



Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών  
Τμήμα Βιολογίας και Ιατρική Σχολή  
Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης «Εφαρμογές της Βιολογίας  
στην Ιατρική»

Μεταπτυχιακή Διπλωματική εργασία με τίτλο:

---

Επιδράσεις της ιονίζουσας ακτινοβολίας στα  
ώριμα ερυθροκύτταρα

Θωμά Βασιλείου  
Τεχνολόγος Ακτινολόγος  
ΑΜ:41722



**Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:** Ισιδώρα Σ. Παπασιδέρη, Καθηγήτρια  
Κυτταρικής & Αναπτυξιακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

**Επιστημονικός Υπεύθυνος:** Αναστάσιος Κριεμπάρδης, Αναπληρωτής  
Καθηγητής Εργαστηριακής Αιματολογίας Παθοφυσιολογίας Διατήρησης του  
Ερυθροκυττάρου και Αιμοδοσίας, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Τομέας  
Ιατρικών Εργαστηρίων, ΠΑΔΑ

**Εργαστήριο:** Αξιοπιστίας και Ποιοτικού Ελέγχου στην Εργαστηριακή  
Αιματολογία - HemQcR , Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής



**Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών**  
**Τμήμα Βιολογίας και Ιατρική Σχολή**  
**Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης «Εφαρμογές της Βιολογίας**  
**στην Ιατρική»**

## **Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία**

**«Επιδράσεις της ιονίζουσας ακτινοβολίας στα**  
**ώριμαερυθροκύτταρα»**

**Θωμά Βασιλείου**  
**Τεχνολόγος Ακτινολόγος**  
**ΑΜ:41722**

**Τριμελής εξεταστική επιτροπή**

**Καθηγήτρια Ισιδώρα Σ. Παπασιδέρη (Επιβλέπουσα), Εθνικό και**  
**Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Σχολή Θετικών**  
**Επιστημών, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής**

**Αναπληρωτής Καθηγητής Αναστάσιος Κριεμπάρδης (Επιστημονικός**  
**Υπεύθυνος), Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Σχολή Επιστημών Υγείας και**  
**Πρόνοιας, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Τομέας Ιατρικών Εργαστηρίων**

**Επίκουρη Καθηγήτρια Μαριάννα Χ. Αντωνέλου, Εθνικό και**  
**Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Σχολή Θετικών**  
**Επιστημών, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής**

Αθήνα 2020

<b>Περιεχόμενα</b>	
<b>Πρόλογος.....</b>	<b>5</b>
<b>A. Εισαγωγή.....</b>	<b>7</b>
<b>1. Το αίμα και τα συστατικά του.....</b>	<b>7</b>
1.1 Έμμορφα συστατικά .....	7
<b>2. Ερυθροκυτταρική μεμβράνη .....</b>	<b>10</b>
2.1 Μεμβρανικά λιπίδια.....	10
2.2 Διαμεμβρανικές πρωτεΐνες .....	12
2.2.1 Ζώνη 3 (Band 3).....	12
2.2.2. Γλυκοφορίνες.....	13
2.2.3 Μεταφορέας Γλυκόζης .....	14
2.3 Σκελετικές .....	14
2.3.1 Σπεκτρίνη .....	14
2.3.2 Αγκυρίνη.....	15
2.3.3 Πρωτεΐνη 4.1 R.....	16
2.3.4 Πρωτεΐνη 4.2.....	16
<b>3. Ερυθρόπτωση.....</b>	<b>16</b>
<b>4. Γήρανση των ερυθροκυττάρων .....</b>	<b>18</b>
4.1 Κυστιδοποίηση (Vesiculation) .....	18
4.2 Μεταβολές στην ομοιόσταση του $Ca^{2+}$ .....	20
4.3 Μονοπάτι γήρανσης και ζώνη 3.....	20
4.4 Ελεύθερη αιμοσφαιρίνη και οξειδωτικό στρες.....	21
<b>5. Ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία.....</b>	<b>25</b>
5.1 Μη ιονίζουσα ακτινοβολία .....	26
5.2 Ιονίζουσα ακτινοβολία .....	27
5.2.1 Παραγωγή ακτίνων Χ- Ακτινολογική Λυχνία .....	27
5.2.2 Αλληλεπιδράσεις ιονίζουσας ακτινοβολίας με την ύλη.....	28
<b>6. Βιολογικές Επιδράσεις της ιονίζουσας ακτινοβολίας. ....</b>	<b>30</b>

6.1 Επιπτώσεις της ακτινοβολίας σε υποκυτταρικό επίπεδο .....	30
6.1.1 Άμεση και Έμμεση επίδραση της ιονίζουσας ακτινοβολίας με την βιολογική ύλη. ....	32
6.2 Επιδράσεις της Ιονίζουσας ακτινοβολίας στα ώριμα ερυθροκύτταρα.....	34
6.2.1 Μελέτες με βάση την βιολογική επίπτωση της Ιονίζουσας Ακτινοβολίας στη βιοχημική σύσταση και μορφολογία των ερυθροκυττάρων.....	35
<b>Γ. Υλικά και Μέθοδοι.....</b>	<b>40</b>
Μέτρηση της οσμωτικής ευθραυστότητας των ερυθροκυττάρων.....	41
Μέτρηση της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης πλάσματος (fHb, freeHb).....	42
Στατιστική ανάλυση .....	43
<b>Δ. Αποτελέσματα .....</b>	<b>45</b>
Μετρήσεις οσμωτικής ευθραυστότητας πριν και μετά την ακτινοβόληση .....	45
Α) Σύγκριση Οσμωτικής ευθραυστότητας control και ακτινοβολημένου αίματος σε σχέση με τη δόση.....	45
Β) Σύγκριση Οσμωτικής ευθραυστότητας μαρτύρων και ακτινοβολημένου αίματος σε σχέση με το φύλο .....	48
Γ) Σύγκριση Οσμωτικής ευθραυστότητας μαρτύρων και ακτινοβολημένου αίματος σε σχέση με την ηλικία .....	50
Μετρήσεις Ελεύθερης αιμοσφαιρίνης πριν και μετά την ακτινοβόληση.....	51
Α) Σύγκριση Ελεύθερης Αιμοσφαιρίνης μαρτύρων και ακτινοβολημένων σε διαφορετικές δόσεις.....	52
Β) Σύγκριση Ελεύθερης Αιμοσφαιρίνης σε σχέση με το φύλο .....	54
Γ) Σύγκριση Ελεύθερης Αιμοσφαιρίνης σε σχέση με την ηλικία .....	56
Δ) Σύγκριση των παραμέτρων της Οσμωτικής Ευθραυστότητας και της Ελεύθερης Αιμοσφαιρίνης ανάλογα με την δόση, φύλο και ηλικία .....	59
<b>Περίληψη .....</b>	<b>64</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>65</b>
<b>ΣΤ. Βιβλιογραφικές αναφορές .....</b>	<b>66</b>

## Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε κατά την περίοδο 2019-2020, στον τομέα Ιατρικών Εργαστηρίων του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού: «**Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική**», του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα και διευθύντρια του Μεταπτυχιακού, Καθηγήτρια **κα Παπασιδέρη Ισιδώρα**, που μου έδωσε την ευκαιρία να διεκπεραιώσω την διπλωματική μου εργασία υπό την επίβλεψη της.

Επίσης, ευχαριστώ τον Αναπληρωτή Καθηγητή και επιστημονικό μου υπεύθυνο **κ. Κριεμπάρδη Αναστάσιο**, που μου έδειξε εμπιστοσύνη και μου ανέθεσε το συγκεκριμένο θέμα, όπως και για την φιλοξενία του στον εργαστηριακό του χώρο.

Ευχαριστώ, την Επίκουρη Καθηγήτρια **Κα. Αντωνέλου Μαριάννα** για την συμμετοχή της στην τριμελή επιτροπή.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια **Κα. Γεωργατζάκου Χαρά**, για την επιστημονική της καθοδήγηση, τις πολύτιμες συμβουλές της και την βοήθεια της στην εκπόνηση και την συγγραφή της διπλωματικής εργασίας, παρά τον υψηλό φόρτο εργασίας της.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες και ευγνωμοσύνη, οφείλω στους συναδέλφους του ακτινολογικού τμήματος του **Γενικού Νοσοκομείου ΚΑΤ**, καθώς και στους φίλους μου για την εθελοντική συμμετοχή τους στην συγκεκριμένη εργασία. Ακόμη ευχαριστώ την προϊστάμενη μου του ακτινολογικού τμήματος **Κα. Ψαρρή Βασιλική** για την πραγματοποίηση των αιμοληψιών και την παραχώρηση του μηχανήματος ακτίνων Χ, για την ακτινοβόληση του αίματος.

Επιπλέον, ευχαριστώ τον Αναπληρωτή Καθηγητή Αιματολογίας, ΓΝΑ Αττικού νοσοκομείου και οικογενειακό φίλο **Κ. Τσιριγώτη Παναγιώτη**, για την προθυμία του να μου παρέχει συμβουλές.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου και την οικογένεια μου που με στήριζαν καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μου, όπως και τους συμφοιτητές μου στο μεταπτυχιακό, για την συμπαράσταση.

### Συντομογραφίες

**Hb:** αιμοσφαιρίνη  
**Epo:** ερυθροποιητίνη  
**PS:** φωσφατιδυλοσερίνη  
**PC:** φωσφατιδυλοχολίνη  
**PE:** φωσφατιδυλεθανολαμίνη  
**PI:** φωσφατιδιλοϊνοσιτόλη  
**SM:** σφιγγομυελίνη  
**PKC:** πρωτεϊνική κινάση C  
**TSP1:** θρομβοσπονδίνη-1  
**SRPα:** σωματίδιο αναγνώρισης σήματος α  
**Araf1:** πρωτεΐνη ενεργοποίησης της απόπτωσης 1  
**FAsL:** προσδέτης FAs  
**Cytc:** κυτόχρωμα C.  
**ABD:** περιοχή πρόσδεσης της ακτίνης.  
**AE1:** ανιοντοανταλλάκτης E1  
**RES:** μονοκυτταρικό φαγοκυτταρικό σύστημα  
**ROS:** δραστικές ρίζες οξυγόνου  
**RNS:** δραστικές ρίζες αζώτου  
**IR ή IA:** Ιονίζουσα ακτινοβολία  
**LET:** γραμμικά εναποτιθέμενη ενέργεια  
**Gy:** μονάδα μέτρησης της απορροφούμενης δόσης της ιονίζουσας ακτινοβολίας  
**SSB:** σπάσιμο ενός κλώνου της αλυσίδας  
**DSB:** σπάσιμο δύο κλώνων της αλυσίδας  
**Fe<sup>2+</sup>:** δισθενής σίδηρος  
**Fe<sup>3+</sup>:** τρισθενής σίδηρος  
**SEM:** ηλεκτρονικό μικροσκόπιο Σάρωσης  
**TEM:** ηλεκτρονικό μικροσκόπιο Διέλευσης  
**Hp:** απποσφαιρίνη  
**Hpx:** αιμοπηξίνη  
**fHb:** ελεύθερη αιμοσφαιρίνη

# A. Εισαγωγή

## 1. Το αίμα και τα συστατικά του

Το αίμα αποτελεί το υγρό στοιχείο που κυκλοφορεί μέσω των αγγείων στον ανθρώπινο οργανισμό. Σε έναν μέσο ενήλικα ο όγκος του αίματος κυμαίνεται στα 5 λίτρα. Αποτελείται από τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα λευκοκύτταρα, τα αιμοπετάλια και το πλάσμα. Οι βασικότερες λειτουργίες του είναι:

- η μεταφορά του  $O_2$  και των θρεπτικών συστατικών στους ιστούς
- η απομάκρυνση των παραπροϊόντων του μεταβολισμού στους νεφρούς και το ήπαρ,
- η μεταφορά αντισωμάτων για αντιμετώπιση των λοιμώξεων,
- η δημιουργία θρόμβων με την συμβολή των αιμοπεταλίων για αποφυγή μεγάλων ποσοτήτων αίματος,
- η ρύθμιση της θερμοκρασίας του σώματος (Dean, 1970) .

### 1.1 Έμφορμα συστατικά

#### 1.1.1 Λευκά Αιμοσφαίρια

Τα λευκά αιμοσφαίρια είναι κύτταρα που αποτελούν το 1% του συνολικού όγκου του αίματος και έχουν διάρκεια ζωής 3-4 ημέρες (Hedayat et al., 2019). Ο βασικός τους ρόλος, είναι η συμμετοχή τους στην άμυνα του οργανισμού έναντι παθογόνων μικροοργανισμών (Qureshi, 2016). Ωριμάζουν στον μυελό των οστών και έπειτα εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος. Υπάρχουν πέντε τύποι λευκοκυττάρων: τα λεμφοκύτταρα, τα μονοκύτταρα, τα ουδετερόφιλα, τα ηωσινόφιλα και τα βασεόφιλα.

### 1.1.2 Αιμοπετάλια

Τα αιμοπετάλια είναι κυτταρικά θραύσματα, διαμέτρου 2-3  $\mu\text{m}$  (Campbell, 2008). Προέρχονται από τα μεγακαρυοκύτταρα και παράγονται στον μυελό των οστών και στον πνεύμονα (όπως έχει παρατηρηθεί προσφάτως), (Lefrançois et al., 2017). Έχουν χρόνο ζωής 5-7 ημέρες και ο ρόλος τους είναι η διατήρηση της ομοιόστασης του περιβάλλοντος του αγγείου με την πήξη του αίματος. Τέλος, εμποδίζουν και την είσοδο των παθογόνων οργανισμών (Hollinstat, 2017).

### 1.1.3 Ερυθροκύτταρα

Τα ώριμα ερυθροκύτταρα αποτελούν το 50-60% της ποσότητας του αίματος, έχουν σχήμα αμφίκοιλου δίσκου με μέγεθος 6-8  $\mu\text{m}$ , πάχος 1,5-2,5  $\mu\text{m}$  με μια ωχρή κεντρική περιοχή που αποτελεί το 1/3 της διαμέτρου του κυττάρου (War et al., 2018). Έχουν διάρκεια ζωής περίπου 100-120 ημέρες και προέρχονται από τα πρώιμα αιμοποιητικά κύτταρα, τα οποία επάγονται από την ορμόνη ερυθροποιητίνη (EPO) που παράγεται στους νεφρούς. Είναι υπεύθυνα για την μεταφορά οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα μεταξύ των ιστών και τους πνεύμονες, μέσω της πλούσιας σε σίδηρο κυτοσολικής αιμοσφαιρίνης (Ingley & Klinken, 2006). Επίσης συμβάλλουν και στην ομοιόσταση της οξεοβασικής ισορροπίας του οργανισμού (Kuhn et al., 2017).

### 1.1.4 Συστατικά των ερυθροκυττάρων

#### Αιμοσφαιρίνη

Αποτελείται από δύο ζεύγη πολυπεπτιδικών αλυσίδων, όπου η καθεμία περιέχει ένα μόριο αίμης και σχηματίζουν μεταξύ τους ένα σφαιρικό μόριο, που απαρτίζει την πρωτογενή δομή της αιμοσφαιρίνης (Εικόνα 1). Η ανθρώπινη αιμοσφαιρίνη αποτελείται από δύο  $\alpha$  και δύο  $\beta$  αλυσίδες ( $\alpha_2\beta_2$ ) και στην εμβρυϊκή φάση από δύο  $\alpha$  και δύο  $\gamma$  ( $\alpha_2\gamma_2$ ). Η αίμη φέρει ένα μόριο πρωτοπορφωρίνης IX, στο κέντρο της οποίας βρίσκεται ένα μόριο σιδήρου. Οι πρωτοπορφωρίνες συνίστανται από τέσσερις δακτυλίους πυρρόλης, οι οποίες



συνδέονται μεταξύ τους με τέσσερις μεθυλικές ομάδες, δυο βινυλικές ομάδες και δυο προπιονικές και σχηματίζουν τον τετραπυρρολικό δακτύλιο. Τα τέσσερα άτομα αζώτου που υπάρχουν στον πυρολλικό δακτύλιο συνδέονται με ένα άτομο δισθενούς σιδήρου δημιουργώντας την οξυαιμοσφαιρίνη (Marengo-Rowe, 2006). Με αυτόν το τρόπο μεταφέρεται η αιμοσφαιρίνη στα τριχοειδή αγγεία.



Εικόνα 1: Τεταρτοταγής δομή της αιμοσφαιρίνης. Συγκροτείται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες και αποτελείται από δύο πανομοιότυπα διμερή. (Ανατύπωση από Bergetal “Biochemistry”. 5th edition, 2002)

Ο ρόλος της αιμοσφαιρίνης είναι η μεταφορά του οξυγόνου από τους πνεύμονες προς τους ιστούς και του διοξειδίου του άνθρακα από τους ιστούς προς τους πνεύμονες, αντίστοιχα. Όμως σε ένα ποσοστό 3% η οξυαιμοσφαιρίνη οξειδώνεται σε μεθαιμοσφαιρίνη (συνδέεται με ένα άτομο τρισθενούς σιδήρου), με αποτέλεσμα να είναι αδύνατη η μεταφορά οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα. Ακόμη, η αιμοσφαιρίνη είναι υπεύθυνη για την μεταφορά του μονοξειδίου του αζώτου το οποίο είναι σημαντικό για πολλές μεταβολικές διεργασίες (αγγειοδιαστολή, νευροδιαβίβαση κτλ), (Bilska-Wilkoszetal., 2017).

