



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΚΗΣ

Μελέτη της συστημικής δράσης της ιοντίζουσας
ακτινοβολίας μέσω ανίχνευσης σύνθετων
βλαβών DNA σε ιστούς ποντικών

Διπλωματική εργασία

Γιαννακανδροπούλου Σταυρούλα-Ισιδώρα

Επιβλέπων : Δρ. Αλέξανδρος Γεωργακίλας, Αναπλ. Καθ. Ε.Μ.Π

Αθήνα , 2017

Στον παλπού μου

Περίληψη

Η ιοντίζουσα ακτινοβολία επιδρά όχι μόνο στα ακτινοβολημένα κύτταρα δημιουργώντας άμεσα βλάβες στο DNA, αλλά επάγει και βλάβες σε σημεία απομακρυσμένα από την περιοχή ακτινοβόλησης. Οι ομαδοποιημένες ή αλλιώς σύνθετες βλάβες και κυρίως οι δίκλωνες θραύσεις του DNA (DSBs) είναι οι πιο επιβλαβείς επιπτώσεις της ακτινοβολίας στον οργανισμό και για αυτό η σωστή επιδιόρθωση τους είναι ζωτικής σημασίας για την εύρυθμη λειτουργία του κυττάρου. Ελλιπής ή ελαττωματική επιδιόρθωσή τους μπορεί να προκαλέσει διάφορες δυσμενείς καταστάσεις για το κύτταρο αλλά και εν γένει τον οργανισμό όπως γονιδιακές μεταλλάξεις, χρωμοσωμικές αλλοιώσεις και γενικότερα γενωμική αστάθεια που μπορεί να οδηγήσει ακόμη και σε καρκινογένεση. Οι σύνθετες αυτές βλάβες που μπορεί να αποτελούνται από DSBs και μη-δίκλωνες οξειδωτικές βλάβες (OCDLs: oxidatively-induced clustered DNA lesions) είναι πιο δύσκολο να επιδιορθωθούν σε σχέση με μία μεμονωμένη βλάβη καθώς οι πρώτες φαίνεται να είναι σύνθετες και εστιασμένες, ενώ π.χ. βλάβες από ενδογενές οξειδωτικό στρες, χημικούς, βιολογικούς παράγοντες είναι σχετικά πιο απλές. Ο τρόπος με τον οποίο επάγονται οι βλάβες αλλά και ο τρόπος με τον οποίο ενεργοποιούνται και λειτουργούν οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης είναι μια αρκετά πολύπλοκη διαδικασία. Για την εκτίμηση και την καλύτερη κατανόηση λοιπόν, των επαγόμενων συστημικών βλαβών, εξετάσαμε τα επίπεδα των σύνθετων βλαβών DNA σε δείγματα ιστού από την γλώσσα και το έντερο ποντικών που είχαν ακτινοβοληθεί με 10Gy στο πόδι με ακτίνες X. Όλα τα πειράματα ανάλυσης των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Υγειοφυσικής του Ινστιτούτου Πυρηνικών και Ραδιολογικών Επιστημών και Τεχνολογίας, Ενέργειας και Ασφάλειας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» (Υπεύθυνη Δρ. Γ. Τερζούδη) σε συνεργασία με το Εργαστήριο Βλαβών DNA στο ΕΜΠ (Υπεύθυνος Αναπλ. Καθ. Α. Γεωργακίλας). Όλα τα δείγματα DNA προήλθαν από υγιή ποντίκια που ακτινοβολήθηκαν στο εργαστήριο της Δρ. Όλγα Μάρτιν (Dr. Olga Martin), Peter McCallum Institute, Μελβούρνη, Αυστραλίας. Η μέθοδος που χρησιμοποιήσαμε βασίζεται στην ηλεκτροφόρηση των DNA δειγμάτων μέσα σε πήκτωμα αγαρόζης. Για την πραγματοποίηση του πειράματος χρησιμοποιήσαμε δύο διαφορετικά ανθρώπινα επιδιορθωτικά ένζυμα, την ενδονουκλεάση APE1 και την γλυκοσυλάση OGG1, όπου το καθένα ανιχνεύει και επιδιορθώνει διαφορετικές αλλοιώσεις του μορίου του DNA. Συγκεκριμένα, αβασικά σημεία στην περίπτωση του APE1 και οξειδωμένες πουρίνες στην περίπτωση του OGG1. Εξετάσαμε τα επίπεδα των βλαβών αυτών την τρίτη και την έβδομη ημέρα από την ακτινοβόληση τους συγκρίνοντάς τα με τα επίπεδα των ενδογενών βλαβών των μη ακτινοβολημένων δειγμάτων. Τα δείγματα ποντικών δεν ήταν όλα τα ίδια, σε κάποια είχαν προστεθεί ουσίες που επιδρούν στους μηχανισμούς επαγωγής βλαβών σε απομακρυσμένα σημεία και κυρίως σε σχέση με την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος για να μπορέσουμε να κρίνουμε την εξέλιξη των βλαβών αλλά και την πειραματική απόδειξη της επίδρασης αυτών των ουσιών. Ο αριθμός των βλαβών των δειγμάτων που ανιχνεύτηκε στα διάφορα απομακρυσμένα σημεία, με το ένζυμο APE1, κυμαίνεται από 1026 -3196 clusters/Gbp, στην γλώσσα και στα 760-4440 clusters /Gbp στο έντερο ανάλογα το είδος του ποντικίου κτλ. Ενώ οι βλάβες που ανιχνεύτηκαν με το ένζυμο OGG1 κυμαίνονται από 1062-4890 clusters/Gbp και στο έντερο 1002-354 clusters/Gbp. Τα επίπεδα βλαβών που ανιχνεύσαμε ήταν υψηλότερα σε σχέση με τα μη ακτινοβολημένα και επιβεβαιώνουν τις θεωρίες των μη-στοχευμένων επιδράσεων της ιοντίζουσας ακτινοβολίας για την επαγωγή σύνθετων βλαβών σε απομακρυσμένους(μη-ακτινοβολημένους) ιστούς.

Abstract

The ionizing radiation affects not only the irradiated cells, by causing direct DNA damage but it can also induce damages to areas distant from the irradiated area through systemic mechanisms. The clustered or complex DNA damages and mainly double-strand breaks (DSBs) are the most harmful for the cell because they are repair resistant and highly mutagenic leading often to genomic instability and potentially carcinogenesis. For this reason, their proper repair is very important for the cell's normal function. In general, clustered damages are more difficult to be repaired compared to single damages as the ones induced for examples under conditions of endogenous oxidative stress, chemicals etc. The clustered DNA damages comprising of DSBs and non-DSB oxidatively-induced clustered DNA lesions (OCDLs) are repaired through complex DNA repair pathways. More specifically, the OCDLs are created from free radicals and as highly complex lesions are repair-resistant and potentially mutagenic if not processed correctly. In order to evaluate the systemic nature for the induction of these DNA lesions, we measured the levels of clustered DNA damages in tissues of the tongue and the colon of mice which they were irradiated with X-rays beam of 10Gy at their leg. All the experiments were done in Laboratory of Health Physics, Radiobiology & Cytogenetics of Institute of Nuclear & Radiological Sciences & Technology, Energy on NCSR "Demokritos" with samples of DNA from healthy mice in Australia, because of our collaboration with Dr Olga Martin. The method that we followed was an adaptation of agarose gel DNA electrophoresis. For the detection of OCDLs, we used two human DNA repair enzymes each one detecting different kind of lesions. Specifically, the APE1 which detects abasic (AP: apurinic/aprimidinic) sites and the OGG1 which detects mainly oxidized purines. We measured the levels of OCDLs at different distant to the irradiated area sites like the tongue, colon of the animals. In addition, for targeting the possible mechanisms implicated in the induction of DNA damage at distant sites i.e. the immune response, different sets of mice was used as positive controls: mice with deficient immune system, with antibody against the macrophages etc. In most cases, the induction of OCDLs was detected in distant sites. The number of the clusters which were detected with the APE1 enzyme in tongue tissue ranges from 1026-3196 clusters/Gbp, in colon tissue from 760-4440 clusters /Gbp. While for the OGG1 enzyme ranges from 1062-4890 clusters/Gbp in tongue tissue and from 1002 to 3547 clusters/Gbp. The levels of DNA damages which were evaluated, were high enough compared to non-irradiated. Therefore, we confirmed that ionizing radiation can induce complex DNA lesions in tissues distant for the irradiated site (leg) underlying the importance of the systemic nature of ionizing radiation.

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση αυτής τη διπλωματικής εργασίας θα ήθελα αν ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου Δρ. Αλέξανδρο Γεωργακίλα για την ανάθεση αρχικά της παρούσας εργασίας, για την αδιάκοπη υποστήριξή του σε ότι χρειάστηκα σε επίπεδο γνώσεων ,για την αμέριστη βοήθεια του αλλά και για την άριστη συνεργασία μας .

Τα πειράματα της εργασίας πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Υγαιοφυσικής του Ινστιτούτου Πυρηνικών και Ραδιολογικών Επιστημών και Τεχνολογίας, Ενέργειας και Ασφάλειας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» με υπεύθυνη την Δρ. Γεωργία Τερζούδη. Θα ήθελα λοιπόν, να την ευχαριστήσω για την βοήθεια και την υποστήριξη της για όλο αυτό το διάστημα που διήρκεσαν τα πειράματα.

Τα δείγματα DNA που επεξεργαστήκαμε ήρθαν από την Μελβούρνη της Αυστραλίας, από την ομάδα της Dr Olga Martin από το Peter Mc Callum Institute, και θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την ανάλυση και την επεξήγηση του εκάστοτε δείγματος καθώς και για την συνεργασίας της.

Στα πρώτα βήματα των πειραμάτων ήταν καθοριστικός ο ρόλος του Νταργαρά Αντρέα και του Πολλάκη Γεράσιμου. Ο πρώτος με βοήθησε στην εξοικείωση μέσα στο εργαστήριο ,στην παρουσίαση του πειράματος αλλά και στην εκτέλεση του ,και με τον δεύτερο συνεργαστήκαμε άψογα για αρκετό χρονικό διάστημα ,εκτελώντας μαζί το πείραμα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την κατανόηση και την αμέριστη βοήθεια που μου παρείχε όλα αυτά τα χρόνια .

Περιεχόμενα

Περίληψη	5
Abstract.....	6
Ευχαριστίες.....	7
Περιεχόμενα.....	9

1^ο Κεφάλαιο: Στοιχεία Κυτταρικής Βιολογίας

1.1 Εισαγωγή.....	13
1.2 Κυτταρική Δομή.....	14
1.3 Το Γενετικό Υλικό.....	15
1.4 Κυτταρικός Κύκλος.....	16
1.5 Σημεία Ελέγχου του Κυτταρικού Κύκλου.....	16

2^ο Κεφάλαιο : Στοιχεία Ακτινοβιολογίας

2.1 Εισαγωγή.....	18
2.2 Πηγές της Ιοντίζουσας Ακτινοβολίας.....	19
2.3 Αλληλεπίδραση Ακτίνων-X με την Ύλη.....	20
2.4 Το Φωτοηλεκτρικό Φαινόμενο.....	20
2.5 Το Φαινόμενο Compton.....	20
2.6 Δίδυμη Γένεση.....	21
2.7 Σημαντικά μεγέθη στην Ακτινοβιολογία.....	22
2.8 Στάδια αλληλεπίδρασης ιοντίζουσας ακτινοβολίας με την βιολογική ύλη.....	23
2.9 Τροποποιητικοί μηχανισμοί δράσης της ιοντίζουσας ακτινοβολίας.....	24
2.10 Βιολογικά αποτελέσματα σε μοριακό επίπεδο.....	25
2.11 Βλάβες στο DNA.....	27
2.12 Ομαδοποιημένες Βλάβες DNA.....	29
2.13 Η απόκριση στις βλάβες του DNA.....	30
2.14 Επιδιόρθωση.....	30
2.14.1 Επιδιόρθωση δίκλωνων θραύσεων.....	31
2.14.2 Επιδιόρθωση μονόκλωνων θραύσεων.....	31

2.15 Προβλήματα στην επιδιόρθωση.....	32
2.15.1 Ελλιπής ανταπόκριση.....	32
2.15.2 Προβληματική Λειτουργία.....	33
2.16 Βιολογικά αποτελέσματα σε κυτταρικό επίπεδο.....	33
2.16.1 Γονιδιακές μεταλλάξεις.....	33
2.16.2 Χρωμοσωματικές αλλοιώσεις.....	34
2.16.3 Κυτταρικός θάνατος.....	35
2.17 Συστημικά Αποτελέσματα.....	36
2.17.1 Καθορισμένα αποτελέσματα.....	36
2.17.2 Στοχαστικά αποτελέσματα.....	37
2.18 Μη στοχευμένες επιδράσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας (Non-targeted effects , NTE).....	38
2.18.1 Επιπτώσεις σε παρακείμενα κύτταρα(bystander effect).....	38
2.18.2 Προσαρμοσμένη απόκριση στην ιοντίζουσα ακτινοβολία	38
2.18.3 Γενωμική αστάθεια.....	39
2.18.4 Απόκριση απομακρυσμένου ιστού.....	39
2.19 Μηχανισμοί επαγωγής μη στοχευμένων επιδράσεων.....	41
2.19.1 Οξειδωτικό στρες.....	41
2.19.2 Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS).....	42
2.19.3 Δραστικές μορφές αζώτου (RNS).....	43
2.19.4 Ανοσοποιητικό σύστημα και φλεγμονώδεις αποκρίσεις.....	43
2.19.5 Οξειδωμένο εξωπυρηνικό DNA	44
2.19.6 Βλάβες και διασυνδέσεις με το ανοσοποιητικό σύστημα.....	44
2.19.7 Κυτοκίνες	44
2.19.8 Μακροφάγα και Ανοσοκύτταρα	45

3^ο Κεφάλαιο: Η Μέθοδος

3.1 Εισαγωγή	49
3.2 Η σημασία των ενζύμων	50
3.3 Ενζυμική επώαση DNA	50
3.4 Η ενδονουκλεάση hAPE1	50
3.5 Η γλυκοσυλάση OGG1	52
3.6 Ηλεκτροφόρηση	52
3.7 Απεικόνιση	52
3.8 Ανάλυση μέσω μοριακού βάρους.....	53

4^ο Κεφάλαιο: Εκτέλεση του Πειράματος

4.1 Σκοπός	55
4.2 Διαδικασία ακτινοβολήσης	56
4.3 Απομόνωση DNA	57
4.4 Υλικά ηλεκτροφόρησης	58
4.5 Πρωτόκολλο πειράματος	59
4.6 Επεξεργασία Εικόνας	62

5^ο Κεφάλαιο : Αποτελέσματα και Συμπεράσματα

5.1 Αποτελέσματα	67
5.2 Απόκριση των ιστών με την χρήση της APE1	68
5.3 Απόκριση των ιστών με την χρήση του OGG1	78
5.4 Συμπεράσματα	87
Βιβλιογραφία	91
Παράρτημα.....	94

Κεφάλαιο 1ο

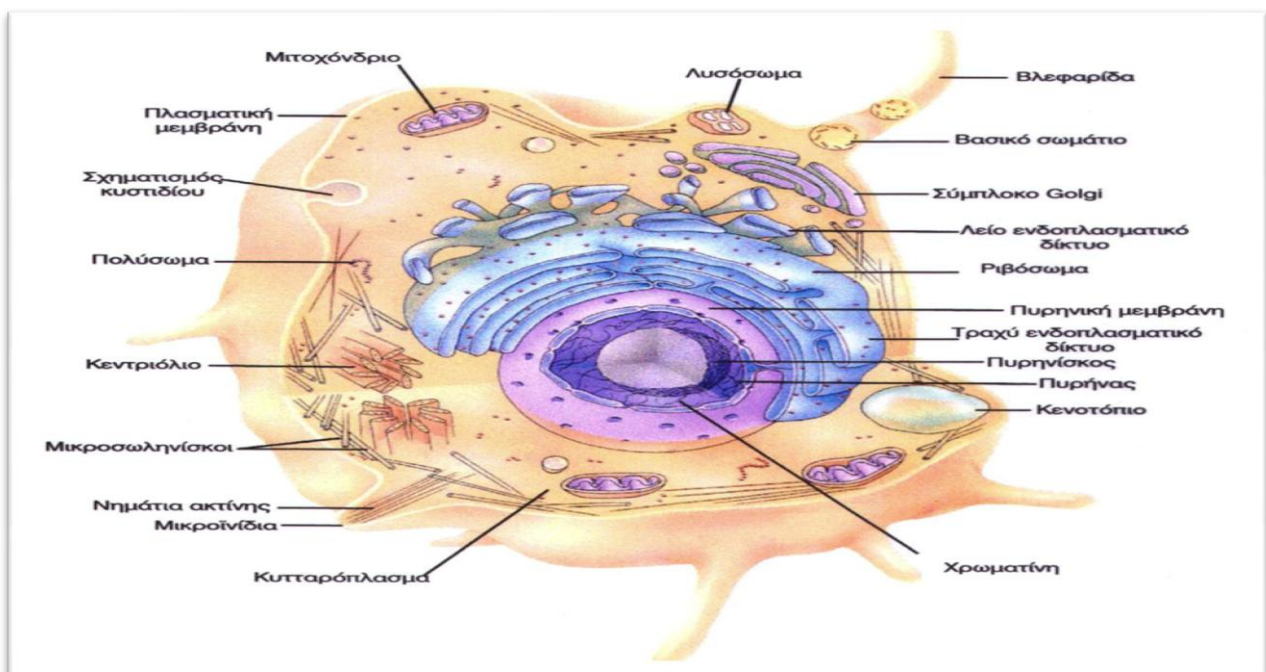
Στοιχεία Κυτταρικής Βιολογίας

1.1 Εισαγωγή

Το κύτταρο αποτελεί την βασική μονάδα οργάνωσης των ζωντανών οργανισμών. Είναι το θεμελιώδες δομικό στοιχείο της έμβιας ύλης και αποτελείται από ένα σύστημα μορίων οργανωμένων σε δυναμική αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Όλα τα κύτταρα ενός οργανισμού έχουν την ίδια χημική σύσταση και ο παράγοντας που τα διαφοροποιεί είναι ο τρόπος έκφρασης του γενετικού τους υλικού. Μια ομάδα, όμοια διαφοροποιημένων κυττάρων ονομάζεται ιστός και αποτελεί τη δεύτερη βιολογική τάξη οργάνωσης ενός οργανισμού. Τα κύτταρα μπορούν να αποθηκεύουν και να μεταφράζουν πληροφορίες και να συνθέτουν κυτταρικά μεγαλομόρια. Έχουν την ικανότητα να μετακινούνται και να μεταβάλλουν τις εσωτερικές αντιδράσεις τους προκειμένου να προσαρμοστούν σε περιβαλλοντικές αλλαγές .[1]

1.2 Κυτταρική Δομή

Τα κύτταρα μπορούν να διακριθούν σε προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά ανάλογα με την ενδοκυτταρική τους δομή. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα υπάρχει συγκροτημένος πυρήνας που περιέχει το γενετικό υλικό, το DNA, δομή που απουσιάζει από τα προκαρυωτικά κύτταρα. Σε κάθε ευκαρυωτικό κύτταρο η βασική διαμερισματοποίηση διακρίνει τρεις βασικές περιοχές: τον πυρήνα, το κυτταρόπλασμα και την κυτταρική μεμβράνη. Στον πυρήνα, που αποτελεί την αποθήκη πληροφοριών του κυττάρου, υπάρχει ο πυρηνίσκος ο οποίος περιέχει τα χρωμοσώματα, και το πυρηνοπλάσμα. Στο κυτταρόπλασμα υπάρχουν πολλαπλές δομές και οργανίδια, όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο, το σύστημα Golgi, τα ριβοσώματα, τα μιτοχόνδρια, τα λυσοσώματα και ένας αριθμός διαφόρων κυστιδίων.[1, 2]



Εικόνα 1.1 Αναπαράσταση τυπικού ευκαρυωτικού κυττάρου.

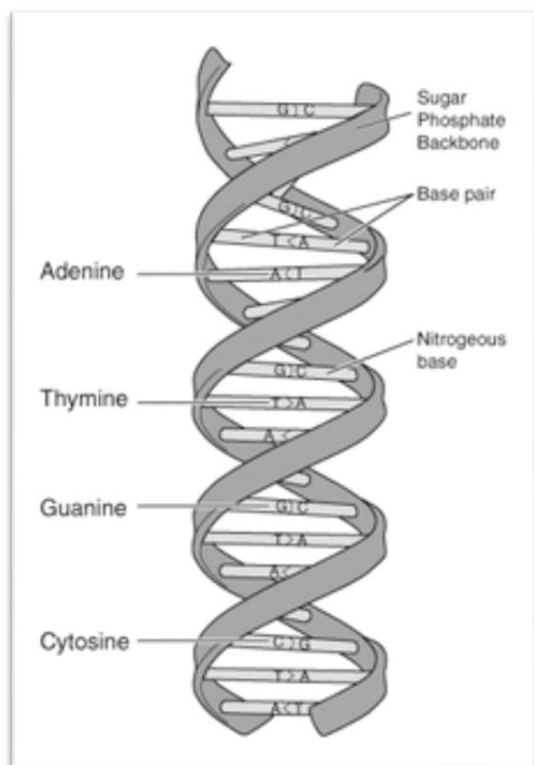
1.3 Το Γενετικό Υλικό

Το ριβοζονουκλεϊνικό οξύ (RNA) και δεσοξυριβοζονουκλεϊνικό οξύ (DNA) είναι μόρια αποθήκευσης πληροφορίας των οργανισμών. Πρόκειται για βιοπολυμερή που αποτελούνται από τα νουκλεοτίδια, κύριος ρόλος των οποίων είναι η αποθήκευση και ανάκληση βιολογικών πληροφοριών. Ένα νουκλεοτίδιο αποτελείται από έναν αζωτούχο δακτύλιο (βάση), που συνδέεται με ένα σάκχαρο με 5 άτομα άνθρακα (C) και μία ή περισσότερες φωσφορικές ομάδες, συνδεδεμένες στο

σάκχαρο. Στο DNA είναι αποθηκευμένες σε μορφή γονιδίων οι απαραίτητες πληροφορίες που καθορίζουν τις λειτουργίες και την ανάπτυξη του κυττάρου ενώ το RNA χρησιμεύει για την προσωρινή αποθήκευση πληροφοριών όπως στην μεταφορά των αμινοξέων ή στην σύνθεση των πρωτεϊνών .[2]

Το DNA εξυπηρετεί δύο πολύ σημαντικές λειτουργίες, να διαβιβάζει πληροφορίες από μία γενιά κυττάρων στην επόμενη (αντιγραφή) και να παρέχει την πληροφορία για τη σύνθεση συστατικών (πρωτεΐνες), απαραίτητων για την κυτταρική λειτουργία (μεταγραφή). Το 1953, οι James Watson και Francis Crick προσδιόρισαν το μόριο του DNA ως μία δεξιόστροφα συστρεφόμενη διπλή έλικα δεσοξυριβοζονουκλεϊκού οξέος . Πρότειναν ότι το μόριο είναι κατασκευασμένο από μία δίκλωνη δομή νουκλεοτιδίων ,με τη μία έλικα να ανέρχεται και την άλλη να κατέρχεται. Οι δύο κλώνοι συγκρατούνται με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των βάσεων, ενώ κάθε κλώνος αποτελείται από νουκλεοτίδια, η αδενίνη με τη θυμίνη σχηματίζουν δύο δεσμούς υδρογόνου, ενώ η κυτοσίνη με τη γουανίνη τρεις. [1, 3] Οι πολυμεράσες ενώνουν τα νουκλεοτίδια μεταξύ τους σε μία αλυσίδα, δημιουργώντας ένα μονόκλωνο (single-stranded) μόριο DNA όμως λόγω της αστάθειας του μορίου αυτού, είναι σύνηθες το DNA να σχηματίζει ένα δίκλωνο (double-stranded) μόριο διαμέτρου 2 nm, ενώνοντας τις βάσεις του ενός κλώνου με τις βάσεις του άλλου. Η διπλή έλικα συμπληρώνει μία πλήρη περιστροφή κάθε 3,4 nm και δεδομένου ότι η απόσταση μεταξύ δύο διαδοχικών βάσεων είναι 0,34 nm, υπάρχουν περίπου 10 ζεύγη ανά περιστροφή.

Λόγω του καθορισμένου τρόπου ζευγαρώματος των βάσεων, οι δύο αλυσίδες του DNA είναι συμπληρωματικές μεταξύ τους, οπότε η νουκλεοτιδική αλληλουχία της μίας αλυσίδας καθορίζει και



Εικόνα 1.2 Η δομή του DNA

την αλληλουχία της δεύτερης. Η συμπληρωματικότητα έχει τεράστια σημασία για τον αυτοδιπλασιασμό του DNA, μια ιδιότητα που το καθιστά το καταλληλότερο μόριο για τη διατήρηση και τη μεταβίβαση της γενετικής πληροφορίας[2, 3]. Η αλληλουχία των βάσεων κατά μήκος του μορίου του DNA μεταφέρει τη γενετική πληροφορία του κυττάρου. Κάθε μόριο DNA συμπυκνώνεται δημιουργώντας ένα ξεχωριστό χρωμόσωμα. Το DNA σχηματίζει ινίδια χρωματίνης και η βασική οργάνωση της χρωματίνης είναι το νουκλεόσωμα, το οποίο αποτελείται από DNA μήκους 146 ζευγών βάσεων γύρω από ένα οκταμερές ιστονών. Τα ινίδια χρωματίνης σχηματίζουν τα χρωμοσώματα. Το σύνολο της γενετικής πληροφορίας που είναι αποθηκευμένο στα χρωμοσώματα ενός οργανισμού, αποτελεί το γονιδίωμα του. Το ανθρώπινο γονιδίωμα είναι οργανωμένο σε 24 χρωμοσώματα (22 αυτοσωματικά και 2 φυλετικά).[3]

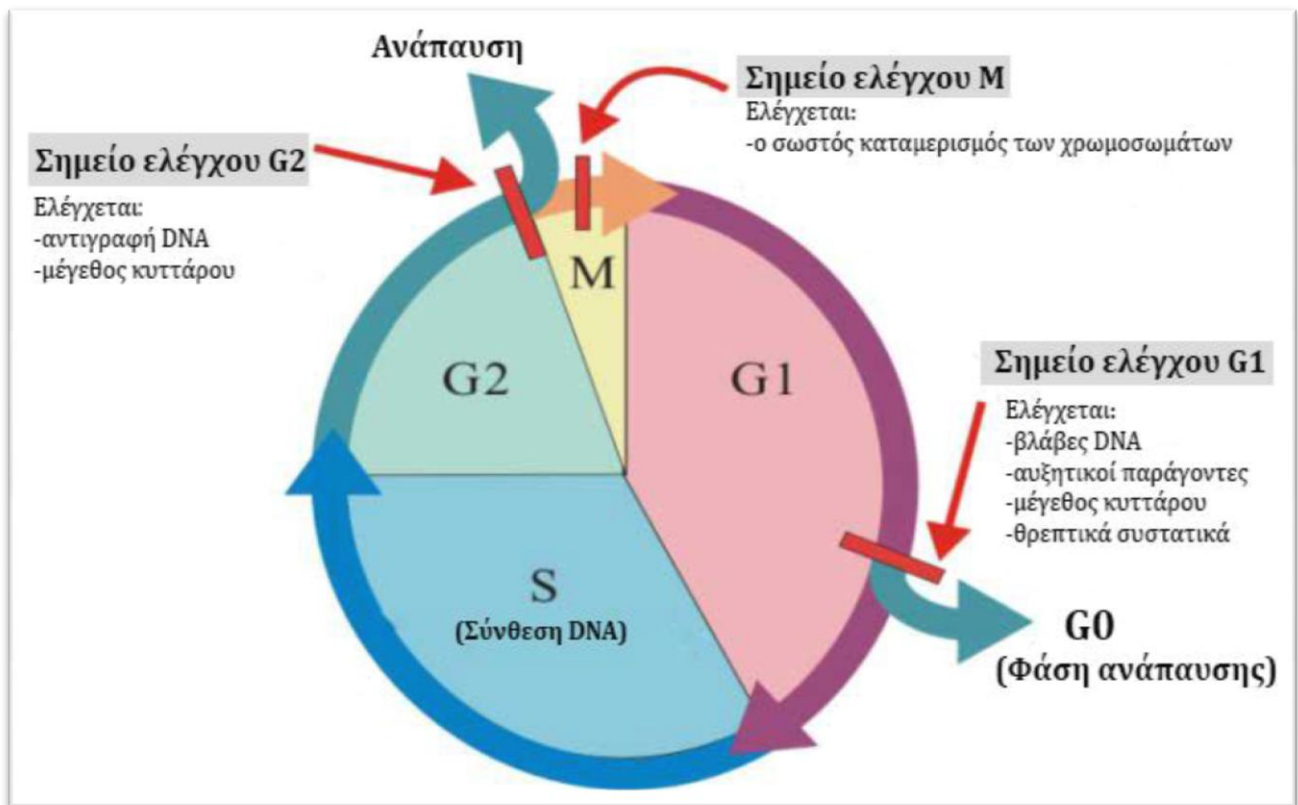
1.4 Κυτταρικός Κύκλος

Ως κυτταρικό κύκλο ονομάζουμε μια αλληλουχία διαδικασιών η οποία εκτελείται σε αυστηρά προγραμματισμένα διαδοχικά στάδια. Ο κύκλος της ζωής του κυττάρου ξεκινά από τη στιγμή της δημιουργίας του και ολοκληρώνεται με το διπλασιασμό του. Ο κυτταρικός κύκλος μπορεί να χωριστεί στη μεσόφαση και τη μίτωση ή μείωση στην περίπτωση των γαμετών (όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.3).

Στη μεσόφαση διακρίνουμε τις εξής φάσεις: τη φάση G1, τη φάση S και τη φάση G2. Στην φάση G1 το κύτταρο αναπτύσσεται πραγματοποιώντας διάφορες διαδικασίες όπως η σύνθεση των πρωτεϊνών και επιλέγει αν θα συνεχίσει στην επόμενη φάση S (Synthesis) όπου πραγματοποιείται η πλήρης αντιγραφή του γενετικού υλικού ή θα εισέλθει στην φάση G0 η οποία παρεμβάλλεται μεταξύ G1 και S, και έτσι επιλέγει να αναβάλλει τον διπλασιασμό του μέχρι να λάβει το κατάλληλο σήμα να εισέλθει στην φάση S. Μετά την S ακολουθεί η G2 φάση όπου το κύτταρο προετοιμάζεται να διπλασιαστεί. Ακολουθεί η μίτωση (M) η οποία χωρίζεται στην πρόφαση, την προμετάφαση, την ανάφαση και την τελόφαση. Κατά τη διάρκεια της μίτωσης το διπλασιασμένο γενετικό υλικό χωρίζεται σε δύο ίδιες ομάδες, διαιρείται ο πυρήνας όπως και το κυτταρόπλασμα και η κυτταρική μεμβράνη Έτσι προκύπτουν τα δύο νέα κύτταρα.[2]

1.5 Σημεία Ελέγχου του Κυτταρικού Κύκλου

Τόσο η αντιγραφή του γενετικού υλικού όσο και η μίτωση του κυττάρου είναι πολυσύνθετες διαδικασίες όπου εμπλέκονται πολλοί μηχανισμοί και έτσι είναι πιθανόν να προκύψουν σφάλματα. Επίσης σφάλματα στην αντιγραφή και τη μίτωση μπορεί να προκληθούν από εξωγενείς παράγοντες όπως οι ιοντίζουσες ακτινοβολίες ή το οξειδωτικό στρες. Σε περίπτωση που το κύτταρο μεταβεί σε επόμενη κυτταρική φάση χωρίς να πληρούνται οι κατάλληλες συνθήκες ή έχοντας βλάβες από την προηγούμενη φάση, μπορεί να επιβαρυνθεί με καινούργιες βλάβες στο DNA του, να υπάρξει γονιδιακή αστάθεια ή ακόμα και να προκληθεί κυτταρικός θάνατος. Για το λόγο αυτό ένα σύνολο πρωτεϊνών και σηματοδοτικών μονοπατιών ελέγχουν σε συγκεκριμένα σημεία του κυτταρικού κύκλου αν υπάρχουν οι σωστές συνθήκες. Τέτοια σημεία ελέγχου βρίσκονται ανάμεσα στα στάδια G1/S, S/G2 και στη φάση M. [2, 3]



Εικόνα 1.3 Στην εικόνα φαίνονται οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου, τα σημεία ελέγχου καθώς και οι διαδικασίες που ελέγχονται στην εκάστοτε φάση.

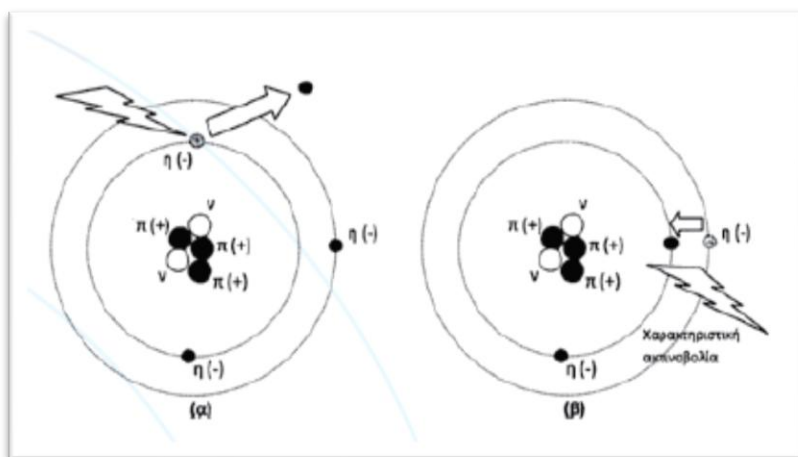
2ο Κεφάλαιο

Στοιχεία Ακτινοβιολογίας

2.1 Γενικά Στοιχεία

Η ακτινοβολία είναι μορφή ενέργειας, η οποία εκπέμπεται από κάποια πηγή και διαδίδεται στο χώρο με οριακά μεγάλη ταχύτητα. Αν η ενέργεια που προσφέρεται στο άτομο είναι ικανή να απομακρύνει τελείως ένα ηλεκτρόνιο από το άτομο, τότε αυτό θα έχει ένα ηλεκτρόνιο λιγότερο και θα εμφανίσει θετικό φορτίο. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται ιονισμός και παίζει σημαντικό ρόλο στην φυσική των ακτινοβολιών καθώς και στις συνέπειές τους στο ανθρώπινο σώμα. Την θέση του ηλεκτρονίου που απομακρύνθηκε την καταλαμβάνει άλλο από υψηλότερη στοιβάδα με αποτέλεσμα την εκπομπή χαρακτηριστικής ακτινοβολίας. Συνεπώς ιοντίζουσα θεωρείται η ακτινοβολία που μεταφέρει τόση ενέργεια σε ένα άτομο της ύλης ώστε να το ιονίσει. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να δημιουργούνται

φορτισμένα σωματίδια τα οποία μέσω διάφορων φυσικοχημικών διαδικασιών είναι ικανά να προκαλέσουν δραστικές μεταβολές στην βιολογική ύλη. Η ιοντίζουσα ακτινοβολία είναι είτε σωματιδιακή (σωματίδια α ,σωματίδια β ,πρωτόνια και άλλα βαρέα σωματίδια) είτε ηλεκτρομαγνητική (ακτινοβολία γ ή X , υπεριώδης ακτινοβολία).[4, 5]



Εικόνα 2.1 α) Η απορρόφηση ενέργειας από το ηλεκτρόνιο του δίνει την δυνατότητα να μεταπηδήσει σε στιβάδα μεγαλύτερης ενέργειας .Τώρα το άτομο είναι διεγερμένο β)Η διέγερση διαρκεί για πολύ μικρό χρονικό διάστημα και το ηλεκτρόνιο επιστρέφει στην αρχική του θέση με ταυτόχρονη εκπομπή χαρακτηριστικής ακτινοβολίας

2.2 Πηγές της Ιοντίζουσας Ακτινοβολίας

Η ιοντίζουσα ακτινοβολία δημιουργείται από διασπάσεις ασταθών πυρήνων, από φαινόμενα εξαύλωσης και από συσκευές όπως το κύκλοτρο ή μηχανήματα που παράγουν ακτίνες X. Η ιοντίζουσα ακτινοβολία προέρχεται από το φυσικό περιβάλλον ή από τεχνητές πηγές .Οι φυσικές πηγές ακτινοβολίας υπάρχουν από ραδιοϊσότοπα που βρίσκονται στο έδαφος και στο υπέδαφος, στον αέρα ,στον νερό που υπάρχουν από τον σχηματισμό της Γη, η κοσμική ακτινοβολία που ακτινοβολεί κάθε ουράνιο σώμα καθώς και ο ήλιος που προκαλεί επίσης ιοντισμούς .Ένα παράδειγμα φυσικού διοξειδίου είναι το ραδόνιο που προέρχεται από την διάσπαση του ραδίου βρίσκεται στα πετρώματα και κατά συνέπεια στα οικοδομικά υλικά και εισέρχεται στον οργανισμό μέσω της αναπνοής .Επειδή ανήκει στα ευγενή αέρια δεν αντιδρά με το περιβάλλον του όμως τα θυγατρικά του στοιχεία δεν είναι ευγενή με αποτέλεσμα να προσκολλώνται στους πνεύμονες και να τους ακτινοβολούν .Δυστυχώς το ραδόνιο είναι υπεύθυνο για την εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα και τα επίπεδα του στις οικίες πλέον μελετώνται συστηματικά.

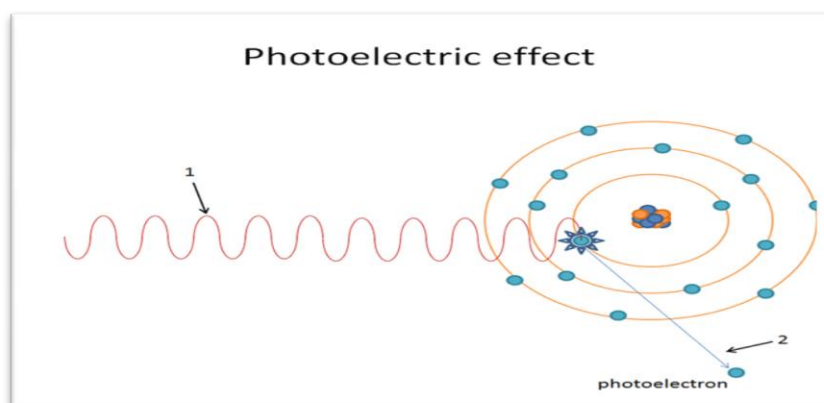
Οι τεχνητές πηγές ακτινοβολίας είναι μηχανήματα παραγωγής ακτινοβολιών που χρησιμοποιούνται κυρίως στην ιατρική (θεραπεία ή διάγνωση) ή στην βιομηχανία λόγω χρήσης πυρηνικών εφαρμογών όπως η παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας από πυρηνικά εργοστάσια. [4] [5]

2.3 Αλληλεπίδραση Ακτίνων-X με την Ύλη

Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία μεταφέρεται σε πακέτα ενέργειας, τα φωτόνια, η ενέργεια των οποίων δίνεται από την εξίσωση του Planck: $E=hf=hc/\lambda$, όπου h η σταθερά του Planck, f η συχνότητα του φωτονίου, λ το μήκος κύματος του φωτονίου και c η ταχύτητα του φωτός στο κενό. Όταν η ακτινοβολία X ή γ απορροφάται ή σκεδάζεται από τα άτομα των ιστών ενός οργανισμού υπάρχουν και βιολογικές επιπτώσεις. Η απορρόφηση ορατού φωτός εξαρτάται από την κατανομή των μορίων στην ύλη, η απορρόφηση των ακτίνων X ή γ εξαρτάται από τον ατομικό αριθμό του υλικού. Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία αλληλεπιδρά με την ύλη με μια σειρά μηχανισμών, οι σημαντικότεροι εκ των οποίων είναι α) το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο, β) το φαινόμενο Compton και γ) η δίδυμη γένεση.

2.4 Το Φωτοηλεκτρικό Φαινόμενο

Το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο αναφέρεται στην εκπομπή ενός δέσμιου ηλεκτρονίου από τον εσωτερικό φλοιό ενός ατόμου. Αν E_n η ενέργεια σύνδεσης του ηλεκτρονίου με $n=K,L,M,\dots$ και E η ενέργεια του εισερχόμενου φωτονίου, τότε η ενέργεια του ηλεκτρονίου που αποδεσμεύεται είναι $E_k=E-E_n$. Απαραίτητη προϋπόθεση για να συμβεί το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο, η ενέργεια του φωτονίου να είναι μεγαλύτερη της ενέργειας σύνδεσης του ηλεκτρονίου (η πλειοψηφία των φωτοηλεκτρικών φαινομένων αφορά τα ηλεκτρόνια της K στοιβάδας). Είναι ο κυρίαρχος μηχανισμός αλληλεπίδρασης με την ύλη για ακτινοβολίες ενέργειας μέχρι 50 KeV και εξαρτάται κυρίως από τον ατομικό αριθμό του υλικού.[6]

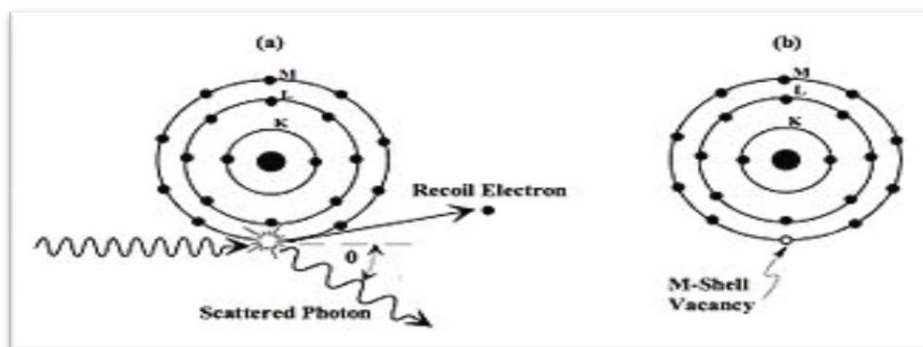


Εικόνα 2.1 Φωτοηλεκτρικό Φαινόμενο

2.5 Το Φαινόμενο Compton

Το φαινόμενο Compton αναφέρεται στην ανελαστική σκέδαση μεταξύ ενός φωτονίου και ενός ελεύθερου ηλεκτρονίου ή ασθενώς δέσμιου ηλεκτρονίου και αφορά φωτόνια ενέργειας από 100 KeV έως 10 MeV. Κατά την είσοδό του σε ένα υλικό, το φωτόνιο αλληλεπιδρά με ένα ελεύθερο ηλεκτρόνιο, του μεταφέρει μέρος της ενέργειάς του σκεδάζεται σε γωνία $0^\circ-180^\circ$ και συνεχίζει μέχρι να

συναντήσει άλλο ηλεκτρόνιο και να ξανασκεδαστεί ανελαστικά. Η διαδικασία αυτή συνεχίζεται έως ότου το φωτόνιο χάσει αρκετή ενέργεια ώστε να αλληλεπιδράσει με φωτοηλεκτρικό φαινόμενο και να εξαφανιστεί δίνοντας όλη του την ενέργεια σε δέσμιο ηλεκτρόνιο ή έως ότου εξέλθει από το υλικό.[6, 7]



Εικόνα 2.2 Το φαινόμενο Compton a) το σκεδαζόμενο φωτόνιο και η αποβολή του ηλεκτρονίου οδηγούν στην b) ιονισμένη κατάσταση του ατόμου

2.6 Δίδυμη Γένεση

Η δίδυμη γένεση είναι ίσως η πιο εντυπωσιακή αλληλεπίδραση μεταξύ φωτονίου και ύλης. Απαραίτητες προϋποθέσεις για την πραγματοποίηση του φαινομένου αυτού είναι το φωτόνιο να έχει ενέργεια τουλάχιστον 1,02 MeV, δηλαδή τουλάχιστον ίση με τη μάζα ηρεμίας του ηλεκτρονίου συν αυτή του ποζιτρονίου που είναι 0,511 MeV και για τα δύο, όπως επίσης η ύπαρξη ισχυρού πεδίου Coulomb ύλης. Οι αλληλεπιδράσεις που περιγράφηκαν παραπάνω αφορούσαν αλληλεπιδράσεις φωτονίου και ηλεκτρονίου ενώ η δίδυμη γένεση αναφέρεται στην αλληλεπίδραση του φωτονίου με τον πυρήνα του ατόμου. Κατά τη δίδυμη γένεση ένα φωτόνιο μετατρέπεται σε ένα ηλεκτρόνιο και ένα ποζιτρόνιο. Το ποζιτρόνιο όταν συναντήσει ένα ηλεκτρόνιο εξαυλώνεται και παράγεται μια ακτίνα γ . Συνεπώς αναφερόμαστε σε μία μετατροπή ενέργειας (φωτόνιο) σε μάζα (ηλεκτρόνιο και ποζιτρόνιο)! Προϋπόθεση για να συμβεί ή εξαύλωση είναι να είναι ακίνητο το ποζιτρόνιο. Αυτό σημαίνει ότι για να εξαυλωθεί με ένα ηλεκτρόνιο θα πρέπει να διανύσει κάποια απόσταση, με σκεδάσεις να χάσει την αρχική του ενέργεια και στη συνέχεια να συμβεί η εξαύλωση.[5]



Εικόνα 2.3 Οι ενεργειακές περιοχές όπου κυριαρχεί το κάθε φαινόμενο και η συσχέτιση με τον ατομικό αριθμό του απορροφητή.

2.7 Σημαντικά μεγέθη στην Ακτινοβιολογία

Η ιοντίζουσα ακτινοβολία, μπορεί να διαχωριστεί ανάλογα με την ενέργειά που έχει. Ακτινοβολίες που προκαλούν έντονους ιοντισμούς κατά μήκος της τροχιάς τους σε ένα υλικό (όπως σωματίδια-α, πρωτόνια ή βαρέα ιόντα) καλούνται ακτινοβολίες υψηλής γραμμικής μεταβίβασης ενέργειας (high linear energy transfer -LET), φυσική ποσότητα που περιγράφει τη μέση ενέργεια που εναποτίθεται ανά μονάδα μήκους της τροχιάς των σωματιδίων στην ύλη και καθορίζει σε σημαντικό βαθμό τις συνέπειες που θα υποστεί το βιολογικό υλικό. Ακτινοβολίες χαμηλής LET (όπως φωτόνια ή ηλεκτρόνια) προκαλούν μικρό αριθμό ιοντισμών και διεγέρσεων ανά μονάδα διαδρομής τους στο υλικό και κατά συνέπεια λιγότερες βλάβες στους βιολογικούς ιστούς, σε σχέση με της ακτινοβολίες υψηλής LET (βαριά, φορτισμένα σωματίδια) όπως φαίνεται και στην Εικόνα 2.4.

