blume-Jensen, P. and Hunter, T.** Oncogenic kinase signalling. *Nature.* 2001, Τόμ. 411, σσ. 355-65.

16. **Roskoski, R., Jr.** The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004, Τόμ. 319, σσ. 1-11.

17. **Weinberg, Robert A.** *The Biology of Cancer.* s.l. : Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, 2007.

18. **Harrison LB, C.M., Hill RJ, Hu K, Shasha D.** Impact of tumor hypoxia and anemia on radiation therapy outcomes. *Oncologist.* 2002, Τόμ. 7, σσ. 492–508.

19. **Georgia I.Terzoudi, Vasiliki I. Hatzi, Katarzyna Barszczewska, Kalliopi N. Manola, Chryssa Stavropoulou, Philip Angelakis and Gabriel E. Pantelias.** G2 - checkpoint abrogation in irradiated lymphocytes: A new cytogenetic approach to assess individual radiosensitivity and predisposition to cancer. *International Journal of Oncology.* 2009, Τόμ. 35, σσ. 1223-1230.

20. **Sanford KK, Parshad R, Gannt R, Tarone RE, Jones GM and Price FM.** Factors affecting and significance of G2 chromatin radiosensitinity in predisposition to cancer. *Int J Radiat Biol.* 1989, Τόμ. 55, σσ. 963-81.

21. **Τριαντοπούλου, Ηρώ.** *Μελέτη της δράσης του παραγώγου N-{4-[(3-βρωμοφαινυλ)αμινο]-κιναζολιν-6-υλ}-2-χλωροακεταμίδιο στην ακτινοευαισθητοποίηση κυττάρων Α 431 με μεθόδους κυτταρογενετικής.* Αθήνα : s.n., 2009.

22. **Μαργαρίτης Λ.Χ., Γαλανόπουλος Β.Κ., Κεραμάρης Κ.Ε., Μαρίνος Ε.Σ., Παπασιδέρη Ι.Σ., Στραβοπόδης Δ.Ι., Τρουγκάκος Ι.Π.** *Βιολογία Κυττάρου.* Αθήνα : Λίτσας Ο.Ε., 2004.

23. **Bennasroune, A., Gardin, A., Aunis, D., Cremel, G. and Hubert, P.** Tyrosine kinase receptors as attractive targets of cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2004, Τόμ. 50, σσ. 23-38.

24. **Hunter, T.** The Croonian Lecture 1997. The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1988, Τόμ. 353, σσ. 583-605.

25. **Zandi, R., Larsen, A. B., Andersen, P., Stockhausen, M. T. and Poulsen, H. S.** Mechanisms for oncogenic activation of the epidermal growth factor receptor. *Cell Signal.* 2007, Τόμ. 19, σσ. 2013-23.

26. **Cohen, S., Ushiro, H., Stoscheck, C. and Chinkers, M.** A native 170,000 epidermal growth factor receptor-kinase complex from shed plasma membrane vesicles. *J Biol Chem.* 1982, Τόμ. 257, σσ. 1523-31.

27. **Roepstorff, K., Grovdal, L., Grandal, M., Lerdrup, M. and van Deurs, B.** Endocytic downregulation of ErbB receptors: mechanisms and relevance in cancer. *Histochem Cell Biol.* 2008, Τόμ. 129, σσ. 563-78.

28. **Abourbeh, G., Dissoki, S., Jacobson, O., Litchi, A., Ben Daniel, R., Laki, D., Levitzki, A. and Mishani, E.** Evaluation of radiolabeled ML04, a putative irreversible

inhibitor of epidermal growth factor receptor, as a bioprobe for PET imaging of EGFR-overexpressing tumors. *Nucl Med Biol.* 2007, Τόμ. 34, σσ. 55-70.

29. **Uberall, I., Kolar, Z., Trojanec, R., Berkovcova, J. and Hajduch, M.** The status and role of ErbB receptors in human cancer. *Exp Mol Pathol.* 2008, Τόμ. 84, σσ. 79-89.