## Πλάσμα

Το πλάσμα του αίματος είναι ένα διαφανές κιτρινωπό υγρό το οποίο καταλαμβάνει περίπου το 55% του αίματος. Αποτελείται από 90% νερό καθώς και σάκχαρα ηλεκτρολύτες και ορμόνες. Ο κύριος ρόλος του είναι:

- η μεταφορά θρεπτικών ουσιών (λευκωματίνες, ορμόνες, κτλ) στην κυκλοφορία του αίματος
- η αποβολή παραπροϊόντων του μεταβολισμού
- η διατήρηση οσμωτικής πίεσης του αίματος (Greer et al., 2014).

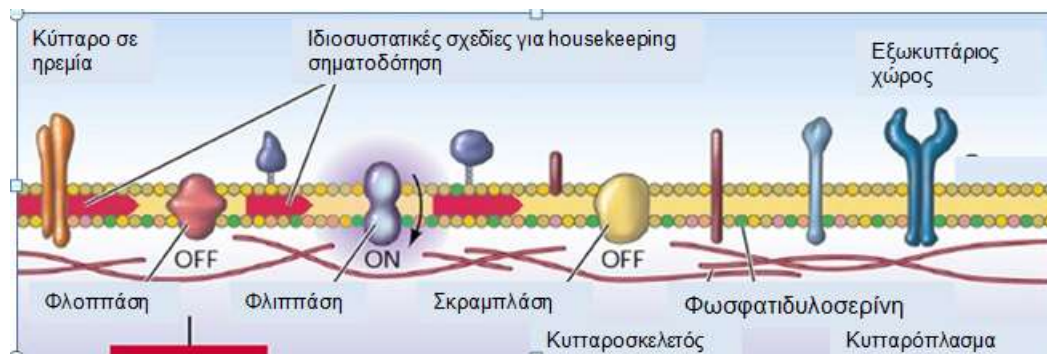
## 2. Ερυθροκυτταρική μεμβράνη

Το ώριμο ερυθροκύτταρο κατά τη διάρκεια της ζωής του (~120 ημέρες), υφίσταται συνεχώς διάφορες φυσικοχημικές αλλαγές, οι οποίες λόγω των μηχανισμών που διαθέτει καθίστανται αναστρέψιμες (Björn et al., 2003) διατήρηση της δομικής του ακεραιότητας επιτυγχάνεται μέσω της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης που διαθέτει. Αναλυτικότερα, η ερυθροκυτταρική μεμβράνη είναι μια διπλοστιβάδα που αποτελείται κατά 50% από πρωτεΐνες, 43% λιπίδια καθώς και 7% υδατάνθρακες (Brosche, 1989). Ουσιαστικά η μεμβράνη του ερυθροκυττάρου αγκυροβολείται σε ένα δυσδιάστατο δίκτυο των σκελετικών πρωτεϊνών, είτε με τη μεσολάβηση των κυτταροπλασματικών περιοχών των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, είτε απευθείας (Li and Lykotrafitis, 2014). Με αυτόν τον τρόπο διατηρείται η ελαστική δομή, και η ικανότητα παραμόρφωσής της, χωρίς την απώλεια της σταθερότητας της και του σχήματος του κυττάρου.

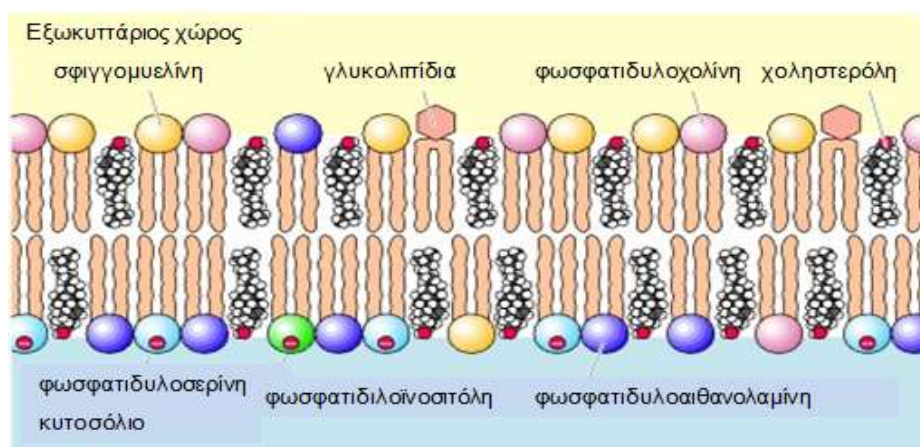
### 2.1 Μεμβρανικά λιπίδια

Η λιπιδική διπλοστιβάδα αποτελείται από 60% φωσφολιπίδια, 30% χοληστερόλες και 10% γλυκολιπίδια, τα οποία συνδέονται με τον κυτταροσκελετό (Oliveira and Saldanha, 2010). Τα φωσφολιπίδια, διαχωρίζονται στην φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE), τη φωσφατιδυλοσερινή (PS), τη φωσφατιδιλοϊνοσιτόλη (PI) που βρίσκονται στο εσωτερικό της μεμβράνης, ενώ η σφιγγομυελίνη (SM) και η φωσφατιδυλοχολίνη (PC) βρίσκονται στο εξωτερικό (Εικόνα 3). Η ασυμμετρία αυτή συμβάλλει στην

σταθερότητα της μεμβράνης, τη ρευστότητα και τη μηχανική αντοχή. Η ασυμμετρία της μεμβράνης προκύπτει, εξαιτίας των διαφορετικών τύπων ενεργο-εξαρτώμενων και μη, πρωτεϊνών μεταφορέων των φωσφολιπιδίων (Daleke,2008). Μια από αυτές πρωτεΐνες είναι η ATP-εξαρτώμενη φλιπάση (*flippase*), η οποία συνεισφέρει στη μεταφορά των φωσφολιπιδίων (*PS, PE*) από το εξωτερικό περιβάλλον στο εσωτερικό, οι φλοπάσες (*florppases*) που μεταφέρουν τα λιπίδια (χοληστερόλη,PC,SL) προς την αντίθετη κατεύθυνση, με κατανάλωση ενέργειας. Τέλος, οι σκραμπλάσες ( $Ca^{2+}$ -εξαρτώμενες και ATP-μη εξαρτώμενες), μεταφέρουν μη επιλεκτικώς και αμφιδρόμως τα φωσφολιπίδια από έσω προς τα έξω, (Εικόνα 2), (Menon& Herrmann,2013).



Εικόνα 2: Συμβολή της φλοπάσης, φλιππάσης και σκραμπλάσης στη μεταφορά των λιπιδίων, ώστε να διατηρηθεί η ασυμμετρία της μεμβράνης και η σταθερότητα της. (Ανατύπωση από Hugel et al., 2005)



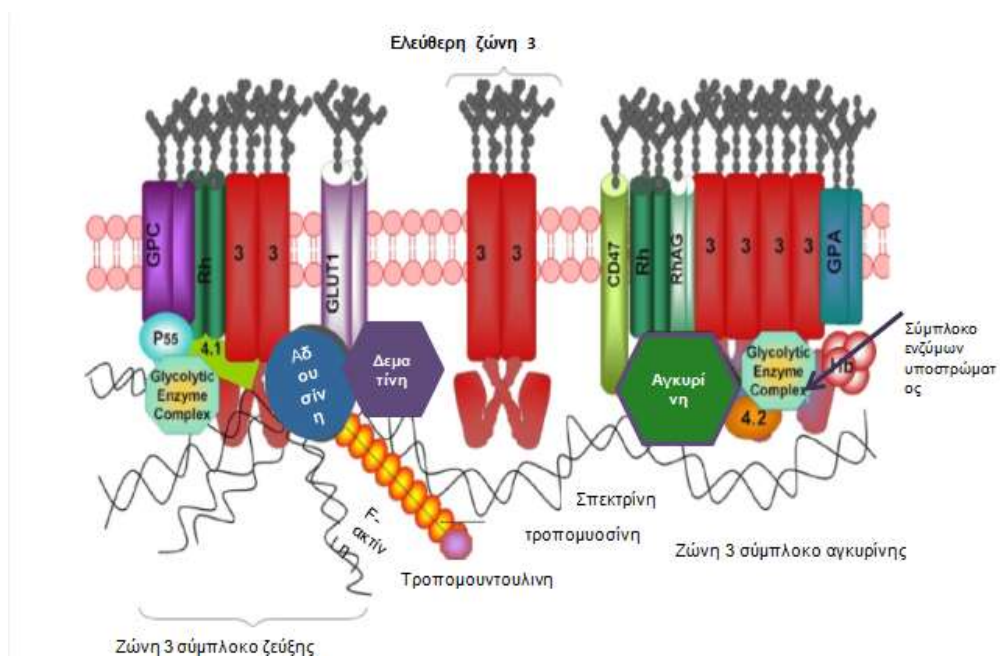
Εικόνα 3: Η εξωτερική μονοστιβάδα περιλαμβάνει την SM, PC και τα γλυκολιπίδια, ενώ η εσωτερική την PS, PE και PI. Η χοληστερόλη εντοπίζεται και στις δύο μονοστιβάδες. (Ανατύπωση από M. Cooper, 2000).

## 2.2 Διαμεμβρανικές πρωτεΐνες

### 2.2.1 Ζώνη 3 (Band 3)

Βασική διαμεμβρανική πρωτεΐνη των ερυθροκυττάρων, αποτελεί η ζώνη 3 που συντελεί το 25% των συνολικών μεμβρανικών πρωτεϊνών. Κάθε ερυθροκύτταρο περιέχει  $10^6$  αντίγραφα υπό τη μορφή διμερών, τετραμερών ή ολιγομερών. Ο ρόλος της είναι να δρα ως προσδέτης της μεμβράνης με τον κυτταροσκελετό (Lu & Liu, 2007). Αυτό επιτυγχάνεται με τη συνδρομή πολλών πρωτεϊνών και τετραμερών της ζώνης 3, τα οποία μέσω της αγκυρίνης προσδένονται σε νημάτια σπεκτρίνης (σύμπλοκο αγκυρίνης).

Επίσης, υπό τη μορφή διμερών συνδέεται στο σύμπλοκο της σπεκτρίνης-ακτίνης και της πρωτεΐνης 4.1R, μέσω της αδουσίνης, δημιουργώντας το σύμπλοκο ζεύξης (*Junctional Complex*) (Εικόνα 4). Με αυτόν τον τρόπο διατηρείται η ακεραιότητα της ερυθροκυτταρική μεμβράνης (Kodippiliet al., 2009). Εκτός από τον ρόλο του προσδέτη έχει και τον ρόλο του μεταφορέα ανιόντων, που συμμετέχουν στην αναπνοή (απελευθέρωση του οξυγόνου από την αιμοσφαιρίνη), (Lu & Liu, 2007).

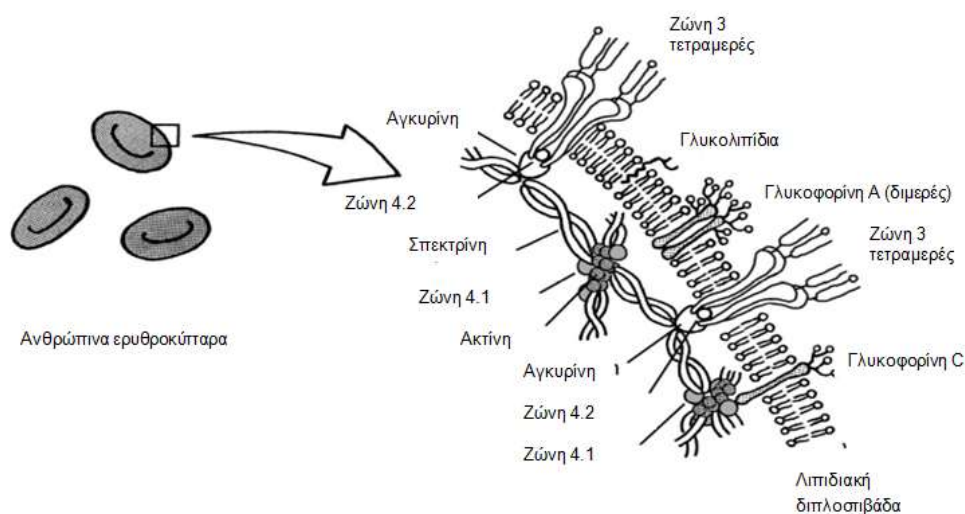


Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση των συμπλόκων της ζώνης 3 στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη (Ανατύπωση από Kodippiliet al., 2011)

## 2.2.2. Γλυκοφορίνες

Οι γλυκοφορίνες ανήκουν στην οικογένεια των σιαλογλυκοπρωτεϊνών που το αμινοτελικό τους άκρο βρίσκεται εξωτερικά της μεμβράνης και συνδέονται με σιαλικά οξέα. Κατατάσσονται σε γλυκοφορίνες Α (GPA), Β (GPB), C (GPC), D (GPD) και Ε (GPE) (Cartron, & Rahuel, 1992). Ο βασικός τους ρόλος είναι, μέσω του υψηλού ποσοστού των σιαλικών οξέων που περιέχουν, να αποδίδουν αρνητικό φορτίο στην ερυθροκυτταρική επιφάνεια, πράγμα το οποίο συμβάλλει στην αποφυγή δημιουργίας συσσωματωμάτων.

Η γλυκοφορίνη Α (GPA) αλληλεπιδρά με την ζώνη 3 της ανθρώπινης ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, συμμετέχοντας σε μεταφραστικές τροποποιήσεις και παράλληλα αποτελεί μοριακή συνοδό για τη μεταφορά μορίων στη μεμβράνη (Giger et al., 2016). Η GPC και η GPD πρωτεΐνες, αλληλεπιδρούν με τον κυτταροσκελετό, μέσω της πρωτεΐνης 4.1R, συνεισφέροντας στη διατήρηση των μηχανικών ιδιοτήτων της μεμβράνης, άρα και του σχήματος του ερυθροκυττάρου (Εικόνα 5) (Aoki, 2017).



Εικόνα 5: Αναπαράσταση της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης και της θέσης των γλυκοφορινών στα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα. (Ανατύπωση από Aoki, 2017).

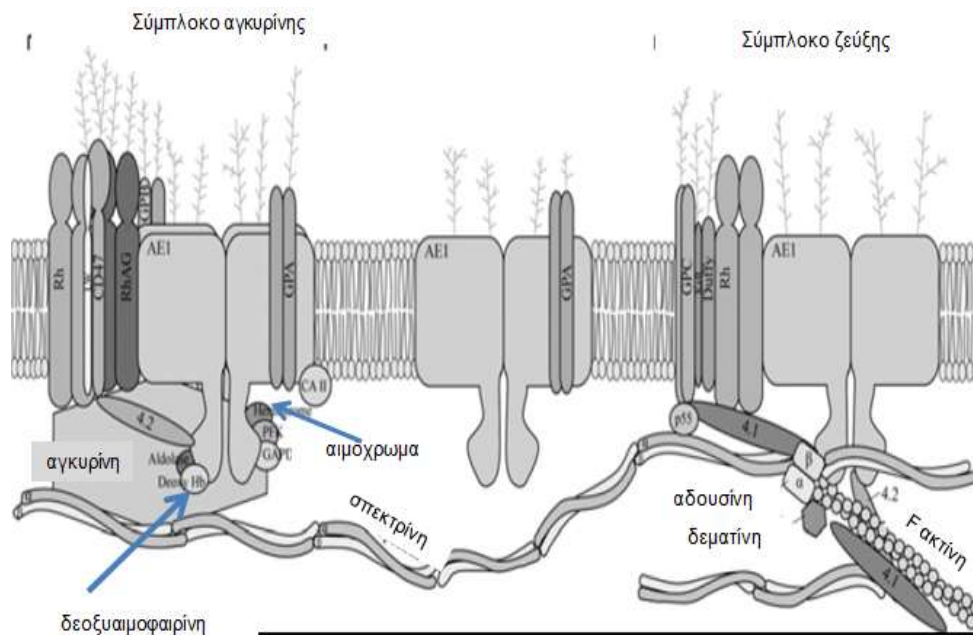
### **2.2.3 Μεταφορέας Γλυκόζης**

Ο μεταφορέας γλυκόζης-1 (GLUT-1) βρίσκεται στα ερυθροκύτταρα σε συγκέντρωση 200.000 μορίων ανά κύτταρο και συγκροτεί το 10% της εσωτερικής στιβάδας της μεμβράνης. Ο ρόλος του είναι να μεταφέρει την γλυκόζη στο εσωτερικό των ερυθροκυττάρων ενώ συγχρόνως αναλαμβάνει και την μεταφορά του L-αφυδροασκορβικού οξέος (DHA) (Vrthonac et al.,2014). Η μεταφορά ρυθμίζεται από την στοματίνη, η οποία αναλαμβάνει την εναλλαγή της μεταφοράς είτε γλυκόζης είτε DHA, καθώς αυτά τα δύο μόρια παρουσιάζουν κοινά χαρακτηριστικά και δεν ανταγωνίζονται μεταξύ τους την θέση πρόσδεσης. Ακόμη, έχει παρατηρηθεί ότι ο GLUT-1, συνδέεται με τα διμερή της ζώνης 3 μέσω της δεματίνης, της αδουσίνης και των πρωτεϊνών 4.1 και 4.2, συγκροτώντας το μακροσύμπλοκο που συνδέει το σύμπλοκο ζεύξης (junctional complex) στην πλασματική μεμβράνη (Guizouarn & Allegrini, 2020).