Μεγέθη που παίζουν σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση μεταξύ ύλης και ακτινοβολίας είναι: α) η ένταση της ακτινοβολίας (I), β) η ενεργειακή δόση ακτινοβολίας (D), γ) και η ισοδύναμη δόση (H_T). Πιο αναλυτικά, η ένταση της ακτινοβολίας (I) δείχνει την πυκνότητα των σωματιδίων ή των φωτονίων μιας δέσμης. Η έντασης της δέσμης κατά την είσοδό της στην βιολογική ύλη δίνεται από τον τύπο :

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

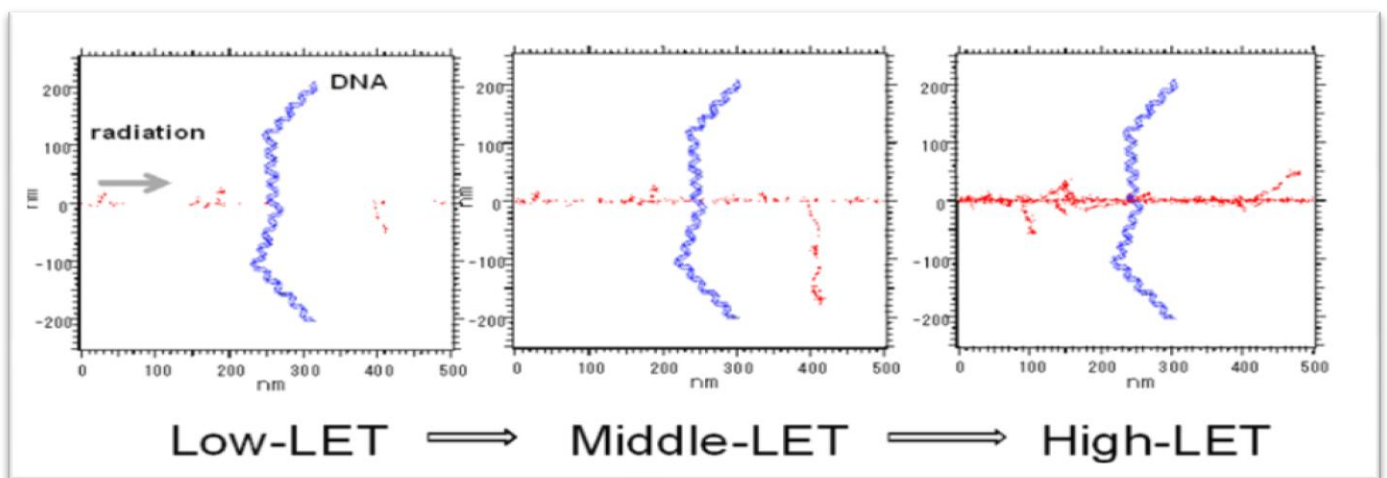
Όπου I_0 η αρχική ένταση της δέσμης, x το πάχος του υλικού και μ ο γραμμικός συντελεστής εξασθένησης. Η παραπάνω σχέση ονομάζεται και **εκθετικός νόμος της εξασθένησης**.

Η απορρόφηση της δέσμης εξαρτάται από την μάζα, την πυκνότητα του υλικού και την ενέργεια της δέσμης. Η ενεργειακή δόση ακτινοβολίας (D) είναι η ενέργεια της iontίζουσας ακτινοβολίας W^D που απορροφάται από όγκο ύλης V και πυκνότητας ρ και δίνεται από τον τύπο:

$$D = dW^D / \rho dV, \quad \text{με μονάδα μέτρησης το Gy (Gray)(Joule/kg)}.$$

Τέλος, για να ληφθεί υπόψη η βιολογική επιβάρυνση που προκαλεί η ακτινοβολία σε ένα ιστό χρησιμοποιείται η έννοια της η ισοδύναμης δόσης (H_T) είναι η απορροφούμενη δόση πολλαπλασιασμένη με έναν παράγοντα βάρους W_R , σύμφωνα με την βιολογική επίδραση της συγκεκριμένης ακτινοβολίας:

$$H_T = D \times W_R \quad \text{με μονάδα μέτρησης Sv (Sievert). [5, 8]}$$



Εικόνα 2.4 Σχηματική απεικόνιση εξάρτησης των ionισμών που απεικονίζονται με το κόκκινο χρώμα από την ένταση της γραμμικής εναπόθεσης ενέργειας (LET).

2.8 Στάδια αλληλεπίδρασης iontίζουσας ακτινοβολίας με την βιολογική ύλη

Τα στάδια κατά σειρά εξέλιξης είναι τα εξής:

- **Φυσικό Στάδιο**(διάρκεια 10^{-18} sec): Σε αυτό το στάδιο μεταφέρεται η ενέργεια στα άτομα της βιολογικής ύλης και κατανέμεται ανάλογα με το είδος και την ενέργεια της ακτινοβολίας. Για ακτινοβολίες με χαμηλό LET υπάρχουν λιγότεροι ionισμοί και διεγέρσεις κατά μήκος της διαδρομής της δέσμης σε αντίθεση με τις ακτινοβολίες με υψηλό LET που υπάρχουν πυκνότεροι ionισμοί.[9]

- **Χημικό Στάδιο**(διάρκεια 10^{-10} sec): Κατά το στάδιο αυτό που ακολουθεί το φυσικό στάδιο τα άτομα του βιολογικού υλικού που ακτινοβολήθηκαν και τα συστατικά των κυττάρων αντιδρούν με ταχείες χημικές αντιδράσεις .Η απορρόφηση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας από τα βιολογικά υλικά δημιουργεί ιοντισμούς και διεγέρσεις συγκεκριμένων σχηματισμών που ονομάζονται ελεύθερες ρίζες .Οι ελεύθερες ρίζες είναι άτομα ή μόρια ηλεκτρικά ουδέτερα με ίσους αριθμούς πρωτονίων και ηλεκτρονίων αλλά ένα ηλεκτρόνιο της εξωτερικής τους στοιβάδας δεν σχηματίζει ζεύγος(ασύζευκτο ηλεκτρόνιο) με αποτέλεσμα οι ελεύθερες ρίζες να είναι εξαιρετικά χημικώς δραστικές και επειδή το μόριο που κυριαρχεί στα βιολογικά υλικά είναι αυτό του ύδατος είναι αυτό που δέχεται την επίδραση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Έτσι προκύπτουν οι βλάβες των βιολογικών μορίων και οι δραστικές ελεύθερες ρίζες.[9] [6]
- **Βιολογικό Στάδιο** (διάρκεια από 1 min έως έτη) : Σε αυτό το στάδιο παρατηρούνται φαινόμενα όπως η αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης ,η αναγνώριση και η επιδιόρθωση των βλαβών που έχουν δημιουργηθεί, η αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης και η δημιουργία βλαβών στους ιστούς .Οι μη επιδιορθωμένες βλάβες οδηγούν σε μεταλλάξεις ή σε κυτταρικό θάνατο. Σε συστημικό επίπεδο μπορεί να προκληθούν βλάβες που να οδηγήσουν σε καρκινογένεση έως και σε θάνατο του οργανισμού.

2.9 Τροποποιητικοί μηχανισμοί δράσης της ιοντίζουσας ακτινοβολίας

- Φυσικοί Παράγοντες

Οι φυσικοί παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται η δράση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας είναι το είδος της ακτινοβολίας, η κατάτμηση της δόσης δεδομένης ακτινοβολίας και ο ρυθμός δόσης. Με το είδος ή ποιότητα της ακτινοβολίας αναφερόμαστε κυρίως στο LET. Ακτινοβολία με μεγάλο LET (π.χ. ακτινοβολία- α) έχει μεγαλύτερη πιθανότητα να προκαλέσει διπλή θραύση στους κλώνους του DNA. Έτσι έχει οριστεί η σχετική βιολογική αποτελεσματικότητα (Relative Biological Effectiveness - RBE) ως ο λόγος της δόσης μιας ακτινοβολίας αναφοράς (συνήθως δέσμης ακτίνων) προς τη δόση την υπό εξέταση ακτινοβολία η οποία θα επαγάγει το ίδιο βιολογικό αποτέλεσμα:

$$RBE = \frac{D(\text{standard radiation})}{D(\text{radiation to be examined})}$$

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

- **Βιολογικοί παράγοντες**

Οι βιολογικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη δράση της ιοντίζουσας ακτινοβολία είναι η φάση του κυτταρικού κύκλου στην οποία θα βρίσκεται το κύτταρο την στιγμή της ακτινοβολήσης αλλά και το είδος των κυττάρων. Αν και το κύτταρο έχει ακτινοβοληθεί από ιοντίζουσα ακτινοβολία σε όλες τις φάσεις του κύκλου του, η ευαισθησία των κυττάρων ποικίλλει από φάση σε φάση. Οι φάσεις της μεγαλύτερης ευαισθησίας είναι το τέλος της G2 και η μίτωση(M), ενώ τα κύτταρα είναι σχετικά λιγότερο ευαίσθητα στη φάση της σύνθεσης (S). Επίσης, οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί κάποιας κυτταρικής βλάβης λειτουργούν σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου αλλά έχει αποδειχτεί ότι είναι αποδοτικότεροι στη φάση S.

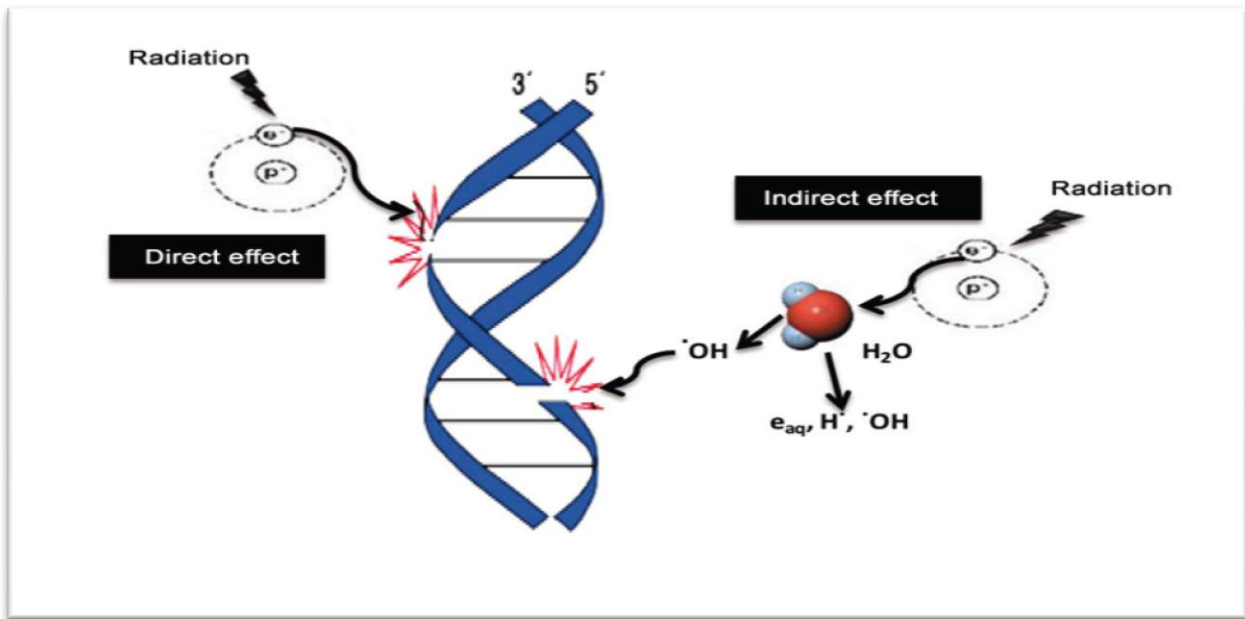
- **Χημικοί παράγοντες**

Διάφοροι χημικοί παράγοντες φαίνεται να ενισχύουν να ή να εμποδίζουν τη βιολογική επίδραση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Οι κυριότεροι τροποποιητικοί χημικοί παράγοντες περιλαμβάνουν το μοριακό οξυγόνο, και διάφορους δεσμευτές των δραστικών ελευθέρων ριζών, όπως διάφορες αντιοξειδωτικές βιταμίνες.

2.10 Βιολογικά αποτελέσματα σε μοριακό επίπεδο

Άμεση δράση

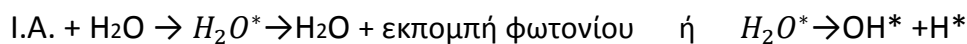
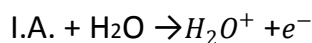
Ως άμεση χαρακτηρίζουμε τη δράση μιας ακτινοβολίας όταν το ίδιο το μόριο που δέχτηκε την ακτινοβολήση υφίσταται κάποια βιοχημική μεταβολή. Τέτοια βιομόρια είναι οργανικά πολυμερή μεγάλης βιολογικής σημασίας όπως ένζυμα ή νουκλεϊκά οξέα κυττάρων. Οι ιοντισμοί που προκλήθηκαν κατά το φυσικό στάδιο είναι ικανοί να προκαλέσουν ρήξη χημικών δεσμών και δημιουργία ελευθέρων ριζών οι οποίες συμβολίζονται με * ή R* στην περίπτωση των οργανικών ελευθέρων ριζών. Με αυτόν τον τρόπο, ένα βιολογικό μακρομόριο σπαι σε μικρότερα μακρομόρια με διαφορετικές βιοχημικές ιδιότητες ή δημιουργεί μια ελεύθερη οργανική ρίζα R* ή οποία μετά από ένωση με κάποια άλλη οργανική ή μη ρίζα, θα δημιουργήσει νέο μακρομόριο με καινούργιες βιοχημικές ιδιότητες. Η άμεση δράση των ακτινοβολιών στα βιολογικά μακρομόρια εκδηλώνεται με ποικίλους και διαφορετικούς τρόπους καθώς στα πρωτεϊνικά οξέα παρατηρείται ρήξη των πεπτιδικών δεσμών και η δημιουργία μικρότερων πολυπεπτιδικών αλυσίδων ενώ στις νουκλεοπρωτεΐνες προκαλείται διαχωρισμός της ιστόνης από τα νουκλεϊκά οξέα ή θραύσεις και δημιουργία ξεχωριστών τμημάτων μέσω θραύσης των χημικών δεσμών. [4] [8]



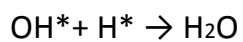
Εικόνα 2.5 Η άμεση και έμμεση δράση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας .Στην εικόνα απεικονίζεται το πώς δευτερογενώς επάγεται μια βλάβη στο DNA μέσω της δημιουργίας ελεύθερης ρίζας μέσω της ραδιόλυσης του ύδατος .

Έμμεση δράση – η ραδιόλυση του ύδατος

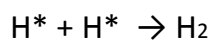
Ως έμμεση χαρακτηρίζουμε τη δράση μιας ακτινοβολίας όταν το μόριο που υφίσταται τη χημική μεταβολή έχει δεχθεί τις επιπτώσεις της ιοντίζουσας ακτινοβολίας μέσω δευτερογενών αντιδράσεων και πιο αναλυτικά στην βιολογική βλάβη εξαιτίας της χημικής αντίδρασης με δραστικές ελεύθερες ρίζες που σχηματίζονται κατά τη ραδιόλυση του νερού .Η έμμεση αλλά και η άμεση δράση των ακτινοβολιών στα μακρομόρια έχει ως αποτέλεσμα την ακαριαία δημιουργία πρωτογενών χημικών μεταβολών στα βιολογικά μακρομόρια καθώς ο χρόνος ζωής των ριζών είναι πολύ μικρός (10^{-5} sec) . Από την αλληλεπίδραση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας με τα μόρια του νερού παράγονται ιοντισμένα (H_2O^+) και διεγερμένα (H_2O^*) μόρια νερού καθώς και ελεύθερα ηλεκτρόνια (e^-), τα οποία έλκουν μόρια νερού λόγω της πολικότητάς τους (e_{aq}^- , καλούμενα και «ενυδατωμένα» ηλεκτρόνια). [8] [10]. Πιο αναλυτικά:



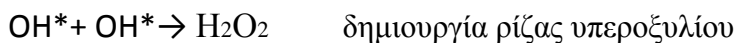
Η υδροξυλική ρίζα, η ρίζα υδρογόνου και τα ενυδατωμένα ηλεκτρόνια αντιδρούν μεταξύ τους με τον εξής τρόπο:



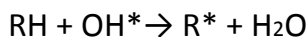
εξουδετέρωση των ριζών και δημιουργία μορίων νερού



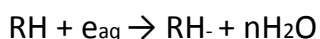
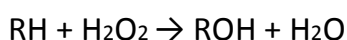
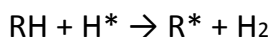
δημιουργία μορίων υδρογόνου



Όλες οι παραπάνω αντιδράσεις συμβαίνουν πολύ γρήγορα (10⁻⁷sec) και έχουν σαν αποτέλεσμα τη παραγωγή των παραπάνω χημικά δραστικών μορίων (OH*, H*, e_{aq}, H₂O₂) που αντιδρούν με άλλα μόρια προκαλώντας χημικές μεταβολές. Η υδροξυλική ρίζα (OH*) που είναι ιδιαίτερα δραστική αν αλληλεπιδράσει με ένα οργανικό μόριο RH (όπως το DNA) θα προκύψει η εξής αντίδραση :



Τα υπόλοιπα προϊόντα προκαλούν τις παρακάτω εξίσου σημαντικές αντιδράσεις:

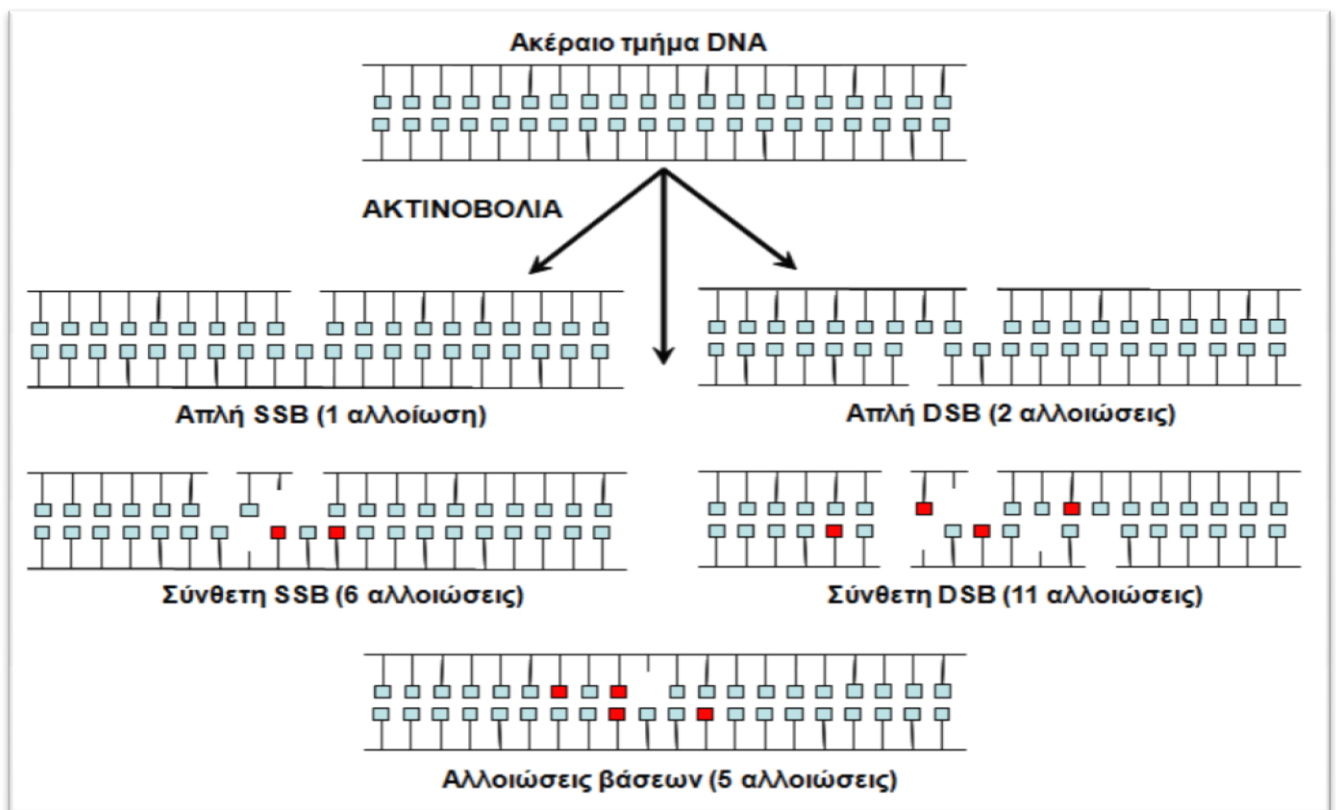


Έχουμε λοιπόν, την δημιουργία οργανικών ελεύθερων ριζών R[·] οι οποίες εξαιτίας της αστάθειας τους θα αντιδράσουν άμεσα και θα προκληθούν άμεσα αλλοιώσεις από τα προϊόντα της ραδιόλυσης με σοβαρές βιοχημικές συνέπειες στο κύτταρο. [6, 8-10]

2.11 Βλάβες στο DNA

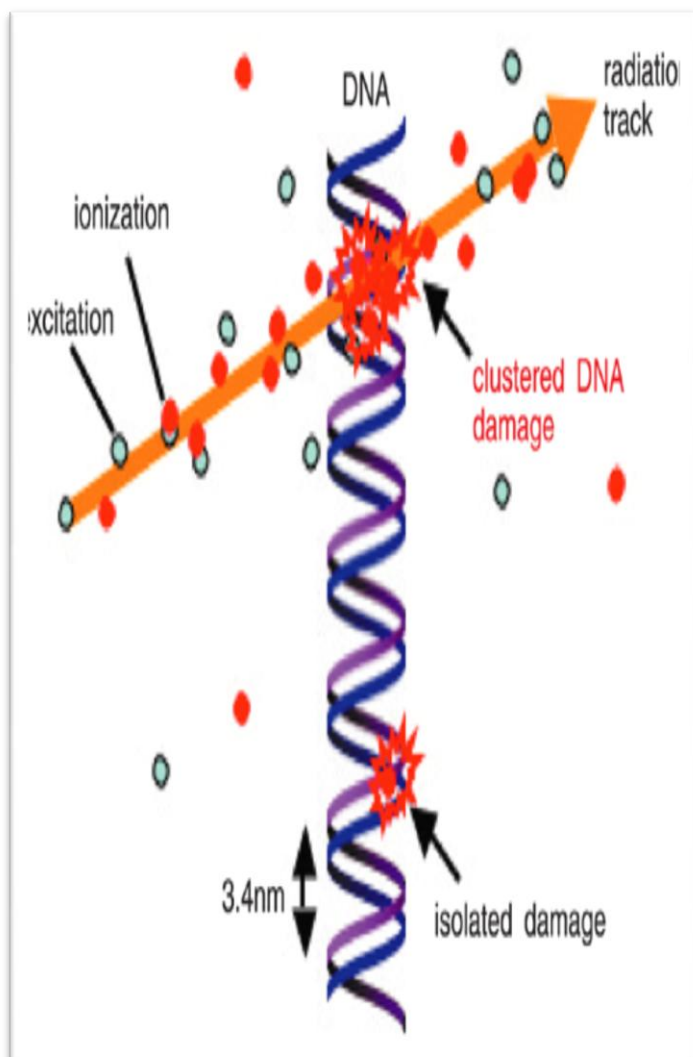
Για τις βιολογικές επιδράσεις της ιοντίζουσας ακτινοβολίας, μείζον πρόβλημα είναι η έκθεση του DNA σε διάφορους τοξικούς παράγοντες όπως η ρίζα του υπεροξυλίου ή το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Η έκθεση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία μπορεί να προκαλέσει στο DNA διάφορα είδη βλάβης όπως: α) αποσύνθεση, β) θραύση του ενός ή και των δύο κλώνων (Single Strand Break - SSB και Double Strand Break - DSB, αντίστοιχα), γ) αλλοιώσεις βάσεων (οξειδωση, απαμίνωση, αλκυλίωση ή μεθυλίωση), δ) απώλεια βάσης (αβασικά σημεία – AP sites), ε) ενδο-κλωνική, δια-κλωνική ή και δια-μοριακή σύνδεση (με άλλα μόρια DNA ή πρωτεϊνών). Υψηλές δόσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας προκαλούν κυρίως θραύσεις των κλώνων του DNA (SSB ή/και DSB), όταν υπάρξει ρήξη του φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ δεσοξυριβόζης και φωσφορικής ομάδας του ενός ή και των δύο κλώνων του DNA αντίστοιχα ενώ χαμηλές δόσεις οι χαμηλές δόσεις προκαλούν αλλοιώσεις των κλώνων, όπως αλλοίωση ή απώλεια βάσης ή σακχάρους [10, 11]. Ανά 1 Gy απορροφούμενης δόσης ακτινοβολίας χαμηλού LET προκαλούνται κατά μέσο όρο περίπου 105 ιοντισμοί ανά κύτταρο οι οποίες οδηγούν σε περίπου 500-1000 SSB, 20-30 DSB και 1000-2000 βλάβες βάσεων στο DNA καθώς σε καθημερινή βάση σημειώνονται πάνω από 50-100.000 βλάβες στο DNA των κυττάρων, αυθόρμητα ή λόγω της επίδρασης εξωγενών παραγόντων. [12] Η βλάβη που συσχετίζεται καλύτερα με τα βιολογικά αποτελέσματα της ιοντίζουσας ακτινοβολίας είναι οι δίκλωνες θραύσεις του DNA. Ακόμα και οι ακτινοβολίες χαμηλού LET, μπορούν να οδηγήσουν σε σύνθετες ή αλλιώς ομαδοποιημένες βλάβες του DNA (clustered DNA damage), οι οποίες περιλαμβάνουν μία ή περισσότερες δίκλωνες θραύσεις, καθώς και αρκετές μονόκλωνες και βλάβες βάσεων. [13] Τέτοιες σύνθετες βλάβες αντιπροσωπεύουν έως και 90% της συνολικής βλάβης του DNA κατά την ακτινοβολήση με

χαμηλού και υψηλού LET ακτινοβολία και είναι πιο δύσκολο να επιδιορθωθούν σε σχέση με μία μεμονωμένη βλάβη καθώς οι πρώτες φαίνεται να είναι σύνθετες και εστιασμένες, ενώ βλάβες από χημικούς, βιολογικούς ή εξωγενείς παράγοντες είναι σχετικά πιο απλές. Πέρα από τις ενδοκλωνικές ή διακλωνικές διασυνδέσεις του DNA υπάρχουν και οι διαμοριακές διασυνδέσεις του DNA με ιστονικές ή μη ιστονικές πρωτεΐνες με τις ιστονικές πρωτεΐνες να είναι αυξάνουν τις πιθανότητες να εμπλακούν σε εγκάρσιες διασυνδέσεις με το μόριο του DNA. [8] Από τις ποικίλες περιπτώσεις αλλοιώσεις βάσεων οι πιο αξιοσημείωτες είναι οι **οξειδωτικές βλάβες** καθώς δημιουργούνται κυρίως υπό συνθήκες στρες. Δημιουργούνται από δραστικές ρίζες και οξειδωτικά μόρια, παίρνουν ποικίλες μορφές και είναι ιδιαίτερα μεταλλαξογόνες



Εικόνα 2.6 Σχηματική αναπαράσταση των κυριότερων βλαβών του DNA, αριστερά έχουμε μονόκλωνες ενώ δεξιά δίκλωνες θραύσεις του DNA [12]

2.12 Ομαδοποιημένες Βλάβες DNA



Εικόνα 2.7 Σχηματισμός ομαδοποιημένης βλάβης

Οι OCDLs μπορούν να είναι αποτέλεσμα ποικίλων συνθέσεων SSBs οποίες κατανομούνται με διάφορους τρόπους στο μόριο του DNA σε απόσταση 1-10 ζεύγη βάσεων. Ιδιαίτερα σημαντικά είναι τα συμπλέγματα που οι βλάβες βρίσκονται σε απέναντι κλώνους του DNA (bistranded clusters) καθώς η περίπτωση της μη επιδιόρθωσης μπορεί να οδηγήσει σε DSB, χρωμοσωματικές βλάβες και γονιδιακή αστάθεια. Η δόση την ακτινοβολίας, η γεωμετρία της δέσμης και η ενέργειά της καθορίζουν τη χωρική αποθήκευση της ενέργειας και ως εκ τούτου την κατανομή των βλαβών.[12, 13] [14]. Ο μέσος όρος των βλαβών σε κάθε CDL αυξάνει με την αύξηση της γραμμικής μεταφοράς ενέργειας (LET) και έτσι σε μεγάλη LET οι CDLs είναι πιο σύνθετες. Ακτινοβολίες χαμηλού LET προκαλούν μεγαλύτερο αριθμό CDLs αλλά πιο απλών, μέσω των δευτερογενών ηλεκτρονίων που προκαλούν βλάβες σε εύρος δεκάδων nm.[14] Ένας ακόμη σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει το είδος και το πλήθος των βλαβών του DNA είναι η συγκέντρωση του οξυγόνου στο περιβάλλον του κυττάρου. Σε υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου το κλάσμα SSB/DSB μειώνεται ενώ ο αριθμός των βλαβών ανά CDL αυξάνει, δηλαδή οι CDLs γίνονται πιο σύνθετες. Οι βλάβες που οφείλονται σε

Ως ομαδοποιημένες/σύνθετες βλάβες (clustered /complex DNA lesions -CDLs) θεωρούμε την ύπαρξη δύο ή περισσότερων βλαβών σε αρκετά κοντινή απόσταση, δηλαδή μέσα σε μία ή δύο περιστροφές της έλικας του DNA. Στην περίπτωση που οι βλάβες αυτές είναι διαφορετικών τύπων βλάβες τότε τις ονομάζουμε σύνθετες ομαδοποιημένες βλάβες (complex clusters). Έχει παρατηρηθεί ότι οι συνέπειες των ομαδοποιημένων βλαβών είναι βιολογικώς σημαντικότερες από τις συνέπειες των ίδιων βλαβών αν αυτές ήταν διασκορπισμένες. Ο αριθμός των επιμέρους βλαβών, οι συνδυασμοί τους στην αλυσίδα στην οποία βρίσκονται όπως και το πόσο κοντά είναι μεταξύ τους είναι παράγοντες καθοριστικής σημασίας για την επιδιόρθωσή τους από το κύτταρο. Οι ομαδοποιημένες βλάβες διακρίνονται σε δύο κατηγορίες τις DSBs και τις μη-DSBs οξειδωτικές ομαδοποιημένες βλάβες DNA (OCDLs-Oxidative Clustered DNA Lesions).

ενδογενείς ή άλλους παράγοντες είναι συνήθως μεμονωμένες ενώ όσες προκαλούνται εξαιτίας έκθεσης σε ιοντίζουσα ακτινοβολία είναι κατά κύριο λόγο ομαδοποιημένες και σύνθετες. Έτσι, αυτές οι βλάβες είναι ακόμα πιο σημαντικές σε βιολογικό επίπεδο καθώς παρουσιάζουν αυξημένη ανθεκτικότητα στους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς σε σχέση με άλλες μεμονωμένες βλάβες που προκλήθηκαν δευτερογενώς από έκθεση σε ακτινοβολία. Συνεπώς, αν και οι βλάβες στο DNA λόγω των ακτινοβολιών είναι λιγότερες από τις βλάβες που προκαλούνται από άλλους παράγοντες, έχουν καθοριστική βιολογική σημασία και οδηγούν σε χρόνιες επιπτώσεις για τον οργανισμό[14].

2.13 Η απόκριση στις βλάβες του DNA

Η ύπαρξη βλαβών στο DNA ενεργοποιεί ένα μηχανισμό σηματοδότησης, το DNA Damage Response (DDR) ο οποίος ανάλογα με τη βαρύτητα και το είδος των βλαβών οδηγεί σε τρεις πιθανές κυτταρικές διαδικασίες : την ενεργοποίηση των κατάλληλων επιδιορθωτικών μηχανισμών, την προσωρινή αναστολή του κυτταρικού κύκλου ή τον κυτταρικό θάνατο μέσω της απόπτωσης. Ένα σύνολο πρωτεϊνών ενεργοποιούνται υπό την ύπαρξη συγκεκριμένων βλαβών και πυροδοτούν συγκεκριμένα σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία οδηγούν το κύτταρο σε κάποια από τις αναφερθείσες διαδικασίες. Τα μονοπάτια αυτά μπορεί να είναι αλληλεπικαλυπτόμενα ανάλογα με την κατάσταση που βρίσκεται το κύτταρο. Βλάβη του DNA ενεργοποιεί συγκεκριμένες πρωτεΐνες ανάλογα με το είδος της βλάβης. Οι πρωτεΐνες αυτές ενεργοποιούν συγκεκριμένες κινάσες(ένζυμα) οι οποίες με τη σειρά τους φωσφορυλιώνουν το υπόστρωμά τους ώστε να ενεργοποιηθεί ο κατάλληλος μηχανισμός επιδιόρθωσης του DNA ανάλογα με τη βλάβη. Ο απαιτούμενος χρόνος για την επιδιόρθωση του DNA εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως οι πρωτεΐνες, οι οποίοι αναστέλλουν τα σύμπλοκα των κυκλινών(οικογένεια πρωτεϊνών) που είτε μειώνουν το ρυθμό είτε αναστέλλουν τη διαδικασία του κυτταρικού κύκλου. Αρχικά, το σύμπλεγμα πρωτεϊνών Mre11–Rad50–Nbs1 (MRN) ανιχνεύει τις DSBs. Το σύμπλεγμα αυτό έχει ρόλο στην ενεργοποίηση των Rad53 ,CHK1 κινάσων των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, όπως και της πρωτεΐνης ATM. Τότε η ATM προσδένεται στα σημεία θραύσης, φωσφορυλιώνεται και ενεργοποιεί τις CHK1 κινάσες οι οποίες με τη σειρά τους φωσφορυλιώνουν την πρωτεΐνη p53 έτσι ενεργοποιείται η p21 που προσδένεται στη κυκλινο-εξαρτώμενη κινάση cyclinE-CDC-2 και έτσι ελέγχει το σημείο μετάβασης από την G1 στην S φάση. Με αυτό τον τρόπο σταματά η μετάβαση στη φάση S και το DNA δεν διπλασιάζεται για να διορθωθεί πρώτα η βλάβη. Σε περίπτωση που η βλάβη είναι εκτεταμένη, το κύτταρο οδηγείται είτε σε απόπτωση είτε σε πρόωρη γήρανση. Σε αντίθετη περίπτωση μπορεί να υπάρξει γονιδιακή αστάθεια και πιθανόν καρκινογένεση.[15]

2.14 Επιδιόρθωση

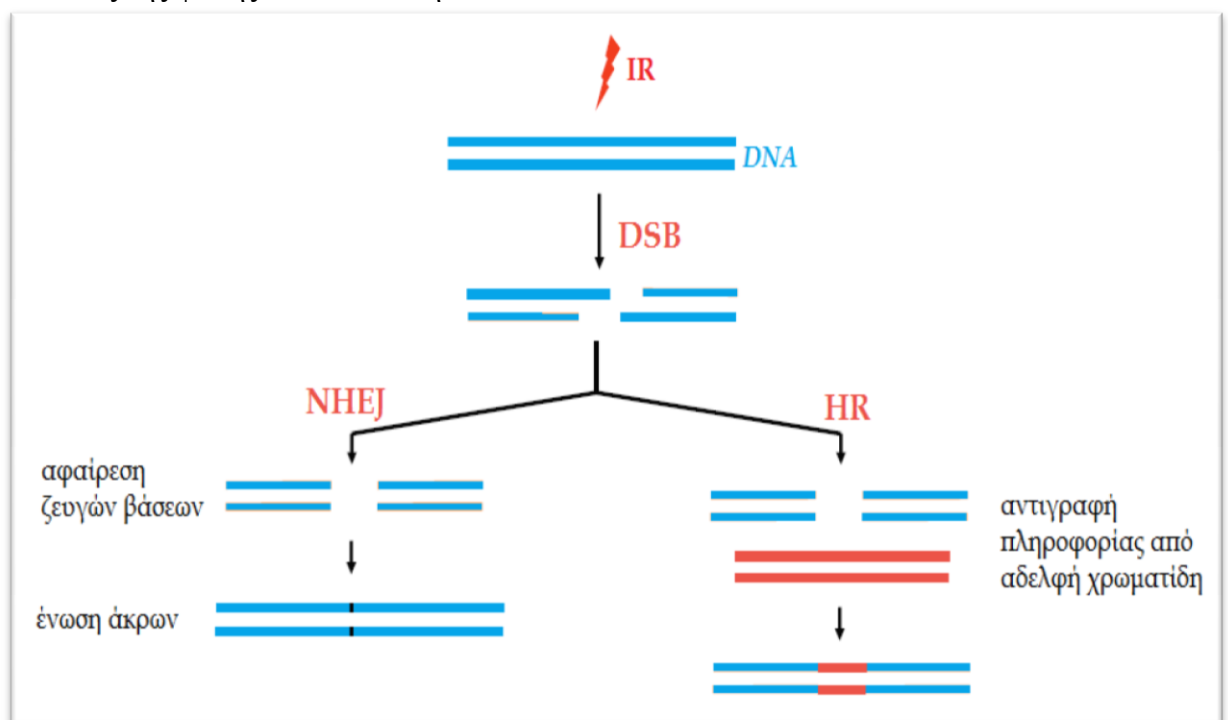
Ποικίλα ένζυμα και πρωτεΐνες ενεργοποιούνται για την επιδιόρθωση των βλαβών στο DNA αφού σε αντίθετη περίπτωση οι επιπτώσεις στο κύτταρο και γενικότερα στον οργανισμό θα ήταν

θανάσιμες. Για κάθε ξεχωριστή βλάβη είναι υπεύθυνος ένας ξεχωριστός επιδιορθωτικός μηχανισμός μέσω της απόκρισης των σηματοδοτικών μονοπατιών χρησιμοποιώντας και τα αντίστοιχα ένζυμα.

2.14.1 Επιδιόρθωση δίκλωνων θραύσεων

Για την επιδιόρθωση των DSB ενεργοποιούνται δύο μηχανισμοί η μη ομόλογη ένωση άκρων NHEJ(Non-homologous End-joining)και ο ομόλογος ανασυνδυασμός HR(Homologous Recombination).

- Μη ομόλογη ένωση άκρων(NHEJ) :Σε αυτήν την περίπτωση οι DNA πολυμεράσες και νουκλεάσες καθαρίζουν και διαμορφώνουν κατάλληλα τα άκρα έτσι ώστε να γίνει η απολί- νωση (αποκοπή) των δύο μερών. Η NHEJ δεν είναι επιρρεπής στα λάθη ,λειτουργεί σε όλη την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου αλλά κυριαρχεί στην G1 και S φάση.
- Ομόλογος ανασυνδυασμός (HR) : Ο ομόλογος ανασυνδυασμός είναι μια αργή, αλλά υψηλής αξιοπιστίας επιδιορθωτική διαδικασία, κατά την οποία περιοχές από ομόλογο DNA συνήθως της αδερφής χρωματίδας και μεταφέρουν της πληροφορία από την ομόλογη ακολουθία για την σύνθεση των κατάλληλων νουκλεοτιδίων με την βοήθεια πρωτεϊνών και ενεργοποιείται στο τέλος της φάσης S και κατά την G2.[16] [17]



Εικόνα 2.8 Επιδιόρθωση δίκλωνων θραύσεων με ομόλογη ένωση άκρων και ομόλογο ανασυνδυασμό.

2.14.2 Επιδιόρθωση μονόκλωνων θραύσεων

Οι μηχανισμοί που ενεργοποιούνται σε αυτήν την κατηγορία μηχανισμών επιδιόρθωσης είναι:

- **Το σύστημα επιδιόρθωσης των αταίριαστων βάσεων (Mismatch Repair-MMR).**
Ενεργοποιείται στην λανθασμένη τοποθέτηση ενός νουκλεοτιδίου που εμφανίζεται κατά την αντιγραφή του DNA (προσθήκη ή απαλοιφή 1-4 βάσεων ή εισαγωγή μη συμπληρωματικής βάσης)
- **Ο μηχανισμός εκτομής νουκλεοτιδίων (nucleotide excision repair –NER).**
Ο μηχανισμός αυτός διορθώνει τις βλάβες λόγω παραμόρφωσης του σχήματος της διπλής έλικας του DNA όπως ο σχηματισμός διμερών πυριμιδινών και η ομοιοπολική πρόσδεση ογκωδών χημικών ομάδων.
- **Ο μηχανισμός εκτομής βάσης (base excision repair –BER).**
Διορθώνει τις SSBs και διάφορες αλλοιώσεις ή απώλεια βάσης (οξειδωση, μεθυλίωση, αποπουρίνωση ,αποπυριμιδίνωση ή απαμίνωση).

Επιδιόρθωση εκτομής βάσεων BER

Οι βλάβες εκείνες που ενεργοποιούν τον μηχανισμό BER προκαλούνται σε μεγαλύτερο ποσοστό από ακτινοβολίες χαμηλού LET .Αν δεν μπορέσει το κύτταρο να τις επιδιορθώσει τότε αυτές οι βλάβες καθίστανται ιδιαιτέρως μεταλλαξογόνες και στην περίπτωση των ομαδοποιημένων βλαβών σε αντίθετους κλώνους μπορεί να εξελιχθούν σε DSBs.

Η διαδικασία BER ξεκινά από ένα ένζυμο το οποίο ονομάζεται DNA γλυκοσυλάση το οποίο διαβάζει την αλληλουχία των βάσεων και ανιχνεύει εκείνες που έχουν αλλοιωθεί .Οι DNA γλυκοσυλάσες διακρίνονται σε δύο είδη, τις μονολειτουργικές ,όπου μέσω ενός μορίου νερού υδρολύουν τον γλυκοζιδικό δεσμό και δημιουργούν μια αβασική θέση, και τις πολυλειτουργικές οι οποίες σπάνε τον φωσφοδιεστερικό δεσμό και έτσι δημιουργούν μια επιπλέον θραύση του κλώνου στην θέση αυτή.Ανεξάρτητα από τον τύπο της γλυκοσυλάσης που έχει επιλεγθεί ,στην συνέχεια θα δράσει μια AP ενδονουκλεάση τύπου 1(APE1) που θα προκαλέσει ρήξη του φωσφοδιεστερικού δεσμού με την χρήση του Mg^{2+} ακριβώς πάνω από την φωσφορική ομάδα της αβασικής θέσης.

2.15 Προβλήματα στην επιδιόρθωση

2.15.1 Ελλιπής ανταπόκριση

Πολλές ανθρώπινες σχετίζονται με δυσλειτουργίες και ελλιπή δραστηριοποίηση κάποιου μηχανισμού επιδιόρθωσης .Οι ελαττωματικές λειτουργίες αυτές εμφανίζονται ως μειωμένη αντιμει-

τώπιση απέναντι σε επιβλαβείς παράγοντες για το DNA ή ως ελλιπής ανταπόκριση των στοιχείων που εμπλέκονται στις διαδικασίες σηματοδότησης για τις βλάβες του DNA .