30. **Imai, K. and Takaoka, A.** Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006, Τόμ. 6, σσ. 714-27.

31. **Dancey, J. and Sausville, E. A.** Issues and progress with protein kinase inhibitors for cancer treatment. *Nat Rev Drug Discov.* 2003, Τόμ. 2, σσ. 296-313.

32. **Levitzki, A. and Mishani, E.** Tyrphostins and other tyrosine kinase inhibitors. *Annu Rev Biochem.* 2006, Τόμ. 75, σσ. 93-109.

33. **Yoshimura, N., Kudoh, S., Kimura, T., Mitsuoka, S., Matsuura, K., Hirata, K., Matsui, K., Negoro, S., Nakagawa, K. and Fukuoka, M.** EKB-569, a new irreversible epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, with clinical activity in patients with non-small cell lung cancer with acquired resistance to gefitinib. *Lung Cancer.* 2006, Τόμ. 51, σσ. 363-8.

34. **Kwak, E. L., Sordella, R., Bell, D. W., Godin-Heymann, N., Okimoto, R. A., Brannigan, B. W., Harris, P. L., Driscoll, D. R., Fidias, P., Lynch, T. J., Rabindran, S. K., McGinnis, J. P., Wissner, A., Sharma, S. V., Isselbacher, K. J., Settleman, J. and Hab.** Irreversible inhibitors of the EGF receptor may circumvent acquired resistance to gefitinib. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005, Τόμ. 102, σσ. 7665-70.

35. **Βασίλειος Κ. Ζουμπουρλής, Σ.Σ.** Αδενοϊός Τροποποιημένος Μέσω Γενετικής Μηχανικής που θανατώνει Επιλεκτικά τα Καρκινικά Κύτταρα: Παρουσίαση Ενός Πολλά Υποσχόμενου Συστήματος Γονιδιακής θεραπείας. Φεβρουάριος 2001.

36. **R.R. Rodrigues, S.E. Grynberg, A.V. Ferreira, L.C.M. Belo and P.L. Squair.** Retrieval Of GammaCell 220 Irradiator Isodose CurvesWith MCNP Simulations And Experimental Measurements. βρες συγγραφείς στο yliko/Co 60/v40_120.pdf!!!!!!

37. **Μπέλλα, Μαρία.** *Επίδραση του κιναζολινικού παραγώγου 6-αμινο-4-[(3-βρωμοφαινυλ)αμινο]-κιναζολίνη στην ακτινοευαισθησία κυττάρων A431.* Αθήνα : s.n., 2010.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ τον Υπεύθυνο Καθ. κ. Θ. Αλεξόπουλο, καθώς επίσης τα μέλη της τριμελούς επιτροπής και 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 το Διευθυντή του Ινστιτούτου Ραδιοϊσοτόπων – Ραδιοδιαγνωστικών Προϊόντων του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» Δρ. Γ. Παντελιά που με προθυμία μου έδωσε τη δυνατότητα να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία στα πλαίσια του Ινστιτούτου.

Ευχαριστώ την Επιβλέπουσα Δρ. Μ. Παραβατού για την καθοδήγηση, την υπομονή, τη στήριξη και την ουσιαστική συμβολή της σε οτιδήποτε χρειάστηκε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας.

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

Ευχαριστώ την Katarzyna Barszczewska για τη συνεργασία και τη βοήθειά της κατά την εκμάθηση των τεχνικών του πειραματικού μέρους.

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

Ευχαριστώ τον Τάσο Μαγγέλη για τη φιλία του, την πολύτιμη συνεργασία και την άψογη συνεννόηση κατά την εκπόνηση αυτής της εργασίας.

Ευχαριστώ τους φίλους μου Βασιλική, Μαρίνα, Νικολίνα και Γιώργο που συνέβαλαν με το δικό τους τρόπο στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

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