## **2.3 Σκελετικές**

### **2.3.1 Σπεκτρίνη**

Η σπεκτρίνη (Menon & Gupton, 2016) είναι μια κυτταροσκελετική πρωτεΐνη-ικριώμα (scaffold protein), η οποία αποτελεί το 25-30% των πρωτεϊνών της μεμβράνης. Βρίσκεται σε μορφή τετραμερούς με 2α (α-Sp) υπομονάδες και 2β (β-Sp). Η α-Sp έχει μοριακό βάρος 240 kDa, ενώ η β-Sp 220 kDa. Η α και η β-σπεκτρίνη συνδέονται μεταξύ τους με αντιπαράλληλο τρόπο, σχηματίζοντας ετεροδιμερή, εκ των οποίων μεταξύ τους ασκούνται διάφορες πλευρικές αλληλεπιδράσεις (Εικόνα 6)(Lu& Liu, 2007). Η έμφυτη ελαστικότητα της σπεκτρίνης είναι ένας από τους παράγοντες σύμφωνα με τους οποίους το ερυθροκύτταρο διατηρεί την ελαστικότητά του κατά το πέρασμά του στο κυκλοφορικό σύστημα. Επίσης, λόγω των πλευρικών αλληλεπιδράσεων των διμερών της σπεκτρίνης και των σκελετικών πρωτεϊνών, διατηρείται η δομική στήριξη και οι μηχανικές ιδιότητες της λιπιδικής διπλοστιβάδας. Τέλος μεταλλάξεις της πρωτεΐνης μπορεί να οδηγήσουν σε κάποιες ασθένειες όπως πχ. παρουσία αιμολυτικής αναιμίας (Zhang et al.,2013).



Εικόνα 6: Αναπαράσταση της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης παρουσία διαμεμβρανικών πρωτεϊνών και των ετεροδιμερών α και β σπεκτρίνης. (Ανατύπωση από van den Akker et al., Blood Cell Mol Dis 2010; 45:1)

### 2.3.2 Αγκυρίνη

Η αγκυρίνη (ζώνη 2.1) είναι πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού που αποτελείται από 1881 αμινοξικά κατάλοιπα και έχει μοριακό βάρος 206 kDa (Lu & Liu, 2007). Είναι απαραίτητη για την κίνηση ιόντων και των μορίων μεταξύ των κυτταρικών μεμβρανών. Η παρουσία μεταλλάξεων στο μόριό της της μπορεί να προκαλέσουν κληρονομική σφαιροκυττάρωση (Cunha & Mohler, 2009). Χωρίζεται σε τρεις λειτουργικές περιοχές διαφορετικού μεγέθους:

- Την αμινοτελική περιοχή 89-kDa η οποία προσδένεται στην ζώνη 3 και στην τουμπουλίνη.
- Την κεντρική περιοχή 62-kDa μέσω της οποίας η σπεκτρίνη αγκυροβολεί στην κυτταρική μεμβράνη.
- Τη λειτουργική περιοχή 55-kDa, που είναι ευαίσθητη σε πρωτεάσες και συμμετέχει στην αλληλεπίδραση της αγκυρίνης με την σπεκτρίνη και την ζώνη 3. Αυτή η περιοχή επηρεάζει τις υδροδυναμικές ιδιότητες της αγκυρίνης και κατ' επέκταση την σύνδεση του κυτταροσκελετού με την διπλοστιβάδα (Lu & Liu, 2007).

### **2.3.3 Πρωτεΐνη 4.1 R**

Οι πρωτεΐνες 4.1 R αποτελούν το 6% των κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών και χωρίζονται σε δύο ισομορφές την 4.1a και 4.1b με μοριακό βάρος 80 kDa και 78 kDa αντίστοιχα. Έχει δύο βασικές περιοχές: α) την 10kDa περιοχή που αλληλεπιδρά με την αμινοτελική περιοχή της σπεκτρίνης και είναι προσδέτης μεταξύ της σπεκτρίνης και της ακτίνης και β) την αμινοτελική περιοχή της (Lu & Liu, 2007), που προσδένεται με την GPC την p55 και ζώνη 3 (Salomao, 2008) και σε αρνητικά φορτισμένα λιπίδια της εσωτερικής μονοστιβάδας της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, συνεισφέροντας στη σύνδεση των απομακρυσμένων περιοχών των τετραμερών της Sp στην μεμβράνη (Lu & Liu, 2007). Βλάβες στην πρωτεΐνη 4.1R, οδηγούν σε απώλεια σταθερότητας της μεμβράνης καθώς και στον κατακερματισμό της (Salomao, 2008).

### **2.3.4 Πρωτεΐνη 4.2**

Η πρωτεΐνη 4.2 καταλαμβάνει το 5% των πρωτεϊνών του υπομεμβρανικού σκελετού. Αλληλεπιδρά με την αμινοτελική περιοχή της ζώνης 3 καθώς και με την αγκυρίνη (Lu & Liu, 2007). Επίσης, συνδέεται με την πρωτεΐνη CD47 του Rh συμπλόκου και αγκυροβολεί στον υπομεμβρανικό κυτταροσκελετό. Έχει μελετηθεί ότι έχει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της μεμβρανικής ακεραιότητας με την αλληλεπίδρασή της με την ζώνη 3 και άλλα συστατικά του κυτταροσκελετού. Ακόμη, μέσω της αλληλεπίδρασης με το CD47, φαίνεται να συμβάλλει στη επιβίωση των ερυθροκυττάρων στην κυκλοφορία. Τέλος, σε περίπτωση απουσίας της πρωτεΐνης παρατηρείται μεταβολή στο σχήμα των ερυθροκυττάρων σε σφαιροκύτταρα και πρόκληση αιμολυτικής αναιμίας (Satchwell et al., 2009).

## **3. Ερυθρόπτωση**

Τα ώριμα ερυθροκύτταρα επιβιώνουν στην κυκλοφορία περίπου 120 ημέρες. Κατά τη διάρκεια αυτή, ορισμένα κύτταρα μπορεί να πληγούν από διάφορα ενδοκυττάρια ή εξωκυττάρια ερεθίσματα και να οδηγηθούν σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο ή και στην ερυθρόπτωση. Η διαδικασία



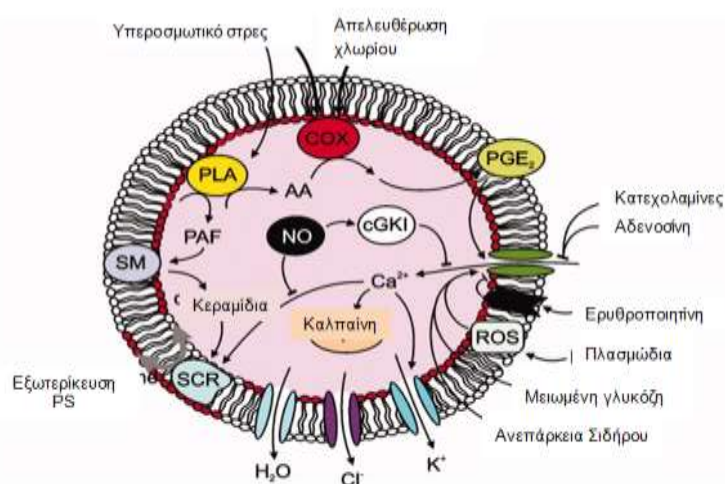
της ερυθρόπτωσης (eryptosis), μοιάζει με τον μηχανισμό απόπτωσης των εμπύρηνων κυττάρων. Αποτελεί μηχανισμό απομάκρυνσης των τραυματισμένων ή μολυσμένων κυττάρων πριν την αιμόλυση, με την ταυτόχρονη απελευθέρωση ενδοκυτταρικού υλικού (υπό την μορφή κυστιδίων), χωρίς να υπάρχει ρήξη τα πλασματικής μεμβράνης (Lang, 2012).

Ο μηχανισμός της ερυθρόπτωσης περιλαμβάνει τη σμίκρυνση του κυττάρου, τη κυστιδοποίηση της μεμβράνης και την εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης (PS)(Εικόνα 7)(Bissinger et al., 2018).

Αναλυτικότερα, η συρρίκνωση του ερυθροκυττάρου προκύπτει από την αύξηση του κυτοσολικού  $Ca^{2+}$  κατά τη διάρκεια οσμωτικού και οξειδωτικού στρες. Η αύξηση αυτή του  $Ca^{2+}$ , οδηγεί στην ενεργοποίηση του καναλιού  $Ca^{2+}$ - $K^{+}$  ή αλλιώς καναλιών Gardos, με αποτέλεσμα την απώλεια νερού και συγκέντρωσης χλωριούχου καλίου και στη συνέχεια στη μείωση του όγκου του κυττάρου (Repsold & Joubert, 2018).

Η εξωτερίκευση της PS οφείλεται στην ανακατάταξη των φωσφολιπιδίων, η οποία συμβαίνει είτε λόγω της ενεργοποίησης της  $Ca^{2+}$ -εξαρτώμενης σκραμπλασης ή/και του περιορισμού από την ATP και  $Ca^{2+}$ -εξαρτώμενη αμινοφωσφολιπιδική μετατοπίαση (Lang et al., 2008).

Η κυστιδοποίηση πραγματοποιείται σε καταστάσεις στρες με αποτέλεσμα να προκαλεί αποδιοργάνωση του υπομεμβρανικού σκελετού.



Εικόνα 7:Απεικόνιση της σηματοδότησης της ερυθρόπτωσης, συμπεριλαμβανομένου των μηχανισμών ενεργοποίησης και αναστολής της εισόδου  $Ca^{2+}$ , σχηματισμός κεραμιδίων, έκθεση PS, ενεργοποίηση καλπαίνων. (Ανατύπωση από: Föllmer et al., 2008).

#### 4. Γήρανση των ερυθροκυττάρων

Η γήρανση των ερυθροκυττάρων παρουσιάζει κλινικό ενδιαφέρον προς μελέτη, καθώς αποτελεί μια σειρά χρονοεξαρτώμενων μοριακών γεγονότων που οδηγούν στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (Antonelou et al., 2010). Τα ερυθροκύτταρα έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν την αυτοκαταστροφή τους, με κύριο μεσολαβητή των σηματοδοτικών τους μηχανισμών, τη λιπιδικής φύσεως μεμβράνη τους (Kriebardis et al., 2007).

Με το πέρασμα της ηλικίας τους τα ερυθροκύτταρα βιώνουν μια σειρά από μεταβολικές αλλαγές όπως η κυστιδοποίηση της μεμβράνης τους, διαταραχές στην ομοιόσταση των ιόντων (εισροή ιόντων  $Ca^{2+}$ -εκροή  $Cl^-$ ), τροποποιήσεις της αιμοσφαιρίνης (γλυκοζυλίωση), γεωμετρικές και μηχανικές αλλαγές στο σχήμα των κυττάρων (συρρίκνωση και αύξηση της κυτταρικής τους πυκνότητας), έκφραση διαφόρων δεικτών απομάκρυνσης στην κυκλοφορία (CD47), σύμπλοκο σπεκτρίνης-αιμοσφαιρίνης, νεοαντιγόνα γήρανσης). Ακόμη, παρατηρείται και ενεργοποίηση των κασπασών μέσω του εξωγενούς μονοπατιού της απόπτωσης, καθώς και μεταβολές στην φωσφολιπιδιακή ασυμμετρία και κατ' επέκταση στη σχέση κυτταροσκελετού και μεμβράνης.

Όλες αυτές οι τροποποιήσεις έχουν σαν κοινό χαρακτηριστικό ότι έμμεσα ή άμεσα οδηγούν τα γηρασμένα κύτταρα στην ερυθροφαγοκυττάρωση (Kaufman 2018;Antonelou et al., 2010).

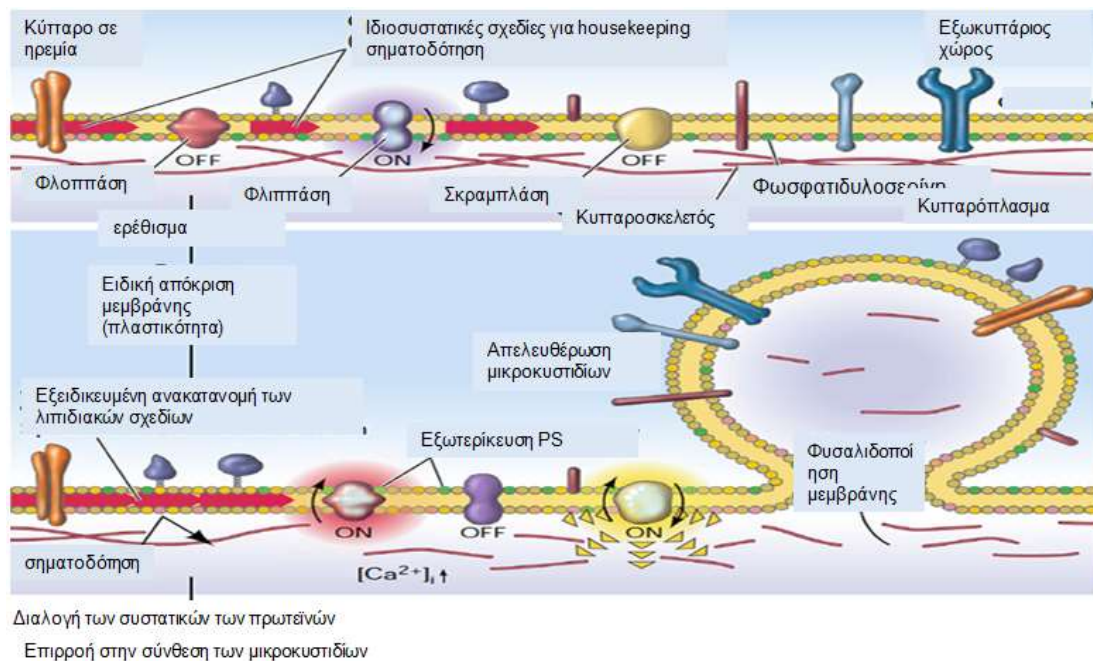
##### 4.1 Κυστιδοποίηση (Vesiculation)

Η κυστιδοποίηση της μεμβράνης είναι μια ρυθμιζόμενη διαδικασία η οποία επιταχύνεται με τη γήρανση των ερυθροκυττάρων, ενώ παράλληλα, αποτελεί μέρος της ωρίμανσής τους (Antonelou et al., 2010).

Η κυστιδοποίηση ωφελεί τα ερυθροκύτταρα με την απομάκρυνση συστατικών τα οποία έχουν υποστεί βλάβη μέσω μηχανικού, οσμωτικού ή οξειδωτικού στρες (Kralj-Iglič, 2015). Συγχρόνως όμως, μπορεί να έχει αρνητικές επιπτώσεις διαμέσου της μη αναστρέψιμης απώλειας της μεμβράνης και της αιμοσφαιρίνης. Έχει παρατηρηθεί ότι, κατά τη διάρκεια της ζωής του το ερυθροκύτταρο, μέσω της εξωκυστιδοποίησης χάνει περίπου το 20% του

όγκου του και ταυτόχρονα αυξάνει την συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης κατά 14%,

Ακόμη έχει μελετηθεί, ότι η διαταραχή της σύνδεσης του κυτταροσκελετού με τη μεμβράνη είτε λόγω αύξησης κατιόντων  $Ca^{2+}$  είτε λόγω αποικοδόμησης πρωτεϊνών, οδηγεί σε ανακατανομή της διπλοστιβάδας, εξωτερίκευση PS και δημιουργία σφαιρικών κυστιδίων που περιέχουν θραύσματα πρωτεϊνών (κυρίως διαμεμβρανικών ή και σκελετικών) και τροποποιημένη (γλυκοζυλιωμένη) αιμοσφαιρίνη. Αυτά τα μικροκυστίδια περιέχουν δείκτες αναγνώρισης και οδηγούνται σε φαγοκυττάρωση (Εικόνα 8)(Nguyen et al., 2017). Με άλλα λόγια, η κυστιδοποίηση μέσω της έκθεσης δεικτών γήρανσης και της ταυτόχρονης απομάκρυνσης μη λειτουργικών πρωτεϊνών, (καταστάσεις που προκαλούνται από τη μειωμένη αλληλεπίδραση κυτταροσκελετού-μεμβράνης), οδηγεί σε σταδιακή αύξηση της πυκνότητας του κυττάρου με ταυτόχρονη μείωση της κυτταρικής παραμορφωσιμότητας και της μεμβρανικής ελαστικότητας (Antonellou et al., 2010).