Αυτές οι δυσλειτουργίες αυτές μπορούν να είναι κληρονομικές και να παρουσιαστεί στους ασθενείς έντονη γενωμική αστάθεια και προδιάθεση για κακοήθεια. Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση της ελλιπούς λειτουργίας σε σχέση με την αποδοτικότητα του μηχανισμού BER, είναι γενικά αποδεκτό πως όταν συναντάμε μεταλλάξεις σε γονίδια που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή των ενζύμων που συμμετέχουν στον μηχανισμό BER, οδηγούμαστε στην ανεπαρκή τους λειτουργία κάτι το οποίο έχει σοβαρές επιπτώσεις για τον οργανισμό. Για παράδειγμα, διάφοροι πολυμορφισμοί του γονιδίου της APE1 έχουν συνδεθεί με διάφορους τύπους καρκίνου ή πιθανών καρκινογενέσεων αφού η σωστή και η ομαλή λειτουργία του κυττάρου εξαρτάται κατά πολύ από την παρουσία της APE1 καθώς το 95% της δραστηριότητας των εδονουκλεασών εξαρτώνται από εκείνη. Η σημασία των APE1 ενζύμων αναφέρεται και στην θεραπεία του καρκίνου, όπου εφαρμόζοντας την απενεργοποίησή τους καταλήγουμε στην απόπτωση των κακοηθών κυττάρων. [18, 19]

2.15.2 Προβληματική Λειτουργία

Ο επιδιορθωτικός μηχανισμός είναι πιθανό να μην λειτουργήσει σωστά και έτσι να προκύψουν νέες βλάβες. Η περίπτωση της γενετικής αστάθειας σχετίζεται άμεσα με τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης BER. Ένα παράδειγμα είναι η επιδιόρθωση της δοξυ-γουανίνης στην αλληλουχία CAG/CTG του γονιδίου Huntington όπου η προβληματική αλληλουχία επεκτείνεται δημιουργώντας περισσότερες δοξυ-γουανίνες, των οποίων η ανεξέλεγκτη εμφάνιση καθιστά δυσκολότερη την επιδιόρθωση από την γλυκοσυλάση OGG1 και αυτό θα οδηγήσει σε εμφάνιση νευροεκφυλιστικής νόσου. Η ελλιπής επιδιόρθωση λοιπόν των διάφορων τύπων βλαβών στο DNA είναι αρκετά συχνή στην περίπτωση των OCDL καθώς η συσσώρευση βλαβών ανά τμήματα δεν επιτρέπει την άμεση επιδιόρθωση τους κάτι το οποίο καθιστά πιθανό το ενδεχόμενο να υπάρχουν ακόμη και στην έναρξη της κυτταρικής διαίρεσης. Επιπλέον στην περίπτωση των OCDL δεν υπάρχει πλήρης εικόνα της γνώριμης αλληλουχίας βάσεων δυσχεραίνοντας την ανίχνευση κάθε βλάβης και την σωστή επιδιόρθωσή της καθώς δεν υπάρχει το σωστό πλαίσιο αντιστοίχισης. Έτσι παρατηρούνται μεταλλάξεις και χρωμοσωμικές θραύσεις. [18-20]

2.16 Βιολογικά αποτελέσματα σε κυτταρικό επίπεδο

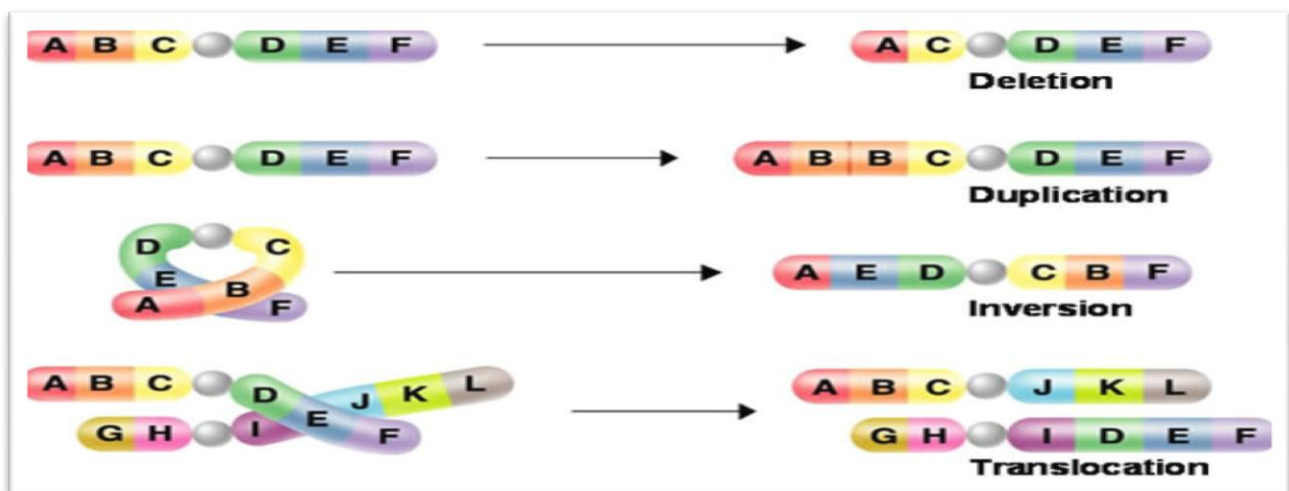
2.16.1 Γονιδιακές μεταλλάξεις

Ως γονιδιακή μετάλλαξη ορίζουμε την μόνιμη αλλαγή της αλληλουχίας των βάσεων ενός γονιδίου. Η ιοντίζουσα ακτινοβολία αποτελεί μεταλλαξογόνο παράγοντα και εκτός από χρωμοσωμικές ανωμαλίες, οι μη επιδιορθωμένες δίκλωνες θραύσεις μπορούν να οδηγήσουν επίσης σε μετάλλαξη, λόγω ελλείμματος βάσεων στην περίπτωση που τμήμα του DNA δεν επανασυνδεθεί μέσω κάποιου μηχανισμού επιδιόρθωσης και συνεχίσει να παραμένει ελεύθερο. Αλλοιωμένες βάσεις επίσης οδηγούν σε μετάλλαξη, όπως π.χ η οξειδωμένη γουανίνη 8-Oxoguanine η οποία λόγω της δομής της δημιουργεί 2 δεσμούς υδρογόνου με την αδενίνη αντί της θυμίνης και στη συνέχεια κατά το διπλασιασμό του DNA αλλάζει την σειρά βάσεων του γονιδίου αντικαθιστώντας την γουανίνη με θυμίνη και την κυτοσίνη με αδενίνη. Οι μεταλλάξεις αυξάνονται με την αύξηση της δόσης της ιοντίζουσας ακτινοβολίας, εμφανίζονται κυρίως μετά από αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα και για αυτό το λόγο σχετίζονται κυρίως με τα στοχαστικά αποτελέσματα της ακτινοβολίας. Οι μεταλλάξεις

είναι ο κύριος παράγοντας εμφάνισης των στοχαστικών αποτελεσμάτων της ακτινοβολίας και η συχνότητα εμφάνισής τους αυξάνει με τη δόση ακτινοβολίας. Αξίζει να σημειωθεί πως ο ανθρώπινος μεταβολισμός οδηγεί σε 240.000 μεταλλάξεις στα ανθρώπινα κύτταρα καθημερινά και η απορρόφηση δόσης ιοντίζουσας ακτινοβολίας προσθέτει σε αυτές μόλις 2000 μεταλλάξεις ανά Gy . [21, 22] [23]

2.16.2 Χρωμοσωματικές αλλοιώσεις

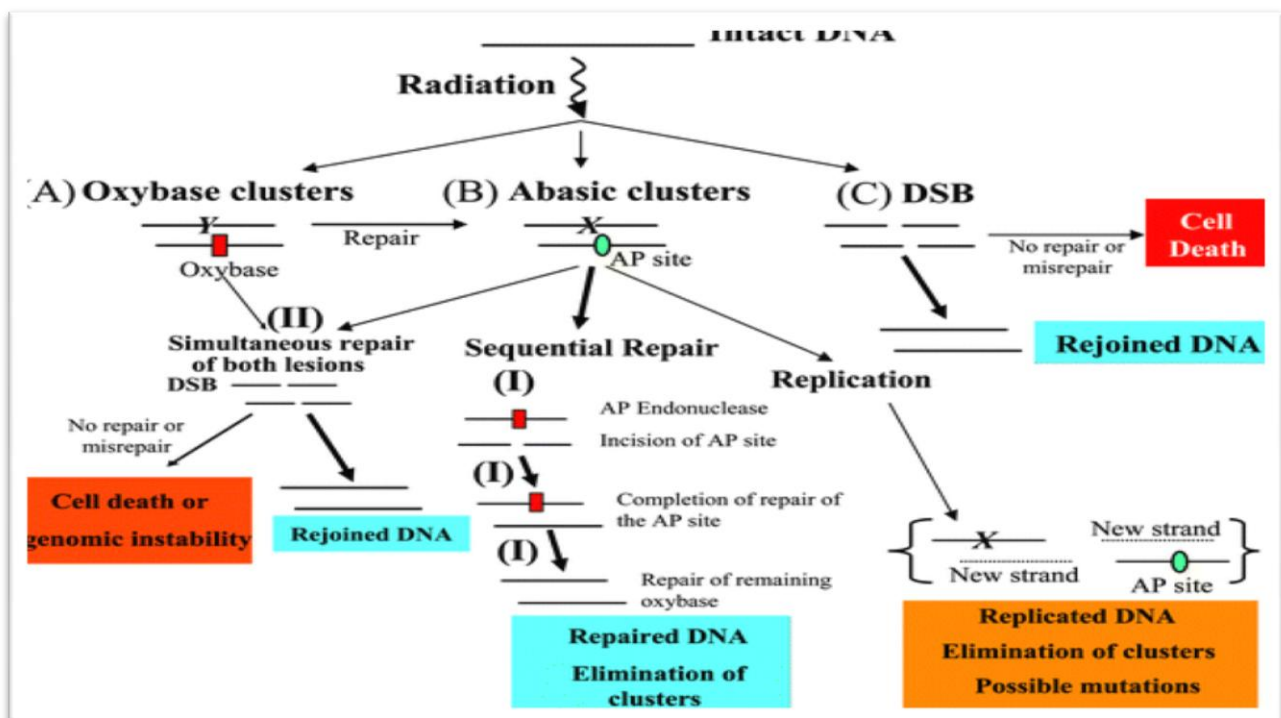
Πέραν των μεταλλάξεων, μη επιτυχώς επιδιορθωμένες DSB (ή ομαδοποιημένες βλάβες DNA) μπορεί να οδηγήσουν σε χρωμοσωματικές αλλοιώσεις, οι οποίες καθίστανται εμφανείς στην επόμενη διαίρεση του κυττάρου, στη φάση της μετάφασης .Οι αλλοιώσεις αυτές προκύπτουν από διάφορους παράγοντες όπως η ιοντίζουσα ακτινοβολία ακόμη και για χαμηλές δόσεις (<1Gy) .Οι χρωμοσωματικές ανωμαλίες περιλαμβάνουν ανταλλαγές των θραυσμάτων του DNA α) μεταξύ διαφορετικών χρωμοσωμάτων, β) μεταξύ των χρωματίδων του ίδιου χρωμοσώματος ή γ)ακόμα και μεταξύ περιοχών της ίδιας χρωματίδης. Διακρίνονται σε χρωμοσωματικές ανωμαλίες (π.χ. δακτύλιοι και δικεντρικά χρωμοσώματα) και χρωματιδικές ανωμαλίες (π.χ. χρωματιδικές θραύσεις), ανάλογα με το εάν η βλάβη συνέβη κατά τη G1 φάση ή τη G2 φάση, αντίστοιχα (βλάβη κατά την S φάση ή τη μίτωση μπορεί να οδηγήσει και στα δύο είδη). Η εμφάνιση άτυπων χρωμοσωμάτων σε κύτταρα που πολλαπλασιάζονται μπορεί να οδηγήσει στον κυτταρικό θάνατο. Η ποσοτικοποίηση των χρωμοσωματικών ανωμαλιών σε λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος στην πρώτη μετάφαση μετά την ακτινοβόληση αποτελεί μέθοδο βιολογικής δοσιμετρίας ,ενώ η ποσοτικοποίηση των χρωματιδικών θραυσμάτων στην πρώτη μετάφαση μετά από *in vitro* ακτινοβόληση λεμφοκυττάρων στη G2 φάση του κυτταρικού κύκλου, χρησιμοποιείται ως μέθοδος ανίχνευσης αυξημένης ακτινοευαισθησίας σε άτομα του πληθυσμού. Ορισμένες αναδιατάξεις των χρωμοσωμάτων είναι σταθερές και μεταβιβάζονται αναλλοίωτες στις επόμενες γενιές κατά τη μείωση και τη μίτωση, ενώ άλλες είναι ασταθείς. Το μέγεθος της βλάβης στα χρωμοσώματα εξαρτάται περισσότερο από τη διάρκεια της έκθεσης παρά από τη συνολική δόση ιοντίζουσας ακτινοβολίας που έχει δεχτεί . Τέλος, η αύξηση του ρυθμού της δόσης αυξάνει τον αριθμό των χρωμοσωμικών θραύσεων . [2, 8]



Εικόνα 2.9 Σχηματική απεικόνιση των χρωμοσωματικών μεταλλάξεων όπου φαίνεται η διαγραφή ,η αλληλοεπικάλυψη, η αντιστροφή και μετατόπιση των χρωμοσωμάτων.

2.16.3 Κυτταρικός θάνατος

Τα είδη κυτταρικού θανάτου είναι τρία η απόπτωση, η νέκρωση και η μιτωτική καταστροφή. Η απόπτωση είναι μια διαδικασία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου και είναι ιδιαίτερα σημαντική για την εξέλιξη και την ελεγχόμενη αποβολή μη φυσιολογικών κυττάρων από τον οργανισμό. Ενεργοποιείται και ρυθμίζεται μέσω των αποπτωτικών σημάτων συγκεκριμένων πρωτεϊνών, και στην συνέχεια παρατηρείται συρρίκνωση της χρωματίνης και του πυρήνα, διάρρηξη της μιτοχονδρικής μεμβράνης και μια συνολική αποδόμηση του κυττάρου όπου αργότερα τα διάφορα σώματα που προέρχονται από αυτήν την αποδόμηση φαγοκυτταρώνονται χωρίς την δημιουργία κάποιας φλεγμονής. Η απόπτωση παρατηρείται αμέσως μετά την ανεπιτυχής κυτταρική διαίρεση λόγω ακτινοβόλησης κυρίως από χαμηλές δόσεις ακτινοβολίας. Η νέκρωση είναι μια μη ελεγχόμενη διαδικασία πρόωρου κυτταρικού θανάτου. Τα κύτταρα που ακολουθούν αυτήν την διαδικασία δεν έχουν ακολουθήσει το σηματοδοτικό μονοπάτι της απόπτωσης καθώς υπάρχει εμπλοκή συγκεκριμένων υποδοχέων που ενεργοποιούνται από την απώλεια ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης και στην συνέχεια υπάρχει μια μη ελεγχόμενη απελευθέρωση κυτταρικών προϊόντων στον ενδοκυττάριο χώρο που συνοδεύεται με διακοπή του μεταβολισμού και με φλεγμονώδη αντίδραση. Η νέκρωση παρατηρείται ως επί το πλείστον σε ακτινοβόληση υψηλών δόσεων ιοντίζουσας ακτινοβολίας παράγοντας βλάβες επικίνδυνες για τον οργανισμό συνολικά. Ο αναπαραγωγικός κυτταρικός θάνατος έρχεται ως αποτέλεσμα της μιτωτικής καταστροφής ύστερα από κάποιες διαιρέσεις σε κύτταρα με βλάβες που δεν είναι πια επιδιορθώσιμες και ενεργοποιείται μετά από μία καθυστερημένη απόπτωση ή νέκρωση και συμβαίνει συνήθως σε υψηλές δόσεις ακτινοβολίας. [2, 8]



Εικόνα 2.10 Μοντέλο κατηγοριοποίησης βλαβών DNA που δείχνει τα πιθανά μονοπάτια με τα οποία οι βλάβες αυτές επιδιορθώνονται ή μετατρέπονται σε βιολογικά επικίνδυνες.

2.17 Συστημικά Αποτελέσματα

Η επίδραση που έχει η ιοντίζουσα ακτινοβολία στην βιολογική ύλη εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως το είδος της βλάβης στο DNA, ο ρυθμός της δόσης της ακτινοβολίας, τα επίπεδα οξυγόνου του κυττάρου καθώς και το είδος τους, η ηλικία, ο τρόπος ζωής και ποικίλοι άλλοι παράγοντες. Υπάρχει μια γενική κατηγοριοποίηση των επιβλαβών αποτελεσμάτων της ιοντίζουσας ακτινοβολίας σύμφωνα με την οποία αυτά διακρίνονται σε καθορισμένα και στοχαστικά αποτελέσματα σύμφωνα με την Διεθνή Επιτροπή Ακτινοπροστασίας (ICRP).

2.17.1 Καθορισμένα αποτελέσματα

Πάνω από κάποιες συγκεκριμένες δόσεις η εμφάνισή τους είναι αναπόφευκτη, ενώ η έντασή τους αυξάνει με την αύξηση δόσης. Προέρχονται από την θανάτωση των κυττάρων και για την εμφάνιση των καθορισμένων αποτελεσμάτων, απαιτείται η υπέρβαση ενός κατώφλιου – δόσης το οποίο αλλάζει από ιστό σε ιστό και εξαρτάται και από διάφορους άλλους παράγοντες όπως π.χ ο χρόνος εμφάνισής τους. Η πιθανότητα της εμφάνισής τους για δόσεις μικρότερες του κατώφλιου - δόσης είναι μηδενική, ενώ με την υπέρβαση του κατώφλιου, η τιμή της πιθανότητας εμφάνισης της βλάβης με την αύξηση δόσης, αγγίζει το 100%. Αν η προκαλούμενη στο όργανο βλάβη είναι εκτεταμένη και μη αναστρέψιμη, μπορεί να οδηγήσει στην πλήρη καταστροφή του οργάνου, ως και στο θάνατο του οργανισμού.[5]

Βλάβη	Συμπτώματα	Δόση Κατώφλιου	Χρόνος Εκδήλωσης
Σύνδρομο αιμοποιητικού συστήματος	Λεμφοπενία, αναιμία, αιμορραγία	2 Gy	24 ώρες
Σύνδρομο γαστρεντερικού συστήματος	Αναιμία, ναυτία, διάρροια, έλκη, εντερική αιμορραγία	7Gy	7 εβδομάδες
Σύνδρομο κεντρικού νευρικού συστήματος	Εγκεφαλικό οίδημα, μείωση ενδιαγγειακού όγκου αίματος	50Gy	Θάνατος σε 1-4 ημέρες

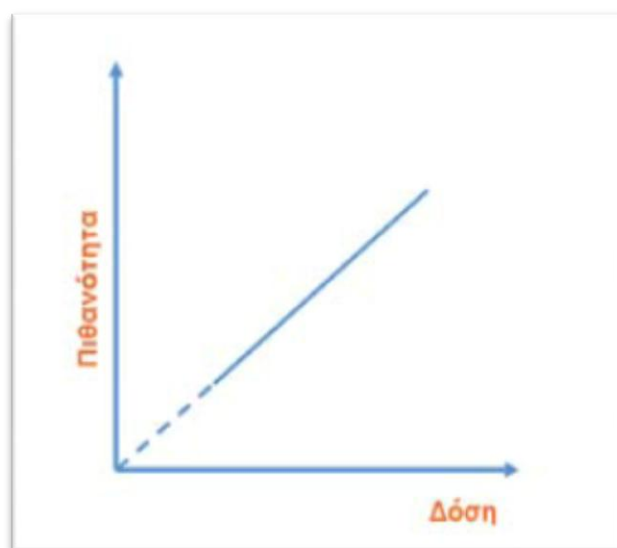


Εικόνα 2.11 Τυπικά καθορισμένα αποτελέσματα και η ραγδαία αύξηση εμφάνισής τους αν ξεπεράσουν το κατώφλι. [5]

2.17.2 Στοχαστικά αποτελέσματα

Τα στοχαστικά αποτελέσματα δεν παρουσιάζουν κατώφλι εμφάνισης, η πιθανότητα εμφάνισής τους αρχίζει από πολύ χαμηλές δόσεις και μπορούν εκδηλωθούν μακροπρόθεσμα σε ένα άτομο που εκτέθηκε σε ακτινοβολία (20-30 χρόνια) ή στους απογόνους του ή να μην εμφανιστούν και καθόλου. Προέρχονται από μεταλλάξεις κυττάρων που εκτέθηκαν σε ακτινοβολία αλλά η βαρύτητα ενός στοχαστικού αποτελέσματος είναι ανεξάρτητη της δόσης, ενώ η εξάρτηση της πιθανότητα εμφάνισης του στοχαστικού αποτελέσματος από τη δόση ακτινοβολίας αποδίδεται με γραμμικό - χωρίς κατώφλι δόσης μαθηματικό πρότυπο (Linear Non Threshold model – LNT).[5]

Βλάβη	Χρόνος	Αύξηση πιθανότητας εμφάνισης	Φυσιολογική πιθανότητα εμφάνισης
Θανατηφόρος καρκίνος	Λεμφοπενία, αναιμία, αιμορραγία	5% ανά Sv	25%
Μη θανατηφόρος καρκίνος	Αναιμία, ναυτία, διάρροια, έλκη, εντερική αιμορραγία	1% ανά Sv	
Λευχαιμία	Εγκεφαλικό οίδημα, μείωση ενδιαγγειακού όγκου αίματος	5% ανά Sv	0,0015%
Γενετικά αποτελέσματα	Επόμενες γενεές	1,3% ανά Sv	3-6%



Εικόνα 2.12 Τυπικά στοχαστικά αποτελέσματα και ως "φυσιολογική" πιθανότητα εμφάνισης εννοείται η πιθανότητα βλάβης από παράγοντες άσχετους με την ακτινοβολία.[5]

2.18 Μη στοχευμένες επιδράσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας (Non-targeted effects, NTE)

Από τις αρχές της δεκαετίας του 90, οι μέχρι τότε θεωρίες για τις επιπτώσεις της ιοντίζουσας ακτινοβολίας στην ακτινοβιολογία άρχισαν να ανατρέπονται. Κλινικά δεδομένα παρουσίασαν πως τα καθορισμένα αποτελέσματα που αναμένονταν σε υψηλές δόσεις ακτινοβολίας εν τέλει μπορούν να εμφανιστούν και σε χαμηλότερες δόσεις κάτι που δείχνει πως παραβιάζεται η σχέση απορροφούμενης δόσης και βαρύτητα επίπτωσης ή ακόμα και η αναθεώρηση του κατωφλίου δόσης προς χαμηλότερες τιμές. [24-26]

Παρατηρήθηκε ότι και στα κύτταρα στα οποία δεν έχει αποθηκευτεί άμεσα ενέργεια εμφανίζονται σημαντικά βιολογικά αποτελέσματα όπως γονιδιακή αστάθεια, ανταλλαγές αδερφών χρωματίδων, καρκινογένεση διάφορες βλάβες στο DNA (μεμονωμένες αλλά και OCDL) και διάφορα διαδικασίες που οφείλονται στην ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος όπως η αυξημένη ακτινοπροστασία. Τα παραπάνω αποτελέσματα συμβαδίζουν με επιπτώσεις που έχουν κύτταρα τα οποία έχουν ακτινοβοληθεί καταδεικνύοντας την σύνδεση και την αποστολή σημάτων από αυτά τα κύτταρα στα μη ακτινοβολημένα. [27]

Οι μη στοχευμένες επιδράσεις (ΜΣΕ) κατηγοριοποιούνται λοιπόν στα παρακείμενα αποτελέσματα (bystander effects), στην απόκριση απομακρυσμένων ιστών (abscopal effects), στην γονιδιακή αστάθεια (genomic instability) και στην προσαρμοσμένη απόκριση στην ιοντίζουσα ακτινοβολία (adaptive response).

2.18.1 Επιπτώσεις σε παρακείμενα κύτταρα (bystander effects)

Ορίζουμε τις συνέπειες που επάγονται λόγω ακτινοβολήσεως σε γειτονικά κύτταρα (μέχρι 5nm) ή σε επαφή με τα ακτινοβολημένα. Τα ακτινοβολημένα κύτταρα επάγουν βλάβες στο DNA και αποσταθεροποιούν το περιβάλλον των γειτονικών τους κυττάρων. Η πειραματική απόδειξη για αυτό το φαινόμενο έγινε στο πείραμα των Nagasawa και Little το 1992 όταν κατά την ακτινοβολήση μιας κυτταρικής καλλιέργειας όπου ακτινοβολήθηκε μόνο το 1% των κυττάρων με σωματίδια α, παρατηρήθηκε πως στο 30% του κυτταρικού πληθυσμού υπήρχε αυξημένη παρουσία ανταλλαγής αδερφών χρωματίδων και επαγωγή γενωμικής αστάθειας η οποία γίνεται αντιληπτή μέσω των εφαιτομενικών κυττάρων λόγω των χασμοσυνδέσεων (gap junctions). Τέλος, πειράματα με μικροδύσμες ιοντίζουσας ακτινοβολίας ενίσχυσαν κι άλλο την υπόθεση ύπαρξης επιπτώσεων σε παρακείμενα κύτταρα αφού λόγω της μεγάλης ακρίβειας του στόχου οι πιθανότητες διασποράς της ακτινοβολίας σχεδόν εκμηδενίστηκαν. [24, 25] [28]

2.18.2 Προσαρμοσμένη απόκριση στην ιοντίζουσα ακτινοβολία

Ως προσαρμοσμένη απόκριση ορίζουμε το φαινόμενο που παρατηρείται στους οργανισμούς όπου η έκθεση αρχικά χαμηλής δόσης ακτινοβολίας προστατεύει από μία μελλοντική έκθεση σε υψηλότερη δόση η οποία σε άλλη περίπτωση θα ήταν επιβλαβής για τον οργανισμό. Πειράματα έδειξαν πως κύτταρα που εκτέθηκαν σε χαμηλά επίπεδα ακτινοβολίας στη συνέχεια έγιναν λιγότερο ευαίσθητα σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες στον σχηματισμό μικροκυρήνων και σε κακοήθους σχηματισμούς όταν αργότερα εκτέθηκαν σε υψηλότερη δόση. Το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε σε χαμηλές δόσεις ακτινοβολίας (η αρχική δόση δεν υπερβαίνει τα 0.5 Gy με αποτέλεσμα να μην σχετίζονται με την εκτίμηση κινδύνου χαμηλών δόσεων. Τα πρώτα επαγόμενα αποτελέσματα έδειξαν πως επηρεάζεται σημαντικά το ποσοστό των μεταλλάξεων, το ποσοστό επιβίωσης των κυττάρων ύστερα από την έκθεση σε υψηλότερη δόση ακτινοβολίας, η κινητική τους κατάσταση αλλά και ο αριθμός των σχηματισμών εστιών H2AX σε μία κυτταρική καλλιέργεια. Πέραν όμως από αυτές τις παρατηρήσεις δεν υπάρχουν αξιόπιστα αποτελέσματα που να οδηγούν σε ασφαλή συμπεράσματα για την προσαρμοσμένη απόκριση στην ιοντίζουσα ακτινοβολία αφού σε κάποιες περιπτώσεις οδηγούμαστε

ακόμη και σε αντίθετα αποτελέσματα όπως η αυξημένη ακτινοευαισθησία σε χαμηλές δόσεις .Τέλος παρουσιάζει ενδιαφέρον ότι οι προκαλούμενες από την ακτινοβολία αποκρίσεις μπορούν να επιτευχθούν με έκθεση των μη-ακτινοβολημένων κυττάρων σε παράγοντες και συνθήκες από άλλες κυτταρικές καλλιέργειες που έχουν υποβληθεί σε ακτινοβόληση χαμηλής δόσης δηλαδή αποτελεσμάτων παρόμοιων με το φαινόμενο των επιπτώσεις των παρακείμενων κυττάρων (bystander effect). Συνεπώς δεν επαρκούν πλήρως τα έως τώρα δεδομένα για να μπορέσουμε να θεωρήσουμε την προσαρμοσμένη απόκριση μια διακριτή περίπτωση ΜΣΕ καθώς είναι δύσκολη η εκτίμηση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας σε τόσο χαμηλές δόσεις. [26]

2.18.4 Γονιδιακή αστάθεια(genomic instability)

Η προκαλούμενη από ακτινοβολία γονιδιακή αστάθεια στα κύτταρα είναι μια διαδικασία που χαρακτηρίζεται από αυξημένο ρυθμό κυτταρογενετικών ανωμαλιών, μεταλλάξεις, ενισχύσεις γονιδίων και κυτταρικό θάνατο στους απογόνους των ακτινοβολημένων κυττάρων αρκετές γενεές μετά την αρχική ακτινοβόληση. Οι περισσότερες μελέτες δεν έχουν εντοπίσει μια συμβατική δόση-απόκριση καθώς η απόκριση σε χαμηλότερες δόσεις που εξετάστηκαν ,έδειξαν ότι δεν υπάρχει αύξηση του φαινομένου σε μεγαλύτερη δόση. Παρουσιάζεται σε κύτταρα της ακτινοβολημένης περιοχής όπως και σε εκείνα που βρίσκονται σε απομακρυσμένες περιοχές. Η σημασία της γονιδιακής αστάθειας αποτελεί βασικό ενισχυτικό παράγοντα διατάραξης της ομοιότητας των κυττάρων . Η διαταραχή αυτή συνήθως οδηγεί σε παρατεταμένες φλεγμονώδεις αποκρίσεις του οργανισμού , δημιουργία οξειδωτικού ή αντιγραφικού στρες και περαιτέρω βλάβες του γονιδιώματος όπως ο κακοήθης μετασχηματισμός και οι σύνθετες ομαδοποιημένες βλάβες .Τέλος, με την παρατήρηση διαφόρων καταληκτικών σημείων (αλλά κυρίως των χρωμοσωματικών ανωμαλιών) έχουν διαπιστωθεί αρκετές διαφορές στην έκφραση της γονιδιακής αστάθειας οφείλονται στον γενότυπο και σε άλλους παράγοντες δημιουργώντας ένα μη ξεκάθαρο τοπίο ακόμη έτσι ώστε να μπορούμε να βγάλουμε ασφαλή συμπεράσματα.[29]

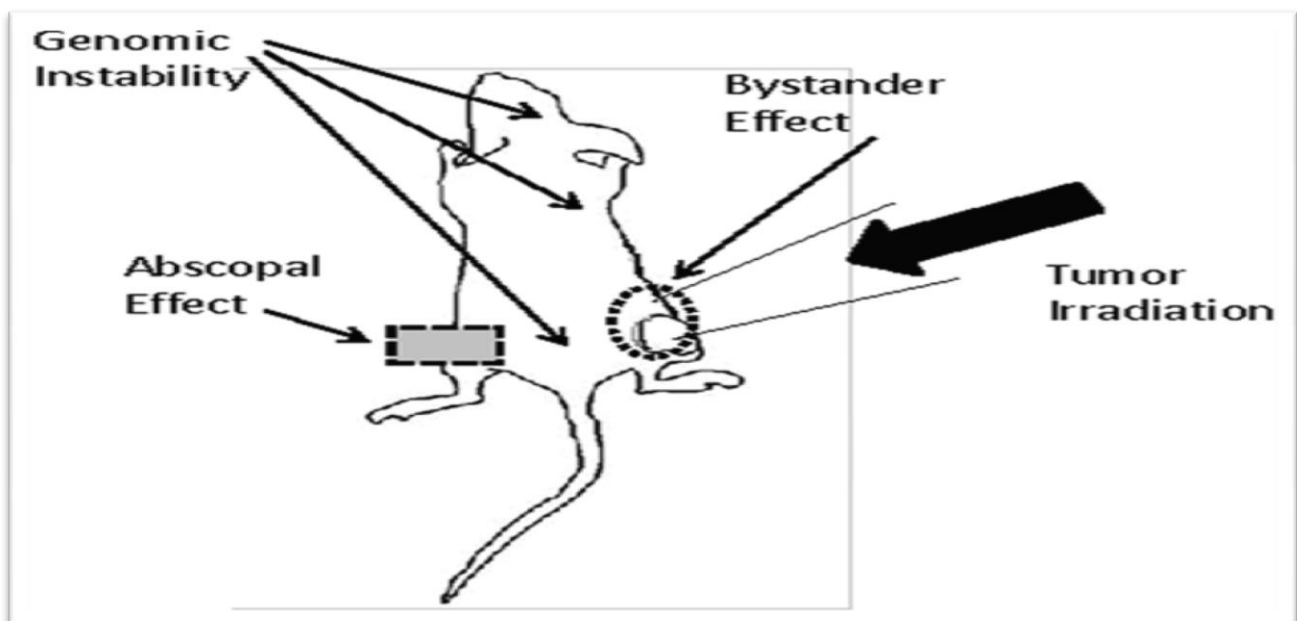
2.18.5 Απόκριση απομακρυσμένου ιστού

Ως απόκριση απομακρυσμένου ιστού ορίζουμε τις αποκρίσεις στην ιοντίζουσα ακτινοβολία όμοιων ή και ανόμοιων κυττάρων και ιστών που βρίσκονται σε απομακρυσμένες θέσεις από την περιοχή άμεσης ακτινοβόλησης .Η παρατήρηση του φαινομένου έγινε από τον Mole (1953) σαν αποτέλεσμα της ακτινοθεραπείας καθώς σημειώθηκε περιορισμός των καρκινικών όγκων σε απομακρυσμένα σημεία από την περιοχή ακτινοβόλησης .Οι αποκρίσεις που παρατηρούνται εκτός του πεδίου ακτινοβόλησης εξαρτώνται από την δόση της ακτινοβολίας και τον τύπο του ιστού. Παρατηρήθηκε ότι με την ακτινοβόληση του πρωτογενούς όγκου παρουσιάστηκε σε αρκετές περιπτώσεις μία ενίσχυση ή καταστολή στην ανάπτυξη άλλων πρωτογενών και δευτερογενών όγκων.

Με την πάροδο των ετών και των κλινικών αποτελεσμάτων ,σημειώθηκαν και άλλα αποτελέσματα σε φυσιολογικούς ιστούς που δεν βρίσκονταν κοντά στην περιοχή στόχευσης όπως είναι οι μεταλλάξεις ,οι βλάβες στο DNA,ο κακοήθης μετασχηματισμός και ο κυτταρικός θάνατος .Ως απόκριση απομακρυσμένου ιστού θεωρούμε ένα αποτέλεσμα "μακριά" από το σημείο στόχευσης ,σε in vivo συνθήκες το οποίο μπορεί να έχει και θετικές και αρνητικές συνέπειες στους ιστούς. Αξίζει

να σημειωθεί πως και λόγω διάφορων άλλων στρεσογόνων παραγόντων μπορούν επίσης να παρατηρηθούν βλάβες σε απομακρυσμένα σημεία ,πέρα από την έκθεση τους σε ιοντίζουσα ακτινοβολία .Το φαινόμενο της απόκρισης απομακρυσμένου ιστού έχει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο για τον οργανισμό καθώς αυτό φαίνεται ότι ενεργοποιεί το ανοσοποιητικό σύστημα και την παραγωγή κυτοκινών στον οργανισμό. Υπάρχουν πια τεκμηριωμένα παραδείγματα όπου η ακτινοθεραπεία έχει οδηγήσει στην ελαχιστοποίηση ή ακόμη και στην εξάλειψη όγκου που βρισκόταν εκτός της ζώνης ακτινοβολήσης ,για παράδειγμα κατά την διάρκεια ακτινοθεραπείας οστικών μεταστάσεων παρατηρήθηκε συνολική υποχώρηση ενός ηπατοκαρκινώματος.[26, 30] Από την άλλη πλευρά ,το φαινόμενο αυτό έχει συσχετιστεί με αυξημένα ποσοστά δευτερογενών κακοηθειών. Μια επιδημιολογική μελέτη διερεύνησε τη συσχέτιση δευτερογενούς κακοήθειας σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη σε χρονικό διάστημα δέκα ετών μετά την ακτινοθεραπεία και διαπιστώθηκε ότι αυτοί οι ασθενείς παρουσιάζουν ανιχνεύσιμη και ξεκάθαρη αύξηση των δευτεροπαθών κακοηθειών σε περιοχές μακριά από την περιοχή που ακτινοβολήθηκαν. [31] Σε ορισμένες περιπτώσεις, αυτοί οι δευτερογενείς όγκοι μπορεί να αποδοθούν σε άλλους παράγοντες, όπως η ενδογενής ραδιοευσαιθησία ή αποβολή βιώσιμων καρκινικών κυττάρων. Ωστόσο, το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από τον όγκο και /ή τη θεραπεία καθώς και η επακόλουθη γενωμική αστάθεια και η δευτερογενής καρκινογένεση θα μπορούσαν επίσης να συμβάλουν στη δευτερογενείς καρκίνους.

Οι πρώτες μελέτες σε ζώα έδειξαν ότι το πλάσμα του αίματος των ακτινοβολημένων πειραματόζωων περιείχε κλαστογόνο δεδομένου ότι η έκθεση των μη ακτινοβολημένων κυττάρων στο ίδιο πλάσμα οδήγησε σε αύξηση των χρωμοσωματικών ανωμαλιών [26, 32]. Το κλαστογόνο είναι ένας μεταλλαξογόνος παράγοντας που προκαλεί την θραύση ή την διάσπαση των χρωμοσωμάτων οδηγώντας σε διαγραφή, προσθήκη ή αναδιάταξη τμημάτων του χρωμοσώματος Αυτή η διαδικασία είναι μια μορφή μεταλλαξογένεσης και μπορεί να οδηγήσει σε καρκινογένεση, καθώς κύτταρα που δεν θα θανατωθούν από την κλαστογόνο δράση μπορεί να γίνουν καρκινικά. Μια άλλη μελέτη, σε ποντίκια που χρησιμοποιήθηκαν ως πειραματόζωα σε μερική ακτινοβολήση του πνεύμονα έδειξε ότι τα επίπεδα των κυτοκινών και των μακροφάγων ήταν αυξημένα στις μη στοχευόμενες περιοχές του πνεύμονα και ήταν παρόμοια με εκείνα τα σημεία του πνεύμονα που είχαν ακτινοβοληθεί.[33]



Εικόνα 2.13 Διαφορετικοί πιθανοί δρόμοι (απόκριση απομακρυσμένου ιστού ,επιπτώσεις σε παρακείμενα κύτταρα και γενωμική αστάθεια) που μπορούν να εμφανιστούν ως αποτέλεσμα στην ακτινοβολήση για την θεραπεία του καρκίνου.

2.19 Μηχανισμοί επαγωγής μη στοχευμένων επιδράσεων

Για την επαγωγή ΜΣΕ από ιοντίζουσα ακτινοβολία εμπλέκονται διάφορες χημικές ουσίες και διαδικασίες που διαμεσολαβούν την μετάδοση του κυτταρικού στρες. Ιδιαίτερη βιολογική σημασία σε αυτό παίζει η παρουσία του οξειδωτικού στρες.

2.19.1 Οξειδωτικό στρες

Η διαρκής παρουσία οξειδωτικού στρες, η διαταραχή δηλαδή της ισορροπίας μεταξύ των δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species-ROS), αζώτου(Reactive Nitrogen Species-RNS) και αντιοξειδωτικών μηχανισμών των κυττάρων σχετίζεται άμεσα κατά πολύ μεγάλο ποσοστό σε όλες τις περιπτώσεις με την εμφάνιση ΜΣΕ. Οι ROS, RNS παράγονται είτε από εξωγενείς παράγοντες όπως οι χημικές ουσίες ή η ιοντίζουσα ακτινοβολία, είτε από διάφορες λειτουργίες του οργανισμού, και αποτελούν σημαντικά μόρια για βασικές κυτταρικές λειτουργίες όπως η απόπτωση, η κυτταρική ανάπτυξη, η κυτταρική σηματοδότηση, ανοσοαπόκριση και φλεγμονή κλπ. Προκειμένου να διατηρηθεί η συγκέντρωση των ROS και RNS χαμηλά έως μέτρια ευεργετικά επίπεδα, τα κύτταρα έχουν αναπτύξει ειδικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς όπως αντιοξειδωτικά ένζυμα. Για να αντιμετωπιστεί περαιτέρω η καταστροφική επίδραση από ROS/RNS που προκαλείται από στρεσογόνους παράγοντες, τα κύτταρα χρησιμοποιούν επίσης τα επιδιορθωτικά μονοπάτια του DNA. Εάν αυτό το δίκτυο άμυνας είναι μειωμένο ή λειτουργεί ανεπαρκώς, τότε τα αυξημένα επίπεδα ROS ή RNS οδηγούν σε οξειδωτικό ή νιτροδωτικό στρες, αντίστοιχα. Αυτό έχει επιβλαβείς συνέπειες στην φυσιολογική κυτταρική λειτουργία, καθώς οι ROS, RNS αντιδρούν με θεμελιώδη βιομόρια όπως το DNA, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια. [34]

Η χρόνια έκθεση σε οξειδωτικό στρες μπορεί να οδηγήσει σε μεταβολές το γονιδιώματος λόγω της συσσώρευσης οξειδωτικών βλαβών του DNA, που προάγουν τη μεταλλάξεις και την καρκινογένεση [35]. Οι οξειδωτικές βλάβες του DNA τυπικά είναι η απουρινικές / απυριμιδικές (αβασικές) θέσεις DNA, μονόκλωνες ρήξεις DNA (SSBs), αποαμινωμένες και προστιθέμενες βάσεις [35, 36]. Η πιο κοινή οξειδωτική βλάβη DNA είναι η 8-οξοG, η οποία χρησιμοποιείται ως αξιόπιστος δείκτης για την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες σε διάφορα βιολογικά συστήματα. Όταν περισσότερες οξειδωτικές βλάβες DNA εμφανίζονται μέσα σε 10 ζεύγη βάσεων, έχουμε αναφέρει ότι καλούνται ως οξειδωτικές μη-δίκλωνες ομαδοποιημένες βλάβες DNA (OCDLs). Οι οξειδωτικές αλλοιώσεις της βάσης ή οι αβασικές θέσεις επισκευάζονται κυρίως από το μηχανισμό επιδιόρθωσης της εκτομής βάσης (BER) και σε μικρότερο βαθμό από τον μηχανισμό επιδιόρθωσης εκτομής νουκλεοτιδίων (NER).

Το οξειδωτικό στρες και επακόλουθες οξειδωτικές αλλοιώσεις DNA σε γειτονικά κύτταρα από κύτταρα που δέχθηκαν ακτινοβολία προκαλούνται από διάφορους διαμεσολαβητές στρες. Κάποιοι παράγονται από τα ακτινοβολημένα κύτταρα και μεταδίδονται στα μη ακτινοβολημένα κύτταρα είτε μέσω της συμβολής των χασμοσυνδέσεων, δεδομένου ότι υπάρχει φυσική επαφή μεταξύ τους, είτε μέσω του μέσου καλλιέργειας στο οποίο απελευθερώνονται. Επιπλέον, οι διαμεσολαβητές στρες πολλαπλασιάζονται από τα γειτονικά κύτταρα μέσω σηματοδοτικών μονοπατιών που ενεργοποιούνται ενδοκυτταρικά, με αποτέλεσμα τη συνεχή παροχή αντιδραστικών ριζών. [37]

2.19.2 Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου μπορούν να δημιουργηθούν άμεσα στα ακτινοβολημένα κύτταρα αλλά και μέσω σηματοδοτικών μονοπατιών και περιλαμβάνουν ελεύθερες ρίζες, ιόντα ή συνδυασμούς ελευθέρων ριζών και ιόντων ακόμη και μόρια (ClO^- , O_2^- , H_2O_2) και λειτουργούν και ως μεταδότες του κυτταρικού στρες και σε άλλες περιοχές [37]. Υπάρχουν πολλά αποδεικτικά στοιχεία ότι οι ROS συμβάλλουν σημαντικά στις επιπτώσεις σε παρακείμενα κύτταρα (bystander effect) εξωκυτταρικά και ενδοκυτταρικά μέσω διάφορων γεγονότων. Οι ROS παράγονται άμεσα από τα ακτινοβολημένα κύτταρα ως προϊόντα ραδιόλυσης ή έμμεσα μέσω φλεγμονώδους αντίδρασης και μεταδίδεται σε γειτονικά κύτταρα μέσω παθητικής διάχυσης, χαμοσυνδέσεων ή ενεργής μεταφοράς [38]. Αν και, οι περισσότερες ROS έχουν σχετικά μικρό χρόνο ημιζωής προκαλούν τοπικά βλάβες όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) το οποίο έχει σχετικά μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής. Μπορεί να μετακινηθεί ελεύθερα στις κυτταρικές μεμβράνες και έτσι να διανύσει μεγάλες αποστάσεις προκαλώντας βλάβες στο DNA σε απομακρυσμένες τοποθεσίες. Τέλος, οι ρίζες υδροξυλίου μπορούν να αντιδράσουν με το DNA όπως και με πρωτεΐνες και λιπίδια με αποτέλεσμα την παρέμβαση στην φυσιολογική λειτουργία τους καθώς μπορούν να απελευθερωθούν στο εξωκυτταρικό περιβάλλον και να αλληλεπιδράσουν με γειτονικά κύτταρα και πολλαπλασιάζοντας έτσι το φαινόμενο των επιπτώσεων στα παρακείμενα κύτταρα. [39, 40]

2.19.3 Δραστικές μορφές αζώτου (RNS)

Όπως και οι δραστικές μορφές οξυγόνου, οι δραστικές μορφές αζώτου πέρα από την επαγωγή οξειδωτικού στρες λειτουργούν και εκείνες ως μέσο διάδοσης του. Το νιτρικό οξείδιο NO μπορεί να διαχυθεί σε μεγάλες αποστάσεις τόσο εξωκυτταρικά όσο και ενδοκυτταρικά. Ο ρόλος του RNS και ιδιαίτερα του νιτρικού οξειδίου (NO) στην μετάδοση του bystander effect έχει αποτελέσει αντικείμενο πολλών ερευνών. Το νιτρικό οξείδιο (NO) είναι ένα μικρό, λιπόφιλο μόριο, ικανό να διαχέεται ελεύθερα σε κύτταρα. Όπως και στις ROS, απελευθερώνεται από τα ακτινοβολημένα κύτταρα και μεταδίδεται στα μη ακτινοβολημένα γειτονικά κύτταρα. Συγκεκριμένα πειράματα έδειξαν το NO προκάλεσε την αύξηση της έκφρασης της πρωτεΐνης p53 και σε μη ακτινοβολημένη περιοχή κυττάρων γλοιοβλαστώματος, ως απόκριση στο οξειδωτικό στρες, είτε μετά από έκθεση σε καλλιέργεια ακτινοβολημένων και μη ακτινοβολημένων κυττάρων, είτε με την έκθεση σε μέσο με ακτινοβολημένα μεταλλαγμένα κύτταρα με ενεργοποιημένη την πρωτεΐνη p53. Το γεγονός δείχνει ότι το NO μεταδίδεται από ακτινοβολημένα σε γειτονικά κύτταρα χωρίς άμεση επαφή κυττάρου προς κύτταρο, όπως οι χαμοσυνδέσεις και επίσης ενεργεί ως εκκινήτης του bystander effect [37, 41]. Αυξημένα επίπεδα NO προκαλούν βλάβες στις βάσεις του DNA που αν δεν επιδιορθωθούν οδηγούν σε SSBs DSBs ή ακόμη και βλάβες στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης. [37, 38]

2.19.4 Ανοσοποιητικό σύστημα και φλεγμονώδεις αποκρίσεις

Νεότερες προσεγγίσεις υποστηρίζουν πως το ανοσοποιητικό σύστημα επικεντρώνεται περισσότερο στην προστασία από πιθανούς επιβλαβείς παράγοντες παρά από την διάκριση ξένων ή μη μικρο-οργανισμών, έτσι τα μη φυσιολογικά κύτταρα στέλνουν σήματα ώστε να ξεκινήσει η ανοσολογική απόκριση. Το ανοσολογικό σύστημα χρησιμοποιεί υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων PRRs (pattern recognition receptors) για εντοπισμό μικροβίων PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) και για αλλοιωμένα κύτταρα ή μόρια DAMPs (damage-associated molecular patterns) [42, 43]. Η αυξημένη έκθεση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία προκαλεί βλάβες στα κύτταρα λόγω οξειδωτικού στρες δημιουργώντας αυξημένο αριθμό DAMPs. Τα μόρια αυτά αναγνωρίζονται από τους PRRs και ενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια που καταλήγουν στην αυξημένη παραγωγή κυτοκίνων και ROS/RNS. [42]

2.19.5 Οξειδωμένο εξωπυρηνικό DNA

Το αλλοιωμένο/οξειδωμένο DNA θεωρείται σημαντικό σήμα στρες για ολόκληρο τον οργανισμό, ως DAMPs επάγοντας την παραγωγή ROS και άλλες ΜΣΕ σε απομακρυσμένες περιοχές. Τα ακτινοβολημένα κύτταρα που βρίσκονται υπό στρες πεθαίνοντας απελευθερώνουν στον εξωκυττάριο χώρο το εξωπυρηνικό DNA (extracellular DNA –ecDNA) που έχει υποστεί εκτεταμένες βλάβες, το οποίο ανιχνεύεται από αισθητήρες βιοχημικής αναγνώρισης της δομής του που βρίσκονται στο εσωτερικό ή στην επιφάνεια άλλων κυττάρων [37]. Οι κυριότερες αλλαγές που ενεργοποιούν σήμα κινδύνου για το κύτταρο είναι η έκταση των οξειδωτικών βλαβών (με πιο σημαντική την 8-oxodG) και η αναντιστοιχία σε ζεύγη CG και AT. Έτσι το οξειδωτικό στρες μεταφέρεται σε γειτονικά ή και απομακρυσμένα κύτταρα καθώς το ecDNA είναι ικανό να διανύσει μεγάλες αποστάσεις κυρίως μέσω του κυκλοφορικού συστήματος. [43-45]