Εικόνα 8: Απεικόνιση της μεμβράνης: Η πλασματική μεμβράνη αποκρίνεται στο κυτταρικό ερέθισμα, προκαλείται ανακατανομή των πρωτεϊνών της, αλλαγή στη δομή των λιπιδιακών σχεδίων, εξωτερίκευση PS, φυσαλιδοποίηση της μεμβράνης και απελευθέρωση των μικροκυστιδίων (Ανατύπωση από Hugel et al., 2005).

## 4.2 Μεταβολές στην ομοιόσταση του $\text{Ca}^{2+}$

Οι διαταραχές στην ομοιόσταση του  $\text{Ca}^{2+}$  φαίνεται να αποτελούν μέρος του μηχανισμού της γήρανσης, ο οποίος είτε λειτουργεί σαν ένας παράγοντας που την πυροδοτεί είτε είναι αποτέλεσμα αυτής. Η εισροή των ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$  στο εσωτερικό του ερυθροκυττάρου σχετίζονται με:

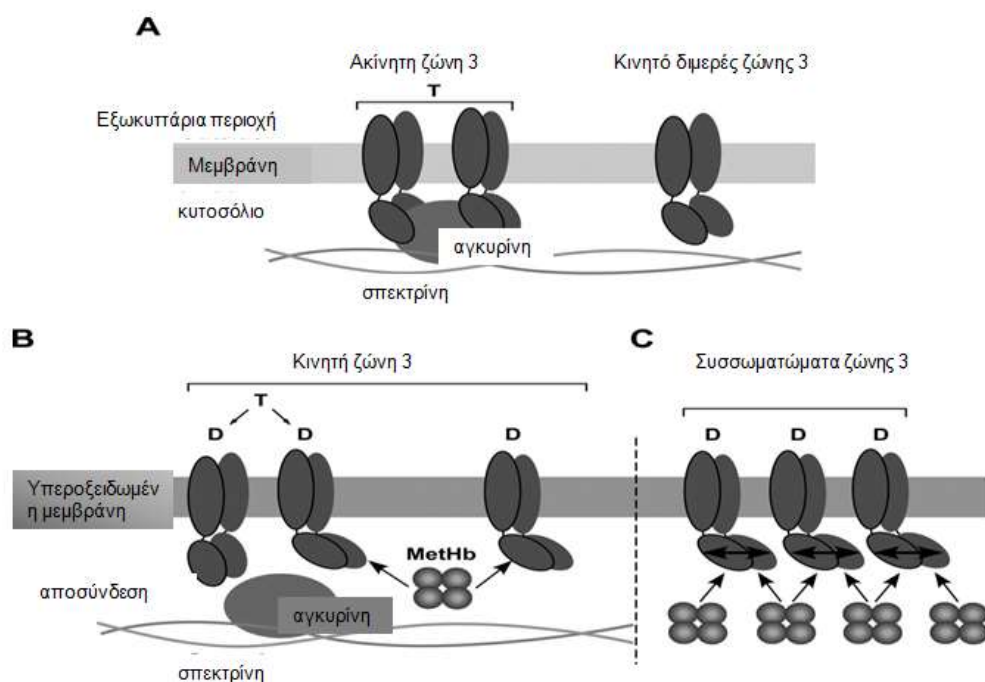
1. το οξειδωτικό στρες
2. την κυστιδοποίηση
3. την αφυδάτωση
4. διαταραχές στον βαθμό παραμόρφωσης της μεμβράνης.

Τελικά, η αύξηση των ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$  αποτελεί σημαντικό παράγοντα απόκρισης σε οξειδωτικές βλάβες και συγχρόνως παίζει σημαντικό ρόλο στην ακεραιότητα και συμμετρία των συστατικών της μεμβράνης, καθώς και στην μορφολογία και φυσιολογία του κυττάρου ( Antonelou et al., 2010)

## 4.3 Μονοπάτι γήρανσης και ζώνη 3

Υπάρχει ένα ακόμη επιπλέον μονοπάτι στο οποίο εμπλέκονται διάφοροι μηχανισμοί του ανοσοποιητικού συστήματος και στο οποίο εμπλέκονται διάφορες μεταβολές στην διαμεμβρανική πρωτεΐνη της ζώνης 3 (Antonelou et al., 2010).

Πιο αναλυτικά, σε συνθήκες οξειδωτικού στρες το κύτταρο υφίστανται βλάβες όπως η μετατροπή της αιμοσφαιρίνης σε μεθ-αιμοσφαιρίνη και η υπεροξειδωση της μεμβράνης. Η συνεργιστική δράση αυτών μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία συσσωματωμάτων της ζώνης 3 (Εικόνα 9) (Arashiki et al, 2013). Οι αλλοιώσεις αυτές οδηγούν σε πρόσδεση αυτόλογων ανοσοσφαιρινών (IgG) και ενεργοποίηση του συμπληρώματος C3 στην μεμβράνη, καταλήγοντας σε ερυθροφαγοκυττάρωση (Antonelou et al., 2010).



Εικόνα 9: Μηχανισμός αποσυγκρότησης της ζώνης 3 από τον συνδυασμό υπεροξειδωσης της μεμβράνης και δημιουργία MetHb. Α) Ζώνη 3 υπό διμερή μορφή είναι αγκυροβολημένη με τον κυτταροσκελετό, μέσω της αγκυρίνης και ομοιόμορφα κατανεμημένη στη μεμβράνη. Το κινητό διμερές δεν συνδέεται με τον κυτταροσκελετό. Β) Υπεροξειδωση της μεμβράνης σε συνδυασμό με την MetHb, οδηγεί στην αποσύνδεση της ζώνης 3 με την αγκυρίνη και καρβονυλίωση της ζώνης 3. C) Η σύνδεση της ζώνης 3 ενισχύει τις δομικές αλλαγές στις άλλες περιοχές των διμερών της ζώνης 3, οδηγώντας σε υψηλή συγγένεια σύνδεσης της MetHb που επάγει την συσσωμάτωση της Band 3 (Ανατύπωση από Arashiki et al., 2013).

#### 4.4 Ελεύθερη αιμοσφαιρίνη και οξειδωτικό στρες

Υπό φυσιολογικές συνθήκες η αιμοσφαιρίνη βρίσκεται εντός των ερυθροκυττάρων και ο βασικός της ρόλος είναι η μεταφορά οξυγόνου στην κυκλοφορία. Όμως κατά την καταστροφή των ερυθροκυττάρων, πράγμα το οποίο δηλώνει αιμόλυση, λόγω εξωκυττάρου ερεθίσματος, έχουμε απελευθέρωση της αιμοσφαιρίνης στον εξωκυττάριο χώρο. Εκεί δεσμεύεται με την απτοσφαιρίνη (Hp) και αιμοπηξίνη (Hpx), γλυκοπρωτεΐνες που βρίσκονται στο πλάσμα και δεσμεύουν την πιθανή ελεύθερη αιμοσφαιρίνη και την αίμη, ώστε να αποφευχθεί η οξειδωσή τους (Conran & Almeida, 2016).

Στην περίπτωση που δεν ελεγχθεί αυτή η διαδικασία και δεν δράσει το αντιοξειδωτικό σύστημα του κυττάρου, τότε έχουμε επιβάρυνση του

οργανισμού από ενδοαγγειακή αιμόλυση που μπορεί να οδηγήσει σε παθολογικές καταστάσεις.

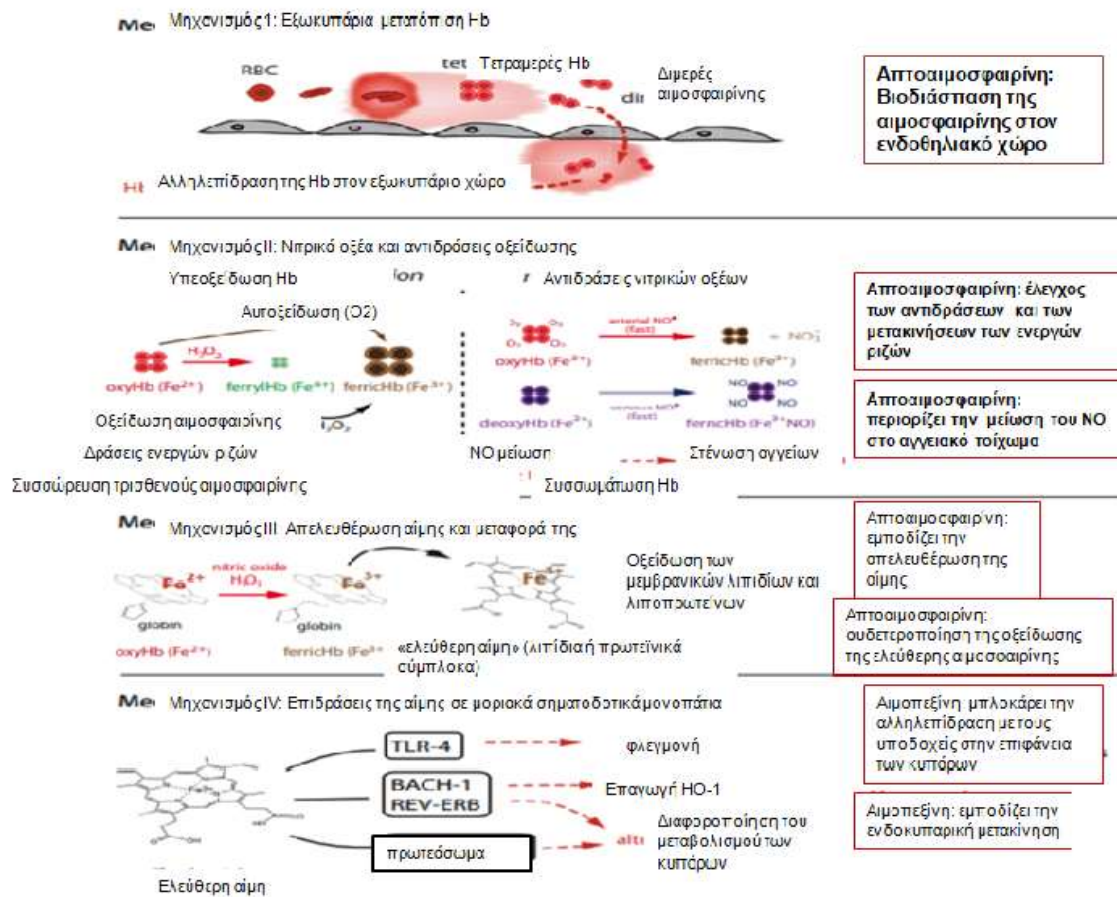
Όταν υπάρχει πλεόνασμα σε ελεύθερη αιμοσφαιρίνη, μπορεί να δημιουργηθούν δυσμενείς κλινικές καταστάσεις, επειδή το μόριο της αιμοσφαιρίνης μπορεί να υποστεί διάφορες βιοχημικές και δομικές αλλαγές. Το γεγονός αυτό, επάγει διάφορους μηχανισμούς αλληλεπίδρασης όπως α) η εξωκυττάρια μετατόπιση της αιμοσφαιρίνης, συμβάν το οποίο μπορεί να προκαλέσει επιπτώσεις στους ιστούς, β) οι αντιδράσεις με δραστικές ρίζες αζώτου και οξυγόνου, γ) απελευθέρωση ελεύθερης αιμοσφαιρίνης και δ) την σηματοδότηση μοριακών γεγονότων (Εικόνα 10).

Μετά την αιμόλυση η αιμοσφαιρίνη βρίσκεται υπό την τετραμερή μορφή της με την παρουσία αβ ετεροδιμερών, με επικράτηση των διμερών αβ σε μικρές συγκεντρώσεις στο πλάσμα. Λόγω του μικρού μοριακού βάρους τα διμερή μετακινούν την αιμοσφαιρίνη στον εξωκυττάριο χώρο, με αποτέλεσμα μαζί με την αίμη να επάγουν προφλεγμονώδεις καταστάσεις στους γειτονικούς ιστούς (νεφρά, ήπαρ).

Ο δεύτερος μηχανισμός αφορά στις αλληλεπιδράσεις της αιμοσφαιρίνης με δραστικές ρίζες αζώτου και οξυγόνου. Το μονοξειδίο του αζώτου αλληλεπιδρά με την αιμοσφαιρίνη με δύο τρόπους: α) μέσω της οξυαιμοσφαιρίνης που διαθέτει δισθενή σίδηρο και οξειδώνεται από το NO σε μεθαιμοσφαιρίνη (Hb-Fe<sup>3+</sup>), που περιέχει νιτρικά οξέα και τρισθενή σίδηρο και β) μέσω της οξυαιμοσφαιρίνης που σχηματίζει σύμπλοκο μεταξύ του μονοξειδίου και του σιδήρου της αίμης. Άρα, αυτή η σειρά αντιδράσεων οδηγεί στην απώλεια της αίμης, την διασταυρωτή σύνδεση (cross-linking) της πολυπεπτιδικής αλυσίδας της αιμοσφαιρίνης, γεγονότα τα οποία με την σειρά τους προκαλούν τροποποιήσεις στα λιπίδια και σε πρωτεΐνες και εν τέλει σε οργανικό επίπεδο.

Ο τρίτος μηχανισμός σχετίζεται με την τοξικότητα που προκαλεί η αίμη στην φερυλική μορφή του τρισθενούς σιδήρου. Η απελευθέρωση της αίμης επιτρέπει την μεταφορά της πορφυρίνης στις κυτταρικές μεμβράνες ή σε διαλυτές πρωτεΐνες και λιπίδια, και προβάλλεται σαν συνδέτης με μόρια τα οποία ενεργοποιούνται σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες. Από τα πιο συχνά σύμπλοκα που δημιουργούνται είναι αυτά της αίμης-αλβουμίνης και της αίμης με τα λιπιδιακά. Το πιο συνηθισμένο τοξικό παράγωγο της ελεύθερης αίμης

είναι η οξειδωμένη LDL, η οποία σχετίζεται με την πρόκληση φλεγμονωδών και κυτταροτοξικών καταστάσεων στο κύτταρο, προκαλώντας βλάβες στα αγγεία (Schaer et al.,2013).



Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση της αρχής των μηχανισμών της τοξικότητας της Hb και της προστασίας της από της πρωτεΐνες του πλάσματος Hρ και Hρx. (Ανατύπωση από Schaer et al., 2013).

Ο τέταρτος μηχανισμός είναι η σύνδεση της αίμης με πρωτεΐνες των μεταγραφικών παραγόντων και ορισμένα ένζυμα. Μια καλά μελετημένη αλληλεπίδραση είναι του Bach-1 μεταγραφικού παράγοντα, που ρυθμίζει την μεταγραφή της αιμοξυγενάσης (HO-1) με άλλα αντιοξειδωτικά ένζυμα που μετέχουν σε περίπτωση αύξησης των επιπέδων της ενδοκυτταρικής αίμης. Επίσης, η ελεύθερη αίμη προκαλεί αναστολή του πρωτεασώματος επηρεάζοντας τον μεταβολισμό των κυττάρων και ακόμη αλληλεπιδρά με τον

υποδοχέα TLR, επάγοντας την φλεγμονή (Duvigneau et al., 2019; Schaer et al., 2013).

Συμπερασματικά, η παθοφυσιολογία της αιμοσφαιρίνης εξαρτάται από τη χρονολογική σειρά των γεγονότων, την ποσότητα και τη θέση της στην επιφάνεια των ιστών, καθώς και από το βαθμό της βλάβης που έχει υποστεί από δραστικές ρίζες αζώτου και οξυγόνου, δηλαδή από τις οξειδωτικές βλάβες.