2.19.6 Βλάβες και διασυνδέσεις με το ανοσοποιητικό σύστημα

Εκτός από τον εντοπισμό ecDNA, η ανοσολογική απόκριση επάγεται και από αλλοιώσεις στο DNA που παραμένει στον πυρήνα [31]. Πολλές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση των βλαβών είναι σημαντικές και στην ανοσολογική σηματοδότηση πχ η πρωτεΐνη Ku70 που ενεργοποιεί τον μηχανισμό NHEJ λειτουργεί και ως αισθητήρας στο κυτταρόπλασμα, ενώ άλλες πρωτεΐνες που ενεργοποιούν τον επιδιορθωτικό μηχανισμό NER επικοινωνούν και με τους αισθητήρες του εγγενούς ανοσοποιητικού. Με αυτόν τρόπο ο εντοπισμός του αλλοιωμένου DNA στέλνει σήματα κινδύνου από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα και έτσι πυροδοτείται το ανοσοποιητικό σύστημα. Η παρατεταμένη ενεργοποίηση του DDR και η συνεχής παρουσία βλαβών DNA μπορούν να προκαλέσουν μία χρόνια φλεγμονή που δεν είναι απίθανο να οδηγήσει από εκφυλισμό μέχρι και καρκινογενέσεις. [42, 43]

2.19.7 Κυτοκίνες

Οι κυτοκίνες είναι βασικά συστατικά της σηματοδότησης και στην απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος και εμπλέκονται άμεσα με τις μη-στοχευμένες επιδράσεις της ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Αποτελούν κατηγορία πρωτεϊνών που προσδένονται σε συγκεκριμένους επιφανειακούς φορείς και οι πιο χαρακτηριστικές κυτοκίνες είναι οι χημοκίνες, οι ιντερφερόνες και λεμφοκίνες. Διαμεσολαβούν και στην άμεση και στην καθυστερημένη απόκριση των ιστών μετά από υψηλή δόση ακτινοβολίας στον ακτινοβολημένο στόχο αλλά και σε απομακρυσμένα σημεία.[31]

Η εμπλοκή του οξειδωτικού στρες στην επαγωγή βλαβών μέσω bystander effect μπορεί να ενισχυθεί περαιτέρω από τις κυτοκίνες δεδομένου ότι ορισμένα χαρακτηριστικά των προκαλούμενων από την ιοντίζουσα ακτινοβολία, bystander effects έχουν τις ίδιες φλεγμονώδεις αποκρίσεις. Συγκεκριμένα, οι κυτοκίνες, όπως η ιντερλευκίνη-1b (IL-1b) και η ιντερλευκίνη-33 (IL-33) απελευθερώνεται από ακτινοβολημένα κύτταρα μέσω της σύνδεσής τους με τα γειτονικά κύτταρα λόγω των υποδοχέων των μεμβρανών τους, ενεργοποιούν άμεσα τον παράγοντα μεταγραφής NF-kB οποίος είναι υπεύθυνος για την έκφραση των γονιδίων iNOS και COX-2 και καθώς η COX-2 εμπλέκεται στην παραγωγή ROS και οι έλεγχοι επιπέδων iNOS εμπλέκονται στην σύνθεση του NO και έτσι προκαλείται η παραγωγή ROS και NO στην περιοχή.[37]

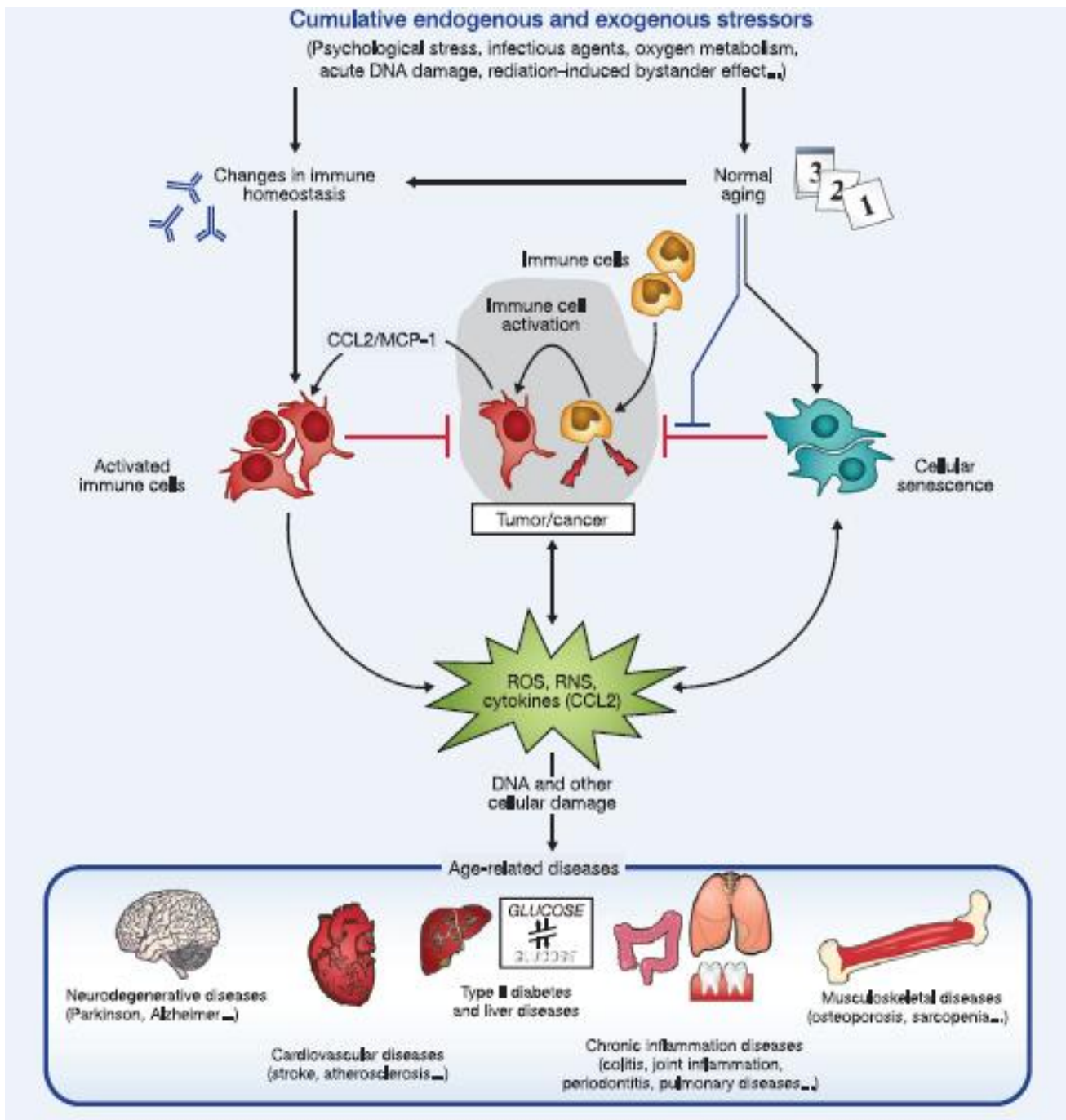
Για την μέτρηση και αξιολόγηση της σηματοδότησης από όγκου σε απομακρυσμένους ιστούς, πειραματικά μετρήθηκαν τα επίπεδα των 56 κυτοκινών στο αίμα από διαφορετικές ομάδες ποντικών, υποθέτοντας ότι αυτό το αίμα θα μπορούσε να είναι μια σημαντική οδός μετάδοσης των σημάτων που προκαλούν βλάβη στο DNA. Μόνο 3 κυτοκίνες, οι CCL2 / MCP-1, CXCL10 / IP-10 και CCL7 / MCP-3, ήταν αυξημένες στο τριπλάσιο στο αίμα των ποντικών που φέρουν όγκο. Οι CCL2 και CCL7 είναι 2 μέλη της μονοκυτταρικής χημειοελκτικής πρωτεΐνης (MCP-1 έως MCP-5), με κάθε μέλος να προσελκύει μια διαφορετική υποομάδα λευκοκυττάρων ενώ το CXCL10 / IP-10 είναι επίσης χημειοελκτικό για διάφορους τύπους ανοσοκυττάρων, συμπεριλαμβανομένων και των μονοκυττάρων. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι μονοκύτταρα και / ή τα μακροφάγα μπορούν να έχουν σημαντικό ρόλο στην επαγωγή των απομακρυσμένων βλαβών DNA. Οι ιστοί στα ποντίκια που φέρουν όγκο, με αυξημένα επίπεδα βλαβών στο DNA, βρέθηκαν να περιέχουν αυξημένο αριθμό ενεργοποιημένων μακροφάγων. Σε με άλλους ιστούς που δεν έδειξαν αυξημένα επίπεδα βλαβών του DNA δεν περιείχαν αυξημένους αριθμούς μακροφάγων. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ένα μοντέλο, στο οποίο η ενεργοποίηση των μακροφάγων στους όγκους επάγει την έκκριση προφλεγμονωδών κυτοκινών επηρεάζοντας απομακρυσμένους προκαλώντας βλάβες του DNA στα κύτταρα των οργάνων που περιέχουν ενεργοποιημένα μακροφάγα, υποδεικνύοντας μια συσχέτιση μεταξύ της φλεγμονής και της απόκρισης της απομακρυσμένης βλάβης DNA σε αυτούς τους ποντικούς που φέρουν όγκο.[46]

Η CCL2 ήταν η πρώτη χημοκίνη που μελετήθηκε. Προσελκύει πολλά ανοσοκύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των λεμφοκυττάρων, φαγοκυττάρων σε περιοχές τραυματισμού και φαίνεται ότι η CCL2 εμπλέκεται στην ενεργοποίηση των μακροφάγων. Πηγές της έκκρισης CCL2 είναι οι κανονικοί ιστοί, κύτταρα ανοσίας και μερικά καρκινικά κύτταρα. Στα κύτταρα δέκτες, η CCL2 δεσμεύεται από την πρωτεΐνη CCR2 και αυτή η σύνδεση οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή COX-2 και έτσι συνδέεται αυτή η κυτοκίνη με την απομακρυσμένη σηματοδότηση.

Τέλος, αρκετά πειράματα έχουν δείξει πως η χρήση αναστολέων της δράσης των κυτοκινών μειώνει τις ΜΣΕ όπως την αύξηση των ROS ,και η αυξημένη παρουσία κυτοκινών έχει ως αποτέλεσμα την συσσώρευση ανοσοκυττάρων στην περιοχή ,όπως και ότι ο αποκλεισμός της δράσης της CCL2 μπορεί να εμποδίσει την ανάπτυξη όγκων πρωτεύοντων και μεταστατικών ασθενειών σε μοντέλα ζώων.[46]

2.19.8 Μακροφάγα και Ανοσοκύτταρα

Τα μακροφάγα κύτταρα εμπλέκονται σε πολλές διαφορετικές διαδικασίες όπως στην επιδιόρθωση των βλαβών, στην αφαίρεση των κατεστραμμένων ή γηρασμένων κυττάρων μετά από τραυματισμό ή μόλυνση ή ακόμη και στην ομοιοστάση. Μια άλλη λειτουργία των μακροφάγων είναι να παρέχουν μια γραμμή άμυνας κατά της οποιαδήποτε μικροβιακής εισβολής και να αναγνωρίζουν και σκοτώνουν αλλοιωμένα ή τοξικά κύτταρα. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με άμεσο τρόπο, που συνεπάγεται την απελευθέρωση προϊόντων οξυγόνου και προφλεγμονώδων παραγόντων (όπως ROS,RNS κλπ) δημιουργώντας οξειδωτικό στρες που είναι επιβλαβές για τις πιθανές απειλές του οργανισμού. Επίσης, μπορούν να δράσουν και με έμμεσο τρόπο εκκρίνοντας κυτοκίνες ή εμφανίζοντας αντιγόνα, ρυθμίζοντας έτσι το ανοσοποιητικό σύστημα .Σχετικά με την συμμετοχή μακροφάγων έναντι μιας κακοήθειας ,τα κύτταρα αυτά απαιτούν σήματα ενεργοποίησης . Η ενεργοποίηση των μακροφάγων αποτελείται από διαφορετικά στάδια που συνοδεύονται και από τις σταδιακές αλλαγές στις ιδιότητες των μακροφάγων. Τα μακροφάγα κύτταρα λοιπόν, μπορούν να χαρακτηριστούν ως μη διεγερμένα, αρχικά και πλήρως ενεργοποιημένα [47]. Κάθε στάδιο συνοδεύεται από διαφορετική έκκριση πρωτεϊνών ,των οποίων τα επίπεδα αυξάνονται ή μειώνονται ανάλογα με το στάδιο ενεργοποίησης που βρίσκονται τα μακροφάγα..Η επικοινωνία μεταξύ των μακροφάγων ,η αλληλεπίδραση τους με υγιή ή αλλοιωμένα κύτταρα καθώς και ο τρόπος με τον οποίο επάγονται οι ΜΣΕ αποτελούν μια αρκετά περίπλοκη διαδικασία .Η πιο πιθανή περίπτωση είναι οι αυξημένες κυτοκίνες που παράχθηκαν από το αντίστοιχο στάδιο των μακροφάγων κυττάρων που ενεργοποιήθηκαν στο σημείο ακτινοβολήσης, να μεταφερθούν σε ένα απομακρυσμένο σημείο και να προκαλέσουν φλεγμονώδη αντίδραση θέτοντας σε ενεργοποίηση άλλα μακροφάγα που βρίσκονται σε αυτήν την απομακρυσμένη θέση. Στην συνέχεια ,τα μακροφάγα μέσω των μηχανισμών που αναφέρθηκαν παραπάνω δημιουργούν οξειδωτικές βλάβες DNA καταλήγοντας έτσι σε μία συνεχόμενη κυτταροτοξική κατάσταση με αποτέλεσμα να επάγεται μια σειρά από ΜΣΕ. [26, 48, 49]



Εικόνα 2.14 Η χρόνια ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος παίζει καθοριστικό ρόλο στην επαγωγή βλαβών σε γειτονικά ή απομακρυσμένους ιστούς από την πρωταρχική βλάβη και σχετίζεται με τις καρκινογενέσεις. Η επαναλαμβανόμενη έκθεση σε στρεσογόνους παράγοντες προάγει αλλαγές στην ανοσολογική ομοίωση και στην φυσιολογική γήρανση των κυττάρων. Η μεταβολή της ανοσολογικής ομοίωσης οδηγεί στην ενεργοποίηση των ανοσοκυττάρων που με την σειρά τους παράγουν ROS, RNS και κυτοκίνες και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την χρόνια φλεγμονή. Αν και η ανοσολογική σηματοδότηση και η κυτταρική γήρανση λειτουργούν ως καταστολείς των όγκων σε νεαρή ηλικία (κόκκινο χρώμα) αυτό μειώνεται με την πάροδο του χρόνου (μπλε χρώμα). [46]

Κεφάλαιο 3

Η Μέθοδος

3.1 Εισαγωγή

Βασικό στοιχείο για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων είναι η αξιολόγηση των βλαβών στο πυρηνικό DNA και ιδιαίτερα οι ομαδοποιημένες και σύνθετες βλάβες .Η ταυτοποίησή τους ,η πυκνότητά τους ,η θέση τους και η μορφή τους είναι απαραίτητα για ένα αξιόπιστο αποτέλεσμα. Μια πολύ καλή και σχετικά αρκετά ακριβής μέθοδος για αυτήν την καταμέτρηση είναι η τεχνική της ηλεκτροφόρησης DNA σε πήκτωμα αγαρόζης (gel), η οπτική απεικόνιση των αποτελεσμάτων με την χρήση UV κάμερας και η ψηφιακή της ανάλυση μέσω του προγράμματος ImageJ. [16, 47]

Η ποσοτική εξακρίβωση απαιτεί την χρήση ειδικών ενζύμων ,τα οποία συμμετέχουν και στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης ,που κόβουν και τις δύο αλυσίδες του DNA στην θέση όπου είχε εντοπιστεί η ομαδοποιημένη βλάβη δημιουργώντας έτσι μια διπλή ρήξη στην αλυσίδα του .Στην συνέχεια ,οι διάφορες OCDLs που έχουν δημιουργηθεί από τα ένζυμα, μέσω της ηλεκτροφόρησης γίνονται αντιληπτές λόγω της φθορίζουσας ουσίας η οποία έχει προστεθεί στο πήκτωμα (βρωμιούχο αιθίδιο-EtBr) και έτσι μέσω της ψηφιακής απεικόνισης μπορεί να γίνει και η κατάλληλη αξιολόγηση σύμφωνα με την διαδρομή που έκανε το μόριο του DNA μέσα στο πήκτωμα.[16, 47]

3.2 Η σημασία των ενζύμων

Τα ROS,RNS μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην πρόκληση καρκίνου δημιουργώντας 8-οξο-dGuo μεταλλαξογόνες βάσεις και αβασικά σημεία τα οποία συνήθως επισκευάζονται από τον μηχανισμό επιδιόρθωσης εκτομής βάσης (BER). Δύο γονίδια επιδιόρθωσης DNA στην οδό BER που επιδιορθώνουν οξειδωτικές αλλοιώσεις είναι OGG1 και APE1. Τα επιδιορθωτικά ένζυμα δρουν κόβοντας την αλυσίδα του DNA αφού αναγνωρίσουν την βλάβη. Η ενδονουκλεάση hAPE1 έχει ως στόχο την ανίχνευση διάφορων αβασικών σημείων όπως τα οξειδωμένα αβασικά σημεία, ενώ η γλυκοσυλάση hOGG1 ανιχνεύει οξειδωμένες πουρίνες και κάποια αβασικά σημεία. Έτσι κάθε διαφορετικό ένζυμο βρίσκεται σε θέση να ανιχνεύει ένα συγκεκριμένο είδος βλαβών. [13, 47]

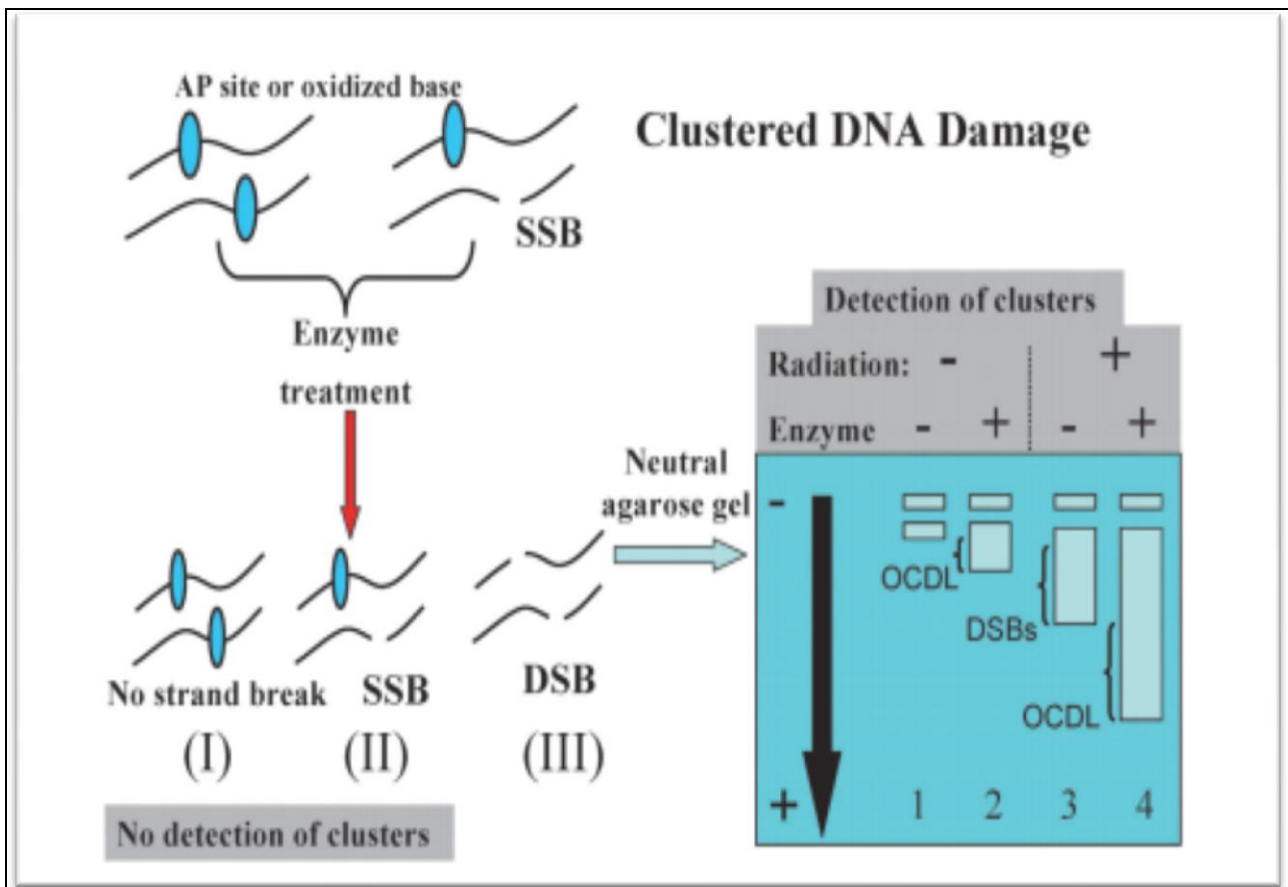
3.3 Ενζυμική επώαση DNA

Οι κατάλληλες συνθήκες για την επιθυμητή δράση του ενζύμου είναι πολύ σημαντικές για την αποτελεσματικότητά του. Τα ένζυμα δρουν με διαφορετικό τρόπο σε ομαδοποιημένες βλάβες σε σχέση με το πώς θα λειτουργούσαν σε μεμονωμένες βλάβες, και έτσι ανάλογα και με την εκάστοτε μορφή βλάβης παρατηρούμε και μια διαφορετική αποτελεσματικότητα. Το κάθε ένζυμο πρέπει να μένει για κάποιο χρονικό διάστημα στον πάγο μαζί με το DNA έτσι ώστε να γίνει η καλύτερη δυνατή πρόσδεση μαζί του και στην συνέχεια αφού επιτευχθούν οι κατάλληλες συνθήκες όπως πχ η θερμοκρασία, να ξεκινήσει η διαδικασία της πλήρους διακοπής της αντίδρασης με την εισαγωγή του κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος έτσι ώστε να μην αλλοιωθεί το ίδιο το DNA. Τέλος, τα διαλύματα που έχουν επωαστεί με ένζυμο και αυτά που δεν έχουν επωαστεί με ένζυμο θα εισαχθούν στο πήκτωμα έτσι ώστε να ξεκινήσει η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης. [13, 50]

3.4 Η ενδονουκλεάση hAPE1

Η hAPE1 (human AP-endonuclease-1) είναι μια επιδιορθωτική πρωτεΐνη του μηχανισμού επιδιόρθωσης BER που εντοπίζει οξειδωμένα ή αλλοιωμένα αβασικά σημεία. Η δομή της αποτελείται από διάφορες αμινοξικές ομάδες οι οποίες δρουν ξεχωριστά ανάλογα με την ποιότητα της βλάβης. Πέραν όμως από τις μεμονωμένες βλάβες η hAPE1 είναι επίσης αποτελεσματική και στις ομαδοποιημένες βλάβες που εμπεριέχουν αβασικά σημεία, δημιουργώντας DSBs μετά την δράση της. Πιο αναλυτικά, μη-κωδικοποιημένες θέσεις απουρινικού / απυριμιδινικού (AP) στο DNA δημιουργούνται συνεχώς σε κύτταρα αυθόρμητα αλλά και από γλυκοσυλάσες DNA όταν ανιχνευτούν βλάβες. Το βιολογικώς σημαντικό αυτό ένζυμο αποκατάστασης εκτομής ανθρώπινης βάσης (BER) APE1 διασπά τη ραχοκοκκαλιά φωσφοδιεστερικού δεσμού του DNA στην θέση 5' των αβασικών θέσεων για να προκαλέσει σύνθεση και επιδιόρθωση DNA. Το APE1 στρέφει την έλικα του DNA και απορροφά τον κλώνο AP-DNA, από την περιοχή απομακρύνεται ένα πρωτόνιο από ένα μόριο νερού και ξεκινά μια πυρηνόφιλη επίθεση στην φωσφορική ομάδα προς την αβασική θέση. Στην συνέχεια εισάγει βρόχους τόσο στο κύριο DNA όσο και στις δευτερεύουσες αυλακώσεις και δεσμεύει μια θέση αναστροφής του αβασικού σημείου σε ένα θύλακα που αποκλείει τις βάσεις DNA. Ηλεκτρόνια από το άτομο του οξυγόνου της φωσφορικής ομάδας δημιουργούν ένα άκρο στο αβασικό σημείο και ένα άκρο στο κανονικό νουκλεοτίδιο διώχνοντας ηλεκτρόνια του άλλου ατόμου

του οξυγόνου. Τέλος, η hAPE1 συντελεί και στην οξειδοαναγωγική λειτουργία για την ενεργοποίηση και άλλων ενζύμων των άλλων επιδιορθωτικών μηχανισμών του DNA, είναι δομικά βελτιστοποιημένη ώστε να συγκρατεί το διασπασμένο προϊόν DNA καθώς εκτοπίζει τις δεσμευμένες γλυκοσυλάσες και διατηρεί το υλικό του DNA, δείχνοντας έτσι ότι δρα για να συντονίσει την ομαλή μεταφορά ασταθών ενδιάμεσων βλαβών DNA μεταξύ των σταδίων εκτομής και σύνθεσης της επισκευής DNA.



Εικόνα 3.1 Ανίχνευση ομαδοποιημένων οξειδωτικών βλαβών DNA (OCDLs) με την χρήση πηκτώματος αγαρόζης. Αριστερά βλέπουμε τις βασικές αρχές ανίχνευσης χρησιμοποιώντας επιδιορθωτικά ένζυμα για δυο τυπικές βλάβες όπως είναι οι βλάβες και στους δύο κλώνους του DNA ή μια βλάβη στον ένα κλώνο και ρήξη του άλλου κλώνου (SSB). Αν με την χρήση του ενζύμου δεν υπάρξει πλήρης "απομάκρυνση" των βλαβών (πρώτη και δεύτερη περίπτωση) τότε δεν θα υπάρξει ανίχνευση σύνθετων βλαβών. Σε αντίθετη περίπτωση, στην "απομάκρυνση" των βλαβών και από τους δύο κλώνους του DNA, δημιουργούνται δίκλωνες θραύσεις (DSBs) οι οποίες είναι πλέον ανιχνεύσιμες. Δεξιά βλέπουμε την ανίχνευση των βλαβών μέσα στο πηκτώμα αγαρόζης όπου η αξιολόγηση των επαγόμενων DSBs και OCDLs γίνεται μέσω του μεθοδολογίας NALA (Number Average Length Analysis). Η σύγκριση της 1^{ης} και της 2^{ης} στήλης δείχνει τα επίπεδα ενδογενών OCDL (μη ακτινοβολημένων δειγμάτων), η σύγκριση της 3^{ης} και της 4^{ης} τα επίπεδα OCDL των ακτινοβολημένων δειγμάτων ενώ η σύγκριση 1^{ης} και 3^{ης} στήλης δείχνει τα επίπεδα άμεσα επαγόμενων DSBs βλαβών από την ακτινοβολήση.[13]

3.5 Η γλυκοσυλάση OGG1

Το OGG1 είναι ένζυμο υπεύθυνο για την εκτομή της 8-οξογουανίνης (8-oxoG), ενός παραπροϊόντος μεταλλαξιόγόνου βάσης στο DNA, που εμφανίζεται ως αποτέλεσμα της έκθεσης σε δραστικά είδη οξυγόνου (ROS) [29]. Η OGG1 γλυκοσυλάση έχει δύο κύριες λειτουργίες, καθώς είναι ικανή τόσο να διασπάσει τον γλυκοσιδικό δεσμό της μεταλλαξιόγόνου βλάβης αλλά και να προκαλέσει θραύση των κλώνων στην ραχοκοκαλιά του DNA. Παρά την σπουδαιότητα αυτής της DNA γλυκοσυλάσης σε πειράματα που έγιναν σε ποντίκια που είχαν έλλειψη του OGG1 παρατηρήθηκε ότι έχουν το φυσιολογικό προσδόκιμο ζωής, ενώ σε ποντίκια που υπήρχε ολοκληρωτική απουσία του OGG1 βρέθηκε ότι έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να αναπτύξουν καρκίνο [51]. Άλλες έρευνες έδειξαν ότι ποντικοί με δυσλειτουργικό γονίδιο OGG1 έχουν περίπου 5 φορές αυξημένα επίπεδα της 8-οξο-dG στο σπύκι και επίσης διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο σε σύγκριση με ποντίκια με φυσιολογικά ποντίκια. [52]

3.6 Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό ηλεκτρικώς φορτισμένων ουσιών (DNA, πρωτεΐνες) ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Στην δική μας περίπτωση το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο και κινείται μέσα σε διάλυμα καθώς ασκείται σε αυτό η δύναμη Coulomb ($F=q \times E$) από τον αρνητικό πόλο προς τον θετικό. Τα διαλύματα DNA επιλέγουμε να κινούνται μέσα σε πήκτωμα αгарόζης καθώς με αυτόν τον τρόπο ελαχιστοποιούμε ρεύματα που δημιουργούνται από διαβαθμίσεις της θερμοκρασίας και επίσης το πήκτωμα μπορεί να λειτουργήσει και ως φίλτρο, παρεμποδίζοντας μεγαλομόρια να κινηθούν και επιτρέποντας μόνο στα μεσαίου μεγέθους μόρια να διέλθουν από τους πόρους του. Έτσι επιτυγχάνεται ένα ομοιότροπος διαχωρισμός σε όλο το πήκτωμα που προσφέρει αρκετά αξιόπιστα αποτελέσματα. Το πήκτωμα εκτός του μοριακού διαχωρισμού εξυπηρετεί και στην οπτική απεικόνιση των αποτελεσμάτων καθώς μετά την ηλεκτροφόρηση το πήκτωμα τοποθετείται σε UV κάμερα, έτσι είναι πολύ σημαντικό η σκόνη αгарόζης να είναι πολύ καλά διαλυμένη σε διάλυμα συγκεκριμένου pH και να γίνει και πολύ προσεκτικά η πρόσθεση της χρωστικής ουσίας που προσδένεται στο DNA. [50]

3.7 Απεικόνιση

Για την ποσοτική απεικόνιση κάθε μπάρας DNA είναι απαραίτητη η χρήση λάμπας UV έτσι ώστε να επέλθει ο φωσφορισμός της χρωστικής ουσίας (βρωμιούχο αιθίδιο) σε όλο το πήκτωμα. Συνεπώς ο φωτισμός πρέπει να είναι ομοιόμορφος και με κατάλληλη διασπορά. Στην συνέχεια τοποθετούμε το πήκτωμα σε μία UV κάμερα η οποία μας δίνει και την ψηφιακή απεικόνιση του πειράματος και έτσι είμαστε πια σε θέση να επεξεργαστούμε μέσω του προγράμματος ImageJ όλα τα πειραματικά μας δεδομένα. [47]

3.8 Ανάλυση μέσω μοριακού βάρους

Χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ImageJ επιλέγουμε κάθε μπάρα DNA και εύκολα υπολογίζουμε σε μια γραφική παράσταση την διασπορά του στον χώρο. Η επεξεργασία των μετρήσεων θα γίνει με την βοήθεια της ανάλυσης μέσω μοριακού βάρους-NALA που χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό βλαβών DNA που έχουν αποκοπεί, έχουν διασπαστεί σε μικρότερα τμήματα και είναι πλέον διακριτά μετά την διαδικασία της ηλεκτροφόρησης. Αν έχουμε ένα πληθυσμό N_a δίκλωνων μορίων DNA όπου το i -οστό μόριο έχει L_i ζεύγη βάσεων, τότε το μέσο μήκος των μορίων του πληθυσμού ορίζεται σύμφωνα με τον τύπο:

$$L_a = \sum_{i=1}^N L_i / N_a \quad (1)$$

όπου ο δείκτης "α" αναφέρεται στα μόρια DNA που δεν έχουν υποστεί ενζυμική επεξεργασία. Στην συνέχεια αφού έχει προηγηθεί επώαση με την ενδονουκλεάση hAPE1 ή την γλυκοσυλάση OGG1, θα προκύψουν M DSBs μειώνοντας αντίστοιχα το μήκος των μορίων. Έτσι θα υπάρχουν πλέον $N_e = N_a + M$ μόρια DNA, όπου ο δείκτης "ε" αντιστοιχεί στα επωασμένα με ένζυμο-επεξεργασμένα και το μέσο μήκος των οποίων δίνεται από τον τύπο:

$$L_e = \sum_{i=1}^N L_i / N_e \quad (2)$$

Καθώς ο αριθμός των ζευγών βάσεων παραμένει ίδιος στους δυο πληθυσμούς μπορεί να αντικατασταθεί από την έκφραση N_{bp} . Στη συνέχεια αν διαιρέσουμε τη σχέση $M = N_e - N_a$ με την ποσότητα N_{bp} προκύπτει ο τύπος:

$$\Phi = \frac{N_e}{N_{bp}} - \frac{N_a}{N_{bp}}$$

ο οποίος σύμφωνα με τις σχέσεις (1) και (2) γίνεται :

$$\Phi = \frac{1}{L_e} - \frac{1}{L_a} \quad (3)$$

Στην τελευταία σχέση οι τιμές των L_e L_a είναι πολλαπλασιασμένες με τον παράγοντα 0.6, καθώς μπορεί να ισχύει $L_{med} = \langle L_n \rangle$ αλλά στην «απόσπαση» βλαβών από ομογενείς πληθυσμούς που αποκόπηκαν πολλαπλά σε τυχαία σημεία χρησιμοποιούμε τον τύπο:

$\langle L_n \rangle = 0.6 \times L_{med}$. Με αυτόν τον τρόπο το μέγεθος Φ δείχνει τη πιθανότητα ή συχνότητα επαγωγής DSBs ανά ζεύγη βάσεων εφόσον έχουμε καθορίσει πρώτα το μέσο μήκος των μορίων που έχουν επωαστεί με το ένζυμο και εκείνων που δεν έχουν. Καθώς το πλήθος των DSBs που θα έχει δημιουργηθεί αντιστοιχεί στις θέσεις των ομαδοποιημένων οξειδωτικών βλαβών σε απέναντι κλώνους, θα έχουμε τελικά μια αρκετά ακριβή ποσοτική εκτίμηση των βλαβών αυτών. [47, 50]

4ο Κεφάλαιο

Εκτέλεση του πειράματος

4.1 Σκοπός

Τα στοιχεία που έχουμε τα τελευταία χρόνια από κλινικές μελέτες και έρευνες για τις επιπτώσεις τις ιοντίζουσας ακτινοβολίας σε απομακρυσμένους ιστούς έχουν φέρει σημαντικές αλλαγές στις μεθόδους ακτινοθεραπείας και έχουν επέλθει σοβαρές τροποποιήσεις στην εκτίμηση της ακτινοευαισθησίας.

Έτσι το αντικείμενο έρευνας αυτής της εργασίας αποτελούν τα συμπλέγματα βλαβών DNA σε απομακρυσμένους ιστούς, βλάβες ιδιαίτερα ανθεκτικές στους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς των κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, θα επιχειρήσουμε να πραγματοποιήσουμε μια ποσοτική εκτίμηση των ομαδοποιημένων βλαβών που αποτελούνται κυρίως είτε από 2 αβασικά σημεία, από ένα αβασικό σημείο και μία SSB είτε από οξειδωμένες πουρίνες. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήσαμε την μέθοδο NALA, ηλεκτροφόρηση δειγμάτων DNA μετά από επώαση είτε με την ενδονουκλεάση hAPE1 είτε με την γλυκοσυλάση OGG1 και μεθόδους ποσοτικής απεικόνισης για τη μέτρηση των συμπλεγμάτων αυτών.

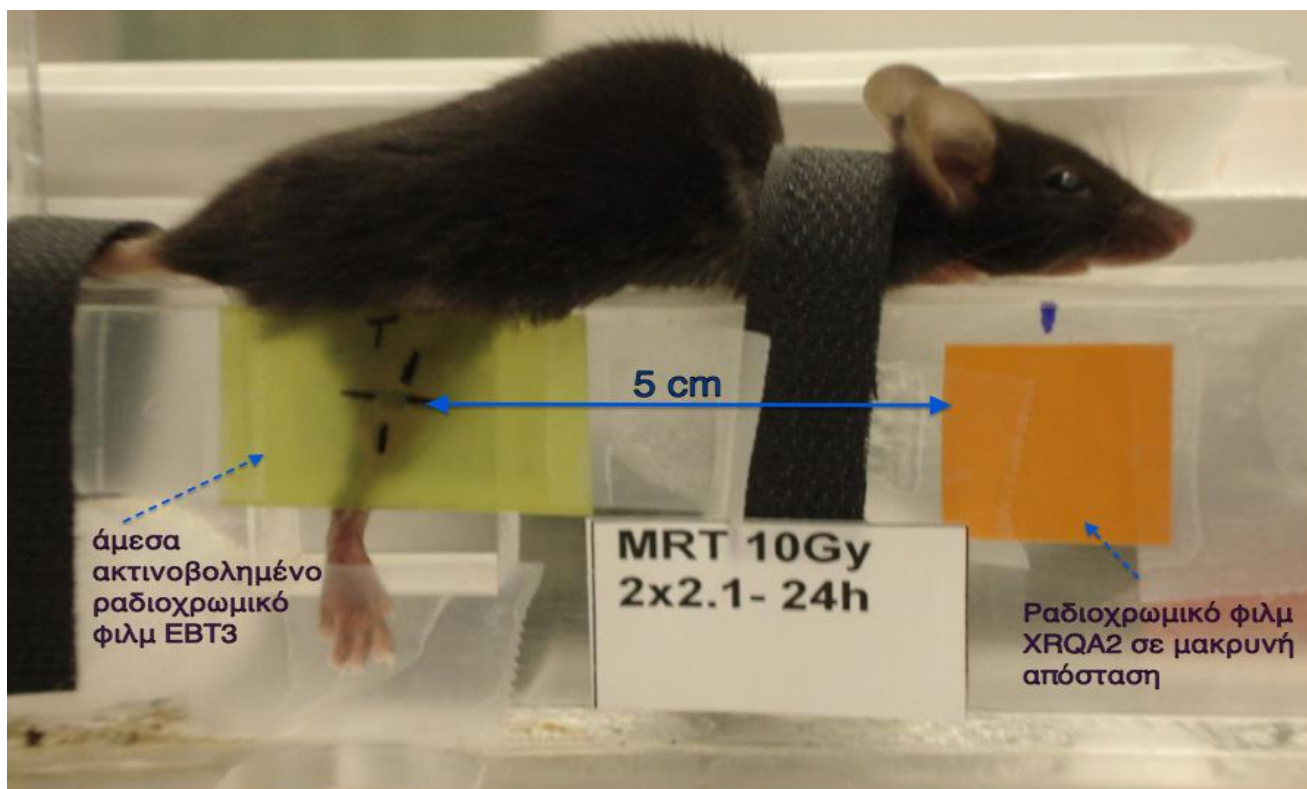
Για να συλλέξουμε στοιχεία για την απόκριση όλου οργανισμού σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο αξιοποιήσαμε τις δυνατότητες που παρέχει η χρήση ποντικών σε *in vivo* πειραματικές διαδικασίες. Μελετήσαμε δύο είδη ιστών, τις συνέπειες από την προσθήκη διαφορετικών ένζυμων, τα αποτελέσματα μετά από την προσθήκη ουσιών στο πειραματόζωο που σχετίζονται με την επιδιόρθωση των βλαβών και τέλος τα αποτελέσματα αυτά σε διάφορους χρόνους μετά την ακτινοβολήση

4.2 Διαδικασία ακτινοβολήσης

Τα συγκεκριμένα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε συνεργασία με την Δρ. Ολγα Μαρτιν (Olga Martin) στη Μελβούρνη της Αυστραλίας στο Ινστιτούτο Peter Mc Callum. Για την ανάγκη των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν υγιή θηλυκά ποντίκια του γένους C57BL/6J (BJ6) από την Ozgene (Perth, Αυστραλία). Τα ποντίκια

τοποθετούνται με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι η δεξιά πλευρά τους εκτεθειμένη στην ακτινοβολία. Η ακτινοβολήση κατευθύνθηκε στο πίσω πόδι, με το υπόλοιπο μέρος του σώματος καλυμμένο για να αποφευχθεί απορρόφηση ακτινοβολίας λόγω διάχυσης. Τα ποντίκια ακτινοβολήθηκαν στην επιταχυντική διάταξη Australian Synchrotron IMBL που παράγει ακτίνες-X υψηλού ρυθμού δόσης, με την ενέργεια των φωτονίων να είναι χαμηλή και να κυμαίνεται στο εύρος των kilovoltage (30-120 keV). Με αυτόν τον τρόπο θα εξεταστεί και η ορθότητα της υπόθεσης πως οι αποκρίσεις των ιστών εκτός στόχου οφείλονται σε διασπορά και απορρόφηση χαμηλών δόσεων ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ονομάζεται MRT (Microbeam Radiation Therapy) και βασίζεται σε μια τεχνική που βρίσκεται σε προκλινικό στάδιο έχοντας μέχρι τώρα δείξει καλύτερα αποτελέσματα στην ακτινοθεραπευτική εφαρμογή της σε σύγκριση με την συμβατική τεχνική της broad beam (BB) ακτινοβολήσης.

Σε αυτή τη μέθοδο η ακτινοβολήση πραγματοποιήθηκε με παράλληλες επίπεδες μικροδέσμες ακτίνων-X πάχους 25 μm σε απόσταση 200 μm μεταξύ των κέντρων κάθε μικροδέσμης. Με αυτόν τον τρόπο ακτινοβολήθηκαν επιφάνειες διαστάσεων 8x8 mm. Δεδομένου ότι το χαμηλότερο κατώφλι δόσης που έχει παρατηρηθεί σε *in vivo* μελέτες αναφορικά με την εμφάνιση μη στοχευμένων επιδράσεων της ιοντίζουσας ακτινοβολίας βρίσκεται περίπου στα 10 Gy, έτσι πραγματοποιήθηκαν και οι ακτινοβολήσεις με δόσεις στα 10Gy.



Εικόνα 4.1 Η διάταξη ακτινοβολήσης των ποντικίων και τα ραδιοχρωμικά φιλμ για τη μέτρηση της απορρόφησης και της διασπορά ακτινοβολίας.

Τέλος, για την απόκριση του οργανισμού σε διάφορους χρόνους μετά την ακτινοβολήση εξετάσαμε τα δείγματα μετά από χρονικό διάστημα 1 ημέρας, 3^{ov} ημερών και 7 ημερών και μια ομάδα ποντικών υποβλήθηκε στην διαδικασία χωρίς να ακτινοβοληθεί έτσι ώστε να χρησιμοποιηθεί ως συγκριτικό δείγμα(control). Τα ποντικά χωρίστηκαν σε έξι ομάδες των πέντε δειγμάτων και για να εξεταστούν διάφορες παράμετροι σχεδόν σε κάθε ομάδα εξετάσαμε και κάτι διαφορετικό, προσθέτοντας σε κάποιες ομάδες ποντικών ουσίες που επηρεάζουν την επιδιόρθωση των βλαβών του DNA όπως φαίνεται και στον πίνακα:

Δείγμα	Επεξήγηση	Χρονικά Σημεία	Σύνολο Δειγμάτων
BALB/C	Φυσιολογικά ποντίκια	3 ^η ημέρα 6 ^η ημέρα 7 ^η ημέρα	17
NSG	Ποντίκια 'χωρίς' ανοσοποιητικό σύστημα	3 ^η ημέρα	8
B6	Φυσιολογικά ποντίκια	3 ^η ημέρα 7 ^η ημέρα	18
B6+Hyb	Προσθήκη μη-σχετικού αντισώματος με την επιδιόρθωση βλαβών	3 ^η ημέρα 7 ^η ημέρα	19
B6+ASF	Προσθήκη του αντι-μακροφάγου αντισώματος ASF98	3 ^η ημέρα 7 ^η ημέρα	20
CCL2	Ποντίκια τύπου B6 με απενεργοποιημένη την κυτοκίνη CCL2	1 ^η ημέρα 3 ^η ημέρα 7 ^η ημέρα	20

Πίνακας 4.1 Πίνακας ποντικών που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα

4.3 Απομόνωση DNA

Για το σκοπό αυτής της εργασίας χρησιμοποιήθηκε απομονωμένο DNA από τον ιστό της γλώσσας και του παχέος εντέρου με μια τεχνική που έχει αναπτυχθεί στο εργαστήριο του Δρ. Γεωργακίλα (ΗΠΑ). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε βασίστηκε στις οδηγίες του High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Indianapolis, IN) και εκτελέστηκε με τέτοιο τρόπο ώστε να εξασφαλιστεί το μέγιστο μήκος των τμημάτων DNA με την ελαχιστοποίηση της επαγωγής μονόκλωνων και δίκλωνων θραύσεων. Ομογενή τμήματα των ιστών μεγέθους 30-50 mg αφού αποψύχθηκαν τοποθετήθηκαν σε διάλυμα λύσης πρωτεΐνάσης K υψηλής αντιοξειδωτικής δράσης (5 mg/ml σε ρυθμιστικό διάλυμα με 4M ουρία, 200 mM Tris, 20 mM NaCl, 200 mM EDTA και pH 7.4). Μετά από επώαση στους 37°C για 3-12h πραγματοποιήθηκε η εξαγωγή και απομόνωση του DNA.

σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε στην κατάλληλη παρασκευή φρέσκων και αποστειρωμένων διαλυμάτων και στη διατήρηση της μέγιστης θερμοκρασίας κατά την εξαγωγή κάτω από τους 60°C αντί των 70°C που συνιστούσε ο κατασκευαστής. Η στήλη στην συνέχεια φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στα ~5000g. Τέλος, το DNA θα διαλυθεί σε πρότυπο διάλυμα TE (0 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 7.5), θα τοποθετηθεί σε σωληνάρια eppendorf και θα αποθηκευτεί στους -20°C. Καθότι τα διαλύματα που προκύπτουν περιέχουν DNA σε διάφορες συγκεντρώσεις με μεγάλες αποκλίσεις μεταξύ τους, προχωρήσαμε σε αραιώσεις με αποσταγμένο νερό (dH₂O) έτσι ώστε τα διαλύματα με τα οποία θα εργαστούμε στη συνέχεια να έχουν όλα συγκέντρωση DNA 20ng/μ

4.4 Υλικά ηλεκτροφόρησης

Συσκευή

Για τη διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκε η συσκευή ηλεκτροφόρησης 2314 Horizontal Electrophoresis Device με δεξαμενή χωρητικότητας 1000 ml. Ειδική φόρμα περιλαμβάνεται για τη κατασκευή του πηκτώματος αгарόζης, όπου με την έγχυση 250 ml διαλύματος TAE και αгарόζης δημιουργείται το πηκτώμα.

Αγαρόζη

Χρησιμοποιήθηκε σκόνη αгарόζης (certified molecular biology agarose 125g) κατάλληλη για τη δημιουργία πηκτώματος για ηλεκτροφορήσεις.

TAE

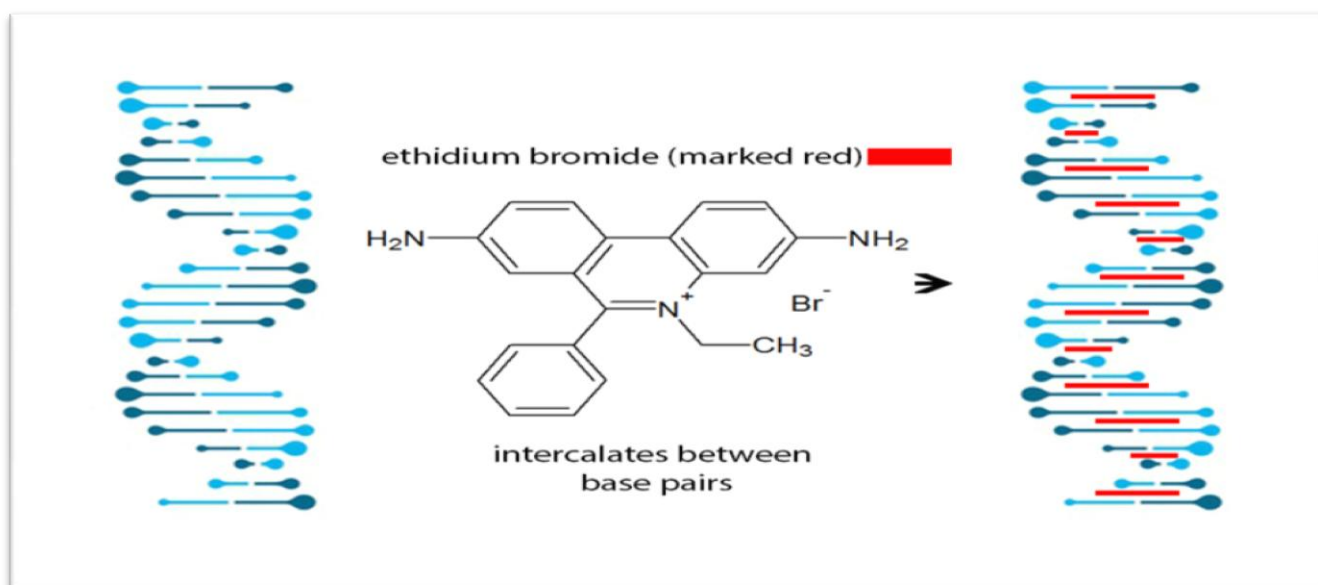
Το ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο χρησιμοποιείται για την πλήρωση της δεξαμενής όσο και για τη δημιουργία του πηκτώματος αгарόζης, είναι το TAE (Tris-acetate-EDTA). Καθότι για τη δεξαμενή της ηλεκτροφορητικής διάταξης χρειαζόμαστε διάλυμα TAE συγκέντρωσης 1X και για την παρασκευή του πηκτώματος συγκέντρωση 0.5X, προχωράμε σε κατάλληλες αραιώσεις του αρχικού 50X διαλύματος.

Βρωμιούχο αιθίδιο

Το βρωμιούχο αιθίδιο (Ethidium bromide - EtBr) είναι χημική ουσία που χρησιμοποιείται ευρέως για τη σήμανση νουκλεϊκών οξέων σε ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αгарόζης. Προσδένεται ανάμεσα στο μόριο του DNA γι αυτό και είναι καρκινογόνος ουσία. Το EtBr να φθορίζει όταν αλληλεπιδράσει με υπεριώδη ακτινοβολία και αυτός είναι και ο λόγος που το χρησιμοποιούμε για να ανιχνεύσουμε τα τμήματα DNA σε UV κάμερα μετά την ηλεκτροφόρηση

DNA Ladder

Για τον υπολογισμό του μοριακού βάρους των δειγμάτων DNA, απαραίτητο είναι ένα διάλυμα μορίων DNA με συγκεκριμένα μεγέθη ώστε να πραγματοποιηθεί η απαιτούμενη βαθμονόμηση. Για τη κατασκευή του χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα Lambda DNA-Hind III Digest που περιέχει κατάλληλα μεγέθη μορίων DNA τέτοια ώστε να καλύπτουν το απαιτούμενο εύρος ζευγών βάσεων. Το τελικό διάλυμα που θα χρησιμοποιηθεί στην ηλεκτροφόρηση προκύπτει με την προσθήκη απιονισμένου νερού αλλά και με το διάλυμα blue loading dye ανιχνεύσουμε τα τμήματα DNA σε UV κάμερα μετά την ηλεκτροφόρηση.



Εικόνα 4.2 Αναπαράσταση πρόσδεσης του βρωμιούχου αιθιδίου στο μόριο του DNA

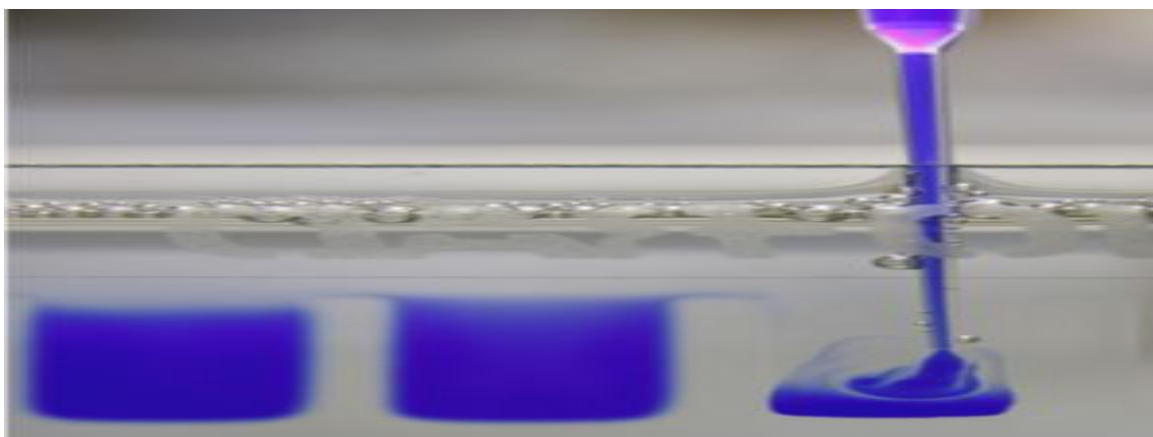
4.5 Πρωτόκολλο πειράματος

Επεξεργασία δειγμάτων DNA και ηλεκτροφόρηση

Για την διεξαγωγή του πειράματος ,βγάζουμε τα δείγματα DNA (δηλαδή τα αραιωμένα διαλύματα συγκέντρωσης 20ng/μl) και το ρυθμιστικό διάλυμα(Buffer) του εκάστοτε ενζύμου που διατηρούνται στην κατάψυξη(-20°C) και τα αφήνουμε να ξεπαγώσουν σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να επανέλθουν πλήρως σε υγρή κατάσταση. Αραιώνουμε το ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου σε αναλογία 1 μέρος ρυθμιστικού διαλύματος και 3 μέρη dH₂O δημιουργώντας έτσι ένα νέο διάλυμα το οποίο τοποθετείται σε δοκιμαστικό σωληνάριο για περαιτέρω χρήση. Στην συνέχεια προσθέτουμε σε PCR tubes 4 μl από το αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα μαζί με 2 μl από τα διαλύματα DNA και τα τοποθετούμε στον πάγο για 30 λεπτά. Για κάθε υπό μελέτη δείγμα DNA πρέπει να φτιαχτούν δύο διαλύματα, στο ένα από τα οποία θα προστεθεί ένζυμο (+ δείγμα) ενώ στο άλλο δεν θα προστεθεί

ώστε να λειτουργήσει σαν control ή αλλιώς δείγμα αναφοράς(- δείγμα).Μετά την πάροδο των 30 λεπτών προσθέτουμε στα (+) δείγματα 1μl από το hAPE1 ή το OGG1 το οποίο έχει αποκτήσει για άλλα 15 λεπτά θερμοκρασία δωματίου. Και επανατοποθετούμε τα δείγματα στον πάγο για άλλα 15 λεπτά . Κατόπιν , τοποθετούμε όλα τα PCR tubes σε συσκευή για επώαση στους 37°C για 1 ώρα (συνολικός όγκος αντίδρασης 7μl).Αφού περάσει η 1 ώρα της επώασης βγάζουμε τα δείγματα από την συσκευή και σταματάμε άμεσα την αντίδραση προσθέτοντας ειδικό διάλυμα stopping solution, 3μl σε όλα τα δείγματα(-και + ,παρότι στα πρώτα δεν πραγματοποιήθηκε προφανώς ενζυμική επώαση). Το διάλυμα που χρησιμοποιήσαμε για τον τερματισμό της επώασης (stopping solution loading dye) αποτελείται από EDTA (0.5M, pH 8.0) και την χρωστική gel loading dye Blue (6x) σε αναλογία 2:1. Στην συνέχεια τοποθετούμε ξανά τα δείγματα στον πάγο για 30 λεπτά.

Κατά την διάρκεια της επώασης των δειγμάτων ,προχωράμε παράλληλα στην κατασκευή του πηκτώματος αγαρόζης το οποίο θα έχει συγκέντρωση 1%,θα περιέχει δηλαδή 2,5gr σκόνη αγαρόζης σε 250 ml TAE0.5x.Διαλύουμε πλήρως την αγαρόζη στο διάλυμα TAE χρησιμοποιώντας φούρνο μικροκυμάτων μετά προσθέτουμε προσεκτικά 0.8 μl από το διάλυμα βρώμιούχου αιθιδίου και εγχύουμε το διάλυμα σε κατάλληλη φόρμα για τον σχηματισμό του πηκτώματος .Στην φόρμα έχουμε τοποθετήσει ειδικά χτένια για τον σχηματισμό των θέσεων «φόρτωσης» των δειγμάτων .Η φόρμα τοποθετείται για 40 λεπτά σε επίπεδη επιφάνεια για να στερεοποιηθεί πλήρως και καλύπτεται κατάλληλα για την προστασία από την σκόνη και άλλες προσμίξεις. Η τοποθέτηση γίνεται σε τοποθέτηση αρκετά χαμηλού φωτισμού λόγω της φωτοευαισθησίας του βρωμιούχου αιθιδίου .Όταν το πήκτωμα είναι έτοιμο το εμβαπτίζουμε στην δεξαμενή της ηλεκτροφόρησης η οποία είναι γεμάτη με ποσότητα TAE 1X (περίπου 1L) έτσι ώστε να καλύπτεται όλο το πήκτωμα .Φορτώνουμε τα δείγματα (τελικός όγκος 10 μl) στα πηγάδια(με όγκο πηγαδιού 15 μl) του πηκτώματος και τα αφήνουμε για 10 λεπτά να εξισορροπήσουν στο περιβάλλον των πηγαδιών .Το φόρτωμα των δειγμάτων πραγματοποιείται τοποθετώντας πρώτα το (-) δείγμα και μετά το (+)δείγμα. Ακόμη, εγχύουμε 1,2 μl DNA ladder από διάλυμα που κατασκευάσαμε με 6μl dH₂O ,4 μl stopping solution loading dye και 2 μl DNA Ladder ,αφού το αφήσουμε στους 58°C για 1 λεπτό ακριβώς, στα 4 ακριανά πηγάδια του πηκτώματος(2 στην πάνω και 2 στην κάτω σειρά του πηκτώματος .Ενεργοποιούμε την ηλεκτροφόρηση με ηλεκτρική τάση 100V και αφήνουμε τα δείγματα να «τρέξουν» για 100 λεπτά.



Εικόνα 4.3 Τοποθέτηση των δειγμάτων στις εγκοπές του πηκτώματος

Λίστα Αντιδραστηρίων-Ρυθμιστικών διαλυμάτων :

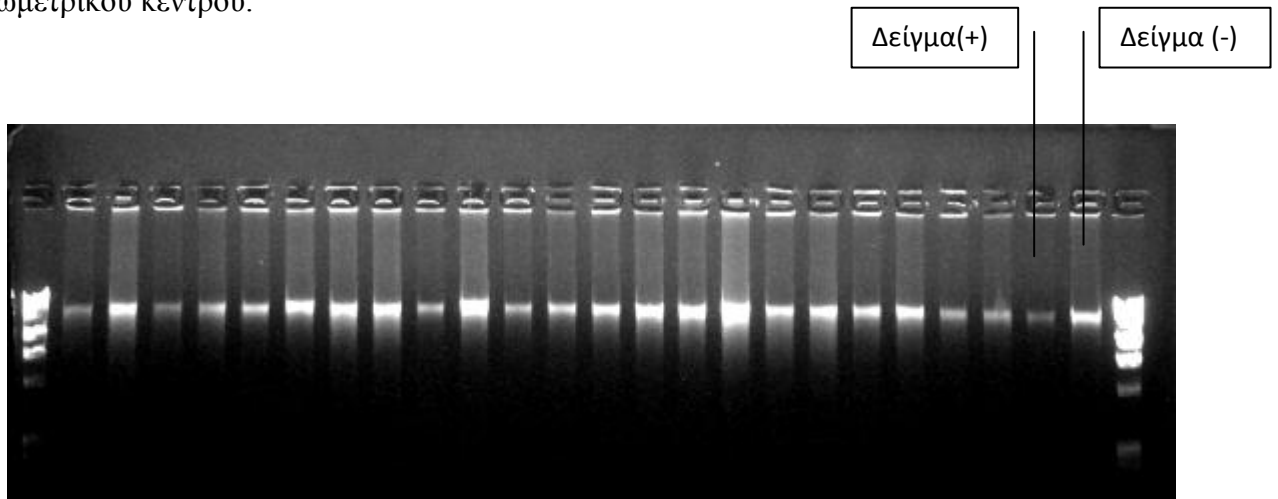
1. Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου hOGG1 : NEBuffer 2 ,10X concentration , (1XBuffer components: 50mM NaCl,10mM Tris-HCl,10mM $MgCl_2$,1mM DTT ,pH 7.9 στους 25°C), Amt: 1.25ml, Lot: 0171507 New England Biolabs
2. Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου hAPE1: NEBuffer 4, 10X concentration , (1XBuffer components: 50mM Potassium Acetate,20mM Tris-acetate,10mM Magnesium Acetate,1mM DTT, pH 7.9 στους 25°C), Amt: 1.25 ml, Lot: 0041411 New England Biolabs
3. Διάλυμα ενζύμου hOGG1: # MO241L ,1600 U/ml , Amt: 0.25 ml ,Lot : 0031512 , New England Biolabs
4. Διάλυμα ενζύμου APE1:#MO282L, 10,000 U/ml, Amt: 0.5 ml, Lot: 0041501, New England Biolabs
5. EDTA–Solution,pH8.00(0.5M),for molecular biology : composition EDTA, $Na_2,2H_2O$, AppliChem Panreac
6. TAE:TAE buffer 50X,SERVA
7. Gel Loading Dye,Blue(6X): #B7021S, 4 ml , Lot:0101508, New England Biolabs
8. Lambda DNA-Hind III Digest:500 ug/ml, Amt: 0.75 ml, Lot: 1731209, New England Biolabs
9. Διάλυμα EtBr συγκέντρωσης 1% από την AppliChem (A1152).

Πιο συγκεντρωτικά τα διαλύματα που παρασκευάζουμε εμείς είναι:

- διάλυμα αραιώσης Buffer hOGG1 (1) με απιονισμένο νερό σε αναλογία 1:3
- διάλυμα αραιώσης Buffer hAPE1 (2) με απιονισμένο νερό σε αναλογία 1:3
- στην περίπτωση του APE1 το ένζυμο(4) το χρησιμοποιούμε αραιωμένο με απιονισμένο νερό σε αναλογία 1:10
- διάλυμα διακοπής επώασης του εκάστοτε ενζύμου (stopping solution), EDTA(5) και gel loading Dye(7) σε αναλογία 2:1
- διάλυμα Ladder: με 6μl dH_2O , 4 μl stopping solution loading dye(7) και 2 μl Lambda DNA Hind III Ladder Digest (8)

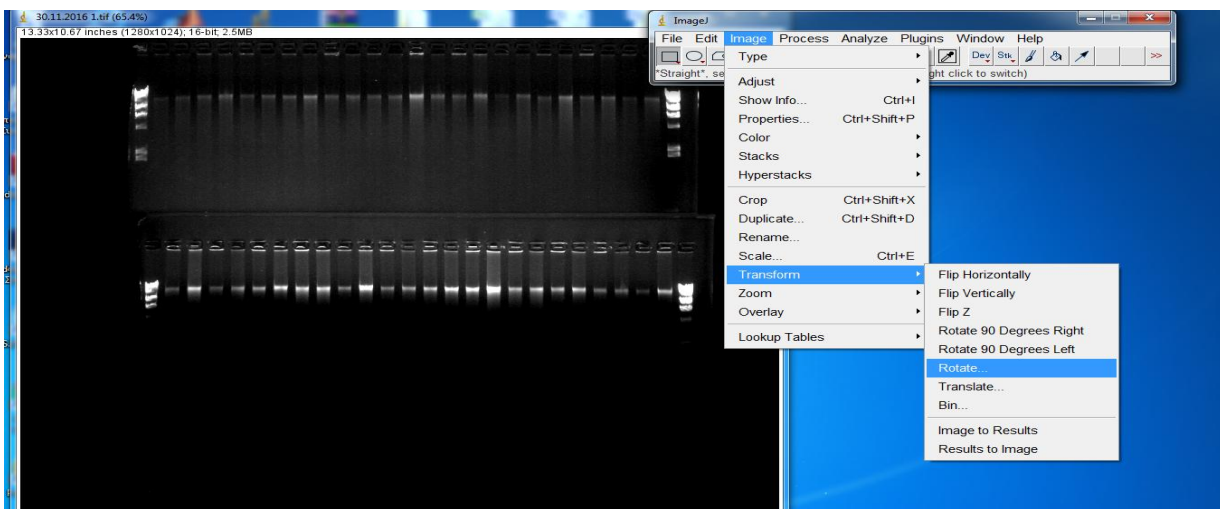
4.6 Επεξεργασία Εικόνας

Για την επεξεργασία του αποτελέσματος της ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα πυκνομετρικής οπτικής ανάλυσης ImageJ του National Institute of Health (NIH). Ρυθμίζουμε κατάλληλα την εικόνα του πηκτώματος, στην οποία απεικονίζονται επαρκώς οι μπάρες του DNA με την ελάχιστη δυνατή φωτεινότητα υποβάθρου. Για κάθε ζευγάρι από μπάρες DNA (- και + δείγμα) υπολογίζουμε τις καμπύλες μετατόπισης του DNA συναρτήσει του μοριακού τους βάρους. Τα αποτελέσματα εξάγονται βάσει και της φωτεινότητας κάθε μπάρας κατά μήκος του άξονα μετατόπισης αλλά και από το μήκος της εκάστοτε μπάρας. Από το εμβαδόν που ορίζεται από την κάθε καμπύλη και τους άξονες x,y υπολογίζεται το X_{med} , το οποίο αντιστοιχεί στη συντεταγμένη X του γεωμετρικού κέντρου.



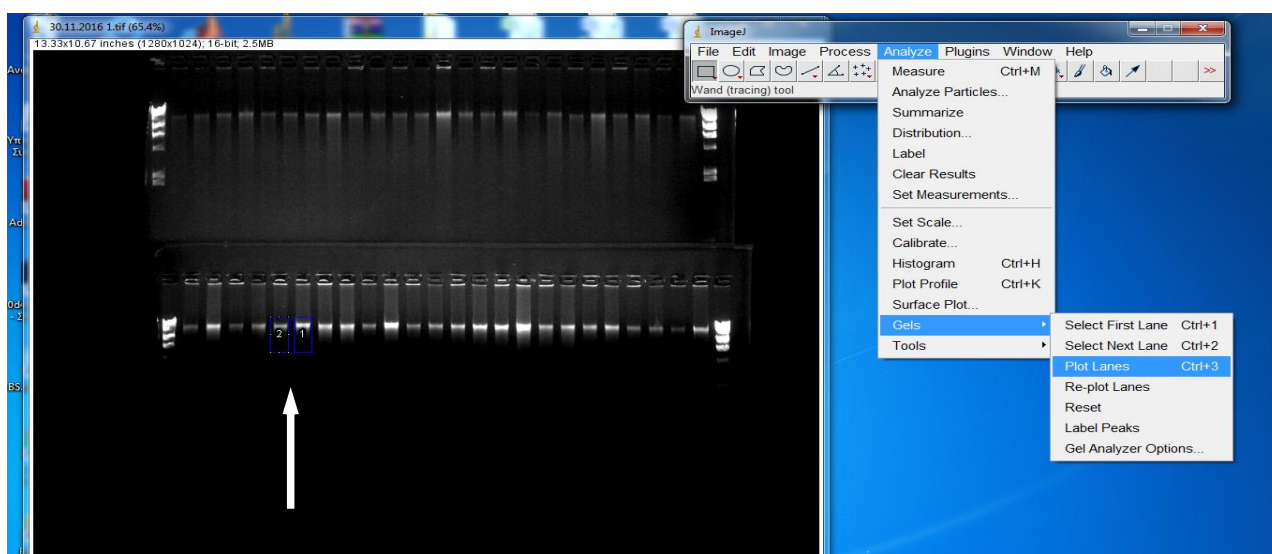
Εικόνα 4.4 Εικόνα του πηκτώματος του πειράματός μας

Πιο αναλυτικά, ανοίγοντας το πρόγραμμα ImageJ στην κεντρική οθόνη του υπολογιστή μας πρέπει να "σύρουμε" την υπό ανάλυση εικόνα πάνω στο πρόγραμμα του ImageJ, έτσι ώστε να ανοίξει μέσω του ImageJ. Πριν ξεκινήσουμε την ανάλυση μας πρέπει να ευθυγραμμίσουμε την εικόνα πατώντας την επιλογή Image από την μπάρα επιλογών του προγράμματος, μετά Transformation και μετά την επιλογή Rotate πως φαίνεται και στην Εικόνα 4.5



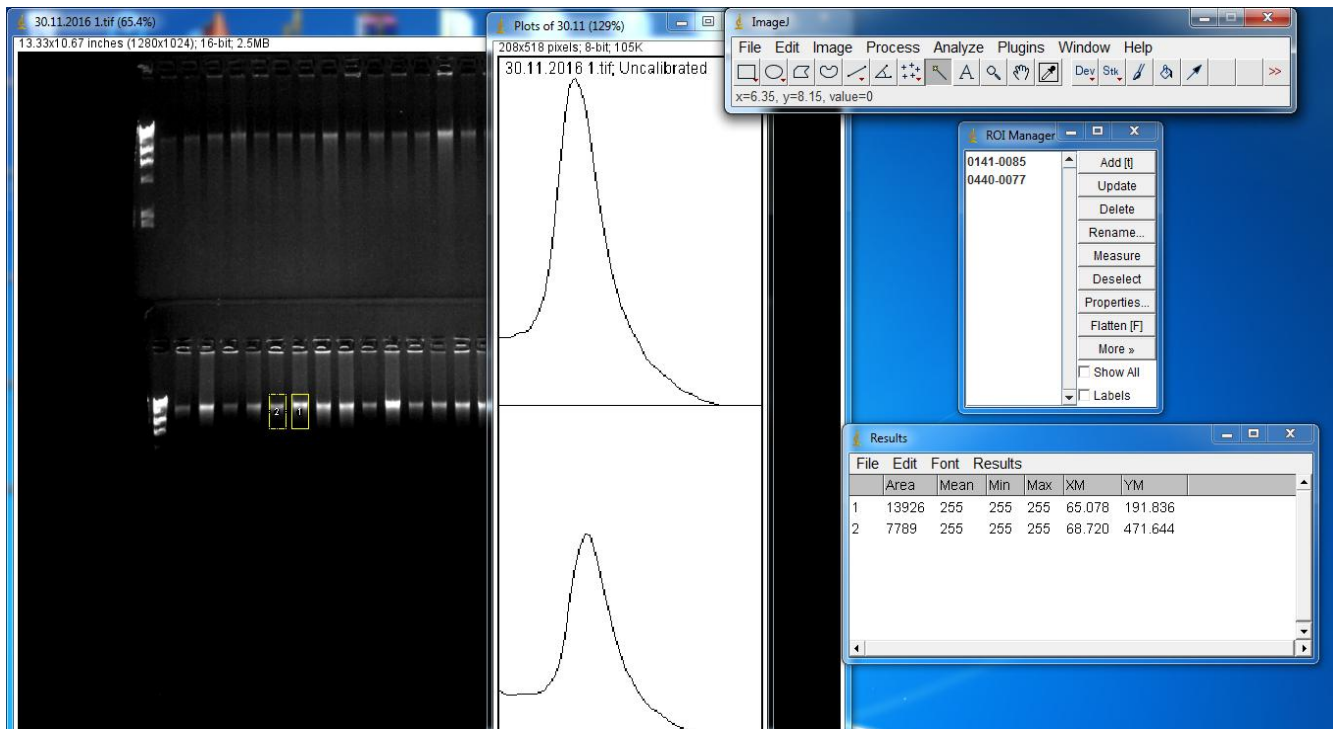
Εικόνα 4.5 Η σωστή ευθυγράμμιση της εικόνας παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αξιολόγηση του αποτελέσματος καθώς όλες οι μετρήσεις πρέπει να έχουν κοινό σημείο αναφοράς.

Στην επεξεργασία της εικόνας σημαντικό ρόλο επίσης, παίζει ο κατάλληλος καθορισμός των κελιών των υπό εξέταση δειγμάτων. Η μελέτη γίνεται σε ζεύγη untreated και treated δειγμάτων, με το εκάστοτε ένζυμο και το μέγεθος των κελιών πρέπει να είναι αυστηρά το ίδιο. Σε αυτό μας βοηθά και το ίδιο το πρόγραμμα του ImageJ αφού κάτω αριστερά της μπάρας επιλογών μας δίνει τις συντεταγμένες των σημείων που επιλέγουμε με τον κέρσορα. Αφού επιλέξουμε το ζευγάρι που θέλουμε να μελετήσουμε χρησιμοποιώντας το πρώτο εικονίδιο από την μπάρα επιλογών για να οριοθετήσουμε το μέγεθός του, διαλέγουμε την επιλογή Analyse από την μπάρα επιλογών, ύστερα Gel και μετά την επιλογή Plot Lanes ώστε να έχουμε το διάγραμμα διασποράς των δειγμάτων μας χώρο.



Εικόνα 4.6 Η επιλογή του ζεύγους δειγμάτων και η διαδικασία για την δημιουργία του διαγράμματος διασποράς στον χώρο.

Έχοντας πια το διάγραμμα διασποράς των δύο δειγμάτων με πρώτο το δείγμα χωρίς την προσθήκη ενζύμου και δεύτερο το δείγμα με το εκάστοτε ένζυμο, διαλέγουμε το όγδοο εικονίδιο από την μπάρα επιλογών και επιλέγουμε το εμβαδόν που σχηματίζεται στις δύο εικόνες ,με την σειρά που προαναφέρθηκε, προσέχοντας κάθε φορά αμέσως μετά την επιλογή του εμβαδού να πληκτρολογούμε το γράμμα T στο πληκτρολόγιο μας έτσι ώστε να μας εμφανιστεί το παράθυρο ROI MANAGER. Στην συνέχεια διαλέγουμε από το παράθυρο του ROI MANAGER την επιλογή Measure και με αυτόν τον τρόπο έχουμε το παράθυρο Results με τα αποτελέσματα των εμβαδών και των γεωμετρικών κέντρων των δύο χωρίων ,όπως φαίνεται και στην εικόνα 4.7 που ακολουθεί.



Εικόνα 4.7 Η διαδικασία που ακολουθήθηκε σε κάθε ζεύγος δείγματος ξεχωριστά για την εύρεση εμβαδών και γεωμετρικών κέντρων των δειγμάτων στον χώρο. Στο διάγραμμα φωτεινότητας που παίρνουμε από την επεξεργασία ο κατακόρυφος άξονας αντιπροσωπεύει την φωτεινότητα και ο οριζόντιος την μετατόπιση. Η επάνω εικόνα αντιστοιχεί στο (-) δείγμα ενώ η κάτω στο (+) δείγμα, η οποία είναι ελαφρώς δεξιότερα.

Ύστερα, ξεκινάμε την δημιουργία αριθμημένης καμπύλης ώστε να αντιστοιχήσουμε τα X_{med} με το μέσο πληθυσμό μορίων DNA L_{med} (μετρημένο σε ζεύγη βάσεων). Για τη δημιουργία αυτής της καμπύλης παίρνουμε το διάγραμμα διασποράς του DNA ladder και βρίσκουμε τις τιμές των X_{med} των 7 καμπυλών του διαγράμματος που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένο αριθμό ζεύγων βάσεων, όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.8.

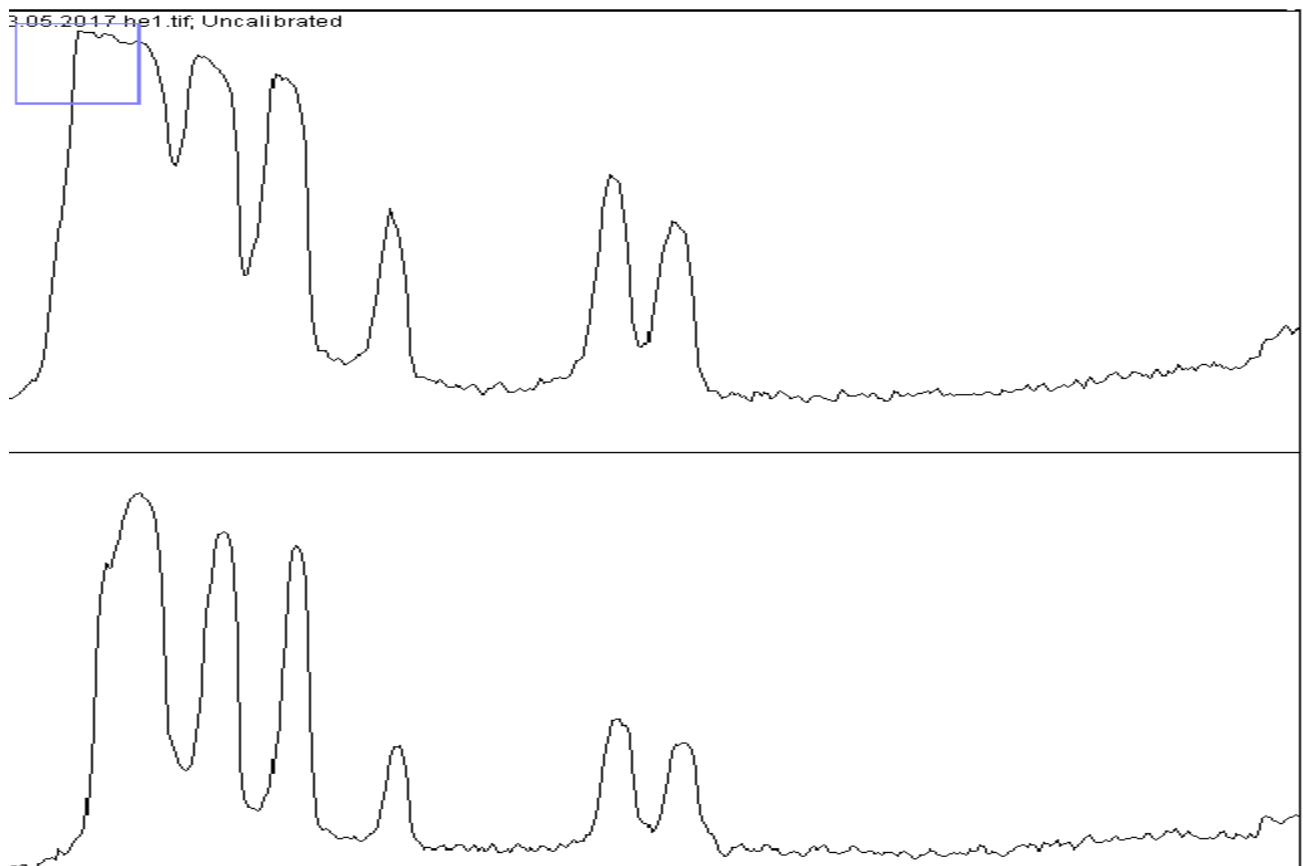
Επειδή όμως ο αριθμός των ζευγών βάσεων για τον DNA ladder για κάθε X_{med} είναι γνωστός δημιουργούμε την καμπύλη διασποράς βάζοντας στους άξονες X-Y τις τιμές του X_{med} και των ζευγών βάσεων αντίστοιχα. Στη συνέχεια προσαρμόζουμε την καμπύλη που προκύπτει στην γραφική παράσταση της συνάρτησης ExpDec2 του προγράμματος OriginPro 8 με τύπο:

$$y = A_1 e^{x/t_1} + A_2 e^{x/t_2} + y_0$$

και έτσι έχουμε τις τιμές των παραμέτρων για τον Ladder και περνώντας και από το πρόγραμμα στο Excel τις τιμές των X_{med} των δειγμάτων προκύπτουν οι αντίστοιχες τιμές L_{med} για κάθε πληθυσμό βάσει της διασποράς που ορίζουν οι παραπάνω παράμετροι. Τέλος από τον τύπο

$$\Phi = \frac{1}{L_\epsilon} - \frac{1}{L_\alpha}$$

(όπου L_ϵ και L_α είναι οι τιμές των L_{med} για το + και - αντίστοιχα πολλαπλασιασμένες με τον παράγοντα 0.6) υπολογίζεται η συχνότητα εμφάνισης των AP clusters/Gbp των δειγμάτων.



Εικόνα 4.8 Τα διαγράμματα Ladder που παίρνουμε δημιουργούνται με τον αντίστοιχο τρόπο που δημιουργούνται και τα υπόλοιπα δείγματα ,μόνο που σε αυτήν την περίπτωση δεν έχουμε μία καμπύλη αλλά έξι ,οπότε κόβουμε την κάθε καμπύλη και την μελετάμε ξεχωριστά .Το τελικό μας αποτέλεσμα στο παράθυρο Results δεν έχει 2 αποτελέσματα αλλά 12(6X2) και έτσι έχουμε τα Xmed των ladder.

5^ο Κεφάλαιο

Αποτελέσματα και συμπεράσματα

5.1. Αποτελέσματα

Για την αξιολόγηση των ομαδοποιημένων οξειδωτικών βλαβών σε συστημικό επίπεδο εκτελέστηκε ένα πλήθος πειραμάτων όπου σύμφωνα με τη μέθοδο NALA μετά από ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων DNA και πραγματοποιώντας την επεξεργασία των πηκτωμάτων στο ImageJ αποκτήθηκε ένα ικανοποιητικά μεγάλο σύνολο δεδομένων για τη συχνότητα των βλαβών σε κάθε περίπτωση. Για την επιβεβαίωση της εγκυρότητας των μετρήσεων πραγματοποιήθηκε επανάληψη όλων των πειραμάτων. Τα δείγματα DNA όπως είδαμε προέρχονται από τους ιστούς της γλώσσας και του παχέος εντέρου, οι οποίοι δεν έχουν ακτινοβοληθεί άμεσα. Τα δείγματα αυτά συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα δείγματα (control) τα οποία προήλθαν από ποντίκια τα οποία υποβλήθηκαν στην ίδια διαδικασία με τα υπόλοιπα, χωρίς ωστόσο να ακτινοβοληθούν. Για κάθε ομάδα δειγμάτων, εκτός από τη τιμή του μέσου όρου, υπολογίστηκε το αντίστοιχο τυπικό σφάλμα (standard error – SE) σύμφωνα με τον τύπο:

$$SE = \frac{S}{\sqrt{n}} \quad , \text{όπου } S \text{ η τυπική απόκλιση που δίνεται από τον τύπο } S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x-x')^2}{n(n-1)}}$$

Για την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε t-test για την σύγκριση των βλαβών ανάμεσα στα ακτινοβολημένα και στα μη ακτινοβολημένα αλλά και μεταξύ των ακτινοβολημένων δειγμάτων που βρίσκονται σε διαφορετικές συνθήκες. Το t-test όταν μας δώσει αποτέλεσμα με $p < 0.05$ σημαίνει ότι έχουμε σημαντικά στατιστικά αποτελέσματα στα υπό εξέταση δείγματά μας με ένα διάστημα εμπιστοσύνης 95%. Πιο αναλυτικά τα αποτελέσματα των πειραμάτων των δύο ιστών και με κάθε ένζυμο ξεχωριστά βρίσκονται στο παράρτημα .

Σε αυτό το κεφάλαιο λοιπόν ,θα παρουσιαστούν ομαδοποιημένα τα αποτελέσματα για το εκάστοτε ένζυμο και θα κατηγοριοποιηθούν και θα συγκριθούν σύμφωνα με τις εξής παραμέτρους: το είδος του ποντικίου, τον ιστό ,το χρονικό διάστημα μετά την ακτινοβολήση και την εξάρτηση των βλαβών από την προσθήκη ουσιών που επηρεάζουν την επιδιόρθωση τους.

5.2 Απόκριση ιστών με hAPE1

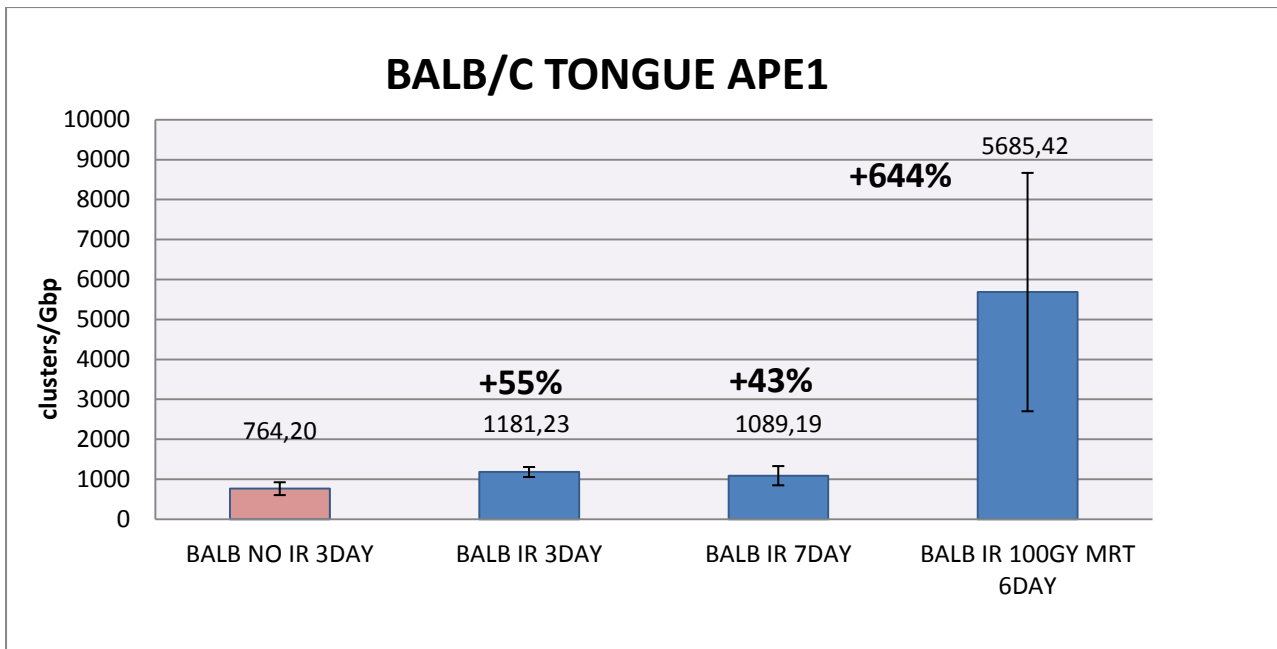
Απόκριση ιστού της γλώσσας

Τα ποντίκια ακτινοβολήθηκαν με δόση 10 Gy στο δεξί πόδι και μέσω των συστημικών μηχανισμών παρατηρήθηκαν οι ακόλουθες βλάβες στα υπο εξέταση δείγματα γλώσσας οι οποίες φαίνονται αναλυτικά στον πίνακα και στα διαγράμματα που ακολουθούν σύμφωνα με το είδος του εκάστοτε ποντικίου.

Tongue hAPE1

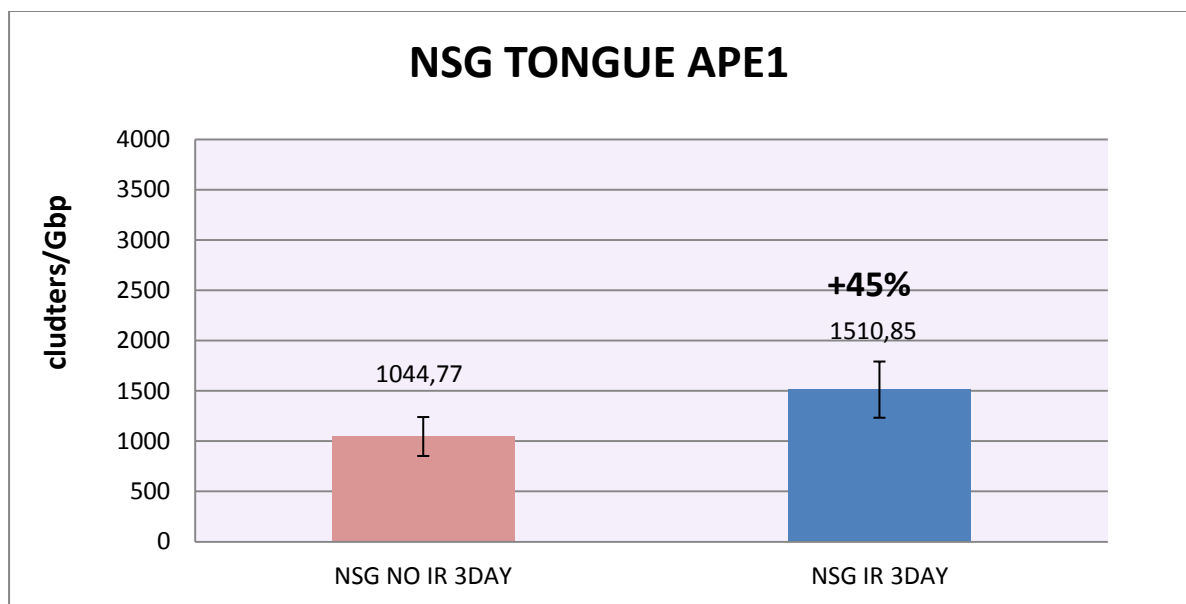
Δείγματα	Μέσος όρος (clusters/Gbp)	Τυπικό σφάλμα (clusters/Gbp)
BALB NO IR 3DAY	764,21	161,01
BALB IR 3DAY	1181,24	125,1
BALB IR 7DAY	1089,2	240,61
BALB IR 100GY MRT 6DAY	5685,43	2983,2
NSG NO IR 3DAY	1044,77	193,72
NSG IR 3DAY	1510,86	279,45
B6 NO IR 3DAY	1028,41	220,99
B6 IR 3DAY	1450,11	182,2
B6 IR 7DAY	1026,35	279,71
B6+HYB NO IR 3DAY	1186,88	147,65
B6+HYB IR 3DAY	1690,06	145,87
B6+HYB NO IR 7DAY	934,71	286,11
B6+HYB IR 7DAY	1703,07	189,57
B6+ASF NO IR 3DAY	1256,94	169,71
B6+ASF IR 3DAY	2749,43	479,256
B6+ASF NO IR 7DAY	1840,76	523,48
B6+ASF IR 7DAY	2759,29	267,33
CCL NO IR 3DAY	2140,63	276,46
CCL IR 1DAY	2648,11	845,88
CCL2 IR 3DAY	3196,97	716,69

Πίνακας 5.1 Πειραματικά αποτελέσματα ιστού γλώσσας με APE1



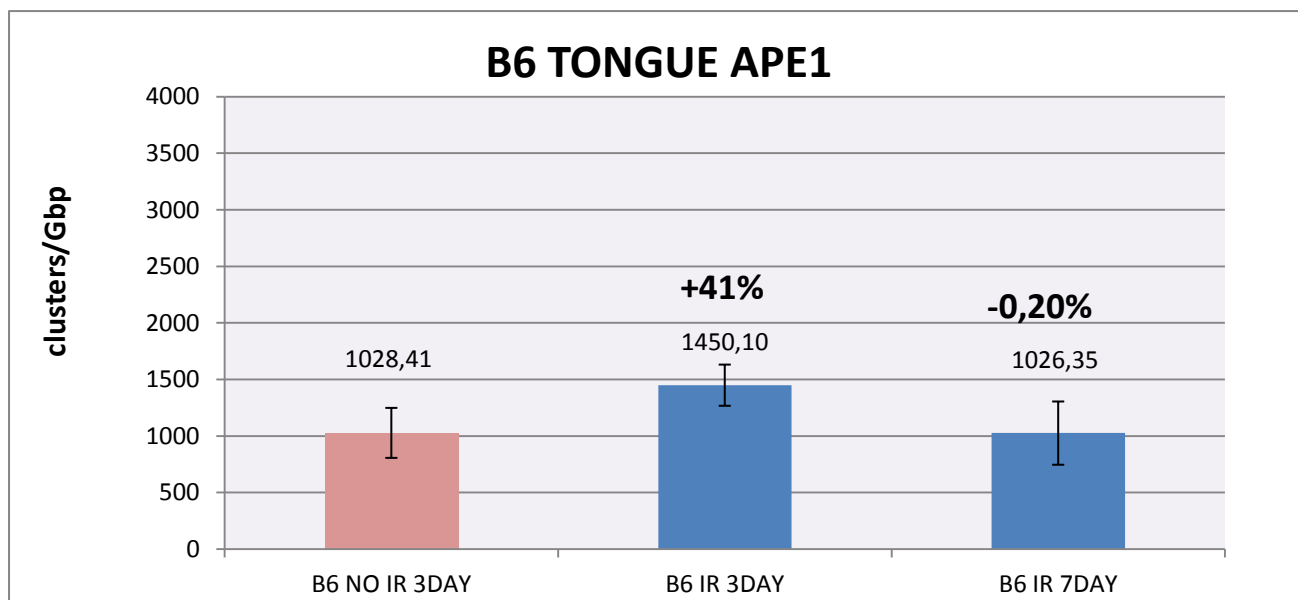
Γράφημα 5.2.1 Βλάβες DNA σε τύπο BALB/C στην γλώσσα με APE1

Στο πρώτο μας γράφημα σε BALB/C τύπου ποντικών βλέπουμε ότι οι βλάβες την τρίτη και την έβδομη ημέρα της ακτινοβόλησης δεν είναι ιδιαίτερα σημαντικές ,αντιθέτως παρατηρούμε ότι την έβδομη ημέρα παρατηρείται μια μικρή μείωση σε σχέση με την τρίτη αλλά είναι αρκετά μικρές οι διαφορές και πολύ κοντά οι τιμές στα όρια του στατιστικού σφάλματος για να μπορέσουμε να βγάλουμε κάποιο αξιόπιστο συμπέρασμα για αυτήν την ελαφρά μείωση. Όσον αφορά την τέταρτη στήλη ,αντιπροσωπεύει μια μέτρηση που πραγματοποιήθηκε κατά λάθος με την ακτινοβόληση του ποντικού στα 100Gy,συνεπώς εξηγείται η απότομη αύξηση των βλαβών DNA αλλά και το μεγάλο τυπικό σφάλμα καθώς τα δείγματα σε αυτήν την σειρά ποντικών ήταν λιγότερα και ακόμη και η εικόνα που είχαμε από το πήκτωμα δεν ήταν η τυπική εικόνα που είχαμε στις υπόλοιπες μετρήσεις.