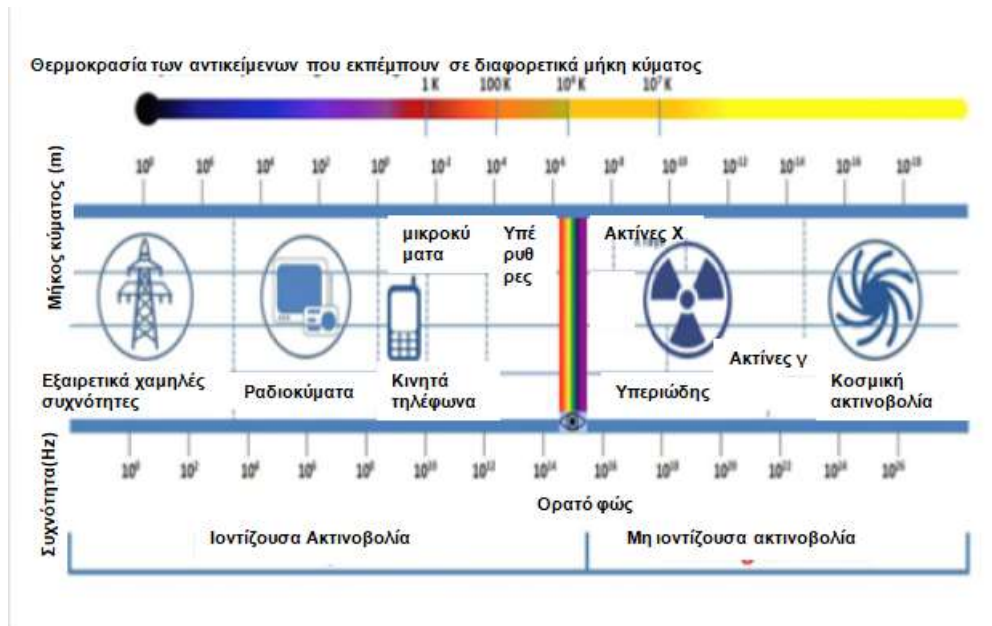


## 5. Ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία

Η ύλη αποτελείται από άτομα και κάθε άτομο περιέχει έναν πυρήνα με νετρόνια ή θετικά φορτισμένα πρωτόνια. Ο πυρήνας περιβάλλεται από αρνητικά φορτισμένα ηλεκτρόνια. Ο πυρήνας των ραδιενεργών ατόμων έχει περίσσεια ενέργειας με αποτέλεσμα να προκαλείται αστάθεια. Για να εξασφαλίσουν τα άτομα πιο σταθερό πυρήνα απελευθερώνουν ενέργεια υπό την μορφή σωματιδίων (α και β σωματίδια), είτε υπό την μορφή ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων (γ και x-rays) (Thaul S, 1999)

Η θεωρία των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων αναπτύχθηκε την εποχή του 19<sup>ου</sup> αιώνα και υπήρξε αποτέλεσμα της ραγδαίας ανάπτυξης της ηλεκτροδυναμικής. Κατά τον Maxwell και τον Hertz, το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο παράγεται από φορτισμένα ιόντα και θεωρητικά επεκτείνεται ως το άπειρο. Αποτελείται από ηλεκτρικό και μαγνητικό πεδίο τα οποία βρίσκονται κάθετα μεταξύ τους και διαδίδονται υπό την μορφή κυμάτων με ταχύτητα ίση με αυτή του φωτός. Στην περίπτωση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας το κύμα διαδίδεται στον χώρο ή αλληλεπιδρά με την ύλη συμφώνα με την διεύθυνση διάδοσης της ενέργειας. Αναλόγως την συχνότητα της ταλάντωσης και του μήκους κύματος της ακτινοβολίας, χωρίζεται σε, ραδιοκύματα (RF), μικροκύματα (RW), υπέρυθη ακτινοβολία (infrared), ορατό φως, υπεριώδη ακτινοβολία (UV), ακτίνες X, ακτίνες-γ, αποτελώντας το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα (Kemal et al, 2019).

Αναλόγως των τιμών του μήκους κύματος και της συχνότητας της ενέργειας που απελευθερώνεται από εξωτερικές πηγές (ακόμη και από το ίδιο το άτομο), η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία διαχωρίζεται αναλόγως εάν προκαλεί ιονισμό ή όχι στην ύλη, σε ιονίζουσα και μη ιονίζουσα ακτινοβολία (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Φάσμα ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (Ανατύπωση από Saliev, etal., 2019).

### 5.1 Μη ιονίζουσα ακτινοβολία

Είναι γνωστό ότι από τον 20<sup>ο</sup> αιώνα και έπειτα παρατηρείται δραματική αύξηση της έκθεσης του ανθρώπου σε μη ιονίζουσα ακτινοβολία, κυρίως προερχόμενη από τεχνητές πηγές (Calvente et al., 2010).

Ειδικότερα, η μη ιονίζουσα ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία (NIR) αναφέρεται σε ενέργειες που εκπέμπουν σε χαμηλές συχνότητες και μεγάλο μήκος κύματος (>100nm), οι οποίες δεν είναι ικανές να προκαλέσουν τον ιονισμό των ατόμων παρά μόνο τη διέγερση τους. Παρ' όλα αυτά μπορούν να προκαλέσουν βιολογικές επιδράσεις. Το φάσμα της NIR χωρίζεται αναλόγως του μήκους κύματος και της συχνότητας σε 4 περιοχές:

- Στατικό ηλεκτρικό και μαγνητικό πεδίο 0 Hz,
- Σε εξαιρετικά χαμηλών συχνοτήτων πεδία (ELF) ( $f < 300$  Hz)
- Σε ραδιοσυχνότητες (RF) και ραδιοκύματα (MW), ( $300 \text{ Hz} \leq f \leq 300 \text{ GHz}$ )
- Οπτική ακτινοβολία
  - Υπέρυθρες: 760 -  $10^6$  nm
  - Ορατό φως: 400-760 nm
  - Υπεριώδης: 100 - 400 nm (NgKwan-Hoong, 2003).

Αναλόγως της διάρκειας της έκθεσης οι μη ιονίζουσες μπορεί να προκαλέσουν βιολογικές επιδράσεις. Οι συνηθέστερες είναι η αύξηση

θερμότητας, η οποία αναλόγως της διάρκειας και του μήκους κύματος μπορεί να οδηγήσει σε μεταβολές των καναλιών των ιόντων ασβεστίου με συνοδό επίδραση στη μορφολογία του κυττάρου (κυρίως του νευρικού συστήματος). Σε πιο σπάνιες περιπτώσεις και κυρίως σε μακροχρόνιες εκθέσεις μπορεί να προκαλέσουν επιπτώσεις στην όραση, στο νευρικό σύστημα (πονοκεφάλους) ακόμη και την πρόκληση κακοηθειών (πχ καρκίνο τους δέρματος σε μακροχρόνια έκθεση στην UV ακτινοβολία), (Bernhardt, 1992; Ng Kwan-Hoong, 2003).

## **5.2 Ιονίζουσα ακτινοβολία**

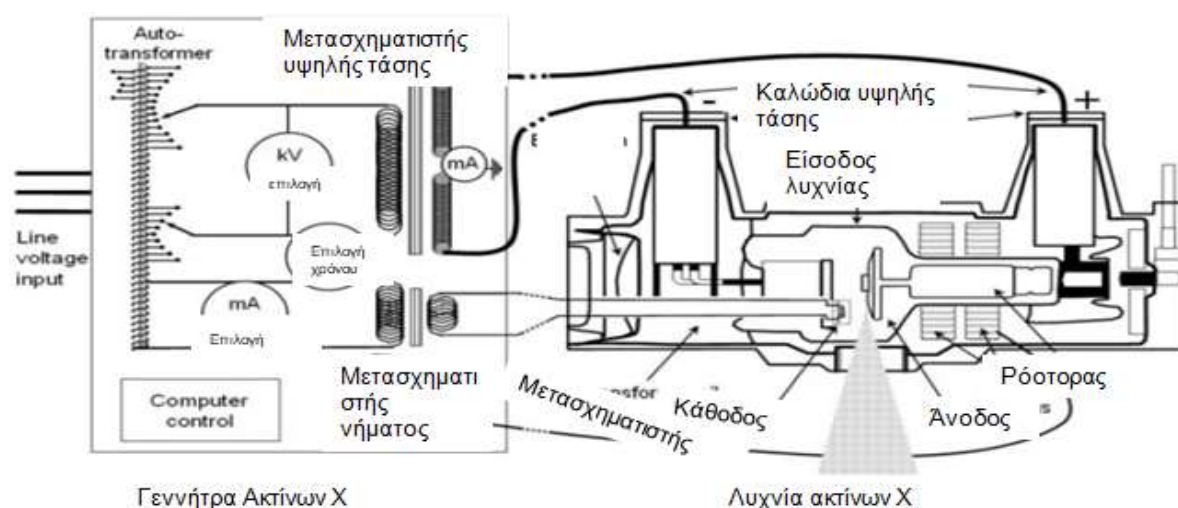
Η ιονίζουσα ακτινοβολία είναι η ενέργεια που έχει παραχθεί από φυσικές πηγές (πχ ραδιενεργά μεταλλεύματα) είτε τεχνητά (πυρηνικός αντιδραστήρας, σπινθηρογράφος, ακτινολογικά μηχανήματα κτλ) και είναι ικανή να προκαλέσει διεγέρσεις στον πυρήνα και να απελευθερώσει ηλεκτρόνια στο εξωτερικό του ατόμου ή της μοριακής δομής (ιονισμός). Επίσης αναλόγως της έντασης μπορεί να σπάσει και χημικούς δεσμούς προκαλώντας βιολογικές επιπτώσεις. Στο φάσμα των ιονιζουσών ακτινοβολιών ανήκουν οι ακτίνες Χ, οι γ-ακτίνες, οι υψηλές συχνότητες υπεριώδους ακτινοβολίας και η σωματιδιακή ακτινοβολία α β και νετρονίων (Hoppe et al., 1983).

### **5.2.1 Παραγωγή ακτίνων Χ- Ακτινολογική Λυχνία**

Οι ακτίνες Χ προέρχονται από την μετατροπή της κινητικής ενέργειας των παραγόμενων ηλεκτρονίων, μέσω της διαφοράς δυναμικού (V) σε ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Αναλυτικότερα, για να παραχθούν οι ακτίνες Χ, απαραίτητη προϋπόθεση είναι η ύπαρξη μιας ακτινολογικής λυχνίας και μιας γεννήτριας. Η ακτινολογική λυχνία είναι το περιβάλλον μέσα στο οποίο παράγονται οι ακτίνες και η γεννήτρια αποτελεί την πηγή δημιουργίας διαφοράς δυναμικού. Στην Εικόνα 12 αποτυπώνεται το σύστημα παραγωγής ακτίνων-Χ. Το πρώτο βήμα είναι η παρουσία ελεύθερων ηλεκτρονίων στην περιοχή της καθόδου και ενός μεταλλικού στόχου μεγάλου ατομικού αριθμού ώστε να προσπέσουν τα ηλεκτρόνια και να παραχθεί ενέργεια.

Το δεύτερο βήμα είναι η εφαρμογή διαφοράς δυναμικού ώστε να επιτευχθεί επιτάχυνση των ηλεκτρονίων στον μεταλλικό στόχο με αποτέλεσμα

είτε την παραγωγή **ακτινοβολίας πέδησης** (επιβράδυνση ή ακινητοποίηση των ηλεκτρονίων), είτε **χαρακτηριστικής ακτινοβολίας** (μεταπήδηση ενός ηλεκτρονίου σε διεγερμένη κατάσταση και αποδιέργηση στην θεμελιώδη κατάσταση), (Seibert, 2004).

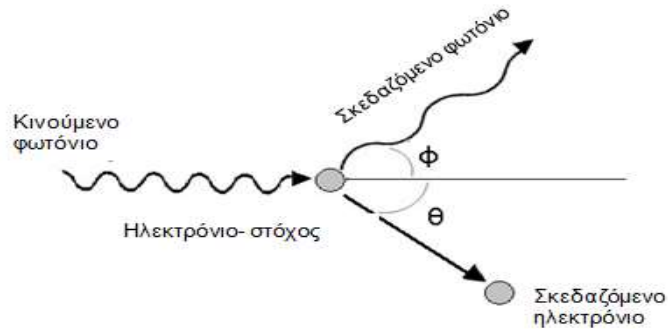


Εικόνα 12: Απεικόνιση εξαρτημάτων της γεννήτριας (δεξιά) και της λυχνίας (Αριστερά) ακτίνων-X. (Ανατύπωση από Seibert, 2004).

## 5.2.2 Αλληλεπιδράσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας με την ύλη

### Φαινόμενο Compton

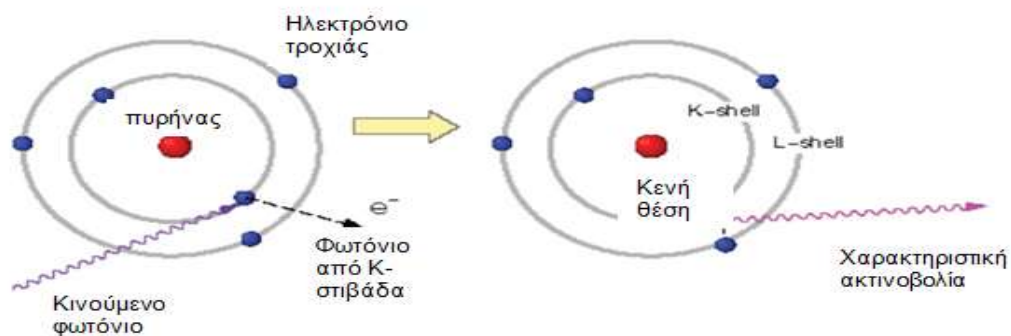
Το φαινόμενο Compton πραγματοποιείται σε ενέργειες μεγαλύτερες των 50 KeV. Για λόγους απλούστευσης λαμβάνεται υπόψη ότι τα ηλεκτρόνια βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας και κινούνται ελεύθερα. Το φωτόνιο που παράγεται από την ακτινολογική λυχνία με αρχική ενέργεια προσκρούει σε ηλεκτρόνια δίνοντάς του μέρος από την ενέργεια του. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα το ηλεκτρόνιο να έχει περίσσεια ενέργειας και να εγκαταλείψει το άτομο. Το φωτόνιο αυτό σκεδάζεται με τελική ενέργεια μικρότερη από την αρχική. Ο βαθμός σκέδασης του είναι από 90 μοίρες έως 180° (οπισθοσκέδαση). Με αυτό τον τρόπο προκαλείται ο ιονισμός του ατόμου (Εικόνα 13)(Als-Nielsen, and Des., 2011).



Εικόνα 13: Φαινόμενο Compton. Κατεύθυνση σκεδαζόμενου φωτονίου και ηλεκτρονίου σε σχέση με το αρχικό φωτόνιο. (Ανατύπωση από Venugopal & Bhagdikar, 2013)

### Φωτοηλεκτρικό φαινόμενο

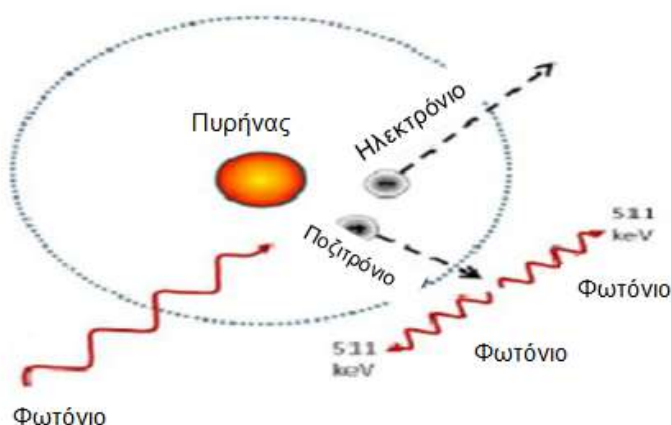
Το φαινόμενο αυτό επικρατεί σε χαμηλές ενέργειες μικρότερες των 50 KeV και εξαρτάται από τον ατομικό αριθμό του υλικού. Το παραγόμενο φωτόνιο απορροφάται από ένα ηλεκτρόνιο εσωτερικής στιβάδας, το οποίο με τη σειρά του απελευθερώνεται από το άτομο με ενέργεια μεγαλύτερη από πριν. Έτσι παράγεται ένα θετικά φορτισμένο ηλεκτρόνιο που παραχωρεί την ενέργειά του στο υλικό με αποτέλεσμα την παραγωγή χαρακτηριστικής ακτινοβολίας (Εικόνα 14)(Beir V, 1990).



Εικόνα 14: Οι δύο διαδικασίες του Φωτοηλεκτρικού φαινομένου. Στην αριστερή πλευρά απεικονίζεται το παραγόμενο φωτόνιο, που απορροφάται από ηλεκτρόνιο εσωτερικής στιβάδας και παράγεται το φωτοηλεκτρόνιο. Στη δεξιά πλευρά έχουμε την κάλυψη της θέσης που είναι κενή από το φωτοηλεκτρόνιο, από ηλεκτρόνιο εξωτερικής στιβάδας, το οποίο απελευθερώνει χαρακτηριστική ακτινοβολία. (Ανατύπωση από Mekki J., 2009).

## Δίδυμη Γένεση

Η δίδυμη γένεση πραγματοποιείται σε ενέργειες της τάξεως του 1,022 MeV και έχει κυρίως εφαρμογή σε ακτινοθεραπευτικές διαδικασίες. Κατά την διαδικασία της δίδυμης γένεσης το φωτόνιο μετατρέπει την ενέργεια του σε ένα ποζιτρόνιο και ένα ηλεκτρόνιο αλληλεπιδρώντας με τον πυρήνα. Το αρχικό φωτόνιο εξαφανίζεται. Με απλά λόγια, το φαινόμενο αυτό μετατρέπει την ενέργεια σε μάζα. Το ποζιτρόνιο και το ηλεκτρόνιο κινούνται σε αντίθετες κατευθύνσεις και προκαλούν διεγέρσεις στο υλικό. Όταν το ποζιτρόνιο αρχίζει να επιβραδύνει τότε εξαυλώνεται με ένα ηλεκτρόνιο της τροχιάς με αποτέλεσμα να παραχθούν δύο φωτόνια ίσης ενέργειας 0,511 MeV (Εικόνα 15)(BeirV, 1990).



Εικόνα 15: Δίδυμη Γένεση: Αλληλεπίδραση φωτονίου με πυρήνα και εξαφάνιση του. Στη θέση του ένα ποζιτρόνιο και ένα ηλεκτρόνιο. (Ανατύπωση από Saldana-Gonzalez et al., 2012).

## 6. Βιολογικές Επιδράσεις της ιονίζουσας ακτινοβολίας.

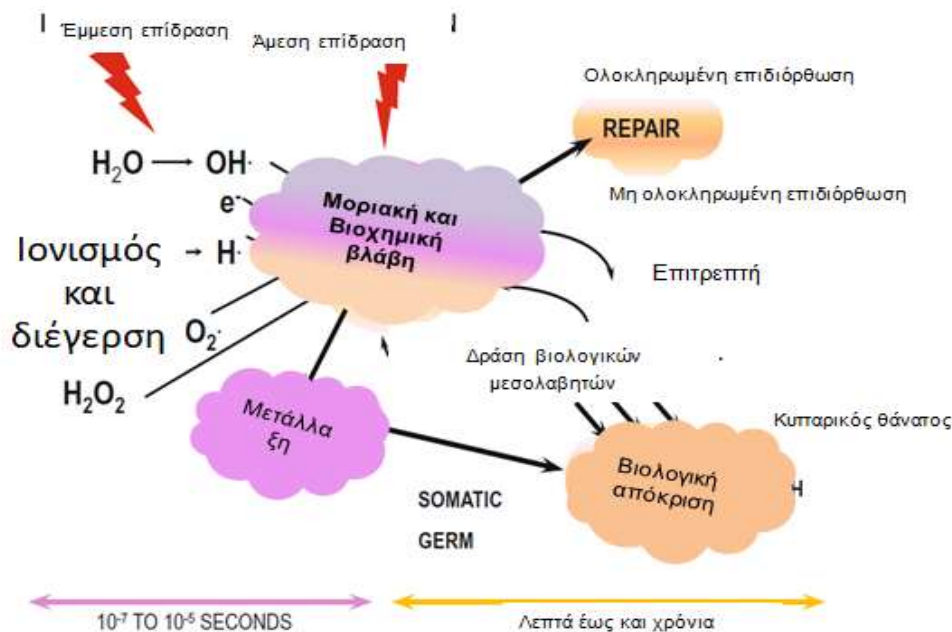
### 6.1 Επιπτώσεις της ακτινοβολίας σε υποκυτταρικό επίπεδο

Οι αρνητικές επιδράσεις της ακτινοβολίας πρακτικά μελετήθηκαν με την ανακάλυψη των ακτίνων-X το 1895. Τα πρώτα ποσοτικά αποτελέσματα σε επίπεδο ραδιοβιολογίας αναπτύχθηκαν το 1920, ύστερα από επιδημιολογικές

μελέτες των επιζώντων του δυστυχήματος στη Χιροσίμα και Ναγκασάκι (Domenech, 2017).

Η αλληλεπίδραση της ακτινοβολίας με βιολογικά συστήματα καταλαμβάνει τρία στάδια το φυσικό, το χημικό και το βιολογικό (Εικόνα 16).

Το φυσικό εξαρτάται από το είδος της ακτινοβολίας και την ενέργεια, και κατ' επέκταση την δόση διάρκεια λίγων sec ( $10^{-7}$  έως  $10^{-5}$ ). Στόχος της ενέργειας είναι να αλληλεπιδράσει με τα ηλεκτρόνια της ύλης και να προκαλέσει τον ιονισμό τους. Αυτό με τη σειρά του προκαλεί χημικές τροποποιήσεις λόγω του ιονισμού των μορίων νερού και δημιουργεί δραστικές ρίζες οξυγόνου (Μαργαρίτης, 1996; Domenech, 2017).



Εικόνα 16: Απεικόνιση φυσικού χημικού και βιολογικού μηχανισμού και στην απόκριση του ερεθίσματος (ακτινοβολία). (Ανατύπωση από Domenech, 2017)

Το βιολογικό στάδιο μπορεί να διαρκέσει ώρες και προκαλεί αλλοιώσεις σε (άμεσες ή έμμεσες) σε μοριακό επίπεδο όπως αναστολή πρωτεϊνσύνθεσης, το οποίο επεκτείνεται και σε κυτταρικό με επιδράσεις στο DNA (διαφοροποιήσεις στον κυτταρικό κύκλο, στα ένζυμα επιδιόρθωσης ακόμη και κυτταρικό θάνατο). Τελικά, η ακτινοβολία καταλήγει να προκαλεί βλάβες σε επίπεδο οργανισμού με μεταλλάξεις, ανοσολογικές αποκρίσεις,

εμφάνιση κακοηθειών (λευχαιμία κτλ) ακόμη και θάνατο. Αυτά τα συμπτώματα, μπορεί να εμφανιστούν από μερικούς μήνες έως και χρόνια (Μαργαρίτης, 1996; Domenech, 2017).

### **6.1.1 Άμεση και Έμμεση επίδραση της ιονίζουσας ακτινοβολίας με την βιολογική ύλη.**

Για την κατανόηση των επιπτώσεων που προκαλεί η ιονίζουσα ακτινοβολία σε βιολογικό επίπεδο είναι απαραίτητο να κατανοηθεί ο τρόπος αλληλεπίδρασης της με τη βιολογική ύλη και οι παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται ο βαθμός της βλάβης που προκαλεί. Αρχικά η ακτινοβολία επιδρά με τον πυρήνα του ατόμου με δύο μηχανισμούς. Τον άμεσο και τον έμμεσο (Εικόνα 17).

#### **Άμεσος μηχανισμός επίδρασης**

Η άμεση δράση της ακτινοβολίας στοχεύει απευθείας στο μόριο του DNA προκαλώντας θραύσεις στην έλικα (SSB ή DSB) και κατ' επέκταση δομικές αλλαγές στο ίδιο το κύτταρο. Ειδικότερα, μπορεί να δημιουργήσει απώλεια ενός ατόμου υδρογόνου ή μεθυλομάδας και να σχηματίσει μακρομοριακές ρίζες, οι οποίες με την σειρά τους με την συμβολή της θερμότητας (του ιονισμού), σχηματίζουν ένα μεγαλομοριακό σύμπλοκο με διαταραχές στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Διαφορετικά, είναι πιθανό να προκληθεί διάσπαση του μακρομορίου σε δύο μικρότερα σύμπλοκα, τα οποία δε θα έχουν τη δυνατότητα επανασύνδεσης τους (λόγω της ανικανότητας επαναφοράς των βλαβών από τους μηχανισμούς επιδιόρθωσής) (Μαργαρίτης, 1996).

Τέλος, σε επίπεδο πρωτεΐνης, η ακτινοβολία μπορεί να προκαλέσει τον πολυμερισμό τους.

Συνοψίζοντας, όλες οι παραπάνω διαδικασίες είναι ικανές εάν δεν επιδιορθωθούν να οδηγήσουν στον κυτταρικό θάνατο ακόμη και να επάγουν την δημιουργία καρκινογένεσης σε υψηλές δόσεις ακτινοβολίας.



## Έμμεσος μηχανισμός επίδρασης

Ο έμμεσος μηχανισμός επίδρασης επηρεάζει απομακρυσμένες μοριακές δομές από αυτές του DNA, δηλαδή μηχανισμούς που σχετίζονται με την ραδιόλυση του νερού.

Πιο συγκεκριμένα, το κύτταρο καταλαμβάνεται κατά 70% από νερό, επομένως η ακτινοβολία στοχεύει στα μόρια νερού δημιουργώντας δραστικές ρίζες υδροξυλίου (HO<sup>-</sup>) και αλκοξυομάδων (RO<sub>2</sub>). Ύστερα από πολλαπλές αντιδράσεις έχουμε ως συνέπεια τη δημιουργία του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), που είναι τοξικό για τα κύτταρα (Desouky et al., 2015).

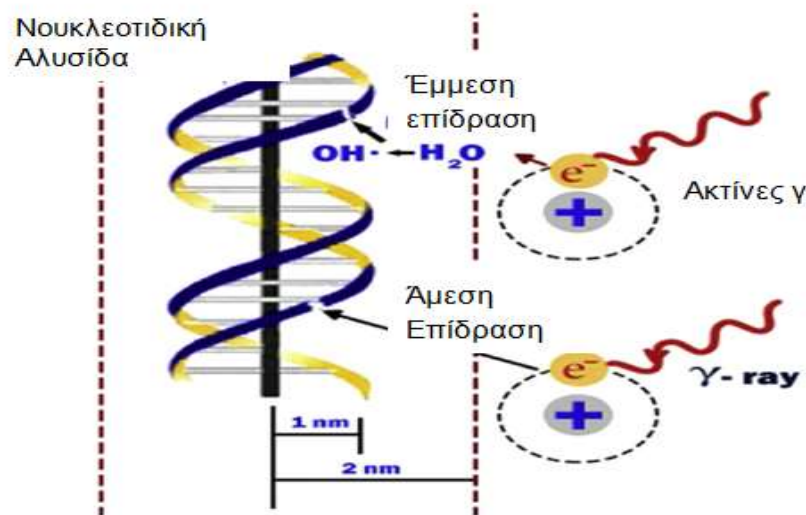
Οι δραστικές ρίζες χαρακτηρίζονται από ένα ελεύθερο ασύζευκτο ηλεκτρόνιο της μοριακής δομής που λαμβάνει την ενέργεια της ακτινοβολίας το οποίο με την σειρά του αλληλεπιδρά με τα μόρια του DNA και προκαλεί διαταραχές στην μοριακή του δομή. Ο αριθμός των δραστικών ριζών που δημιουργούνται εξαρτάται από τη δόση της ακτινοβολίας.

Επομένως η δημιουργία δραστικών ριζών μπορεί να προκαλέσει μακροπρόθεσμα βλάβη στον κυτταρικό κύκλο του DNA, σε πρωτεΐνες του κυττάρου (Smith et al., 2017), καθώς και γενετικές και επιγενετικές διαταραχές (Desouky et al., 2015).

Ο βαθμός της βλάβης που προκαλείται σε κυτταρικό επίπεδο καθορίζεται από:

- Από την γραμμικά εναποτεθειμένη ενέργεια (LET), κατά μήκος της τροχιάς του φορτισμένου σωματιδίου. Οι ακτίνες Χ και γ εκλύουν φωτόνια χαμηλής LET (λίγους ιονισμούς), άρα έχουν μειωμένη ικανότητα ιονισμού στις ευαίσθητες περιοχές του κυττάρου ( “non-targeted” αποτελέσματα).
- Από το πεδίο ακτινοβολήσης, όσο μεγαλύτερο είναι τόσες περισσότερες βλάβες θα προκληθούν στα κύτταρα.
- Ποικιλομορφία στην ευαισθησία του κάθε κυττάρου. Όσο λιγότερο διαφοροποιημένη είναι η κυτταρική σειρά τόσο πιο ευαίσθητη είναι στην επίδραση της ακτινοβολίας πχ τα λευκοκύτταρα και τα πρώιμα ερυθροκύτταρα είναι πιο ακτινοευαίσθητα από νευρικά (υψηλή διαφοροποίηση).

- *Ποικιλομορφία στην ακτινοευαισθησία* διαφορετικών οργανισμών. Οι μικροοργανισμοί και τα βακτήρια είναι περισσότερο ακτινοευαίσθητοι από τα θηλαστικά, και ακόμη και τα θηλαστικά μεταξύ τους παρουσιάζουν διαφορές στην αντίδραση τους στην ακτινοβολία (πχ ποντίκια-άνθρωπος),(RSSC: Biological Effects of Ionizing Radiation, 2011). Γι' αυτό το λόγο, η ακτινοβολία χρησιμοποιείται και για την αδρανοποίηση μικροοργανισμών στο αίμα που προορίζεται για μετάγγιση.



Εικόνα 17: Άμεσος και έμμεσος μηχανισμός αλληλεπίδρασης ακτινοβολίας με DNA (Ανατύπωση από Hall & Gaccia, 2011).

## 6.2 Επιδράσεις της Ιονίζουσας ακτινοβολίας στα ώριμα ερυθροκύτταρα

Τα τελευταία πενήντα χρόνια ο τομέας της Ραδιοβιολογίας έχει επεκταθεί στην μελέτη των βιολογικών επιπτώσεων στα κύτταρα και τους ιστούς, που εκτίθενται στην ιονίζουσα ακτινοβολία (ΙΑ). Η ακτινοβολία αυτή όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, μπορεί να πηγάζει από φυσικές πηγές του περιβάλλοντος, αλλά και από τεχνητές πηγές όπως στον τομέα της υγείας και της απεικόνισης. Οι επιδράσεις της ΙΑ αποτελούν μείζον ζήτημα για τους μελετητές της ακτινοβιολογίας και της πυρηνικής ιατρικής. Αυτό συμβαίνει, λόγω των επιπλοκών που μπορεί να προκαλέσουν στις υποκυτταρικές δομές,

ύστερα από έκθεση σε ακτινοθεραπευτικές δόσεις και θεραπείες με ραδιενεργά ισότοπα, έκθεση κατά την πραγματοποίηση διαγνωστικών εξετάσεων (ακτινογραφίες, αξονικές, σπινθηρογραφήματα), καθώς και την εφαρμογή υψηλών συχνοτήτων UV και την ακτινοβολία προϊόντων αίματος που προορίζονται για μετάγγιση.

Ειδικότερα, όσον αφορά την περίπτωση του αίματος και κυρίως των ερυθροκυττάρων η ιονίζουσα ακτινοβολία σύμφωνα με μελέτες, προκαλεί επιπτώσεις κυρίως *in vitro* με:

- τις αλλαγές στο σχήμα του ερυθροκυττάρου (δισκοκύτταρα, εχινόκύτταρα, σφαιροκύτταρα κτλ.)
- την παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου ROS και RNS
- Την αφυδάτωση του ερυθροκυττάρου
- Τη διαταραχή του κυτταροσκελετού
- Την υπεροξειδωση των λιπιδίων της μεμβράνης
- Την αποδόμηση των μεμβρανικών πρωτεϊνών
- Την επαγωγή της απόπτωσης και την επιτάχυνση της κυτταρικής γήρανσης (έκθεση PS και MVs)
- Την αυξημένη αιμόλυση
- Τα αυξημένα επίπεδα Hb
- Την διαταραχή των καναλιών ιόντων κυρίως  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$

### **6.2.1 Μελέτες με βάση την βιολογική επίπτωση της Ιονίζουσας Ακτινοβολίας στη βιοχημική σύσταση και μορφολογία των ερυθροκυττάρων.**

Αρκετοί ερευνητές έχουν στρέψει το ενδιαφέρον τους στη μελέτη του βιοχημικού και μορφολογικού περιβάλλοντος του ερυθροκυττάρου, ιδιαίτερα όσον αφορά την περίπτωση των μεταγγίσεων.

Πιο αναλυτικά, η χρησιμότητα της μετάγγισης αποσκοπεί στην ενίσχυση της ενδοαγγειακής χωρητικότητας και αποτελεί θεραπεία ζωτικής σημασίας για ασθενείς που έχουν υποστεί αναιμία λόγω τραύματος, κακοηθειών,

αιμοσφαιρινοπάθειών κτλ (Adams et al., 2018). Ένας τρόπος αποστείρωσης τους είναι με τη χρήση της ιονίζουσας ακτινοβολίας.

Στην συγκεκριμένη περίπτωση μας αφορούν έρευνες που μελετούν τις επιπτώσεις στη δομική λειτουργία και μορφολογία των κυττάρων, σε ακτινοβολούμενο αίμα *in vitro* σε φρέσκο αίμα ή αποθηκευμένο.

### **Αλλαγές στο σχήμα και την μορφολογία των ερυθροκυττάρων**

Αρχικά σύμφωνα με αρκετές μελέτες έχει παρατηρηθεί ότι η ακτινοβολία επιδρά στο σχήμα και στη μορφολογία των ερυθροκυττάρων. Σε μια έρευνα των Χυ και συν., 2012, δείγματα αίματος ακτινοβολήθηκαν διαφορετικές δόσεις ακτίνων γ ( $^{37}\text{Cs}$ ) και αργότερα αποθηκεύτηκαν και μελετήθηκαν σε διαφορετικές περιόδους μετά την ακτινοβολήση (Ημέρα: 0, 7, 14, 21, 28).