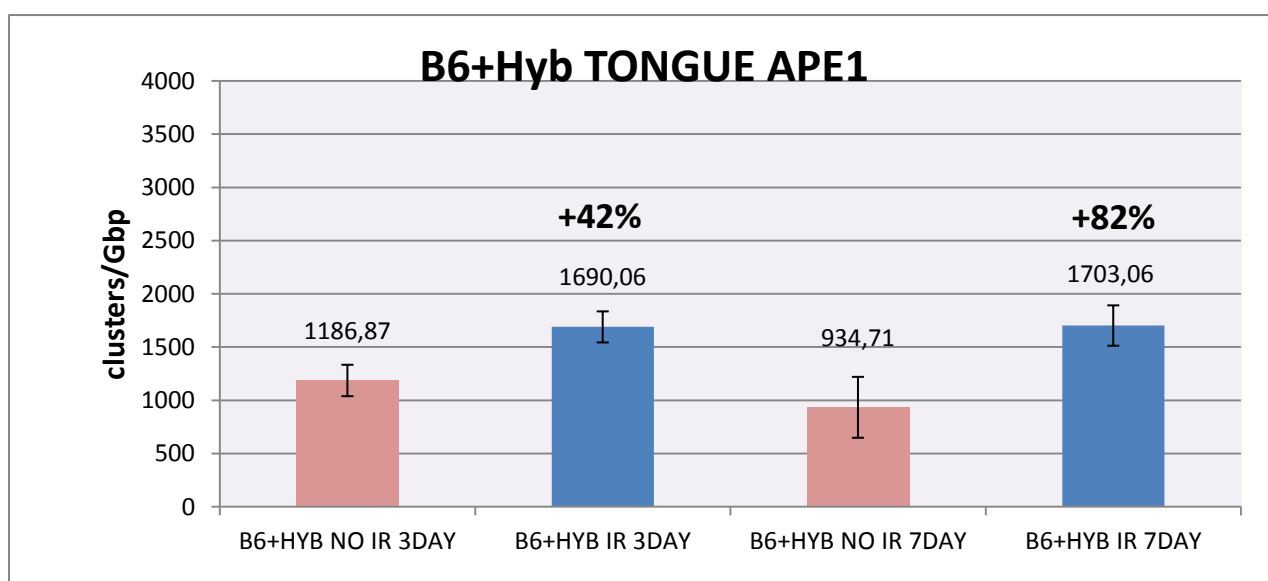
Γράφημα 5.2.2 Βλάβες DNA σε τύπο NSG στην γλώσσα με APE1

Στο Γράφημα 5.2 έχουμε NSG τύπο ποντικών που σημαίνει πως αυτή η σειρά ποντικών ακτινοβόληθηκε με πλήρης απουσία του ανοσοποιητικού τους συστήματος, όπως και δικαιολογείται και στο γράφημα καθώς βλέπουμε μια αύξηση της τάξης των 500Gbp



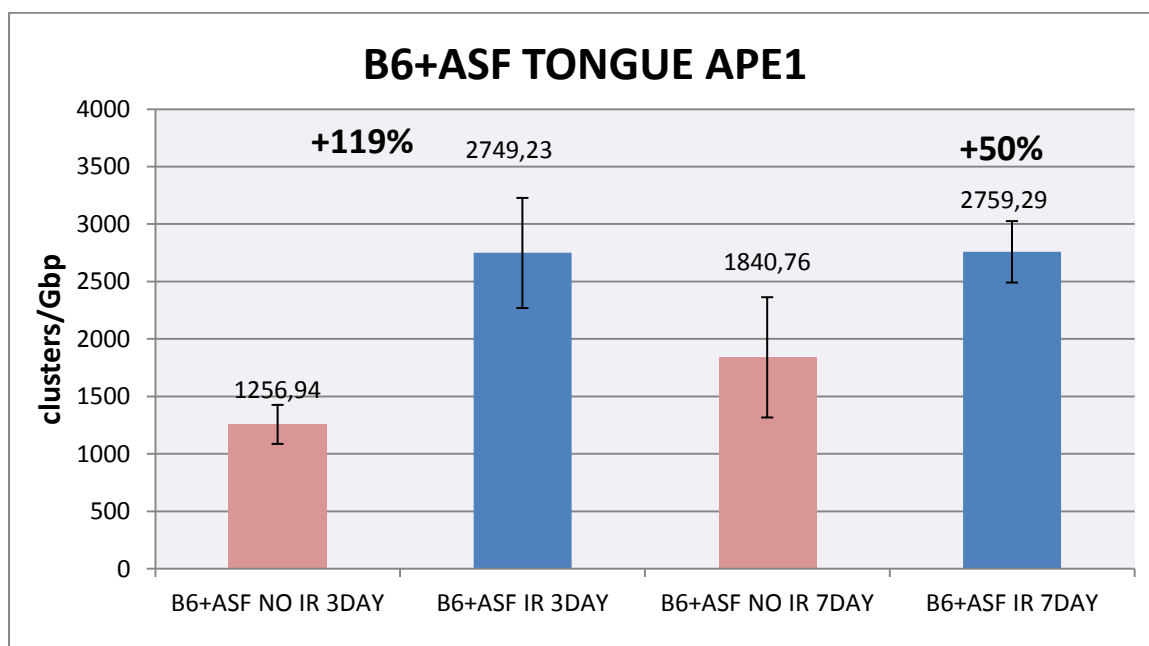
Γράφημα 5.2.3 Βλάβες DNA σε τύπο B6 στην γλώσσα με APE1

Στο Γράφημα 5.3 έχουμε B6 τύπο ποντικών και παρατηρούμε μία σαφής αύξηση των βλαβών την 3^η ημέρα της ακτινοβόλησης αλλά ακολουθεί μια σημαντική μείωση τους την 7^η ημέρα ,στα επίπεδα του μη ακτινοβολημένου δείγματός μας. Αυτή η σχετικά μεγάλη μείωση βέβαια μπορεί να αποδοθεί είτε στην επιδιορθωτική ικανότητα αυτού του τύπου ποντικών είτε στο τυπικό σφάλμα του control δείγματος μας που επικαλύπτεται σε σημαντικό βαθμό με το σφάλμα του ακτινοβολημένου μας δείγματος την 7^η ημέρα.



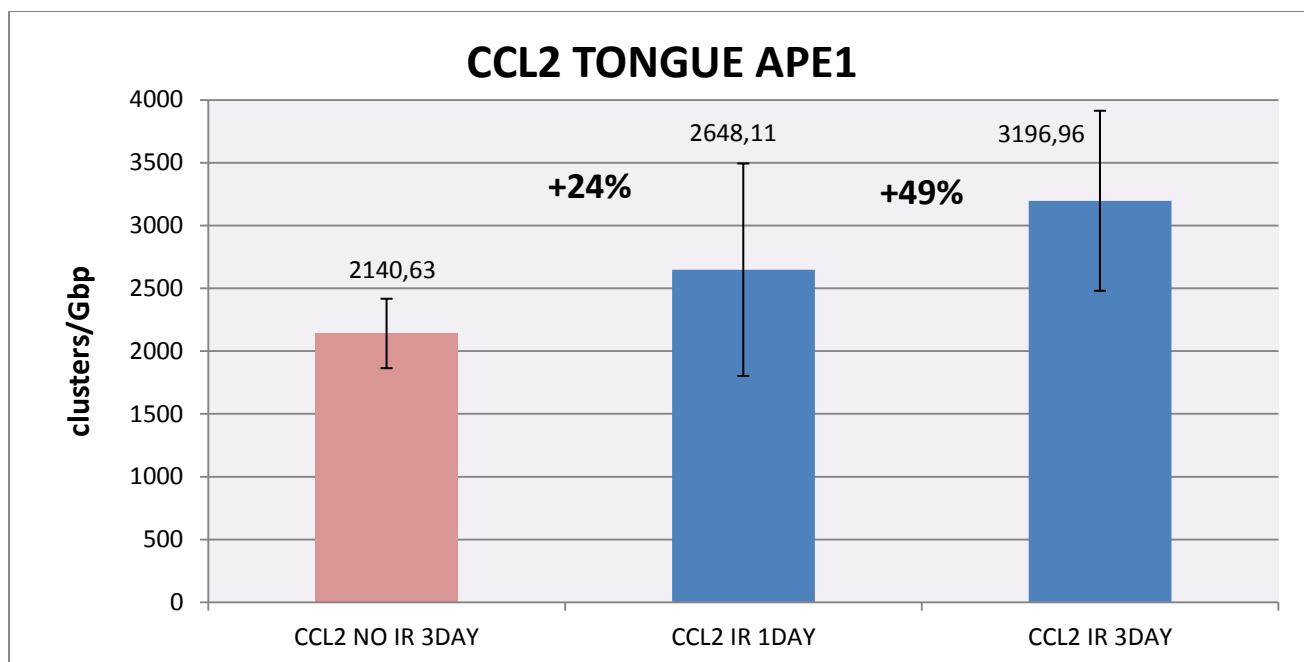
Γράφημα 5.2.4 Βλάβες DNA σε τύπο B6+Hyb στην γλώσσα με APE1

Στο Γράφημα 5.4 έχουμε B6 τύπο ποντικών στα οποία όμως είχαμε προσθέσει ένα αντίσωμα (hybridoma) το οποίο **δεν σχετίζεται** με την παραγωγή μακροφάγων και άλλων ανοσοκυττάρων. Παρατηρούμε λοιπόν, μια σαφή αύξηση των βλαβών DNA σε σχέση με τα control δείγματα που κυμαίνονται από τα 500 clusters/Gbp την 3^η ημέρα έως και τα 700 clusters/Gbp που υποδηλώνει μια αδυναμία αντιμετώπισης της βλάβης καθώς σε αντίθεση με τους άλλους τύπους ποντικών την 7^η ημέρα παρατηρούμε αύξηση των βλαβών.



Γράφημα 5.2.5 Βλάβες DNA σε τύπο B6+ASF στην γλώσσα με APE1

Στο Γράφημα 5.5 έχουμε το δείγμα B6+ASF που σημαίνει ότι σε τύπο ποντικών B6 προσθέσαμε το αντι- μακροφάγο ASF και έτσι αναμέναμε οι βλάβες να είναι μειωμένες καθώς το αντίσωμα θα μείωνε την απόκριση και την επαγωγή στις βλάβες DNA κάτι που **δεν επαληθεύεται** από τις πειραματικές μας τιμές. Παρατηρούμε λοιπόν την 3^η ημέρα μια σημαντική αύξηση των βλαβών και την 7^η ημέρα μια σχετικά μικρότερη αύξηση.



Γράφημα 5.2.6 Βλάβες DNA σε τύπο CCL2 στην γλώσσα με APE1

Στο Γράφημα 5.5 έχουμε το δείγμα CCL2 ,ποντίκια τύπου B6 στα οποία τους έχει εκμηδενιστεί η δυνατότητα παραγωγής κυτοκίνης. Αναμέναμε σχετικά χαμηλές τιμές στα ακτινοβολημένα κύτταρα αφού η έλλειψη κυτοκίνης θεωρητικά θα μείωνε και τις οξειδωτικές βλάβες ,πάραιτα έχουμε μια αυξημένη παρουσία βλαβών την 1^η ημέρα μετά την ακτινοβόληση οι οποίες αυξάνονται την 3^η ημέρα οδηγώντας μας στο συμπέρασμα της έλλειψης απόκρισης του ανοσοποιητικού συστήματος.

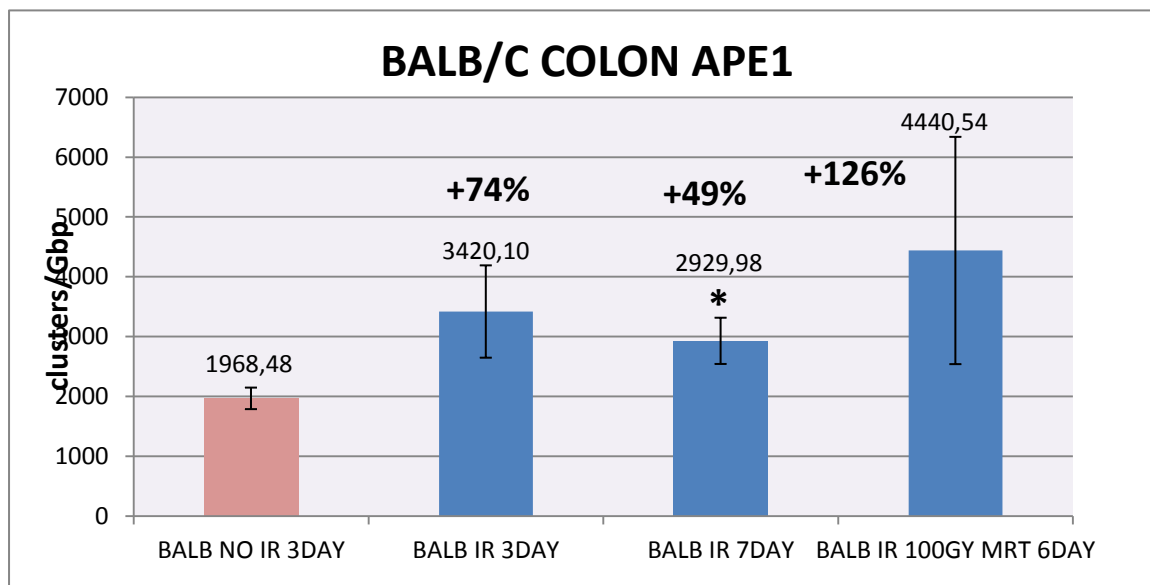
Απόκριση ιστού του παχέος εντέρου

Στον πίνακα που ακολουθεί έχουμε τα δείγματα από τα ποντίκια που ακτινοβολήθηκαν με δόση 10 Gy στο δεξί πόδι και μέσω των συστημικών μηχανισμών παρατηρήθηκαν οι ακόλουθες βλάβες στα υπό εξέταση δείγματα του παχέος εντέρου οι οποίες φαίνονται αναλυτικά και στα διαγράμματα που ακολουθούν σύμφωνα με το είδος του εκάστοτε ποντικιού.

Colon APE1

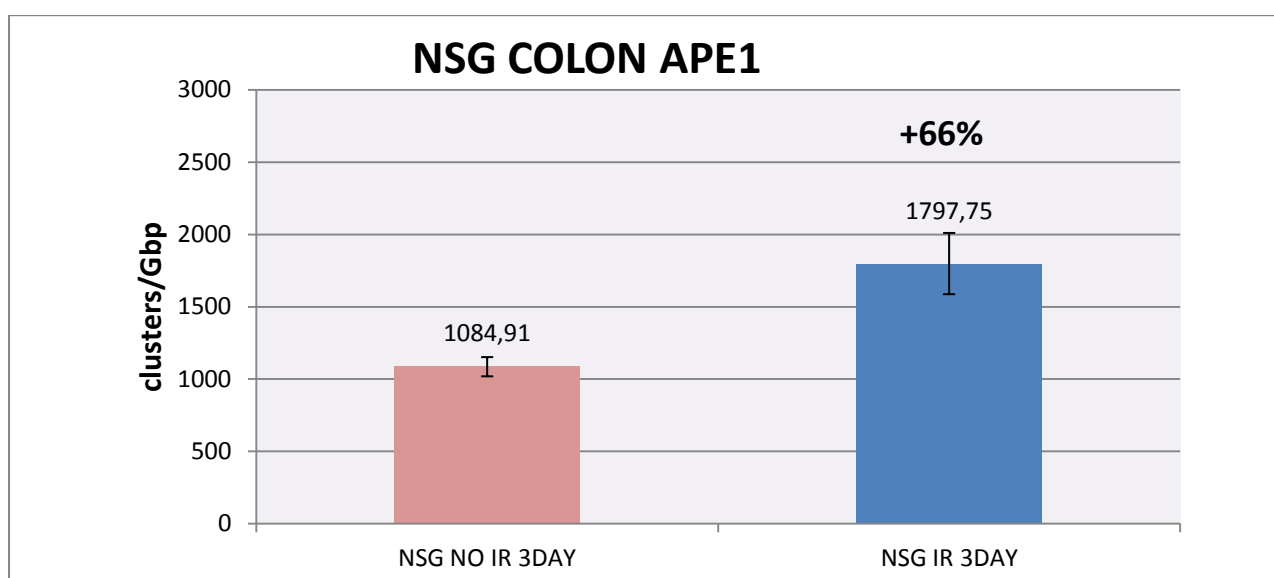
Δείγματα	Μέσος όρος (clusters/Gbp)	Τυπικό σφάλμα (clusters/Gbp)
BALB NO IR 3DAY	1968,48	179,91
BALB IR 3DAY	3420,11	771,7
BALB IR 7DAY	2929,99	386,28
BALB IR 100GY MRT 6DAY	4440,55	1899,76
NSG NO IR 3DAY	1084,91	66,4
NSG IR 3DAY	1797,75	211,71
B6 NO IR 3DAY	951,36	155,08
B6 IR 7DAY	2030,59	285,14
B6+HYB NO IR 3DAY	1540,98	39,19
B6+HYB IR 3DAY	2196,81	228,15
B6+HYB NO IR 7DAY	1097,97	119,25
B6+HYB IR 7DAY	1489,11	185,57
B6+ASF NO IR 3DAY	716,11	183,57
B6+ASF IR 3DAY	760,46	120,38
B6+ASF NO IR 7DAY	975,3	104,27
B6+ASF IR 7DAY	2388,43	181,36
CCL NO IR 3DAY	1095,56	185,79
CCL IR 1DAY	1177,55	134,13
CCL IR 3DAY	1594,24	377
CCL IR 7DAY	1411,42	206,67

Πίνακας 5.2 Πειραματικά αποτελέσματα ιστού εντέρου με APE1



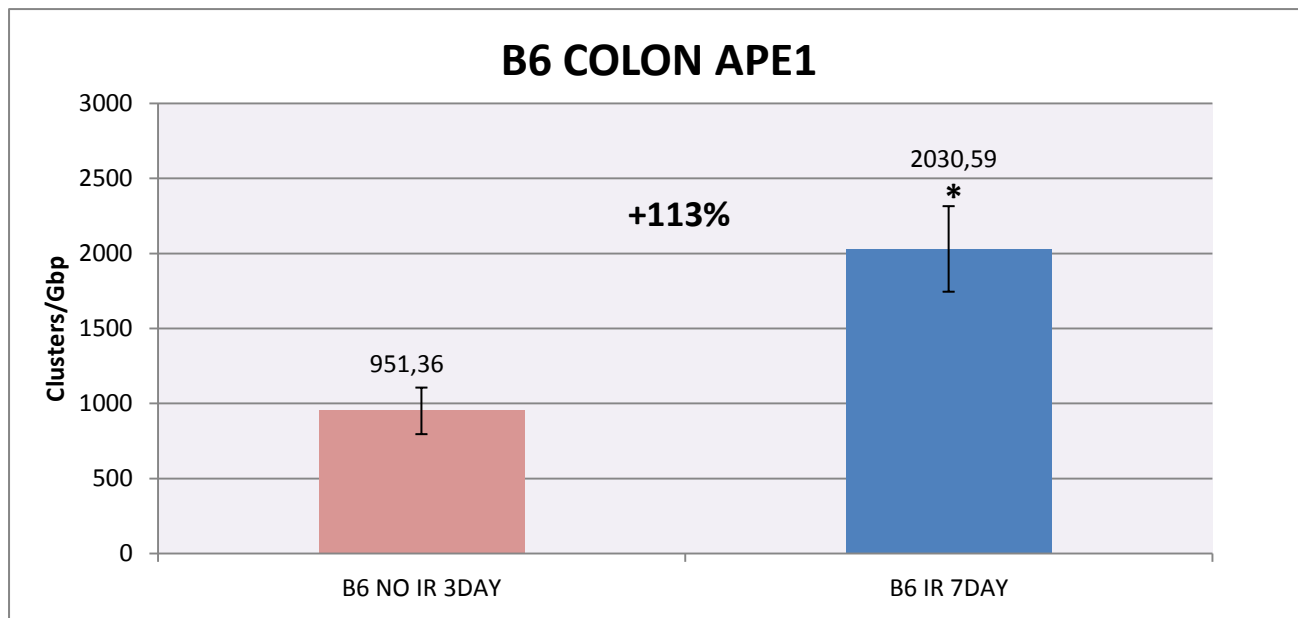
Γράφημα 5.2.7 Βλάβες DNA σε τύπο BALB/C στο έντερο με APE1

Στο Γράφημα 5.7 έχουμε επεξεργαστεί DNA από έντερο BALB/C τύπο ποντικών και παρατηρούμε ιδιαίτερα αυξημένες βλάβες την 3^η ημέρα από την ακτινοβολήση ενώ την 7^η ημέρα οι βλάβες παρουσιάζουν μια μείωση κάτι που υποδεικνύει ,όπως και στα περισσότερα γραφήματα ,την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος και των επιδιορθωτικών μηχανισμών του οργανισμού..Όσον αφορά στην τέταρτη στήλη ανήκει και αυτή στο δείγμα που ακτινοβολήθηκε με τα 100Gy και παρουσιάζει πολύ μεγάλο αριθμό βλαβών με πολύ μεγάλο τυπικό σφάλμα επίσης καθώς το υπό μελέτη DNAαυτών των δειγμάτων στα πειράματα δεν βοήθησε στην αξιολόγηση τους .



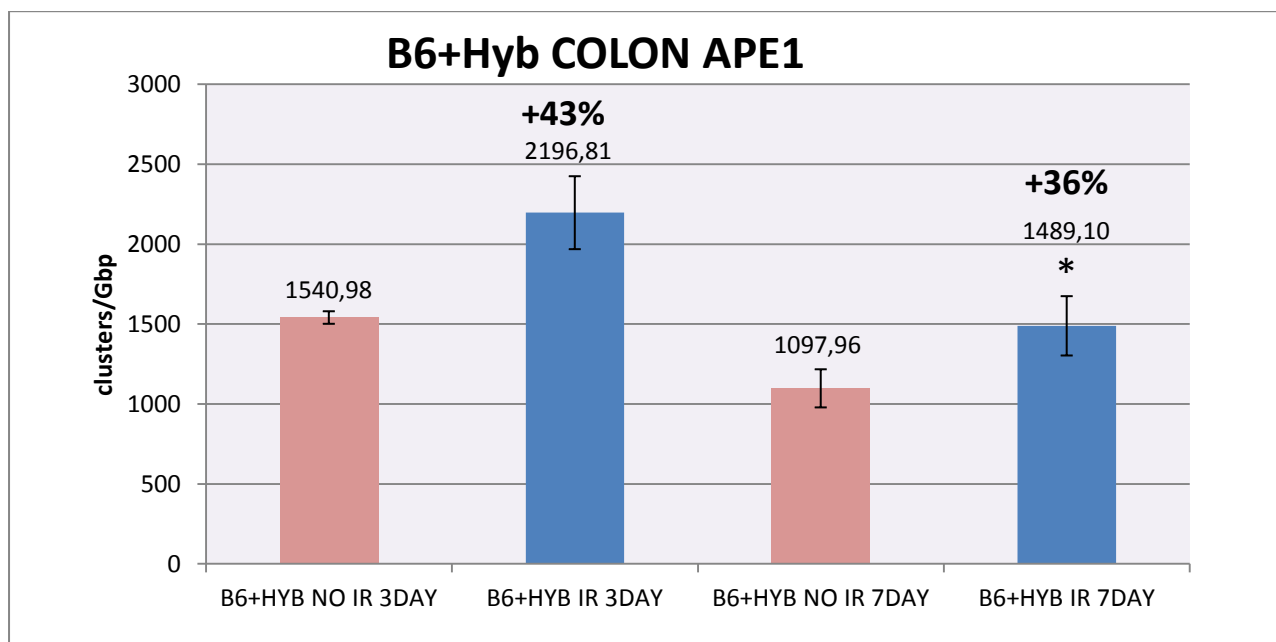
Γράφημα 5.2.8 Βλάβες DNA σε τύπο NSG στο έντερο με APE1

Στο Γράφημα 5.8 έχουμε NSG τύπο ποντικών, που ακτινοβολήθηκαν με πλήρης απουσία του ανοσοποιητικού τους συστήματος περιμέναμε σχετικά μειωμένη παρουσία βλαβών καθώς η έλλειψη ανοσοκυττάρων δεν θα επέτρεπε την μετάδοση του οξειδωτικού στρες σε απομακρυσμένες περιοχές, κάτι το οποίο επιβεβαιώνεται και πειραματικά όπως φαίνεται και στο γράφημα.



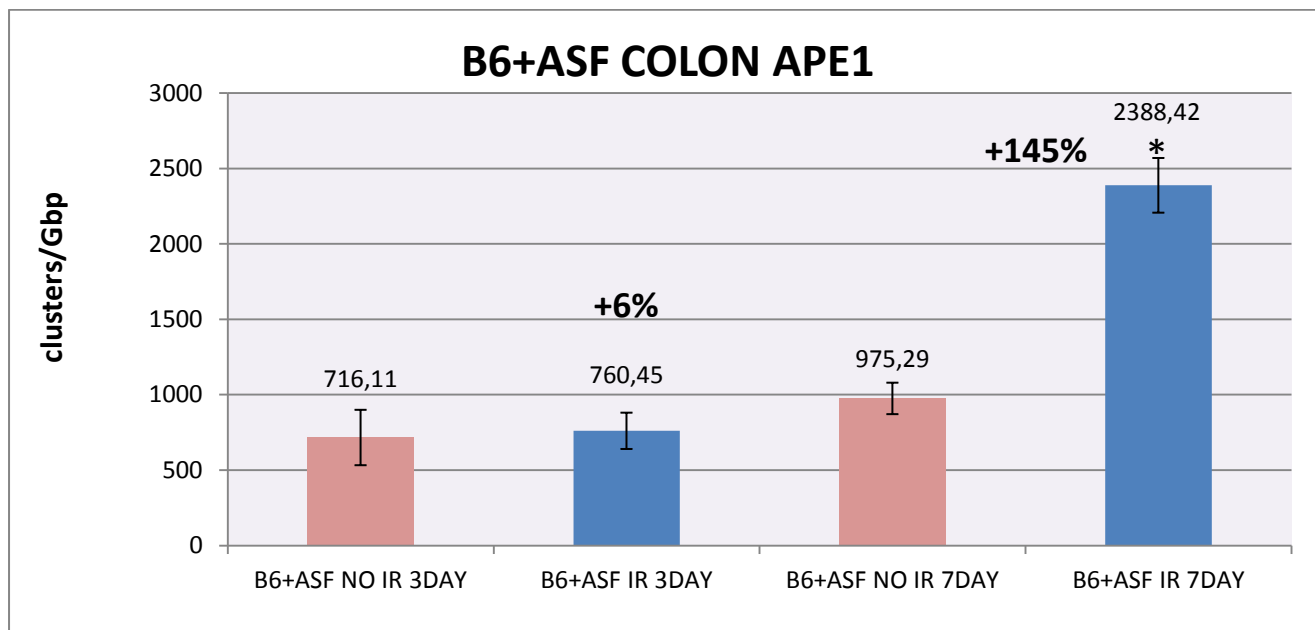
Γράφημα 5.2.9 Βλάβες DNA σε τύπο B6 στο έντερο με APE1

Στο Γράφημα 5.10 έχουμε B6 τύπο ποντικών και βλέπουμε μία μεγάλη και απότομη διαφορά στην αύξηση των βλαβών DNA την 7^η ημέρα, κάτι το οποίο καταγράφεται και στο t-test που πραγματοποιήσαμε καθώς υπολογίστηκε $P = 0,03462 (< 0.05)$.



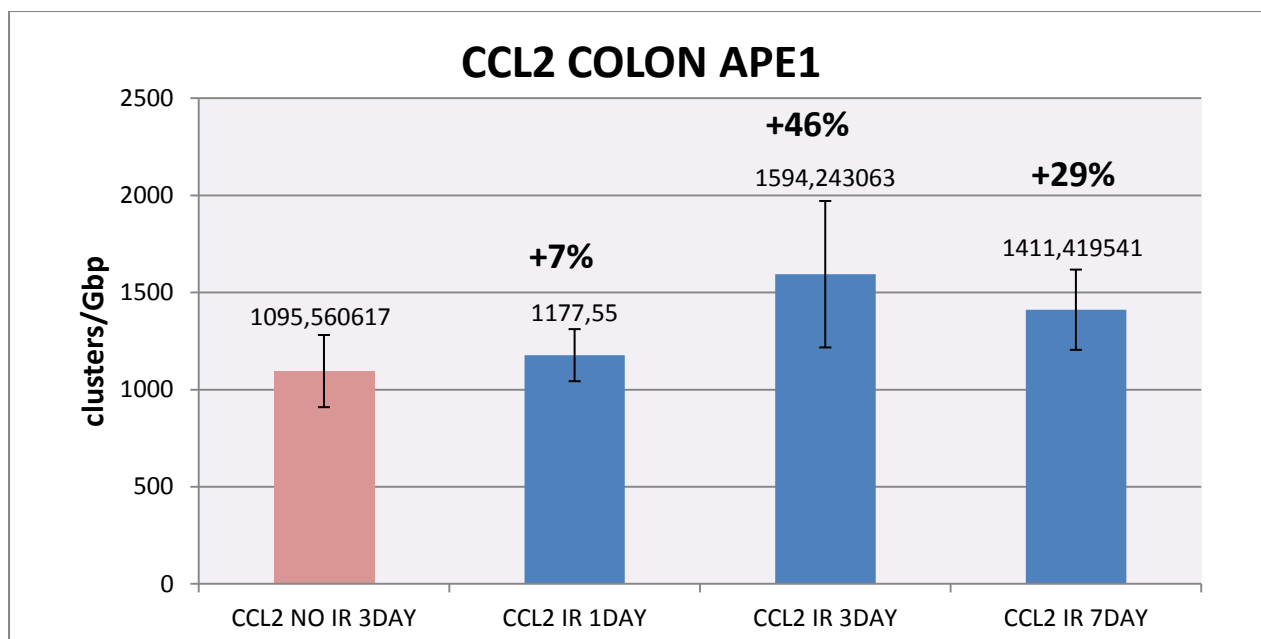
Γράφημα 5.2.10 Βλάβες DNA σε τύπο B6+Hyb στο έντερο με APE1

Στο Γράφημα 5.10 έχουμε ακτινοβόληση B6+Hyb τύπου ποντικών όπου η προσθήκη του αντισώματος Hyb **δεν** σχετίζεται με την επιδιόρθωση βλαβών και έτσι δεν αναμένουμε μεγάλες διαφορές στα πειραματικά μας αποτελέσματα κάτι το οποίο φαίνεται και στο γράφημά μας .Την 3^η ημέρα δεν σημειώνονται αρκετές βλάβες σε σχέση πάντα με τα control δείγματα μας ενώ την 7^η ημέρα μειώνονται σημαντικά με $P= 0,03965(<0.05)$ κάτι που υποδεικνύει την ενεργοποίηση των επιδιορθωτικών μηχανισμών του οργανισμού.



Γράφημα 5.2.11 Βλάβες DNA σε τύπο B6+ASF στο έντερο με APE1

Στο Γράφημα 5.11 έχουμε B6+ASF τύπο ποντικών που σημαίνει πως το αντίσωμα ASF που προστέθηκε δυσχεραίνει την μετάδοση των όποιων βλαβών δημιουργήθηκαν στην περιοχή ακτινοβόλησης .Έτσι αναμένουμε χαμηλό αριθμό βλαβών κάτι το οποίο επιβεβαιώνεται πειραματικά την 3^η ημέρα εμφανίζοντας αρκετά χαμηλό αριθμό βλαβών σε αντίθεση με την 7^η ημέρα όπου οι βλάβες είναι ιδιαίτερα αυξημένες και με στατιστικώς σημαντική διαφορά από το control δείγμα μας με $P \ll 0.05$.



Γράφημα 5.2.12 Βλάβες DNA σε τύπο CCL2 στο έντερο με APE1

Στο Γράφημα 5.12 όπου παρουσιάζονται τα δείγματα CCL2, δηλαδή τα δείγμα με την εξάλειψη της κυτοκίνης δεν αναμέναμε μεγάλο αριθμό βλαβών λόγω της μπλοκαρισμένης σηματοδότησης του ανοσοποιητικού κάτι το οποίο παρατηρούμε και στα πειραματικά μας αποτελέσματα καθώς την 1^η ημέρα οι βλάβες κυμαίνονται κοντά στο επίπεδο των μη ακτινοβολημένων κυττάρων, την 3^η ημέρα έχουμε μία μικρή αύξηση της τάξης των 400 clusters/Gbp ενώ την 7^η ημέρα έχουμε μία μικρή μείωση. Τα παραπάνω αποτελέσματα του παραπάνω γραφήματος κινούνται πολύ κοντά στις τιμές των δειγμάτων που χρησιμοποιήσαμε ως control κάτι που επιβεβαιώνει τις αρχικές μας υποθέσεις.

5.3 Απόκριση των ιστών με την χρήση του OGG1

Τα δείγματα DNA και των δύο ιστών που μελετήσαμε αρχικά με την ενδονουκλεάση APE1 στην συνέχεια τα μελετήσαμε με την γλυκοσυλάση DNA OGG1 ανιχνεύοντας αυτήν την φορά οξειδωμένες πουρίνες. Τα αποτελέσματα μας φαίνονται συγκεντρωτικά στον πίνακα που ακολουθεί καθώς και τα διαγράμματα αν είδος ποντικίου.

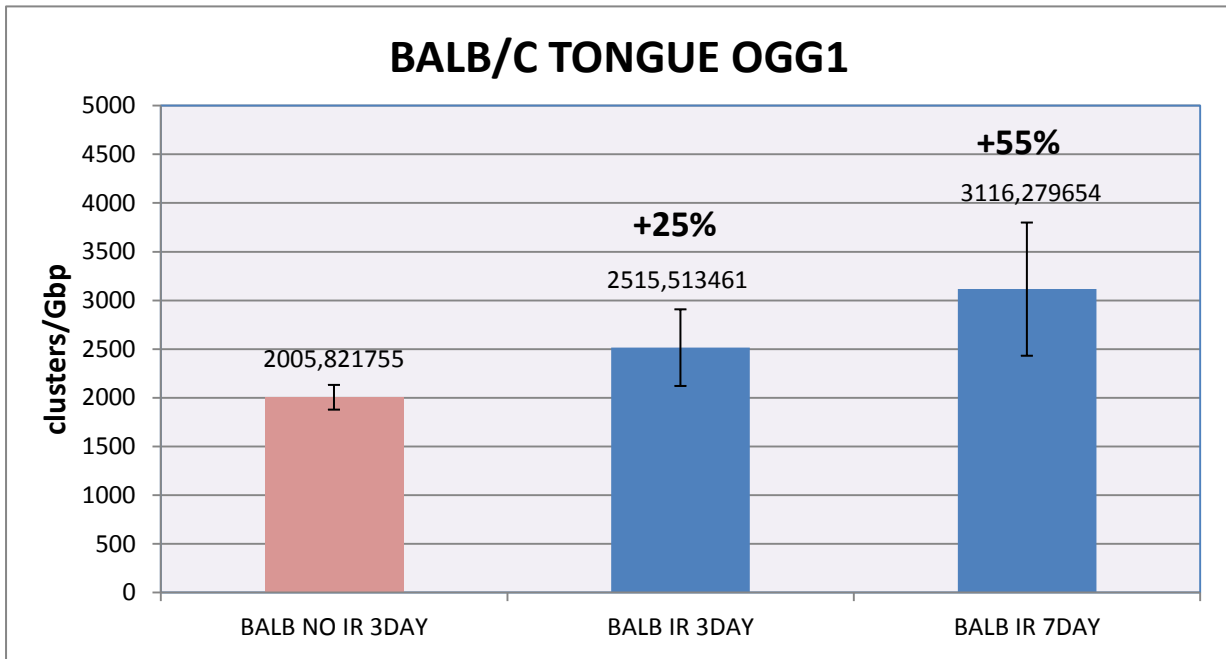
Απόκριση ιστού γλώσσας με OGG1

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται αναλυτικά τα αποτελέσματα των πειραμάτων που διενεργήθηκαν με την χρήση του ενζύμου OGG1 στον ιστό της γλώσσας όπως και στα διαγράμματα που ακολουθούν.

Tongue OGG1

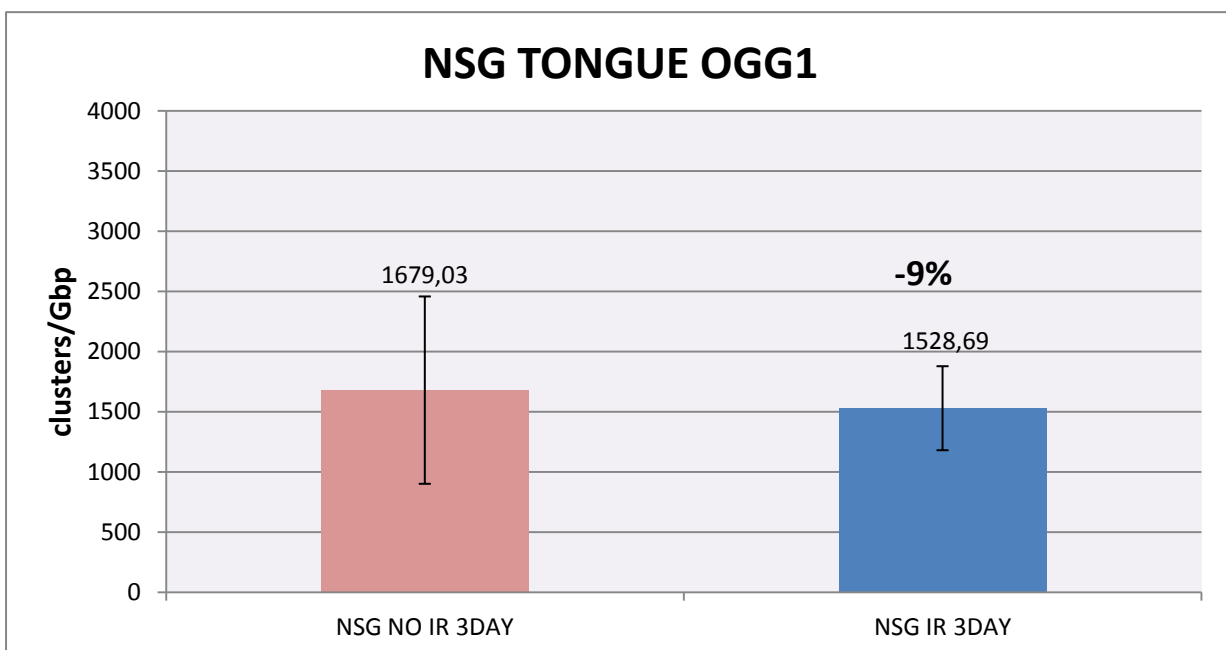
Δείγματα	Μέσος όρος (clusters/Gbp)	Τυπικό σφάλμα (clusters/Gbp)
BALB NO IR 3DAY	2005,82	127,04
BALB IR 3DAY	2515,51	393,55
BALB IR 7DAY	3116,28	683,93
NSG NO IR 3DAY	1679,03	778,54
NSG IR 3DAY	1528,70	349,16
B6 NO IR 3DAY	982,70	207,89
B6 IR 3DAY	1360,83	194,12
B6 IR 7DAY	2307,42	304,34
B6+HYB NO IR 3DAY	2802,98	124,17
B6+HYB IR 3DAY	4890,70	520,07
B6+HYB NO IR 7DAY	1164,23	78,43
B6+HYB IR 7DAY	3063,36	463,64
B6+ASF NO IR 3DAY	1498,66	88,50
B6+ASF IR 3DAY	1593,24	176,22
B6+ASF NO IR 7DAY	1204,17	154,14
B6+ASF IR 7DAY	3098,96	412,02
CCL NO IR 3DAY	1110,02	119,85
CCL IR 1DAY	1277,70	219,85
CCL IR 3DAY	1062,53	78,24
CCL IR 7DAY	2177,59	160,86

Πίνακας 5.3 Πειραματικά αποτελέσματα ιστού γλώσσας με OGG1



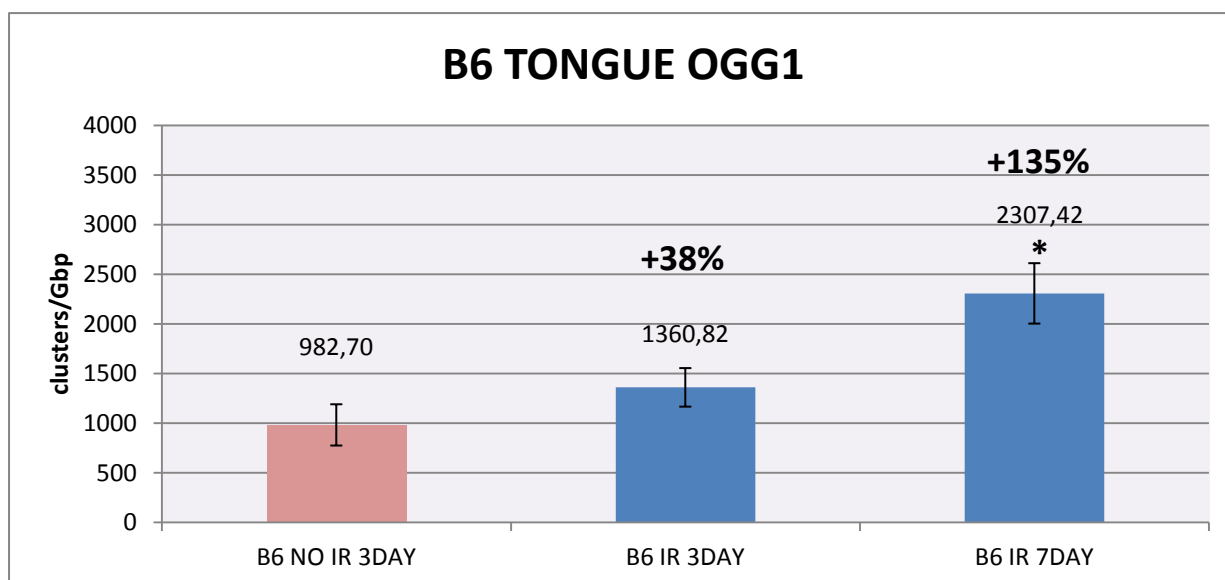
Γράφημα 5.3.1 Βλάβες DNA σε τύπο BALB στην γλώσσα με OGG1

Στο Γράφημα 5.3.1 έχουμε την σειρά BALB τύπου ποντικών όπου παρατηρούμε την αναμενόμενη αύξηση των βλαβών την 3^η ημέρα μετά την ακτινοβόληση και την 7^η ημέρα έχουμε μια ακόμη μεγαλύτερη αύξηση κάτι το οποίο ίσως εξηγείται από μια ενδεχόμενη ανεπάρκεια του ανοσοποιητικού συστήματος ή και από το μεγάλο τυπικό σφάλμα που παρουσιάζει αυτή η μέτρηση.



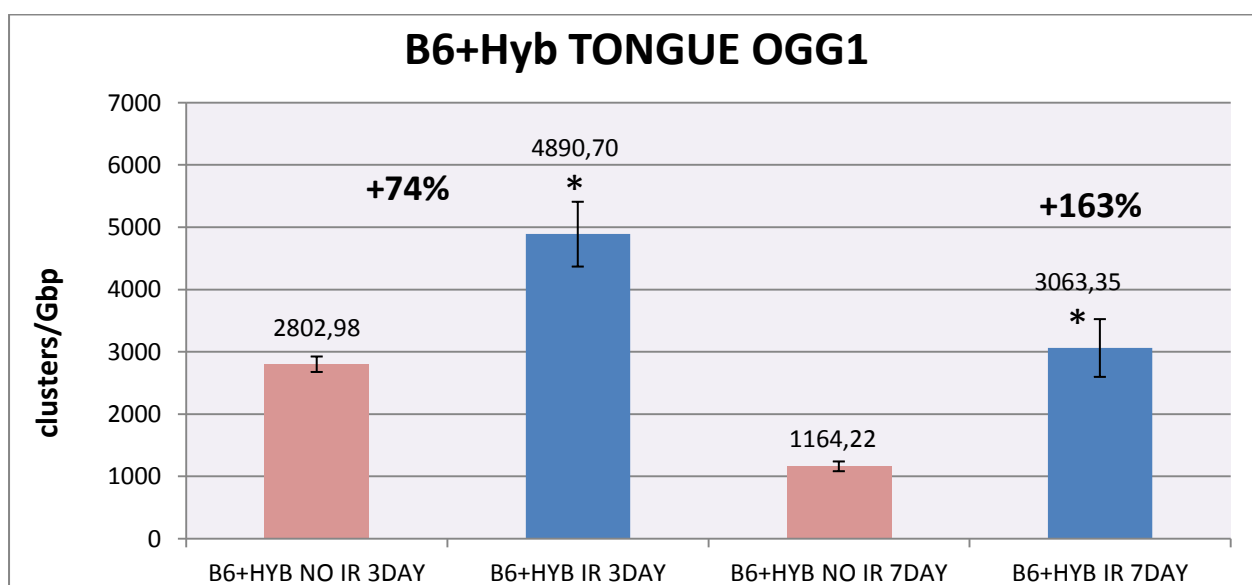
Γράφημα 5.3.2 Βλάβες DNA σε τύπο NSG στην γλώσσα με OGG1

Στο γράφημα 5.3.2 με τύπο ποντικών NSG δηλαδή χωρίς ανοσοποιητικό σύστημα παρατηρούμε το εξής παράδοξο ,τα μη ακτινοβολημένα δείγματα παρουσιάζουν μεγαλύτερο αριθμό βλαβών από τα ακτινοβολημένα μας δείγματα .Στα δείγματα NSG αναμέναμε αυξημένες βλάβες καθώς η έλλειψη ανοσοποιητικού συστήματος δεν θα επέτρεπε στον οργανισμό να επιδιορθώσει βλάβες ,κάτι το οποίο δεν προέκυψε πειραματικά ,ίσως και λόγω του μεγάλου τυπικού σφάλματος που παρουσιάζουν τα control δείγματα.