Ύστερα από μελέτη σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM) και διέλευσης (TEM), παρατηρήθηκε αλλαγή στη μορφολογία των κυττάρων και με το πέρασ τον ημερών, ειδικότερα στα 35 Gy και στην 21<sup>η</sup> ημέρα, μειωνόταν όλο και περισσότερο το πλήθος των φυσιολογικών ερυθροκυττάρων και παρατηρούνταν επιδεινωμένες μορφολογίες (σφαιροκύτταρα, εχινοκύτταρα κτλ).

Το μέγεθος το σχήμα και το πλήθος των ερυθροκυττάρων έχει διαπιστωθεί ότι είναι δοσοξαρτώμενα και χρονοεξαρτώμενα. Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε πειραματόζωα (αρουραίους) στα 35 mSv/h με ραδιενεργή πηγή Ραδίου ( $^{226}\text{Ra}$ ) στα 5 και 15 λεπτά, παρατηρήθηκε αλλαγή στις παραμέτρους του κυττάρου. Με άλλα λόγια, στα 5 λεπτά υπήρξε μείωση κατά 14,06 % των ερυθροκυττάρων των ακτινοβολημένων δειγμάτων, λόγω αφυδάτωσης, ενώ στα 15 λεπτά αύξηση κατά 14,69%, λόγω της διόγκωσης των κυττάρων, από τροποποιήσεις της μεμβράνης (βλ. ενότητα 6.1). Και στις δύο περιπτώσεις υπήρξε μείωση του πλήθους των κυττάρων (Bandalyan et al, 2016). Παρεμφερή γεγονότα έχουν μελετηθεί και από τους Suzuki και συν., με την χρήση ακτίνων Χ.

Ακόμη και πολύ παλαιότερα, είχε μελετηθεί σε μικρές δόσεις ακτινοβολίας της τάξεως των 0.5 Gy (όπως τις διαγνωστικές ακτίνες Χ), σε μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων, αύξηση του πληθυσμού παραμορφωμένων ερυθροκυττάρων που παρουσίαζαν διογκωμένο πυρήνα και μείωση των

φυσιολογικών κυττάρων, πράγμα που οδηγεί και σε αυξημένη αιμόλυση (Lessler, 1959).

Επομένως, σύμφωνα με τις παραπάνω ερευνητικές εργασίες διαπιστώνεται ότι η ιονίζουσα ακτινοβολία επηρεάζει το σχήμα και το πλήθος των ερυθροκυττάρων αναλόγως με την δόση, (υψηλή δόση/χαμηλή LET- πιο επιβλαβής), με τον χρόνο ακτινοβολήσης (υψηλός χρόνος- μεγαλύτερη παραμόρφωση) και στην περίπτωση του αποθηκευμένου αίματος ανάλογα του χρόνου αποθήκευσης (υψηλός χρόνος αποθήκευσης και υψηλή δόση- αυξημένο ποσοστό παραμόρφωσης).

### **Αιμόλυση και βλάβη στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη**

Η παρέκκλιση του σχήματος των ερυθροκυττάρων από το φυσιολογικό τους σχήμα, λόγω της ακτινοβολήσης, προκαλεί όπως αναφέρθηκε στις παραπάνω μελέτες, την εμφάνιση ανωμαλιών στο σχήμα τους με αποτέλεσμα των κατακερματισμό τους και την πρόκληση αιμόλυσης. Αυτό οφείλεται σε ορισμένους παράγοντες μεταβολών στη δομή της ερυθροκυτταρικής τους μεμβράνης, στην ανταλλαγή των ιόντων ασβεστίου, και στην αντλία  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ .

Από το 1904 καταγράφηκαν οι πρώτες αναφορές ότι η ακτινοβολία επάγει την αιμόλυση του αίματος από τους Henri & Mayer με τη χρήση ραδιενεργής πηγής ραδίου. Μετέπειτα το 1923 επιβεβαιώθηκε και από τον Holthusen ότι παρομοίως ισχύει και για τις ακτίνες Χ. Επίσης σε υψηλές δόσεις (20kGy) το 1959 σε άλογα, τεκμηριώθηκε ότι η ιονίζουσα ακτινοβολία, δημιουργεί δραστικές ρίζες αζώτου, οι οποίες προκαλούν θραύση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας της αιμοσφαιρίνης. Έχει παρατηθεί ότι η αιμόλυση των κυττάρων αρχίζει να επάγεται σε δόσεις ακτίνων Χ μεγαλύτερες από 60 Gy (Sokolov, 1961). Όσον αφορά την  $\gamma$  ακτινοβολία, είχε μελετηθεί στα ερυθροκύτταρα αρουραίων, ότι σε δόση 2kGy η αιμοσφαιρίνη μειώνονταν ύστερα από αποθήκευση του αίματος για 20 ώρες σε θερμοκρασία 4 ή 37°C (Myers and Bide, 1966).

Οι Shapiro & Kollman διαπίστωσαν ότι η ακτινοβολία του  $^{60}\text{Co}$  στοχεύει τους δισουλφιδικούς δεσμούς των ανθρώπινων ερυθροκυττάρων, δημιουργώντας μικρά ανοίγματα στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη, διαταράσσοντας τα κανάλια και την ποσότητα της αιμοσφαιρίνης.

Οι Ting και Zircle παρατήρησαν επιπλέον ότι οι ακτίνες Χ προκαλούν οσμωτικές αλλαγές στο κύτταρο με την μετακίνηση στον εξωκυττάριο χώρο του NaCl.

Σε μια *in vitro* μελέτη οι Besciani και συν. συμπέραναν με την χρήση ακτίνων Χ απορροφούμενης δόσης 1,25 Gy/min, ότι προκαλείται αποδιοργάνωση της μεμβράνης με διαταραχή της πολικότητας καθώς αναστέλλεται η αντλία Na<sup>+</sup>, προκαλώντας εισροή ιόντων Na<sup>+</sup> στο εσωτερικό και εκροή ιόντων K<sup>+</sup> στο εξωτερικό.

Ακόμη, διαπιστώθηκε ότι λόγω της ακτινοβολίας δημιουργείται αρνητικό φορτίο στη μεμβράνη με αποτέλεσμα να μετακινούνται ιόντα Cl<sup>-</sup> και H<sub>2</sub>O στο κύτταρο και να προκαλείται η διόγκωση του (Brugnara and Churchill, 2012).

Επιπροσθέτως, σε δόση 2\*2Gy παρατηρείται ελάττωση ή αναστολή του μεταφορέα της γλυκόζης (GLUT1), πράγμα το οποίο πιθανόν οφείλεται στην επίδραση των δραστικών ριζών (Viskovicova et al., 2015). Ακόμη, στην ίδια δόση διαπιστώθηκε ότι η ενεργητική μεταφορά ιόντων Ca<sup>2+</sup> εκτελούνταν σε πιο αργό ρυθμό, γεγονός το οποίο επιδεινώνονταν με αύξηση της δόσης (Azhari and Diba, 2017).

Σε πιο πρόσφατες μελέτες έχει παρατηρηθεί ότι η ιονίζουσα ακτινοβολία προκαλεί την αναπαραγωγή ROS/RNS (Reisz et al., 2012), οι οποίες με τη σειρά τους επιφέρουν ορισμένα μοριακά γεγονότα που τροποποιούν τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων. Πιο αναλυτικά, σε ακτινοβολία με δόση 40 Gy φαίνεται ότι υπάρχει μια ελάττωση της απόστασης μεταξύ των λιπιδίων και μεταβολές στην αναλογία χοληστερόλης/φωσφολιπιδίων με παράλληλη αύξηση της ρευστότητας στην λιπόφιλη περιοχή (Corre et al., 2010).

Σε δόσεις μικρότερες των 40 Gy με χρόνο ακτινοβολήσης τα 5 και 15 λεπτά χρησιμοποιώντας πηγή <sup>226</sup>Ra, έχει διαπιστωθεί *in vitro* σε κύτταρα αρουραίων παραγωγή διαφορετικών φορτίων στην επιφάνεια της μεμβράνης, με αποτέλεσμα την αύξηση της επιφάνειας της, την διαρροή ενδοκυττάρων συστατικών της (αύξηση της οσμωτικής πίεσης) και ύστερα από τα 15 λεπτά ακτινοβολήσης, την τροποποίηση στην κατανομή των λιπιδίων (Badalyan et al, 2016).

Η έκθεση των κυττάρων σε ραδιενεργή πηγή αργού για μια ώρα προκαλεί υπεροξειδωση των λιπιδίων, επηρεάζοντας τα πολυακόρεστα λιπαρά

οξέα προκαλώντας αλλαγή της πολικότητας της μεμβράνης και επηρεάζοντας την ακεραιότητα του κυττάρου (Edimecheva & Kisel, 1997). Ακόμη η ιονίζουσα ακτινοβολία επηρεάζει τον μεταβολισμό των σφιγγολιπιδίων, ελαττώνοντας το ποσοστό της σφιγγομυελίνης στην μεμβράνη (Edimecheva & Kisel, 1997).

Όσον αφορά την διαταραχή στις πρωτεΐνες της μεμβράνης, η ακτινοβολία προκαλεί τον σχηματισμό σταυροειδών δεσμών (cross-link) των πρωτεϊνών στην ζώνη 3, την 4.1 και την ακτίνη (Soszyński & Schuessler, 1991). Από τις πρωτεΐνες της μεμβράνης έχει διαπιστωθεί ότι πιο ακτινοευαίσθητη είναι η σπεκτρίνη. Σε ακτινοβόληση ζωικού μοντέλου (χαμστερ) με  $^{16}\text{C}$  από δόσεις 1-6 Gy, παρατηρήθηκε στις δόσεις μικρότερες των 4 Gy μια μικρή αύξηση της σπεκτρίνης, ενώ σε δόσεις μεγαλύτερες από 4Gy αναστολή της, πράγμα που επηρεάζει την ελαστικότητα της μεμβράνης αρνητικά και οδηγεί το κύτταρο σε δυσκαμψία. Σύμφωνα με αυτά τα αποτελέσματα, η σπεκτρίνη θα μπορούσε να αποτελεί βιοδείκτη για τον εντοπισμό κυττάρων που προκαλούν απορρύθμιση των συστατικών της μεμβράνης (Zhang et al., 2014).

Επιπλέον, η IA σε δόσεις 15-25 Gy επάγει την απόπτωση και υπάρχει θετική συσχέτιση του Fas προσδέτη και Fas-L στα 35 Gy (Xu et al., 2012). Επίσης, και σε υψηλές δόσεις UV προκαλείται η αύξηση των κεραμιδίων τα οποία με την σειρά προκαλούν υπερέκφραση της σφιγγομυελινάσης και ενεργοποιούν τα αποπτωτικά μονοπάτια. Ακόμη, έχει παρατηρηθεί *in vitro* παραγωγή ROS που επιφέρουν παρακείμενα αποτελέσματα της ιονίζουσας ακτινοβολίας (RIBE), λόγω της δημιουργίας μικροκυστιδίων και σε δόσεις των 50 Gy προκαλείται εξωτερίκευση της φωσφατιδιλοσερίνης με ταυτόχρονη αναστολή των αντιοξειδωτικών μορίων όπως της γλουταθειόνης, ειδικότερα σε αποθηκευμένο αίμα περίπου 20 ημερών (Antosik et al., 2015). Άρα η ακτινοβολία ειδικά σε υψηλές δόσεις και σε αποθηκευμένο αίμα μετά το πέρας τουλάχιστον 20 ημερών επάγει διάφορα μονοπάτια γήρανσης.

## **B. Σκοπός**

Σε προηγούμενες μελέτες που αφορούν την ακτινοβόληση του αίματος με ακτίνες X, έχει παρατηρηθεί η αυξημένη διάρρηξη των ερυθροκυττάρων (αιμόλυση) με συνοδό αύξηση της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης και της οσμωτικής

ευθραυστότητας, λόγω παρουσίας οξειδωτικού στρες. Αυτό μπορεί να προκαλέσει επιπτώσεις *in vitro* στην ποιότητα και ποσότητα των ερυθροκυττάρων και σε *in vivo* καταστάσεις αντιδράσεις σε επίπεδο οργανισμού (πχ. αντίδραση μοσχεύματος εναντίον του ξενιστή –GVHD σε περίπτωση μεταγίσεων).

Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε μελέτη της οσμωτικής ευθραυστότητας και της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης *in vitro*, σε 30 υγιείς εθελοντές με την λήψη 5 ml ολικού αίματος. Το ολικό αίμα χωρίστηκε σε επιμέρους ποσότητες των 2,5 ml σε σωληνάρια με EDTA, εκ των οποίων 30 αποτελούσαν τους μάρτυρες και τα υπόλοιπα 30 δείγματα ακτινοβολήθηκαν σε διαγνωστικό μηχάνημα ακτίνων Χ.

Για την λήψη βιολογικών δειγμάτων από τους εθελοντές συμπληρώθηκε ειδικό έντυπο συγκατάθεσης σύμφωνα με τον *Γενικό Κανονισμό για τα Προσωπικά Δεδομένα* (Κανονισμός Ε.Ε, 2016/679), (GDPR).

## **Γ. Υλικά και Μέθοδοι**

### **Ακτινοβολία αίματος με την χρήση ακτίνων Χ**

#### Αρχή Μεθόδου

Εκτός από την ακτινοβολία υποβάθρου, συχνή είναι και η έκθεση σε ακτινοβολία χαμηλών δόσεων ακτίνων Χ για διαγνωστικούς λόγους. Οι ακτίνες Χ παράγονται από την ακτινολογική λυχνία και εξάγουν πρωτογενή δέσμη φωτονίων, που προσπίπτει στην επιφάνεια του ασθενούς και κατ' επέκταση στο ίδιο το αίμα (Tungjai et al., 2019).

Στην συγκεκριμένη περίπτωση τοποθετήθηκε στην ακτινολογική τράπεζα σωληνάριο 2,5 ml ολικού αίματος σε αντιπηκτικό EDTA από δειγματοληψία που πραγματοποιήθηκε σε υγιείς εθελοντές, με ρύθμιση των



διαφραγμάτων της δέσμης 10x12 και ρύθμιση των στοιχείων έκθεσης Kvp και mAs, από το ακτινολογικό χειριστήριο. Πραγματοποιήθηκε η ακτινολογική λήψη δύο φορές και καταγράφηκε η απορροφούμενη δόση και όλα τα στοιχεία της έκθεσης, όπως αναγράφονται στον Πίνακας 1.

Υλικά και μέθοδοι

- Ακτινολογικό μηχάνημα: Siemens Healthineers, Ysio Max, model no. 10762470
- Απορροφούμενη Δόση:  $\Delta_1=2*32,52 \mu\text{Gy}\cdot\text{m}^2$ ,  $\Delta_2=2*187,84\mu\text{Gy}\cdot\text{m}^2$

**Πίνακας 1:** Ακτινολογικοί παράμετροι έκθεσης δείγματος.

Δόση	Kvp	mAs	FOV	Εστιακή Απόσταση	Πρωτόκολλο
<b>2*32,52 <math>\mu\text{Gy}\cdot\text{m}^2</math></b>	2*100	2*50	10x12	100cm	L-spine lateral
<b>2*187,84<math>\mu\text{Gy}\cdot\text{m}^2</math></b>	2*100	2*200	10x12	100cm	L-spine lateral

\***Kvp**: Υψηλή τάση/ποιότητα ακτινογραφίας, \***mAs** (παροχή ρεύματος)=mA\*sec= ρεύμα λυχνίαςx χρόνος έκθεσης/ποσότητα ακτινογραφίας, \***FOV**= διάμετρος πεδίου

Διαδικασία ακτινοβόλησης

1. Τοποθέτηση σωληναρίου EDTA 2,5 ml αίματος
2. Ακτινοβόληση δειγμάτων  $\times 2$  με ακτίνες X σε θερμοκρασία δωματίου
3. Τοποθέτηση σε θερμοκρασία 4°C για δύο ώρες μέχρι τη μελέτη τους στο εργαστήριο.

## Μέτρηση της οσμωτικής ευθραυστότητας των ερυθροκυττάρων

Αρχή της Μεθόδου

Ως οσμωτική ευθραυστότητα ορίζεται ο βαθμός κατά τον οποίο τα ερυθροκύτταρα φέρουν αντίσταση, όταν προκαλείται μείωση της ποσότητας του χλωριούχου νατρίου (NaCl). Όταν τα ερυθροκύτταρα βρίσκονται σε υπότονο διάλυμα, το νερό εισέρχεται εντός ή εξέρχεται εκτός του κυττάρουπροκειμένου να επέλθει οσμωτική ισορροπία (Parapart et al., 1947).

Επομένως με την μέθοδο αυτή τα ερυθροκύτταρα αιμολύονται με την προοδευτική μείωση της πυκνότητας του διαλύματος NaCl από 0,9% σε 0,1 %, εφόσον για αυτά ισότονο διάλυμα αποτελεί η ποσότητα 0,9% σε NaCl και υπότονο το 0,1%. Η συγκέντρωση που προκαλεί αιμόλυση σε ποσοστό 50% λόγω οσμωτικού στρες ονομάζεται δείκτης οσμωτικής ευθραυστότητας (MCF).