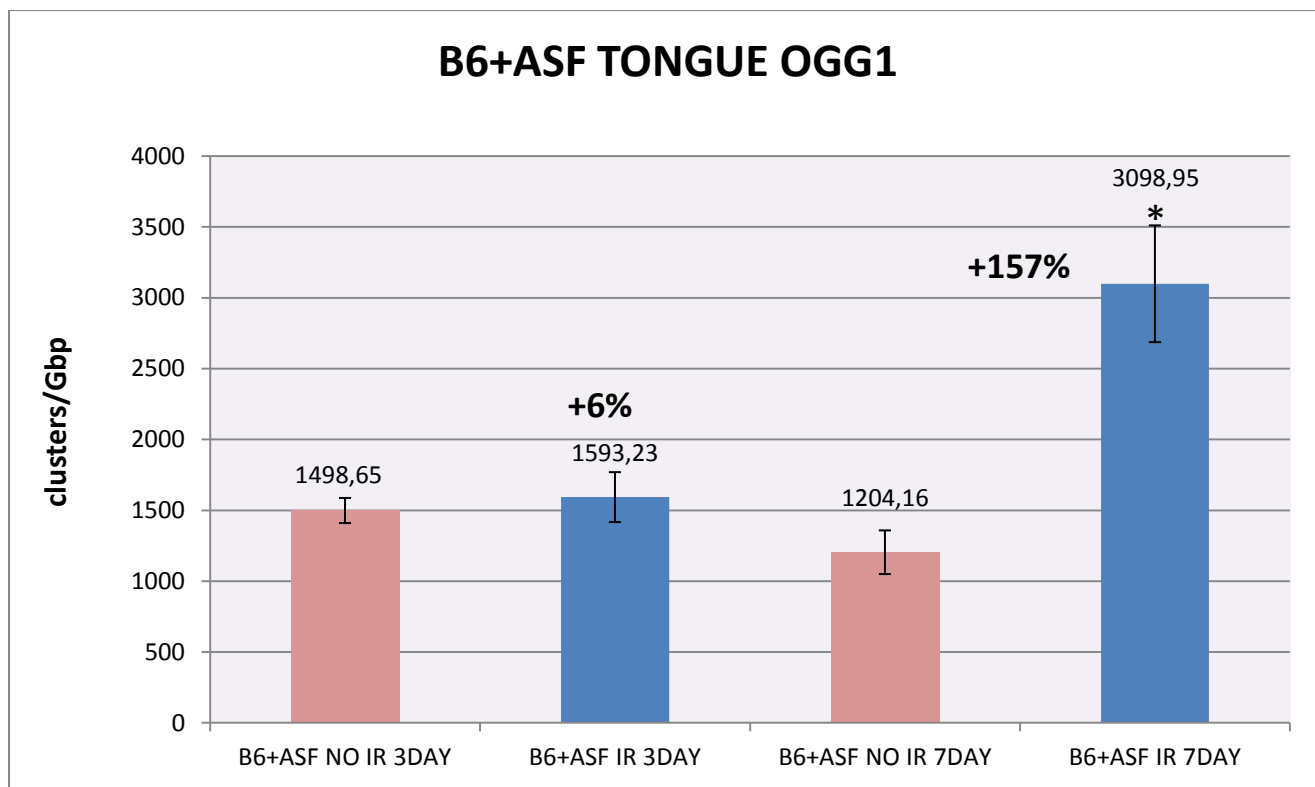
Γράφημα 5.3.3 Βλάβες DNA σε τύπο B6 στην γλώσσα με OGG1

Στο γράφημα 5.3.3 έχουμε B6 τύπο ποντικών και παρατηρούμε την αναμενόμενη αύξηση των βλαβών την 3^η ημέρα μετά την ακτινοβολήση και μια ακόμη μεγαλύτερη αύξηση την 7^η ημέρα με αρκετά μεγάλο αριθμό βλαβών, κάτι το οποίο αποτυπώνεται και στο t-test που διενεργήθηκε καθώς την 7^η ημέρα είχαμε $P= 0,0229 (<0.05)$.



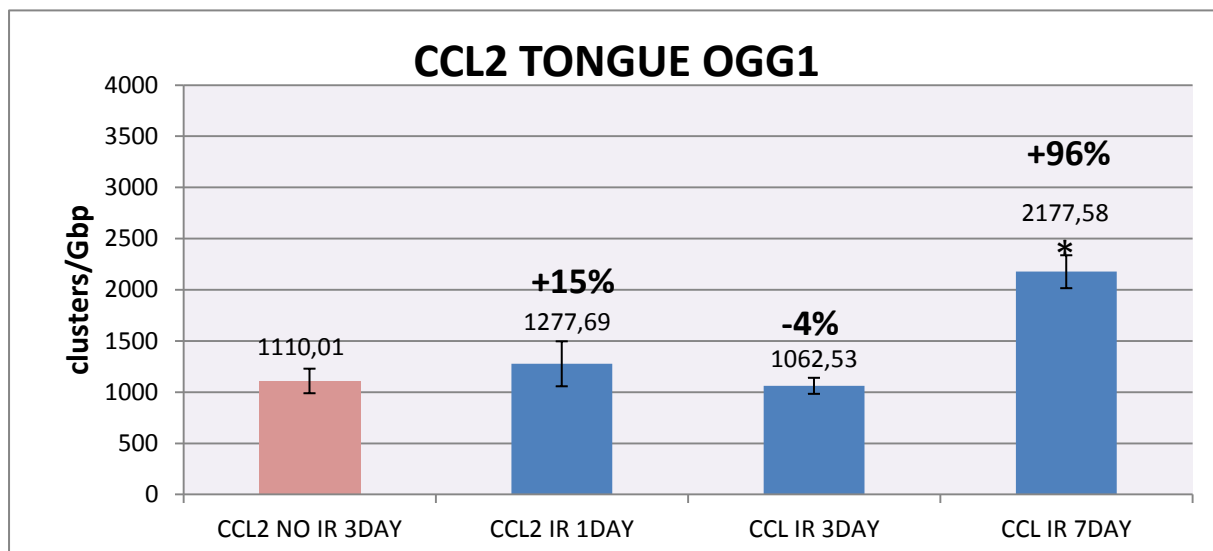
Γράφημα 5.3.4 Βλάβες DNA σε τύπο B6+Hyb στην γλώσσα με OGG1

Στο γράφημα 5.3.4 έχουμε B6+Hyb, δηλαδή την προσθήκη μη-σχετικού αντισώματος σε τύπο ποντικών B6 και παρατηρούμε μια ραγδαία αύξηση των βλαβών που εμφανίζει και στατιστικά σημαντική διαφορά με $P=0,00794 (<0.05)$ την 3^η ημέρα και μια εξίσου αύξηση των βλαβών την 7^η ημέρα που όμως και πάλι εμφανίζει στατιστικώς σημαντική διαφορά με $P=0,00374$.



Γράφημα 5.3.5 Βλάβες DNA σε τύπο B6+ASF στην γλώσσα με OGG1

Στο Γράφημα 5.3.5 έχουμε τύπο B6+ASF, δηλαδή προσθήκη στου αντισώματος ASF και έτσι λόγω ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού θα περιμέναμε χαμηλό αριθμό βλαβών κάτι το οποίο επιβεβαιώνεται μόνο την 3^η ημέρα με μια σχετικά μικρή αύξηση της τάξης των 100 clusters /Gbp. Την 7^η ημέρα έχουμε μια ραγδαία αύξηση των βλαβών κατά 1500 clusters /Gbp κάτι το οποίο αποτυπώνεται και στο t-test με $P=0,00217 (<0.005)$.



Γράφημα 5.3.6 Βλάβες DNA σε τύπο CCL2 στην γλώσσα με OGG1

Στο γράφημα 5.3.6 έχουμε B6 τύπο ποντικών με μπλοκαρισμένο το σύστημα παραγωγής κυτοκίνης. Την 1^η ημέρα μετά την ακτινοβολία παρατηρούμε μια μικρή αύξηση στις βλάβες ενώ την 3^η ημέρα μια μικρή πολύ μικρή μείωση που βρίσκεται όμως μέσα στα όρια στατιστικού λάθους. Τέλος την 7^η ημέρα έχουμε μία αύξηση των βλαβών και μάλιστα με μια στατιστικώς σημαντική διαφορά αφού στην 7^η ημέρα είχαμε $P=0,00145$.

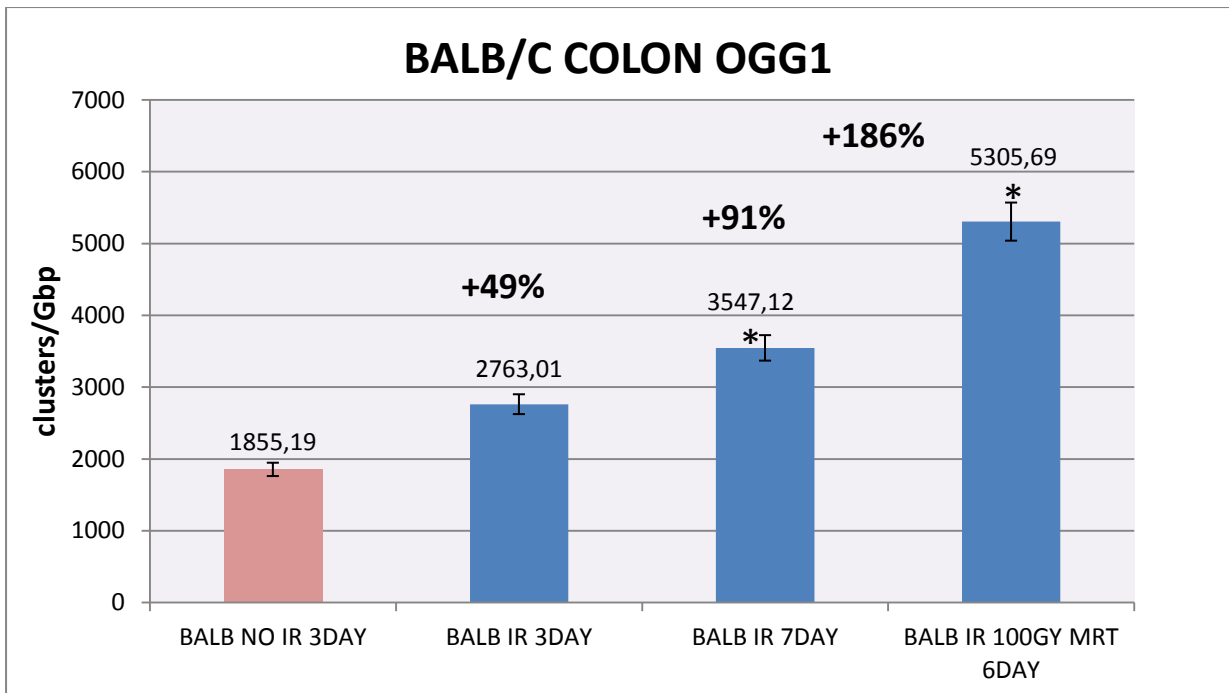
Απόκριση ιστού του παχέος εντέρου

Στον πίνακα που ακολουθεί έχουμε τα πειραματικά μας δεδομένα από τον ιστό του παχέος εντέρου με την χρήση του OGG1 ,και ακολουθούν τα αναλυτικά διαγράμματα των μετρήσεων αυτών.

Colon

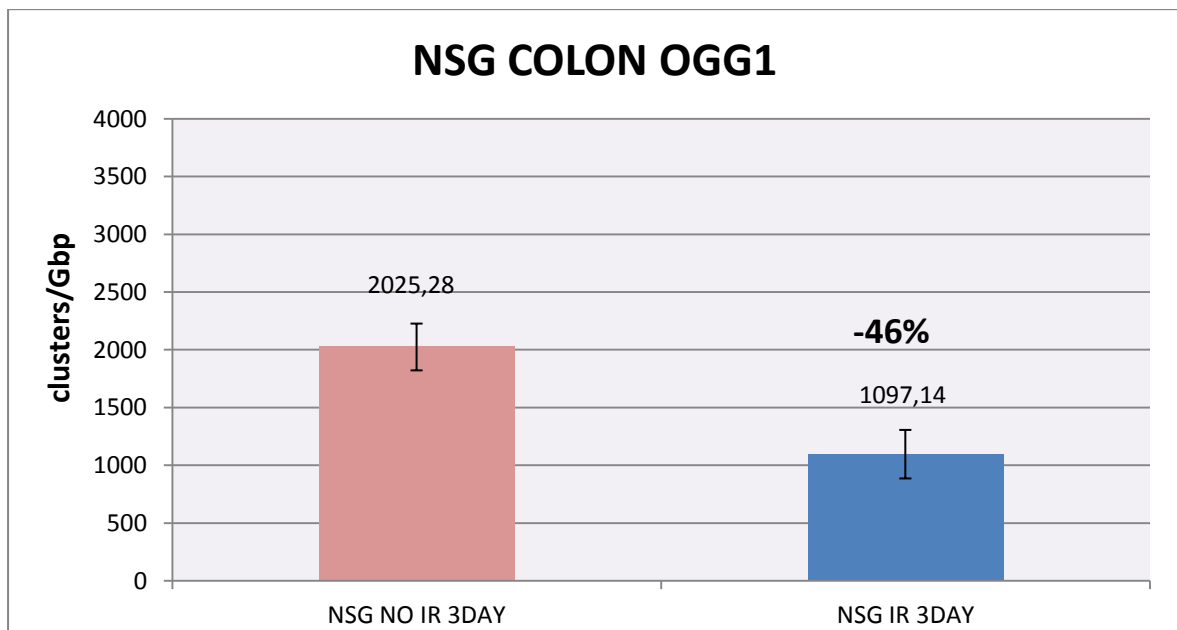
Δείγματα	Μέσος όρος (clusters/Gbp)	Τυπικό Σφάλμα (clusters/Gbp)
BALB NO IR 3DAY	1855,19	182,62
BALB IR 3DAY	2763,01	276,30
BALB IR 7DAY	3547,13	276,62
BALB IR 100GY MRT 6DAY	5305,69	1100,76
NSG NO IR 3DAY	2025,29	202,50
NSG IR 3DAY	1097,15	210,12
B6 NO IR 3DAY	731,02	57,47
B6 IR 7DAY	3283,86	142,66
B6+HYB NO IR 3DAY	2765,26	602,62
B6+HYB IR 3DAY	3000,31	171,00
B6+HYB NO IR 7DAY	1366,86	210,17
B6+HYB IR 7DAY	1698,62	181,33
B6+ASF NO IR 3DAY	1642,49	138,83
B6+ASF IR 3DAY	2004,36	307,56
B6+ASF NO IR 7DAY	1596,67	336,64
B6+ASF IR 7DAY	2625,05	308,57
CCL NO IR 3DAY	2471,61	273,81
CCL IR 1DAY	2523,09	450,61
CCL IR 3DAY	1821,92	522,20
CCL IR 7DAY	2149,5	789,00

Πίνακας 5.4 Πειραματικά αποτελέσματα ιστού εντέρου με OGG1



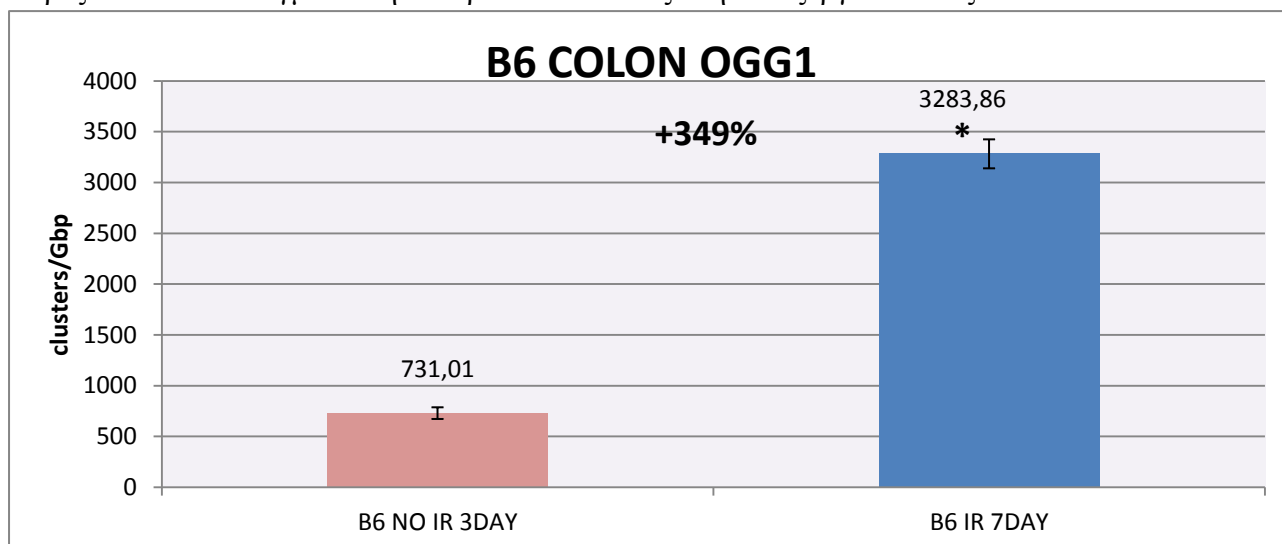
Γράφημα 5.3.7 Βλάβες DNA σε τύπο BALB/C στο έντερο με OGG1

Στο Γράφημα 5.3.7 έχουμε BALB/C τύπο ποντικών και παρατηρούμε την αναμενόμενη αύξηση των βλαβών την 3^η ημέρα μετά την ακτινοβολήση και την 7^η ημέρα παρατηρούμε μια περαιτέρω αύξηση με σημαντική διαφορά από το control δείγματά μας αφού και από το t-test έχουμε $P=0,00112$ (<0.05). Τέλος στην τέταρτη στήλη έχουμε τα δείγματα που ακτινοβολήθηκαν με τα 100Gy και έτσι δικαιολογείται ο αρκετά μεγάλος αριθμός βλαβών που σημειώνεται και που αποτυπώνεται και στο t-test με $P=0,0033$.



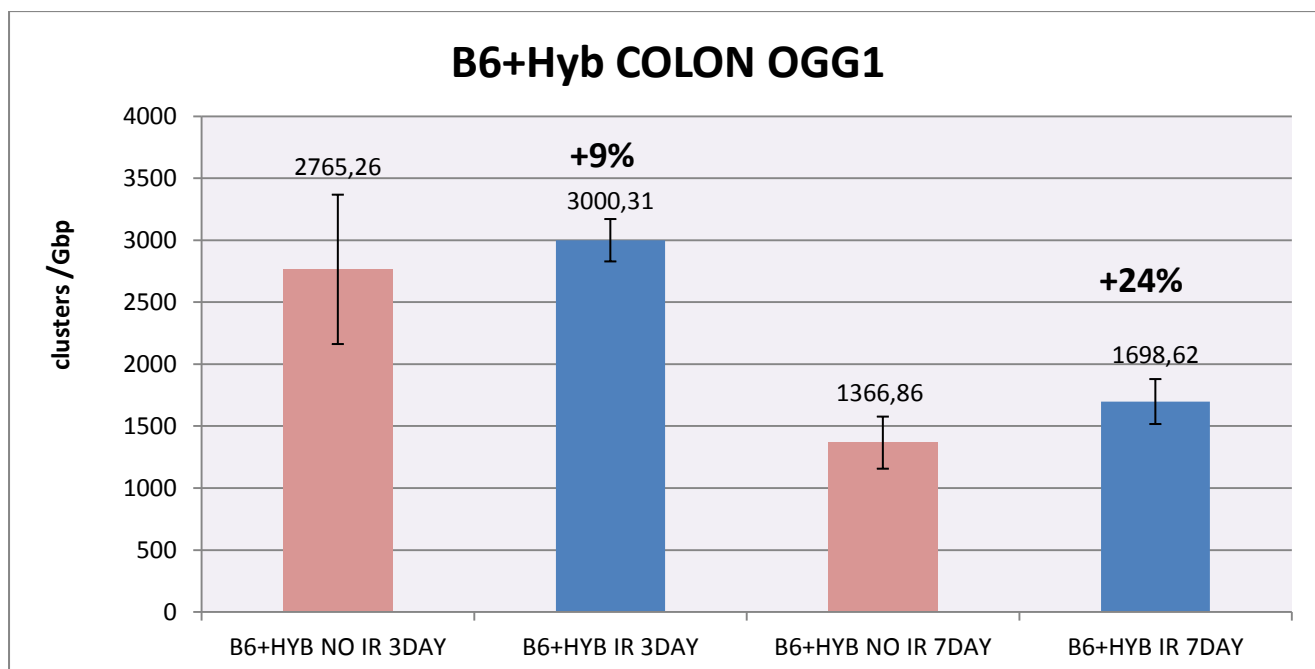
Γράφημα 5.3.8 Βλάβες DNA σε τύπο NSG στο έντερο με OGG1

Στο Γράφημα 5.3.8 έχουμε NSG τύπο ποντικών και ενώ θα περιμέναμε αρκετά αυξημένες βλάβες να σημειωθούν σε αυτά τα δείγματα, δεδομένου ότι υπάρχει πλήρης έλλειψη του ανοσοποιητικού συστήματος, παρατηρούμε ακριβώς το αντίστροφο. Τα ακτινοβολημένα κύτταρα παρουσιάζουν λιγότερες βλάβες από τα μη ακτινοβολημένα κύτταρα, κάτι το οποίο παρουσιάστηκε και στα αντίστοιχα δείγματα της γλώσσας σε NSG με προσθήκη OGG1. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι οι σειρές αυτών των δειγμάτων ήταν αρκετά δύσκολες στην επεξεργασία τους.



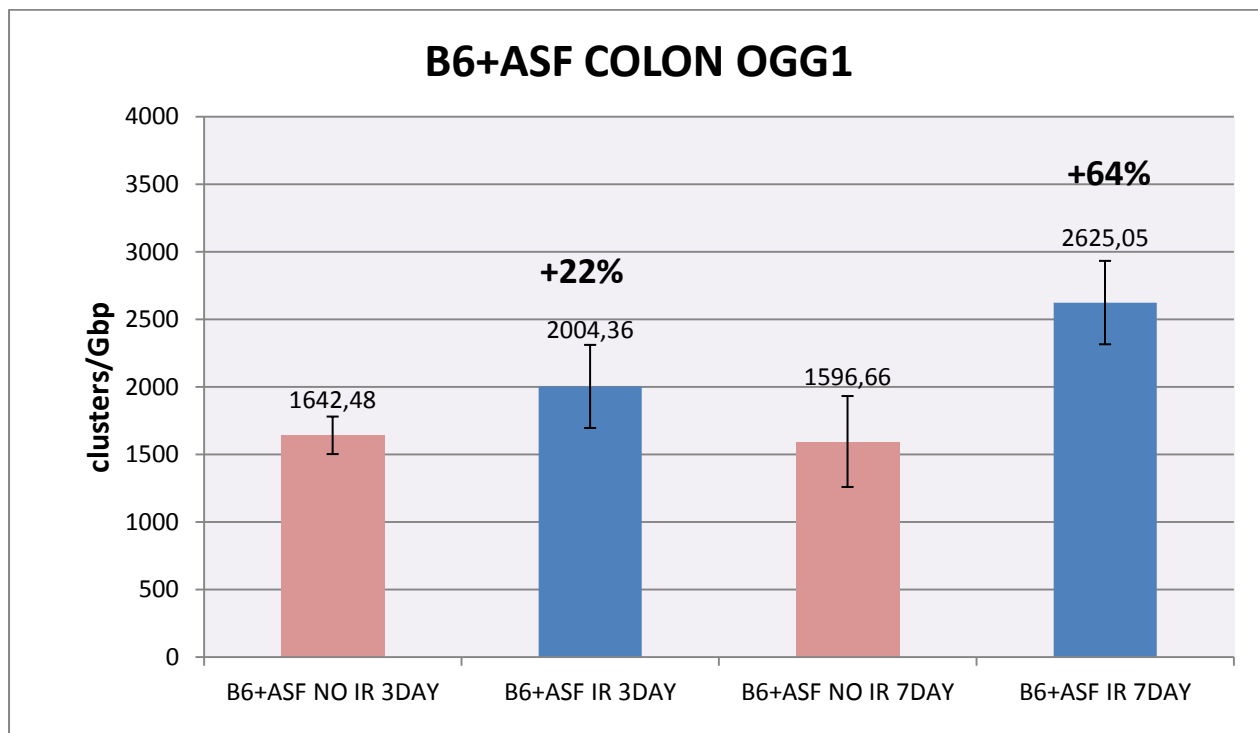
Γράφημα 5.3.9 Βλάβες DNA σε τύπο B6 στο έντερο με OGG1

Στο γράφημα 5.3.9 έχουμε B6 τύπο ποντικών και παρατηρούμε αρχικά μία αρκετά μεγάλη αύξηση των βλαβών την 7^η ημέρα με το αποτέλεσμα του t-test $P < 0.05$ να επιβεβαιώνει αυτήν την παρατήρηση.



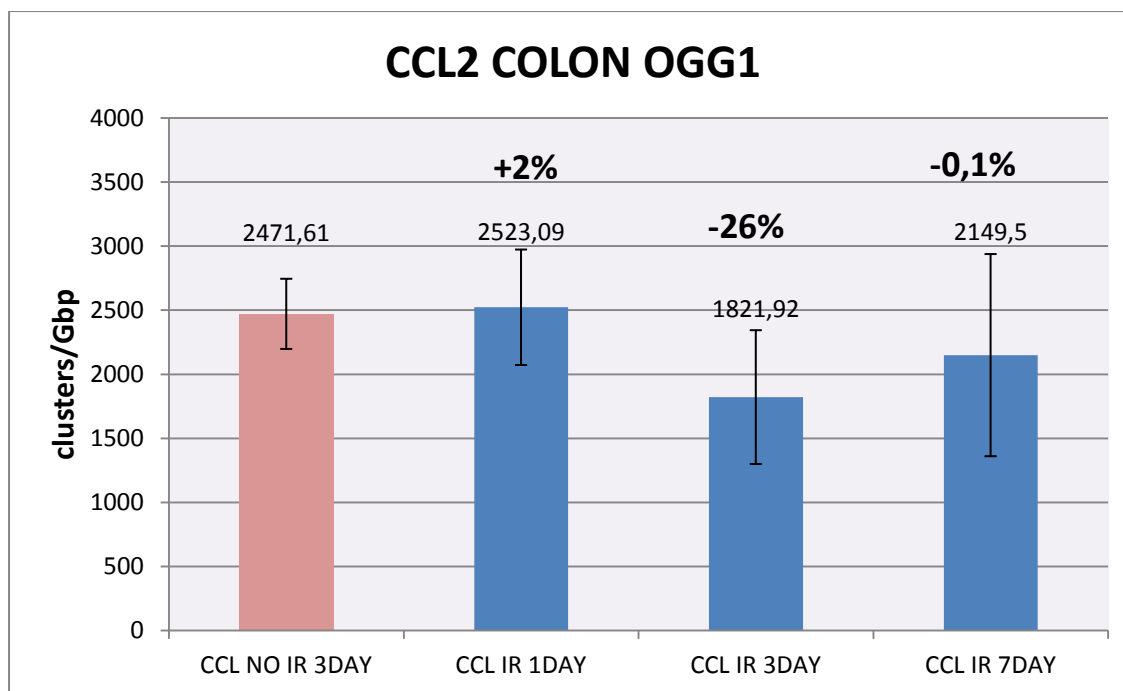
Γράφημα 5.3.10 Βλάβες DNA σε τύπο B6+Hyb στο έντερο με OGG1

Στο γράφημα 5.3.10 έχουμε B6 τύπο ποντικών με την προσθήκη αντισώματος που δεν σχετίζεται με την επιδιόρθωση των βλαβών και παρατηρούμε την 3^η ημέρα έναν αρκετά μεγάλο αριθμό βλαβών όμως με μια σχετικά μικρή αύξηση βλαβών συγκριτικά με τα control δείγματα μας καθώς και μια αρκετά μεγάλη μείωση των βλαβών την 7^η ημέρα συγκριτικά με την 3^η ημέρα όμως μικρή αύξηση σε σχέση με το control δείγμα. Συνεπώς και οι δυο μετρήσεις παρουσιάζουν μικρό αριθμό αύξησης βλαβών σε σχέση με τα μη ακτινοβολημένα δείγματα κάτι το οποίο αναμενόταν.



Γράφημα 5.3.11 Βλάβες DNA σε τύπο B6+ASF στο έντερο με OGG1

Στο γράφημα 5.3.11 έχουμε και πάλι B6 τύπο ποντικών με την προσθήκη αντισωμάτων ASF και βλέπουμε πως έχουμε μια μικρή σχετικά αύξηση των βλαβών την 3^η ημέρα σε σχέση με τα control δείγματα και μία μεγάλη αύξηση των βλαβών την 7^η ημέρα τόσο σε σχέση με τα control δείγματα όσο και με τα δείγματα της 3^{ης} ημέρας.



Γράφημα 5.3.12 Βλάβες DNA σε τύπο CCL2 στο έντερο με OGG1

Τέλος ,στο γράφημα 5.3.12 έχουμε και πάλι Β6 τύπο ποντικών με προσθήκη παράγοντα που μπλοκάρει την παραγωγή κυτοκίνης, και παρατηρούμε μια μικρή αύξηση των βλαβών την 1^η ημέρα την μειωσή τους την 3^η και μία αύξηση την 7^η ημέρα όπου και οι τιμές μας κατά την επεξεργασία των δειγμάτων ήταν αρκετά δύσκολες στην καταμέτρηση των βλαβών .

5.4 Συμπεράσματα

Το κυτταρικό στρες που δημιουργείται σε μια περιοχή εξαιτίας της ιοντίζουσας ακτινοβολίας επηρεάζει όχι μόνο τους ιστούς που εκτέθηκαν άμεσα σε αυτή αλλά και αρκετά απομακρυσμένους ιστούς από την περιοχή ακτινοβόλησης ,όπως φαίνεται και στην συγκεκριμένη εργασία . Η ιοντίζουσα ακτινοβολία προκαλεί μια αλληλουχία γεγονότων όπως είναι το κυτταρικό στρες , οι οξειδωτικές βλάβες , η δημιουργία ελευθέρων ριζών, οι μεμονωμένες ή οι σύνθετες βλάβες DNA, η απόπτωση και η μόνιμη ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος του οργανισμού . Οι σημαντικές επιπτώσεις της ιοντίζουσας ακτινοβολίας σε απομακρυσμένες περιοχές είναι κάτι που μελετάται τις τελευταίες δεκαετίες και ήταν και ο λόγος για την έναρξη αυτής της εργασίας, εξετάζοντας ιστούς ποντικών μακριά από το σημείο ακτινοβόλησής τους και καταμετρώντας τις βλάβες που προέκυψαν και την εξέλιξη τους με την πάροδο του χρόνου . Αξίζει βέβαια να σημειωθεί πως οι ομαδοποιημένες βλάβες που δημιουργούνται κάποιες ημέρες μετά δεν γίνεται να είναι ίδια με εκείνα της άμεσης απόκρισης του οργανισμού .

Γενικά, η επιδιόρθωση μίας ομαδοποιημένης βλάβης πραγματοποιείται σε διάστημα κάποιων ωρών και η επαγωγή και αναδημιουργία των οξειδωτικών βλαβών DNA που παρατηρείται σε απομακρυσμένους ιστούς υποδεικνύει την εκτεταμένη τους ανάπτυξη. Τα ακτινοβολημένα κύτταρα λόγω των βλαβών DNA (μέσω απόκριση του DDR) και του έντονου οξειδωτικού στρες επάγουν την έκλυση κυτοκίνων οι οποίες μπορούν να πυροδοτήσουν αποπτωτικά μονοπάτια ενεργοποιώντας κύτταρα του ανοσοποιητικού όπως τα μακροφάγα τα οποία με τη σειρά τους εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες και ROS/RNS που μπορούν προκαλέσουν βλάβες στα κύτταρα της περιοχής και να διαμεσολαβήσουν στην απόκριση ιστών μακριά από το σημείο της αρχικής κυτταρικής βλάβης.

Θα αξιολογήσουμε τα αποτελέσματα μας σύμφωνα με το εκάστοτε ένζυμο που προσθέσαμε στα δείγματα DNA για να είναι συγκρίσιμα τα μεγέθη. Ξεκινώντας με την ανάλυση των δειγμάτων με την ενδονουκλεάση APE1 παρατηρούμε ότι οι βλάβες μας κυμαίνονται από τα 1026 -3196 clusters / Gbp στην γλώσσα και στα 760- 4440 clusters /Gbp στο έντερο, με μέση τιμή βλαβών στα control δείγματα μας στα 1218 clusters /Gbp στην γλώσσα και 1178 clusters /Gbp αντίστοιχα στο έντερο, εξαιρώντας τις τιμές των δειγμάτων με τα 100Gy που είναι πολύ πιο υψηλές από τις μέγιστες των τιμών που προαναφέρθηκαν και με αρκετά μεγάλο τυπικό σφάλμα .

Στα ποντίκια τύπου BALB/C παρατηρείται μια αύξηση των βλαβών την 3^η ημέρα ,μικρότερη στην γλώσσα(+55%) υψηλότερη στο έντερο(+74%) ,και σημειώνεται μια μικρή μείωση την 7^η ημέρα και για τον ιστό της γλώσσας(+43%) και για τον ιστό του εντέρου(+49%) κάτι το οποίο μπορεί να εξηγείται με την πιθανή ενεργοποίηση με την πάροδο των ημερών των επιδιορθωτικών μηχανισμών του οργανισμού(Γράφημα 5.2.1, 5.2.7) .Στα ποντίκια τύπου NSG έχουμε μετρήσεις μόνο από την 3^η ημέρα και δεν σημειώθηκαν υψηλές βλάβες αριθμητικά ,καθώς στον ιστό της γλώσσας είχαμε 1510 clusters/Gbp (+45%) και στον ιστό εντέρου 1797 clusters/Gbp (+66%)κάτι το οποίο ήταν και αναμενόμενο καθώς τα ποντίκια τύπου NSG είχαν πλήρως απενεργοποιημένο το ανοσοποιητικό τους σύστημα(Γράφημα 5.2.2, 5.2.8) .Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού λειτουργούν και ως διαμεσολαβητές των επαγόμενων βλαβών καθώς δημιουργούν οξειδωτικές βλάβες DNA με αποτέλεσμα να επάγεται μια σειρά από ΜΣΕ. Η πλήρης απουσία του ανοσοποιητικού συστήματος μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι δεν θα έπρεπε να αναμένουμε σχετικά υψηλά επίπεδα βλαβών κάτι το οποίο επιβεβαιώθηκε και πειραματικά .

Στα ποντίκια τύπου B6 παρατηρούμε μια μικρή αύξηση των βλαβών την 3^η ημέρα στα δείγματα γλώσσας (+41%) κάτι το οποίο δεν μπορούμε να το συγκρίνουμε χρονικά με τους ιστούς του εντέρου την 3^η ημέρα, καθώς τα αποτελέσματα που είχαμε ήταν πολύ δύσκολο να δώσουν κάποιο αξιόπιστο συμπέρασμα .Την 7^η ημέρα, οι βλάβες μειώνονται στον ιστό της γλώσσας ,στα ίδια επίπεδα με τα control δείγματα, ενώ παρατηρούμε μια αρκετά μεγάλη αύξηση των βλαβών στο έντερο 2030 clusters/Gbp(+113%) σχεδόν τις διπλάσιες βλάβες DNA σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα της γλώσσας που βρέθηκαν στα 1026 clusters/Gbp (Γραφημα 5.2.3, 5.2.9).Η επόμενη σειρά δειγμάτων μας είναι και πάλι ποντίκια τύπου B6, αυτήν την φορά όμως με την προσθήκη ενός αντισώματος (B6+Hyb) το οποίο δεν σχετίζεται με την επιδιόρθωση των βλαβών DNA ,συνεπώς αναμέναμε να δούμε αποτελέσματα σχετικά παρόμοια με την παραπάνω σειρά των B6 ποντικών .Τα πειραματικά μας αποτελέσματα μας έδειξαν πως οι τιμές των βλαβών στην γλώσσα (+42% την 3^η ημέρα και 82% την 7^η ημέρα) είναι σχετικά στα ίδια επίπεδα κυμαίνονται και τα αποτελέσματα από τον ιστό του εντέρου (43% την 3^η ημέρα και 36% την 7^η ημέρα), που μπορεί με μία γρήγορη

εκτίμηση οι τιμές να φανούν πολύ υψηλές αριθμητικά όμως συγκριτικά με τα μη ακτινοβολημένα δείγματα δεν υπάρχει αξιοσημείωτη διαφορά ,με εξαίρεση τον ιστό της γλώσσας την 7^η ημέρα .Οι υψηλές τιμές στα μη ακτινοβολημένα κύτταρα δεν είναι κάτι που θα πρέπει απαραίτητα να μας ανησυχήσει καθώς υποδηλώνουν και βλάβες από ενδογενείς παράγοντες ,που δεν σχετίζονται με την ιοντίζουσα ακτινοβολία, όπως η ανάπτυξη ενδοκυτταρικού στρες και διάφοροι χημικοί και βιολογικοί παράγοντες(Γράφημα 5.2.4, 5.2.10) . Στην συνέχεια, μελετήσαμε και πάλι τύπο B6 ποντικών που αυτήν την φορά είχαμε προσθέσει το αντίσωμα ASF το οποίο κατατάσσεται στα αντι-μακροφάγα, δεν επιτρέπει δηλαδή την σωστή λειτουργία των ανοσοκυττάρων .Τα αποτελέσματα σε αυτήν την σειρά δειγμάτων έδειξαν ιδιαίτερα υψηλές βλάβες στον ιστό της γλώσσας την 3^η ημέρα 2749clusters/Gbp με μια μικρή μεταβολή την 7^η ημέρα στα 2759 clusters/Gbp, ενώ στα αποτελέσματα του εντέρου είχαμε ελάχιστη αύξηση των βλαβών την 3^η ημέρα (+6%) σε σχέση με τα control δείγματα και έναν αρκετά υψηλό βαθμό βλαβών να σημειώνεται την 7^η ημέρα 2388 cluster/Gbp (+145%). Τα πειραματικά μας αποτελέσματα δεν ήταν τα αναμενόμενα καθώς τα ανοσοκύτταρα διαμεσολαβούν στην επαγωγή των βλαβών και στην συγκεκριμένη σειρά εμείς τα μπλοκάρουμε με την χρήση του αντισώματος ASF,περιμέναμε λοιπόν σαφώς λιγότερες βλάβες και παρατηρούμε επίσης τον μεγάλο αριθμό βλαβών και στους δύο ιστούς την 7^η ημέρα μετά την ακτινοβολήση κάτι που μας κάνει να υποθέτουμε μια πιθανή παρεμπόδιση στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του οργανισμού(Γράφημα 5.2.5, 5.2.11) . Τέλος η τελευταία σειρά που επεξεργαστήκαμε με το ένζυμο APE1,ήταν η σειρά CCL2 με ποντίκια τύπου B6 όπου τους είχε απενεργοποιηθεί πλήρως η παραγωγή κυτοκίνης CCL2 .Αυτή η παρέμβαση αναμενόταν να μειώσει αισθητά τις επαγόμενες βλάβες καθώς η CCL2 εμπλέκεται στην ενεργοποίηση των μακροφάγων και λειτουργεί ως σηματοδότης του ανοσοποιητικού συστήματος αφού αρκετά πειράματα έχουν δείξει πως η χρήση αναστολέων της δράσης των κυτοκινών μειώνει τις ΜΣΕ[46]. Στους δύο υπό εξέταση ιστούς οι βλάβες που σημειώνονται είναι υψηλές αριθμητικά αλλά δεν απέχουν πολύ από τα control δείγματα στον ιστό της γλώσσας (+24% την 3^η ημέρα και +49% την 7^η ημέρα) και αντίστοιχα στον ιστό του εντέρου(+7% την 1^η ημέρα,+46% την 3^η ημέρα και +29% την 7^η ημέρα).Στα δείγματα αυτά αξίζει να σημειωθεί πως η επεξεργασία της εικόνας που είχαμε μετά την ηλεκτροφόρηση ήταν αρκετά δύσκολη και η πλειοψηφία των δειγμάτων δεν έδινε την ικανοποιητική ανάλυση γι αυτόν τον λόγο έχουμε και αρκετά μεγάλα τυπικά σφάλματα (Γράφημα 5.2.6, 5.2.12).

Αναλύοντας τώρα τα δείγματα με την προσθήκη την γλυκοσυλάσης DNA OGG1,οι βλάβες που σημειώνονται στην γλώσσα κυμαίνονται από 1062-4890 clusters/Gbp και στο έντερο 1002-3547 clusters/Gbp δειγμάτων με μέση τιμή control δειγμάτων τα 1555 clusters/Gbp και τα 1838 clusters / Gbp για την γλώσσα και το έντερο αντίστοιχα εξαιρώντας και πάλι τις τιμές των δειγμάτων που ακτινοβολήθηκαν με 100Gy καθώς δεν αποτελούν αντιπροσωπευτικό παράδειγμα.

Στα ποντίκια τύπου BALB/C παρατηρούμε αρχικά έναν υψηλό αριθμό βλαβών μη ακτινοβολημένων δειγμάτων αλλά και μία προοδευτική παρόμοια αύξηση των βλαβών με την πάροδο του χρόνου και στον ιστό της γλώσσας με 2515 clusters/Gbp και 3116 clusters/Gbp την 3^η και την 7^η μέρα αντίστοιχα και στον ιστό του εντέρου με 2763 clusters/Gbp και 3547 clusters /Gbp την 3^η και την 7^η μέρα αντίστοιχα(Γράφημα 5.3.1, 5.3.7). Στην σειρά NSG,με την απουσία ανοσοποιητικού συστήματος , είναι αξιοσημείωτο πως παρατηρούμε μία μείωση των βλαβών σε σχέση με τα control δείγματα μας και στους δύο ιστούς(-9% στην γλώσσα και -46%στο έντερο) κάτι το οποίο είναι

σαφώς μη αναμενόμενο, αλλά πρέπει να αναφερθεί πως υπάρχουν αποκλίσεις λόγω μεγάλων τυπικών σφαλμάτων ειδικά στην περίπτωση του ιστού της γλώσσας (Γράφημα 5.3.2, 5.3.8).

Στην σειρά B6 παρατηρούμε μια σταδιακά μεγάλη αριθμητική αύξηση των βλαβών και στους δύο ιστούς ,στην γλώσσα (+38% την 3^η ημέρα και +135% την 7^η ημέρα) και στο έντερο(+349% την 7^η ημέρα) κάτι παρόμοιο με την σειρά BALB/C που μπορεί να δικαιολογηθεί από την παρατεταμένη έκθεση του οργανισμού σε κυτταρικό στρες λόγω διαταραχής ομοιόστασης των κυττάρων(Γράφημα 5.3.3, 5.3.9). Στην επόμενη σειρά δειγμάτων έχουμε σειρά ποντικών B6+Hyb,δηλαδή με την προσθήκη αντισώματος που δεν επηρεάζει την κυτταρική επιδιόρθωση ,και ενώ αναμέναμε μια εικόνα παρόμοια με την προηγούμενη σειρά ποντικών B6, έχουμε ιδιαίτερα αυξημένες βλάβες στον ιστό της γλώσσας, +74% την 3^η ημέρα και +163% την 7^η ημέρα, ενώ αρκετά μικρότερες στον ιστό του εντέρου, +9% την 3^η ημέρα και +4% την 7^η ημέρα(Γράφημα 5.3.4, 5.3.10) .Στην προτελευταία σειρά έχουμε και πάλι τύπο B6 ποντικών με προσθήκη αντι-μακροφάγου (ASF) και θα περίμενε κανείς χαμηλά επίπεδα βλαβών λόγω της έλλειψης της παρουσίας μακροφάγων άρα και αρκετά μειωμένες πιθανότητες επαγωγής οξειδωτικών βλαβών στον οργανισμό .Παρατηρούμε λοιπόν, όντως σχετικά χαμηλά επίπεδα βλαβών σε σχέση με τα control δείγματα την 3^η ημέρα (1593 clusters/Gbp για την γλώσσα και 2004 clusters/Gbp για το έντερο) αλλά μία απότομη άνοδο στην 7^η ημέρα (3098 clusters/Gbp για την γλώσσα και 2625 clusters /Gbp για το έντερο) μετά την ακτινοβολία και στους δύο ιστούς κάτι που και πάλι μπορεί μόνο να δικαιολογηθεί με την παρατεταμένη κατάσταση κυτταρικού στρες που υφίσταται ο οργανισμός (Γράφημα 5.3.5,5.3.11). Τέλος, στην τελευταία σειρά ποντικών έχουμε και πάλι B6 σειρά με απενεργοποιημένη την παραγωγή κυτοκίνης και τα πειραματικά αποτελέσματα δεν δείχνουν μια ξεκάθαρη κατεύθυνση καθώς για τους ιστούς της γλώσσας είχαμε 2523 -1821-2149 clusters/Gbp την 1^η ,την 3^η και την 7^η ημέρα αντίστοιχα ενώ στο έντερο είχαμε 2846-1017-1002 την 1^η ,την 3^η και την 7^η ημέρα αντίστοιχα (Γράφημα 5.3.6, 5.3.12). Δυστυχώς για αυτήν την σειρά μετρήσεων δεν μπορούμε να βγάλουμε κάποιο συμπέρασμα ,πρώτον γιατί οι βλάβες δεν ακολουθούν τις θεωρητικές μας προβλέψεις και δεύτερον γιατί οι μετρήσεις αυτών των σειρών δειγμάτων ήταν αρκετά δύσκολη και η εικόνα που παίρναμε από το πρόγραμμα ImageJ δεν ήταν ικανοποιητικές για να εξάγουμε κάποιο αξιόπιστο αποτέλεσμα και αυτό οδήγησε στον αποκλεισμό αρκετών πειραματικών τιμών.

Το πλήθος ROS και RNS που έχει παραχθεί στην ακτινοβολημένη περιοχή του ποδιού στο ποντίκι, εκτός από κοντινές περιοχές δεν έχει την ικανότητα να βλάψει τον ιστό της γλώσσας και του παχέος εντέρου παράγοντας τέτοιο αριθμό συσσωρευμένων βλαβών όμως η παρατεταμένη διαταραχή της ομοιόστασης των κυττάρων μαζί με τη διατήρηση των βλαβών στην ακτινοβολημένη περιοχή προκαλούν μία επιμένουσα φλεγμονώδη απόκριση στον ιστό του εντέρου και της γλώσσας και έτσι παρατηρούνται αυτά τα επίπεδα βλαβών .Πιο αναλυτικά,με το πέρας αυτής της εργασίας καταλήγουμε στα εξής συμπεράσματα :

A)Γενικά, η επιδιόρθωση ενός συμπλέγματος πραγματοποιείται σε διάστημα κάποιων ωρών και η επαγωγή και αναδημιουργία των οξειδωτικών βλαβών DNA που παρατηρείται σε απομακρυσμένους ιστούς υποδεικνύει την de novo τους ανάπτυξη.

B)Οι μέσοι όροι των βλαβών του κάθε ιστού είναι οι ακόλουθοι :

i) για το hAPE1 στα δείγματα της γλώσσας είχαμε 1813clusters/Gbp και στα δείγματα εντέρου 2143 clusters/Gbp,

ii) για το OGG1 στα δείγματα της γλώσσας είχαμε 2100clusters/Gbp και στα δείγματα εντέρου 2459 clusters/Gbp .

Η μετατροπή clusters σε DSBs είναι φαινόμενο που παρατηρείται κυρίως σε έντονα πολλαπλασιαζόμενους ιστούς όπως το παχύ έντερο, γεγονός που εξηγεί τις υψηλότερες τιμές των βλαβών σε αυτόν τον ιστό. Επίσης, συγκρίνοντας τα δύο ένζυμα , το OGG1 είναι αυτό με τις υψηλότερες βάσεις κάτι που πιθανώς υποδεικνύει περισσότερες βλάβες λόγω οξειδωμένων πουρινών.

Γ) Στην πλειοψηφία των μετρήσεων οι δύο ιστοί , ανάλογα με το ένζυμο που χρησιμοποιούσαμε εμφάνισαν παρόμοια απόκριση στις βλάβες, δηλαδή οι έξι σειρές ποντικών αντιδρούσαν σχεδόν με τον ίδιο τρόπο στους δύο διαφορετικούς ιστούς .

Δ) Τα αποτελέσματα του hAPE1 εμφανίζουν μία απότομη αύξηση των βλαβών την 3^η ημέρα και μια σημαντική μείωση την 7^η ημέρα (εκτός από την σειρά της γλώσσας CCL2 και την σειρά του εντέρου B6+ASF) , κάτι που υποδεικνύει την ενεργοποίηση των επιδιορθωτικών μηχανισμών με την πάροδο λίγων ημερών με την χρήση του συγκεκριμένου ενζύμου. Τα αποτελέσματα του OGG1 εμφανίζουν μια σταδιακή αύξηση των βλαβών με την μέγιστη καταγραφή των βλαβών την 7^η ημέρα της ακτινοβολήσης (εκτός από την σειρά του εντέρου B6+Hyb και CCL2) , κάτι που υποδεικνύει μια δυσκολία αντιμετώπισης και επιδιόρθωσης των οξειδωτικών βλαβών με την πάροδο του χρόνου, με την χρήση του ενζύμου OGG1 ή ίσως σήματα που παράγονται οδηγούν στην εμφάνιση αντιγραφικού στρες, δυσκολεύοντας επιπλέον τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης των βλαβών DNA[53].

Η επαγωγή και παραμονή σε υψηλά επίπεδα των βλαβών για μέρες σε απομακρυσμένους μη ακτινοβολημένους ιστούς είναι ένα σύνθετο φαινόμενο . Η προστασία των κυττάρων από την δημιουργία βλαβών DNA εξαρτάται παράγοντες όπως η αποτελεσματικότητα των επιδιορθωτικών μηχανισμών, ο αριθμός αντιοξειδωτικών, ο πολλαπλασιαστικός ρυθμός και η απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος. Πιο συγκεκριμένα, η συνεχής ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού και το οξειδωτικό στρες δημιουργούν ένα κυτταροτοξικό περιβάλλον και η φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων διαταράσσεται .

Τέλος , η επαγωγή οξειδωμένων ομαδοποιημένων βλαβών σε συστημικό επίπεδο αποτελεί βασικό στοιχείο αξιολόγησης των αποτελεσμάτων της ακτινοθεραπείας αλλά και γενικότερα της ιοντίζουσας ακτινοβολίας και απαιτείται περαιτέρω ανάλυση του τρόπου επαγωγής των βλαβών και της βιολογικής σημασίας τους στους ιστούς όλου του οργανισμού. Χρειάζεται μία βαθύτερη να μελέτη των τρόπων ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος, των μακροφάγων και των κυτοκίνων που εμπλέκονται όπως επίσης και ο προσδιορισμός των κατάλληλων ενζύμων που μπορούν να συντελέσουν στην καλύτερη δυνατή αντιμετώπιση όλων αυτών των προβλημάτων.

Βιβλιογραφία

1. Alberts, B., ed. *Molecular Biology of The Cell*. 2002, Garland Science: New York.
2. Alberts, B., et al ed. *Essential cell biology*. 2 ed. 2004, Garland Science.
3. Cooper, G.M., ed. *The Cell: A molecular approach*. 2 ed. 2000, Sinauer Associates: Sunderland (MA).
4. Χ.Χ.Προυκάκης, ed. *Εισαγωγή στην Ιατρική Ακτινοφυσική*. Εκδόσεις Παριζιάνου
5. Ενέργειας, Ε.Ε.Α., *Μαθήματα ακτινοπροστασίας για χειριστές ιατρικών μηχανημάτων ιοντίζουσων ακτινοβολιών*. 2011.
6. Kohanoff, J.J., et al., *Interactions between low energy electrons and DNA: A perspective from first-principles simulations*. J Phys Condens Matter, 2017.
7. Evans, ed. *R.D. Compton Effect, in Corpuscles and Radiation in Matter II / Korpuskeln und Strahlung in Materie II*. 1958, Springer Berlin Heidelberg
8. Agency, I.A.E., ed. *Radiation Biology*. 2010: Vienna.
9. Α.Γεωργακίλας, *Σημειώσεις Εφαρμογες Ιοντίζουσών ακτινοβολιών στην Ιατρική και την Βιολογία*.
10. Ε., Γ., *Ιοντίζουσες ακτινοβολίες*. 1999: ΕΜΠ.
11. Lett, J.T., *Damage to cellular DNA from particulate radiations, the efficacy of its processing and the radiosensitivity of mammalian cells. Emphasis on DNA double strand breaks and chromatin breaks*. Radiat Environ Biophys, 1992. **31**(4): p. 257-77.
12. Georgakilas, A.G., P. O'Neill, and R.D. Stewart, *Induction and repair of clustered DNA lesions: what do we know so far?* Radiat Res, 2013. **180**(1): p. 100-9.
13. Hada, M. and A.G. Georgakilas, *Formation of clustered DNA damage after high-LET irradiation: a review*. J Radiat Res, 2008. **49**(3): p. 203-10.
14. Ward, J.F., ed. *Some biochemical consequences of the spatial distribution of ionizing radiation produced free radicals*. 1981, Radiat.
15. Grenon, M., C. Gilbert, and N.F. Lowndes, *Checkpoint activation in response to double-strand breaks requires the Mre11/Rad50/Xrs2 complex*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(9): p. 844-7.
16. Sutherland, B.M., et al., *Clustered DNA damages induced in isolated DNA and in human cells by low doses of ionizing radiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(1): p. 103-8.
17. Chiruvella, K.K., Z. Liang, and T.E. Wilson, *Repair of double-strand breaks by end joining*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(5): p. a012757.
18. Schermerhorn, K.M. and S. Delaney, *A chemical and kinetic perspective on base excision repair of DNA*. Acc Chem Res, 2014. **47**(4): p. 1238-46.
19. Doetsch, P.W. and R.P. Cunningham, *The enzymology of apurinic/apyrimidinic endonucleases*. Mutat Res, 1990. **236**(2-3): p. 173-201.
20. Kovtun, I.V., et al., *OGG1 initiates age-dependent CAG trinucleotide expansion in somatic cells*. Nature, 2007. **447**(7143): p. 447-52.
21. Kadhim, M., et al., *Non-targeted effects of ionising radiation--implications for low dose risk*. Mutat Res, 2013. **752**(2): p. 84-98.

22. Cheng, K.C., et al., *8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G---T and A---C substitutions*. J Biol Chem, 1992. **267**(1): p. 166-72.
23. Gunz, F.W., *Bone marrow changes in patients with chronic leukemia treated by splenic X-irradiation; preliminary report*. Blood, 1953. **8**(8): p. 687-92.
24. Herok, R., et al., *Bystander effects induced by medium from irradiated cells: similar transcriptome responses in irradiated and bystander K562 cells*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2010. **77**(1): p. 244-52.
25. Hatzi, V.I., et al., *Non-targeted radiation effects in vivo: a critical glance of the future in radiobiology*. Cancer Lett, 2015. **356**(1): p. 34-42.
26. Sprung, C.N., et al., *Oxidative DNA damage caused by inflammation may link to stress-induced non-targeted effects*. Cancer Lett, 2015. **356**(1): p. 72-81.
27. Nikitaki, Z., et al., *Systemic mechanisms and effects of ionizing radiation: A new 'old' paradigm of how the bystanders and distant can become the players*. Semin Cancer Biol, 2016. **37-38**: p. 77-95.
28. Suzuki, M. and D.A. Boothman, *Stress-induced premature senescence (SIPS)--influence of SIPS on radiotherapy*. J Radiat Res, 2008. **49**(2): p. 105-12.
29. Boiteux, S. and J.P. Radicella, *The human OGG1 gene: structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis*. Arch Biochem Biophys, 2000. **377**(1): p. 1-8.
30. Ohba, K., et al., *Abscopal regression of hepatocellular carcinoma after radiotherapy for bone metastasis*. Gut, 1998. **43**(4): p. 575-7.
31. Aivaliotis, I.L., et al., *How do cytokines trigger genomic instability?* J Biomed Biotechnol, 2012. **2012**: p. 536761.
32. Goh, K. and H. Sumner, *Breaks in normal human chromosomes: are they induced by a transferable substance in the plasma of persons exposed to total-body irradiation?* Radiat Res, 1968. **35**(1): p. 171-81.
33. Zhou, H., et al., *Mechanism of radiation-induced bystander effect: role of the cyclooxygenase-2 signaling pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(41): p. 14641-6.
34. Kotsinas, A., et al., *PIG3: a novel link between oxidative stress and DNA damage response in cancer*. Cancer Lett, 2012. **327**(1-2): p. 97-102.
35. Cooke, M.S., et al., *Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease*. FASEB J, 2003. **17**(10): p. 1195-214.
36. Kryston, T.B., et al., *Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis*. Mutat Res, 2011. **711**(1-2): p. 193-201.
37. Havaki, S., et al., *The role of oxidative DNA damage in radiation induced bystander effect*. Cancer Lett, 2015. **356**(1): p. 43-51.
38. Azzam, E.I., S.M. de Toledo, and J.B. Little, *Oxidative metabolism, gap junctions and the ionizing radiation-induced bystander effect*. Oncogene, 2003. **22**(45): p. 7050-7.
39. Morel, F., J. Doussiere, and P.V. Vignais, *The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects*. Eur J Biochem, 1991. **201**(3): p. 523-46.
40. Simon, H.U., A. Haj-Yehia, and F. Levi-Schaffer, *Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction*. Apoptosis, 2000. **5**(5): p. 415-8.
41. Matsumoto, H., et al., *Induction of radioresistance by a nitric oxide-mediated bystander effect*. Radiat Res, 2001. **155**(3): p. 387-96.
42. Klammer, H., et al., *Bystander effects as manifestation of intercellular communication of DNA damage and of the cellular oxidative status*. Cancer Lett, 2015. **356**(1): p. 58-71.
43. Heil, M. and W.G. Land, *Danger signals - damaged-self recognition across the tree of life*. Front Plant Sci, 2014. **5**: p. 578.
44. Glebova, K., et al., *Oxidized extracellular DNA as a stress signal that may modify response to anticancer therapy*. Cancer Lett, 2015. **356**(1): p. 22-33.
45. Ermakov, A.V., et al., *Oxidized extracellular DNA as a stress signal in human cells*. Oxid Med Cell Longev, 2013. **2013**: p. 649747.
46. Martin, O.A., et al., *Systemic DNA damage related to cancer*. Cancer Res, 2011. **71**(10): p. 3437-41.

47. Sutherland, B.M., et al., *Evaluation of number average length analysis in quantifying double strand breaks in genomic DNAs*. *Biochemistry*, 2003. **42**(11): p. 3375-84.
48. Klimp, A.H., et al., *A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2002. **44**(2): p. 143-61.
49. MacKay, R.J. and S.W. Russell, *Protein changes associated with stages of activation of mouse macrophages for tumor cell killing*. *J Immunol*, 1986. **137**(4): p. 1392-8.
50. Sutherland, B.M., et al., *Quantifying clustered DNA damage induction and repair by gel electrophoresis, electronic imaging and number average length analysis*. *Mutat Res*, 2003. **531**(1-2): p. 93-107.
51. Klungland, A., et al., *Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(23): p. 13300-5.
52. Sakumi, K., et al., *Ogg1 knockout-associated lung tumorigenesis and its suppression by Mth1 gene disruption*. *Cancer Res*, 2003. **63**(5): p. 902-5.
53. Redon, C.E., et al., *Tumors induce complex DNA damage in distant proliferative tissues in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(42): p. 17992-7.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ- Αναλυτικά αποτελέσματα

TONGUE APE1

		Δείγματα	1η Μέτρηση	2η Μέτρηση	Μέσος όρος
1	1	BALB NO IR 3DAY	4768,386376		764,2092931
1	2	BALB NO IR 3DAY	1107,222723		
1	3	BALB NO IR 3DAY	446,631434		
1	4	BALB NO IR 3DAY	536,7206923		
1	5	BALB NO IR 3DAY	966,2623232		
2	1	BALB IR 3DAY	1555,81447		1181,239711
2	2	BALB IR 3DAY	927,1657605		
2	3	BALB IR 3DAY	1041,712449		
2	4	BALB IR 3DAY	980,3984221		
2	5	BALB IR 3DAY	1401,107452		
3	1	BALB IR 7DAY	1794,203798		1089,197087
3	2	BALB IR 7DAY	798,6221447		
3	3	BALB IR 7DAY	999,015108		
3	4	BALB IR 7DAY			
3	5	BALB IR 7DAY	764,947299		
4	1	BALB IR 100GY MRT 6DAY	2702,233093		5685,428384
4	2	BALB IR 100GY MRT 6DAY	8668,623676		
5	1	NSG NO IR 3DAY	1075,230894		1044,771935
5	2	NSG NO IR 3DAY	1364,034997		
5	3	NSG NO IR 3DAY	695,0499134		
6	1	NSG IR 3DAY	1426,0364		1510,855645
6	2	NSG IR 3DAY	2084,792		
6	3	NSG IR 3DAY	1583,038204		
6	4	NSG IR 3DAY	731,6622335		
6	5	NSG IR 3DAY	949,5559773		
7	1	B6 NO IR 3DAY			1028,41109
7	2	B6 NO IR 3DAY	1485,597225		
7	3	B6 NO IR 3DAY	1328,657364		
7	4	B6 NO IR 3DAY	651,699289		
7	5	B6 NO IR 3DAY	647,690481		
8	1	B6 IR 3DAY	1088,579468		1450,106517
8	2	B6 IR 3DAY			
8	3	B6 IR 3DAY	1591,314112		
8	4	B6 IR 3DAY			
8	5	B6 IR 3DAY	1670,42597		

9	1	B6 IR 7DAY	935,5306611		1026,352058
9	2	B6 IR 7DAY	225,5672336	1493,107468	
9	3	B6 IR 7DAY	694,8634707	525,9318022	
9	4	B6 IR 7DAY		1060,016903	
9	5	B6 IR 7DAY			
10	1	B6 SCATTER 3DAY			Δεν είχαμε αποτέλεσμα
10	2	B6 SCATTER 3DAY			
10	3	B6 SCATTER 3DAY			
11	1	B6+HYB NO IR 3DAY			1186,875404
11	2	B6+HYB NO IR 3DAY			
11	3	B6+HYB NO IR 3DAY	1039,22144		
11	4	B6+HYB NO IR 3DAY	1334,529367		
12	1	B6+HYB IR 3DAY	1844,761694		1690,062996
12	2	B6+HYB IR 3DAY	876,9140843		
12	3	B6+HYB IR 3DAY	1412,205389		
12	4	B6+HYB IR 3DAY	1480,888794		
12	5	B6+HYB IR 3DAY	2022,396107		
13	1	B6+HYB NO IR 7DAY	818,3119067		934,7116648
13	2	B6+HYB NO IR 7DAY	1478,100471		
13	3	B6+HYB NO IR 7DAY	507,7226167		
13	4	B6+HYB NO IR 7DAY			
13	5	B6+HYB NO IR 7DAY			
14	1	B6+HYB IR 7DAY	96,58292974	3686,069545	1703,067654
14	2	B6+HYB IR 7DAY	700,9032664	3353,667578	
14	3	B6+HYB IR 7DAY	138,454298		
14	4	B6+HYB IR 7DAY	258,4127171	2070,678478	
14	5	B6+HYB IR 7DAY	844,5735901	2613,65313	
15	1	B6+ASF NO IR 3DAY	820,3422706		1256,94873
15	2	B6+ASF NO IR 3DAY	1195,610697		
15	3	B6+ASF NO IR 3DAY			
15	4	B6+ASF NO IR 3DAY	734,9548199	3914,203018	
15	5	B6+ASF NO IR 3DAY	486,2938388	765,5561452	
16	1	B6+ASF IR 3DAY	3761,933847	2262,654697	2749,23
16	2	B6+ASF IR 3DAY	2460,39175	3629,27887	
16	3	B6+ASF IR 3DAY		1364,566031	
16	4	B6+ASF IR 3DAY	490,1974138		
16	5	B6+ASF IR 3DAY	2706,817923	4443,676414	
17	1	B6+ASF NO IR 7DAY	1071,763044		1840,762279
17	2	B6+ASF NO IR 7DAY	2059,80044	4816,9921	
17	3	B6+ASF NO IR 7DAY	2220,310398	1108,835587	

17	4	B6+ASF NO IR 7DAY			
17	5	B6+ASF NO IR 7DAY	2011,175232	2439,025684	
18	1	B6+ASF IR 7DAY	3169,518619	3398,297846	2759,29383
18	2	B6+ASF IR 7DAY	2237,716259	2577,452884	
18	3	B6+ASF IR 7DAY		2586,388701	
18	4	B6+ASF IR 7DAY			
18	5	B6+ASF IR 7DAY	2321,139968		
19	1	CCL NO IR 3DAY	4524,120403		2140,632414
19	2	CCL NO IR 3DAY	4221,03372		
19	3	CCL NO IR 3DAY	1915,827585		
19	4	CCL NO IR 3DAY	2690,522073		
19	5	CCL NO IR 3DAY	1815,547585		
20	1	CCL IR 1DAY			2648,113541
20	2	CCL IR 1DAY			
20	3	CCL IR 1DAY			
20	4	CCL IR 1DAY	3493,99082		
20	5	CCL IR 1DAY	1802,236262		
21	1	CCL IR 3DAY	1674,832669	3965,411552	3196,968211
21	2	CCL IR 3DAY		4387,481639	
21	3	CCL IR 3DAY		1328,395376	
21	4	CCL IR 3DAY		4251,873717	
21	5	CCL IR 3DAY			
22	1	CCL IR 7DAY			δεν είχαμε αποτέλεσμα
22	2	CCL IR 7DAY			
22	3	CCL IR 7DAY			
22	4	CCL IR 7DAY			
22	5	CCL IR 7DAY			

COLON APE1

		Δείγματα	1η Μέτρηση	2η Μέτρηση	3η Μέτρηση	Μέσος όρος
1	1	BALB NO IR 3DAY	1335,060229	2067,473475		1968,481069
1	2	BALB NO IR 3DAY	2364,090324			
1	3	BALB NO IR 3DAY	1647,165762	2265,054362		
1	4	BALB NO IR 3DAY	806,1129624	2106,428598		
1	5	BALB NO IR 3DAY	2625,52002	2103,81463		
2	1	BALB IR 3DAY	983,2762771			3420,108375
2	2	BALB IR 3DAY	3222,133551			
2	3	BALB IR 3DAY	4169,9712			
2	4	BALB IR 3DAY	3318,638619	2417,80213		
2	5	BALB IR 3DAY				
3	1	BALB IR 7DAY	1778,9876			2929,987566
3	2	BALB IR 7DAY	3394,14358			
3	3	BALB IR 7DAY		3188,506382		
3	4	BALB IR 7DAY				
3	5	BALB IR 7DAY	2774,689202	3941,9362		
4	1	BALB IR 100GY MRT 6DAY		2540,789343		4440,549672
4	2	BALB IR 100GY MRT 6DAY	8340,31			
5	1	NSG NO IR 3DAY	1264,341839	1038,27869		1084,914329
5	2	NSG NO IR 3DAY	1018,518394			
5	3	NSG NO IR 3DAY				
6	1	NSG IR 3DAY	3218,659579	1308,595487		1797,754882
6	2	NSG IR 3DAY	1924,66723	1676,58112		
6	3	NSG IR 3DAY	1306,69253	1170,563111		
6	4	NSG IR 3DAY				
6	5	NSG IR 3DAY	1888,139999			
7	1	B6 NO IR 3DAY	1219,625212	780,2562685		951,3647144
7	2	B6 NO IR 3DAY	1619,016177	765,7123731		
7	3	B6 NO IR 3DAY	1106,75909	216,8191654		
7	4	B6 NO IR 3DAY	1719,025085			
7	5	B6 NO IR 3DAY		1970,350476		
8	1	B6 IR 3DAY				δεν είχαμε αποτέλεσμα
8	2	B6 IR 3DAY				
8	3	B6 IR 3DAY				

8	4	B6 IR 3DAY				
8	5	B6 IR 3DAY				
9	1	B6 IR 3DAY	1513,56069			2030,59345
9	2	B6 IR 3DAY	2389,25232		799,6439844	
9	3	B6 IR 3DAY	2694,496547		2162,115673	
9	4	B6 IR 3DAY	2962,566484			
9	5	B6 IR 3DAY	1654,085814			
10	1	B6 SCATTER 3DAY	371,9409561			955,5899154
10	2	B6 SCATTER 3DAY	1186,243176			
10	3	B6 SCATTER 3DAY	1308,585614			
11	1	B6+HYB NO IR 3DAY				1540,981477
11	2	B6+HYB NO IR 3DAY		6498,542582		
11	3	B6+HYB NO IR 3DAY	1580,174085			
11	4	B6+HYB NO IR 3DAY	255,5286349	1501,788869		
12	1	B6+HYB IR 3DAY		1503,706044		2196,810476
12	2	B6+HYB IR 3DAY	2681,591288	3871,578893	1180,123498	
12	3	B6+HYB IR 3DAY		2757,798923		
12	4	B6+HYB IR 3DAY	2375,382448		2222,698545	
12	5	B6+HYB IR 3DAY	1356,107812		2219,815485	
13	1	B6+HYB NO IR 7DAY	1000,584469			1097,966158
13	2	B6+HYB NO IR 7DAY		1380,978226		
13	3	B6+HYB NO IR 7DAY	618,94567	1034,045765		
13	4	B6+HYB NO IR 7DAY		1183,806221		
13	5	B6+HYB NO IR 7DAY				
14	1	B6+HYB IR 7DAY	2905,197968	1968,276318	1259,28873	1489,106361
14	2	B6+HYB IR 7DAY	1972,166004			
14	3	B6+HYB IR 7DAY	2103,728583	1131,330658		
14	4	B6+HYB IR 7DAY	1946,308572	1676,855108		
14	5	B6+HYB IR 7DAY		1009,118116		
15	1	B6+ASF NO IR 3DAY	684,1626737	724,9738306		716,1120383
15	2	B6+ASF NO IR 3DAY	960,047267	1031,222633		
15	3	B6+ASF NO IR 3DAY	1260,26481	698,234291	1532,159258	
15	4	B6+ASF NO IR 3DAY	225,2925412	393,8449386		
15	5	B6+ASF NO IR 3DAY	152,693471	661,7774554		
16	1	B6+ASF IR 3DAY				760,4584911
16	2	B6+ASF IR 3DAY	461,6371018			
16	3	B6+ASF IR 3DAY	893,687556	977,356931		

16	4	B6+ASF IR 3DAY	551,5588003	788,823777	
16	5	B6+ASF IR 3DAY	974,483272		
17	1	B6+ASF NO IR 7DAY	1113,252832	894,4766795	975,2952466
17	2	B6+ASF NO IR 7DAY	1704,434727	775,9180905	
17	3	B6+ASF NO IR 7DAY		737,9077547	
17	4	B6+ASF NO IR 7DAY			
17	5	B6+ASF NO IR 7DAY	1309,86722	528,5969141	
18	1	B6+ASF IR 7DAY	1619,9187	2503,76421	2388,42676
18	2	B6+ASF IR 7DAY		2200,999015	
18	3	B6+ASF IR 7DAY			
18	4	B6+ASF IR 7DAY		2399,647507	
18	5	B6+ASF IR 7DAY		2891,219062	
19	1	CCL NO IR 3DAY			1095,560617
19	2	CCL NO IR 3DAY		848,3372535	
19	3	CCL NO IR 3DAY		978,942831	
19	4	CCL NO IR 3DAY		1459,401766	
19	5	CCL NO IR 3DAY			
20	1	CCL IR 1DAY		913,580317	1177,552441
20	2	CCL IR 1DAY			
20	3	CCL IR 1DAY		1268,189471	
20	4	CCL IR 1DAY		1350,887537	
20	5	CCL IR 1DAY			
21	1	CCL IR 3DAY			1594,243063
21	2	CCL IR 3DAY			
21	3	CCL IR 3DAY	2417,069467	1525,419462	
21	4	CCL IR 3DAY			
21	5	CCL IR 3DAY	1088,6787	1345,804624	
22	1	CCL IR 7DAY			1411,419541
22	2	CCL IR 7DAY		1204,750101	
22	3	CCL IR 7DAY			
22	4	CCL IR 7DAY			
22	5	CCL IR 7DAY		1618,08898	

TONGUE OGG1

		Δείγματα	1η Μέτρηση	2η Μέτρηση	Μέσος όρος
1	1	BALB NO IR 3DAY			2005,821755
1	2	BALB NO IR 3DAY	2322,108878		
1	3	BALB NO IR 3DAY	1815,249778		
1	4	BALB NO IR 3DAY	1785,796487		
1	5	BALB NO IR 3DAY	2100,131876		
2	1	BALB IR 3DAY	2534,402527		2515,513461
2	2	BALB IR 3DAY	3111,078134		
2	3	BALB IR 3DAY	1118,699665		
2	4	BALB IR 3DAY	3399,384706		
2	5	BALB IR 3DAY	2414,002273		
3	1	BALB IR 7DAY	4046,125285		3116,279654
3	2	BALB IR 7DAY	1782,560323		
3	3	BALB IR 7DAY			
3	4	BALB IR 7DAY			
3	5	BALB IR 7DAY	3520,153355		
4	1	BALB IR 100GY MRT 6DAY			Δεν είχαμε αποτέλεσμα
4	2	BALB IR 100GY MRT 6DAY			
5	1	NSG NO IR 3DAY	900,4952426		1679,033489
5	2	NSG NO IR 3DAY	2457,571735		
5	3	NSG NO IR 3DAY	3359,851524		
6	1	NSG IR 3DAY			1528,697816
6	2	NSG IR 3DAY	1949,735199		
6	3	NSG IR 3DAY	835,6997154		
6	4	NSG IR 3DAY	1800,658534		
6	5	NSG IR 3DAY	758,9561118		
7	1	B6 NO IR 3DAY	422,8488324		982,7022984
7	2	B6 NO IR 3DAY	1417,212936		
7	3	B6 NO IR 3DAY	1909,005995		
7	4	B6 NO IR 3DAY	1110,712766		
7	5	B6 NO IR 3DAY	980,0346599		
8	1	B6 IR 3DAY		1276,388048	1360,826987

8	2	B6 IR 3DAY	121,6285035	1477,673176	
8	3	B6 IR 3DAY		1288,844167	
8	4	B6 IR 3DAY		2010,249824	
8	5	B6 IR 3DAY		1429,002055	
9	1	B6 IR 7DAY	1272,698928		2307,421076
9	2	B6 IR 7DAY	1116,945948	2287,642283	
9	3	B6 IR 7DAY	2290,538867	2508,800808	
9	4	B6 IR 7DAY		2875,299534	
9	5	B6 IR 7DAY		3287,142966	
10	1	B6 SCATTER 3DAY	12080,24731		8947,217537
10	2	B6 SCATTER 3DAY	5220,257829		
10	3	B6 SCATTER 3DAY	9541,147471		
11	1	B6+HYB NO IR 3DAY	2610,485493		2802,981606
11	2	B6+HYB NO IR 3DAY	3128,659408		
11	3	B6+HYB NO IR 3DAY	2864,890762		
11	4	B6+HYB NO IR 3DAY	2607,890762		
12	1	B6+HYB IR 3DAY	5021,912058		4890,704954
12	2	B6+HYB IR 3DAY	3933,196998		
12	3	B6+HYB IR 3DAY	6296,386606		
12	4	B6+HYB IR 3DAY	4311,324156		
12	5	B6+HYB IR 3DAY			
13	1	B6+HYB NO IR 7DAY	1074,798889		1164,227566
13	2	B6+HYB NO IR 7DAY	1326,669581		
13	3	B6+HYB NO IR 7DAY	1273,675839		
13	4	B6+HYB NO IR 7DAY	899,7659127		
13	5	B6+HYB NO IR 7DAY	1246,22761		
14	1	B6+HYB IR 7DAY	3018,381959		3063,356672
14	2	B6+HYB IR 7DAY	2336,144333		
14	3	B6+HYB IR 7DAY	3793,727082		
14	4	B6+HYB IR 7DAY	1812,621822		
14	5	B6+HYB IR 7DAY	4355,908166		
15	1	B6+ASF NO IR 3DAY	1344,557328		1498,657553
15	2	B6+ASF NO IR 3DAY	2651,998274		
15	3	B6+ASF NO IR 3DAY	1500,313898		
15	4	B6+ASF NO IR 3DAY			
15	5	B6+ASF NO IR 3DAY	1651,101433		
16	1	B6+ASF IR 3DAY			1593,236297

16	2	B6+ASF IR 3DAY	1830,623465		
16	3	B6+ASF IR 3DAY	1546,977215		
16	4	B6+ASF IR 3DAY	1113,04471		
16	5	B6+ASF IR 3DAY	1882,299799		
17	1	B6+ASF NO IR 7DAY	1535,97948		1204,167635
17	2	B6+ASF NO IR 7DAY	1155,152256		
17	3	B6+ASF NO IR 7DAY	1565,122933		
17	4	B6+ASF NO IR 7DAY	770,1288423		
17	5	B6+ASF NO IR 7DAY	994,454665		
18	1	B6+ASF IR 7DAY			3098,957247
18	2	B6+ASF IR 7DAY	2491,74084		
18	3	B6+ASF IR 7DAY	3185,941741		
18	4	B6+ASF IR 7DAY	4232,431308		
18	5	B6+ASF IR 7DAY	2485,715097		
19	1	CCL NO IR 3DAY	1026,848959		1110,019093
19	2	CCL NO IR 3DAY	911,7704149		
19	3	CCL NO IR 3DAY	1458,761976		
19	4	CCL NO IR 3DAY	2066,503738		
19	5	CCL NO IR 3DAY	1042,695023		
20	1	CCL IR 1DAY	1239,219091		1277,696809
20	2	CCL IR 1DAY	1904,641981		
20	3	CCL IR 1DAY	1061,99512		
20	4	CCL IR 1DAY	904,9310453		
20	5	CCL IR 1DAY	787,8799263		
21	1	CCL IR 3DAY	909,8806613		1062,53026
21	2	CCL IR 3DAY	1139,526854		
21	3	CCL IR 3DAY	1334,420185		
21	4	CCL IR 3DAY	961,0257709		
21	5	CCL IR 3DAY	967,7978273		
22	1	CCL IR 7DAY	1559,536152		2177,58561
22	2	CCL IR 7DAY	2295,75799		
22	3	CCL IR 7DAY	2186,885841		
22	4	CCL IR 7DAY	2446,873541		
22	5	CCL IR 7DAY	2398,874528		

COLON OGG1

		Δείγματα	1η Μέτρηση	2η Μέτρηση	3η Μέτρηση	Μέσος όρος
1	1	BALB NO IR 3DAY	2222,070964	2753,981939		1855,192802
1	2	BALB NO IR 3DAY	1347,650638	2127,28909		
1	3	BALB NO IR 3DAY	866,689965	1859,53089		
1	4	BALB NO IR 3DAY		1915,333643		
1	5	BALB NO IR 3DAY	1263,54971	2280,49754		
2	1	BALB IR 3DAY				2763,012699
2	2	BALB IR 3DAY				
2	3	BALB IR 3DAY				
2	4	BALB IR 3DAY		2763,012699		
2	5	BALB IR 3DAY				
3	1	BALB IR 7DAY	2487,144635	4068,923415		3547,125184
3	2	BALB IR 7DAY		2988,874567		
3	3	BALB IR 7DAY	3649,887745	3652,104362		
3	4	BALB IR 7DAY				
3	5	BALB IR 7DAY	4711,482171	3829,71001		
4	1	BALB IR 100GY MRT 6DAY		4204,936401		5305,691599
4	2	BALB IR 100GY MRT 6DAY		6406,446797		
5	1	NSG NO IR 3DAY	1445,758758	2604,815999		2025,287379
5	2	NSG NO IR 3DAY				
5	3	NSG NO IR 3DAY				
6	1	NSG IR 3DAY	856,0125371	918,035898		1097,148356
6	2	NSG IR 3DAY	1178,471098	1436,073889		
6	3	NSG IR 3DAY				
6	4	NSG IR 3DAY				
6	5	NSG IR 3DAY				
7	1	B6 NO IR 3DAY	725,667987	905,1442847		731,0156535
7	2	B6 NO IR 3DAY		756,4103468		
7	3	B6 NO IR 3DAY		621,230478		
7	4	B6 NO IR 3DAY				
7	5	B6 NO IR 3DAY				

8	1	B6 IR 3DAY				Δεν είχαμε αποτέλεσμα
8	2	B6 IR 3DAY				
8	3	B6 IR 3DAY				
8	4	B6 IR 3DAY				
8	5	B6 IR 3DAY				
9	1	B6 IR 3DAY				3283,861002
9	2	B6 IR 3DAY				
9	3	B6 IR 3DAY	3141,199464			
9	4	B6 IR 3DAY	3626,522539			
9	5	B6 IR 3DAY				
10	1	B6 SCATTER 3DAY	2419,248153			2093,448147
10	2	B6 SCATTER 3DAY	2374,885576			
10	3	B6 SCATTER 3DAY	2571,865889	400,555536		
11	1	B6+HYB NO IR 3DAY	2382,190935	1943,08482		2765,257957
11	2	B6+HYB NO IR 3DAY	3367,878036			
11	3	B6+HYB NO IR 3DAY		4025,293162		
11	4	B6+HYB NO IR 3DAY	7727,092432	3551,930324		
12	1	B6+HYB IR 3DAY	3134,631528			3000,311108
12	2	B6+HYB IR 3DAY	2765,249882	2457,840631		
12	3	B6+HYB IR 3DAY				
12	4	B6+HYB IR 3DAY	3993,207253	2516,305829		
12	5	B6+HYB IR 3DAY	4642,12114	4363,624522		
13	1	B6+HYB NO IR 7DAY	835,4126938	1095,649352		1366,861748
13	2	B6+HYB NO IR 7DAY				
13	3	B6+HYB NO IR 7DAY	1864,187149	1054,415844		
13	4	B6+HYB NO IR 7DAY				
13	5	B6+HYB NO IR 7DAY	1606,214823	1745,290627		
14	1	B6+HYB IR 7DAY	1510,831171	2444,085984		1415,12072
14	2	B6+HYB IR 7DAY	1297,151712	2676,459245		
14	3	B6+HYB IR 7DAY	1401,629061	1810,84288		
14	4	B6+HYB IR 7DAY	1556,690663	891,3202762		
14	5	B6+HYB IR 7DAY				
15	1	B6+ASF NO IR 3DAY	1204,421071	1732,038861		1642,485966
15	2	B6+ASF NO IR 3DAY	1184,754309			
15	3	B6+ASF NO IR 3DAY	1847,412434			
15	4	B6+ASF NO IR 3DAY	1731,804935	1822,601202		
15	5	B6+ASF NO IR 3DAY	2073,440633	1796,219474		

16	1	B6+ASF IR 3DAY				2004,363436
16	2	B6+ASF IR 3DAY	1497,931603	1053,046859		
16	3	B6+ASF IR 3DAY	2693,946209			
16	4	B6+ASF IR 3DAY	1667,26879	1875,605397		
16	5	B6+ASF IR 3DAY	2276,581211			
17	1	B6+ASF NO IR 7DAY	1205,992501	1864,1916		1596,668929
17	2	B6+ASF NO IR 7DAY	1141,762563	765,4175139		
17	3	B6+ASF NO IR 7DAY	2396,049719	2680,314428		
17	4	B6+ASF NO IR 7DAY				
17	5	B6+ASF NO IR 7DAY	1026,38954	1693,233569		
18	1	B6+ASF IR 7DAY		4169,565503		2625,054827
18	2	B6+ASF IR 7DAY				
18	3	B6+ASF IR 7DAY	2677,695759	4022,092224		
18	4	B6+ASF IR 7DAY	2280,29925			
18	5	B6+ASF IR 7DAY	1788,272234	4004,945056		
19	1	CCL NO IR 3DAY				2471,605
19	2	CCL NO IR 3DAY		2858,588308		
19	3	CCL NO IR 3DAY	2266,108968	2666,914881	894,5913126	
19	4	CCL NO IR 3DAY	2843,315206	2837,001902	2160,748213	
19	5	CCL NO IR 3DAY				
20	1	CCL IR 1DAY	1119,390402	3149,613796	1351,377373	2523,095
20	2	CCL IR 1DAY				
20	3	CCL IR 1DAY		2895,632467	1717,857201	
20	4	CCL IR 1DAY		3447,724602	679,5906041	
20	5	CCL IR 1DAY		2908,330561	4788,700756	
21	1	CCL IR 3DAY			2800,844475	1821,921
21	2	CCL IR 3DAY				
21	3	CCL IR 3DAY		1017,213689		
21	4	CCL IR 3DAY				
21	5	CCL IR 3DAY			1647,70347	
22	1	CCL IR 7DAY				2149,499
22	2	CCL IR 7DAY	1002,456677		1722,899448	
22	3	CCL IR 7DAY			3727,512126	
22	4	CCL IR 7DAY			1358,307293	
22	5	CCL IR 7DAY				
		Δείγματα	1η Μέτρηση	2η Μέτρηση	3η Μέτρηση	Μέσος όρος
1	1	BALB NO IR 3DAY	2222,070964	2753,981939		1855,192802

1	2	BALB NO IR 3DAY	1347,650638	2127,28909		
1	3	BALB NO IR 3DAY	866,689965	1859,53089		
1	4	BALB NO IR 3DAY		1915,333643		
1	5	BALB NO IR 3DAY	1263,54971	2280,49754		
2	1	BALB IR 3DAY			2763,012699	
2	2	BALB IR 3DAY				
2	3	BALB IR 3DAY				
2	4	BALB IR 3DAY		2763,012699		
2	5	BALB IR 3DAY				
3	1	BALB IR 7DAY	2487,144635	4068,923415	3547,125184	
3	2	BALB IR 7DAY		2988,874567		
3	3	BALB IR 7DAY	3649,887745	3652,104362		
3	4	BALB IR 7DAY				
3	5	BALB IR 7DAY	4711,482171	3829,71001		
4	1	BALB IR 100GY MRT 6DAY		4204,936401	5305,691599	
4	2	BALB IR 100GY MRT 6DAY		6406,446797		
5	1	NSG NO IR 3DAY	1445,758758	2604,815999	2025,287379	
5	2	NSG NO IR 3DAY				
5	3	NSG NO IR 3DAY				
6	1	NSG IR 3DAY	856,0125371	918,035898	1097,148356	
6	2	NSG IR 3DAY	1178,471098	1436,073889		
6	3	NSG IR 3DAY				
6	4	NSG IR 3DAY				
6	5	NSG IR 3DAY				
7	1	B6 NO IR 3DAY	725,667987	905,1442847	731,0156535	
7	2	B6 NO IR 3DAY		756,4103468		
7	3	B6 NO IR 3DAY		621,230478		
7	4	B6 NO IR 3DAY				
7	5	B6 NO IR 3DAY				
8	1	B6 IR 3DAY			Δεν είχαμε αποτέλεσμα	
8	2	B6 IR 3DAY				
8	3	B6 IR 3DAY				
8	4	B6 IR 3DAY				
8	5	B6 IR 3DAY				
9	1	B6 IR 3DAY			3283,861002	

9	2	B6 IR 3DAY					
9	3	B6 IR 3DAY	3141,199464				
9	4	B6 IR 3DAY	3626,522539				
9	5	B6 IR 3DAY					
10	1	B6 SCATTER 3DAY	2419,248153			2093,448147	
10	2	B6 SCATTER 3DAY	2374,885576				
10	3	B6 SCATTER 3DAY	2571,865889	400,555536			
11	1	B6+HYB NO IR 3DAY	2382,190935	1943,08482		2765,257957	
11	2	B6+HYB NO IR 3DAY	3367,878036				
11	3	B6+HYB NO IR 3DAY		4025,293162			
11	4	B6+HYB NO IR 3DAY	7727,092432	3551,930324			
12	1	B6+HYB IR 3DAY	3134,631528			3000,311108	
12	2	B6+HYB IR 3DAY	2765,249882	2457,840631			
12	3	B6+HYB IR 3DAY					
12	4	B6+HYB IR 3DAY	3993,207253	2516,305829			
12	5	B6+HYB IR 3DAY	4642,12114	4363,624522			
13	1	B6+HYB NO IR 7DAY	835,4126938	1095,649352		1366,861748	
13	2	B6+HYB NO IR 7DAY					
13	3	B6+HYB NO IR 7DAY	1864,187149	1054,415844			
13	4	B6+HYB NO IR 7DAY					
13	5	B6+HYB NO IR 7DAY	1606,214823	1745,290627			
14	1	B6+HYB IR 7DAY	1510,831171	2444,085984		1415,12072	
14	2	B6+HYB IR 7DAY	1297,151712	2676,459245			
14	3	B6+HYB IR 7DAY	1401,629061	1810,84288			
14	4	B6+HYB IR 7DAY	1556,690663	891,3202762			
14	5	B6+HYB IR 7DAY					
15	1	B6+ASF NO IR 3DAY	1204,421071	1732,038861		1642,485966	
15	2	B6+ASF NO IR 3DAY	1184,754309				
15	3	B6+ASF NO IR 3DAY	1847,412434				
15	4	B6+ASF NO IR 3DAY	1731,804935	1822,601202			
15	5	B6+ASF NO IR 3DAY	2073,440633	1796,219474			
16	1	B6+ASF IR 3DAY				2004,363436	
16	2	B6+ASF IR 3DAY	1497,931603	1053,046859			
16	3	B6+ASF IR 3DAY	2693,946209				
16	4	B6+ASF IR 3DAY	1667,26879	1875,605397			
16	5	B6+ASF IR 3DAY	2276,581211				
17	1	B6+ASF NO IR 7DAY	1205,992501	1864,1916		1596,668929	

17	2	B6+ASF NO IR 7DAY	1141,762563	765,4175139			
17	3	B6+ASF NO IR 7DAY	2396,049719	2680,314428			
17	4	B6+ASF NO IR 7DAY					
17	5	B6+ASF NO IR 7DAY	1026,38954	1693,233569			
18	1	B6+ASF IR 7DAY		4169,565503		2625,054827	
18	2	B6+ASF IR 7DAY					
18	3	B6+ASF IR 7DAY	2677,695759	4022,092224			
18	4	B6+ASF IR 7DAY	2280,29925				
18	5	B6+ASF IR 7DAY	1788,272234	4004,945056			
19	1	CCL NO IR 3DAY				2471,605	
19	2	CCL NO IR 3DAY		2858,588308			
19	3	CCL NO IR 3DAY	2266,108968	2666,914881	894,5913126		
19	4	CCL NO IR 3DAY	2843,315206	2837,001902	2160,748213		
19	5	CCL NO IR 3DAY					
20	1	CCL IR 1DAY	1119,390402	3149,613796	1351,377373	2523,095	
20	2	CCL IR 1DAY					
20	3	CCL IR 1DAY		2895,632467	1717,857201		
20	4	CCL IR 1DAY		3447,724602	679,5906041		
20	5	CCL IR 1DAY		2908,330561	4788,700756		
21	1	CCL IR 3DAY			2800,844475	1821,921	
21	2	CCL IR 3DAY					
21	3	CCL IR 3DAY		1017,213689			
21	4	CCL IR 3DAY					
21	5	CCL IR 3DAY			1647,70347		
22	1	CCL IR 7DAY				2149,499	
22	2	CCL IR 7DAY	1002,456677		1722,899448		
22	3	CCL IR 7DAY			3727,512126		
22	4	CCL IR 7DAY			1358,307293		
22	5	CCL IR 7DAY					