#### Υλικά-Αντιδραστήρια

- NaCl διάλυμα 9%
- Eppendorf
- Φυγόκεντρος: Hettich Zentrifugen D 78532 Tuttlingen.
- Spectrometer Eppendorf ag 22331 Hamburg.

#### Πειραματική διαδικασία

1. Από αρχικό διάλυμα 0,9% NaCl παρασκευάστηκαν οι αραιώσεις: 0.35%,0.40%, 0,45%, 0,50%, 0,55%,0,60%, 0,70%,0,90%
2. Ακολούθησε προσθήκη 10λ ολικού αίματος σε διαλύματα διαφόρων συγκεντρώσεων NaCl (0,0-0,9%).
3. Ήπια ανάδευση και επώαση για 15λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Φυγοκέντρωση για 5 λεπτά, στις 1500 rpm.
5. Φωτομέτρηση υπερκείμενου στα 540 nm.

Η συγκέντρωση του NaCl που προκαλεί την λύση στο 50% των κυττάρων υπολογίζεται με βάση την πρότυπη καμπύλη απορρόφησης και συγκέντρωσης NaCl. Στο διάλυμα 0,9% NaCl, η αιμόλυση θεωρείται 0%.

#### **Μέτρηση της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης πλάσματος (fHb, freeHb)**

##### Αρχή μεθόδου

Σε φυσιολογικές συνθήκες η αιμοσφαιρίνη βρίσκεται στο εσωτερικό του κυττάρου και όχι στο πλάσμα. Οι μετρήσεις της fHb πραγματοποιούνται με την αφαίρεση του πλάσματος από το αίμα και την φωτομέτρηση στα 380, 415 και 450 nm (Chung et al., 2020). Οι μετρήσεις στα 380 και 450 nm (διόρθωση κατά Allen) χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της

αιμοσφαιρίνης χωρίς την επίδραση άλλων συστατικών του πλάσματος όπως της χολερυθρίνης και άλλων λιπιδίων (Han et al., 2010).

### Υλικά και μέθοδοι

- Γυάλινος Δοκιμαστικός Σωλήνας (test tube) διαμέτρου 15,5mm και ύψους 150mm.
- LKB Novaspec Model 4049 Digital Spectrophotometer

### Πειραματική Διαδικασία

- 1) Φυγοκέντρηση ολικού αίματος σε EDTA για 10 λεπτά, 3000rpm, θερμοκρασία δωματίου.
- 2) Αραίωση πλάσματος 1:10 σε dH<sub>2</sub>O
- 3) Ακολουθεί καλή ανάδευση (vortex) των δειγμάτων
- 4) Επώαση για 30 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου
- 5) Μέτρηση στα 380nm - 415nm - 450nm

Η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης υπολογίζεται ως εξής:

$$\text{Hb(mg/100ml)} = [(\text{OD}^*/1.655)] \times (\text{dilution} \times 1000) / 79.46, \text{ (Harboe correction)}$$

$$(\text{OD}^* = (2 \times \text{OD}_{415}) - \text{OD}_{380} - \text{OD}_{450} \text{ (Zolla et al., 20$$

### Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με την χρήση του προγράμματος IBM SPSS Statistics, έκδοση 25. Οι μεταβλητές ελέγχθηκαν αν είναι συμβατές με την κανονική κατανομή με το κριτήριο Kolmogorov-Smirnov (KS). Για όσες μεταβλητές ίσχυε η μηδενική υπόθεση  $H_0$  (μεταβλητή που δε διαφέρει από την κανονική κατανομή) χρησιμοποιήθηκαν μη παραμετρικά τεστ, εναλλακτικά όταν δεν ίσχυε η μηδενική υπόθεση εφαρμόστηκαν παραμετρικά τεστ.

Στις ποσοτικές μεταβλητές καταγράφεται η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση υπό την μορφή *μέση τιμή ± τυπική απόκλιση*. Επίσης, για την σύγκριση της μέσης τιμής μεταξύ δύο ή περισσότερων ποσοτικών μεταβλητών (ακτινοβολημένου αίματος και control) εφαρμόστηκε ο έλεγχος υποθέσεων t-test κατά ζεύγη στις παραμετρικές μεταβλητές. Αντίστοιχα, για την σύγκριση μια

ποσοτικής μεταβλητής (ακτινοβολημένα ερυθροκύτταρα) με μία ή δύο κατηγορίες μια ποιοτικής μεταβλητής (πχ. Φύλο) έγινε χρήση του ελέγχου υποθέσεων του t-test δύο ανεξαρτήτων μεταβλητών και αντίστοιχα ANOVA test (πχ διαφορετικές ομάδες ηλικίας).

Για τον έλεγχο συσχέτισης (correlation testing) μεταξύ των ποσοτικών μεταβλητών εφαρμόστηκε δοκιμασία κατά Pearson's  $r$ . Στις περιπτώσεις που εντοπίστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά εφαρμόστηκε ανάλυση απλής γραμμικής παλινδρόμησης (simple linear regression). Το επίπεδο σημαντικότητας για όλες τις αναλύσεις ορίστηκε το  $p < 0,05$ .

## Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκαν ορισμένοι ερυθροκυτταρικοί παράμετροι για τη μελέτη της επίδρασης της ιονίζουσας ακτινοβολίας *X in vitro*, σε δόσεις που χρησιμοποιούνται σε διαγνωστικά ψηφιακά ακτινολογικά μηχανήματα, στα ερυθροκύτταρα 30 υγιών εθελοντών.

Ειδικότερα, μελετήθηκε η διαφορά της οσμωτικής ευθραυστότητας των ερυθροκυττάρων και της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης σε 60 δείγματα (30 μαρτύρων και 30 ακτινοβολημένα).

### Μετρήσεις οσμωτικής ευθραυστότητας πριν και μετά την ακτινοβόληση

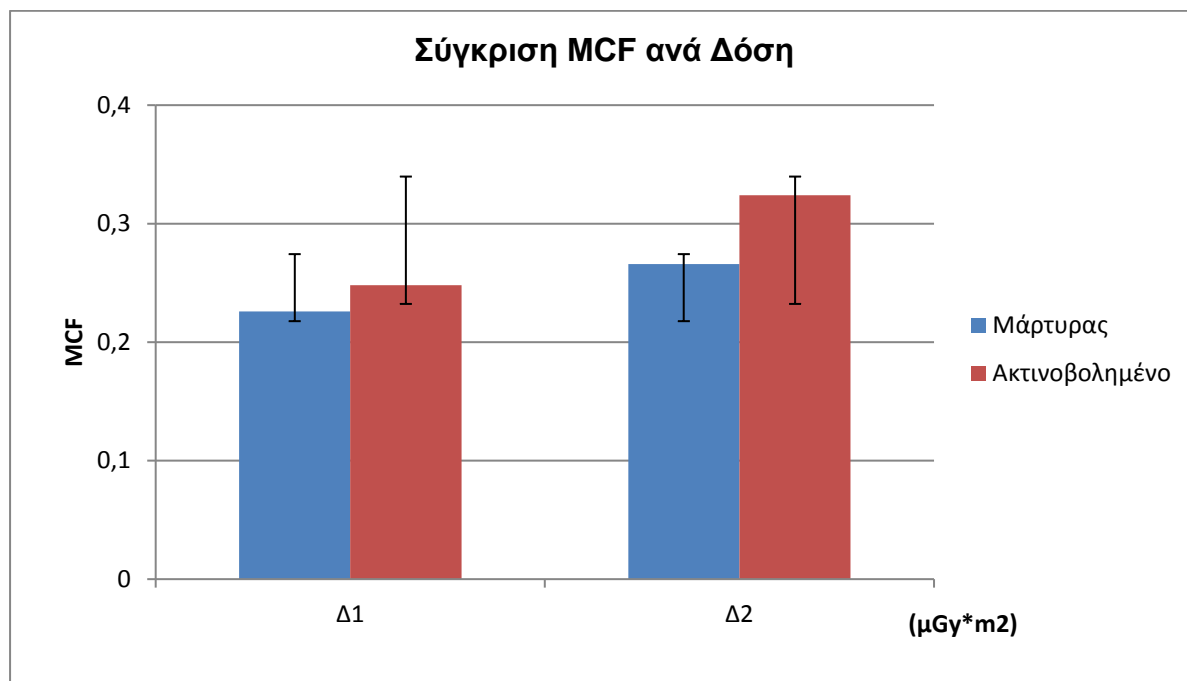
Με τη μέθοδο της οσμωτικής ευθραυστότητας υπολογίστηκε η συγκέντρωση του χλωριούχου νατρίου (NaCl) που προκαλεί αιμόλυση σε ποσοστό 50% λόγω οσμωτικού στρες (MCF).

Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε πραγματικό χρόνο στο εργαστήριο, δύο ώρες μετά την ακτινοβόληση. Δεν διαπιστώθηκαν σύμφωνα με τις μετρήσεις μας στατιστικά σημαντικές διαφορές πριν και μετά την ακτινοβόληση ούτε φαίνεται να επηρεάζονται από τον παράγοντες φύλο και ηλικία. Στις επόμενες παραγράφους αναλύονται τα στατιστικά δεδομένα της οσμωτικής ευθραυστότητας σε σχέση με την δόση, το φύλο και την ηλικία.

### Α) Σύγκριση Οσμωτικής ευθραυστότητας control και ακτινοβολημένου αίματος σε σχέση με τη δόση

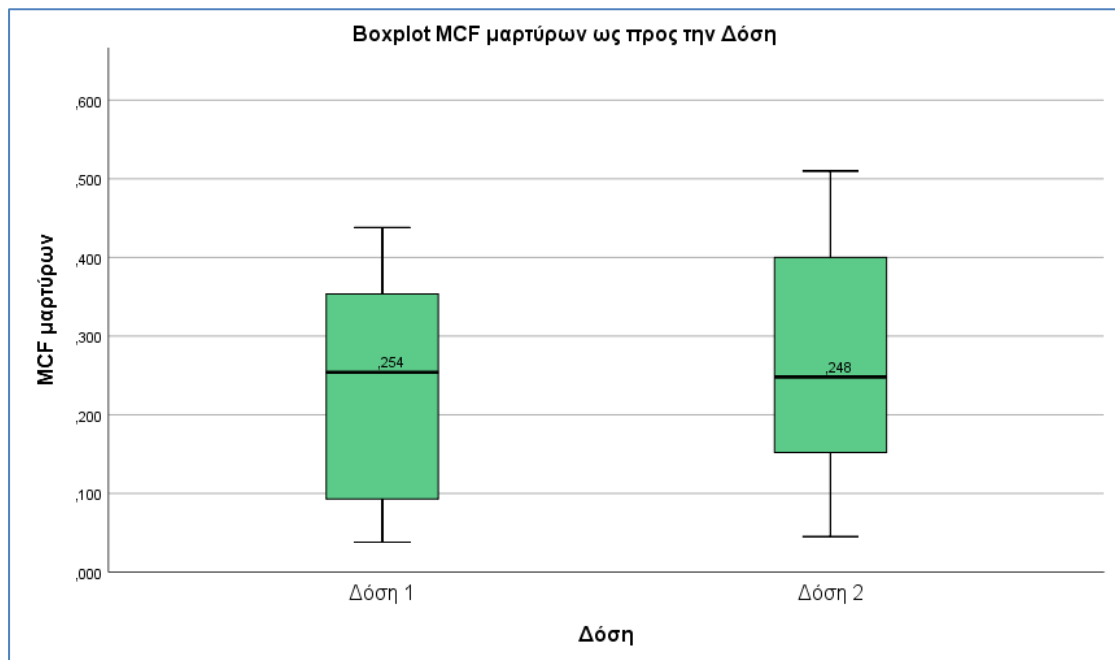
**Πίνακας 2:** Μέση τιμή και τυπική απόκλιση του δείκτη MCF πριν και μετά την ακτινοβόληση. Δ: ακτινοβολημένο αίμα ανεξαρτήτου δόσης, Δ1: 32,52  $\mu\text{Gy}\cdot\text{m}^2$ , Δ2: 187,84  $\mu\text{Gy}\cdot\text{m}^2$ .

MCF	Δ1	Δ2
Μάρτυρας	24,26±15,15	28,43±16,48
Ακτινοβολημένο	25,33±17,78	31,60±17,27

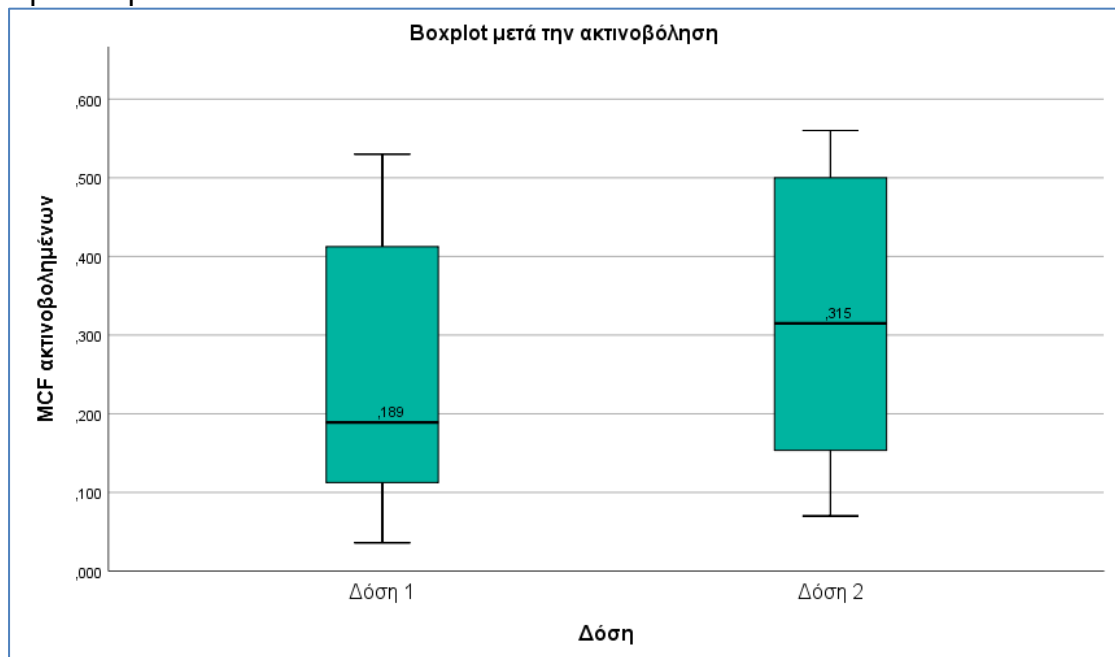


**Διάγραμμα 1:** Στο διάγραμμα απεικονίζεται η μέση τιμή και οι τυπικές αποκλίσεις του MCF σε διαφορετικές δόσεις σε θερμοκρασία δωματίου, 2 ώρες μετά την ακτινοβολήση. ( $p > 0,05$ )

Τα δεδομένα ακολουθούν την κανονική κατανομή ( $p > 0,05$ ), σύμφωνα με το στατιστικό τεστ Kolmogorov-Smirnoff, επομένως για την σύγκριση τους εφαρμοστήκαν παραμετρικοί μέθοδοι. Σύμφωνα με το θηκόγραμμα δεν παρατηρούνται έκτοπες τιμές (outliers), άρα δεν υπάρχουν τιμές που να επηρεάζουν την ανάλυση μας, πριν (Διάγραμμα 2) και μετά την ακτινοβολήση (Διάγραμμα 3). Από την μελέτη επίδρασης τη ιονίζουσας ακτινοβολίας, παρατηρείται ότι πριν και μετά την ακτινοβολήση υπάρχει αύξηση του δείκτη MCF σε σχέση με τους μάρτυρες, άρα αυξημένη αιμόλυση. Με άλλα λόγια όσο αυξάνεται ο παράγοντας δόση τόσο μεγαλύτερη αιμόλυση παρουσιάζουν τα ερυθρά. Στην προκειμένη περίπτωση διαπιστώνεται αύξηση ~10% στα  $2 \cdot 32,52 \mu\text{Gy} \cdot \text{m}^2$  με συντελεστή συσχέτισης  $r = 0,768$ ,  $p = 0,001 < 0,05$  ενώ για δόση  $2 \cdot 187,84 \mu\text{Gy} \cdot \text{m}^2$  παρατηρείται αύξηση 22%, ( $r = 0,647$ ,  $p = 0,009 < 0,05$ ). Όμως, επειδή η μηδενική υπόθεση απορρίπτεται και στις δύο περιπτώσεις (Δ1 και Δ2), ( $p = 0,10 > 0,05$ ) αρά δεν είναι στατιστικά σημαντική η διαφορά του δείκτη MCF και της δόσης.



**Διάγραμμα 2:** Θηκόγραμμα (boxplot) του δείκτη MCF μαρτύρων σε σχέση με την δόση.

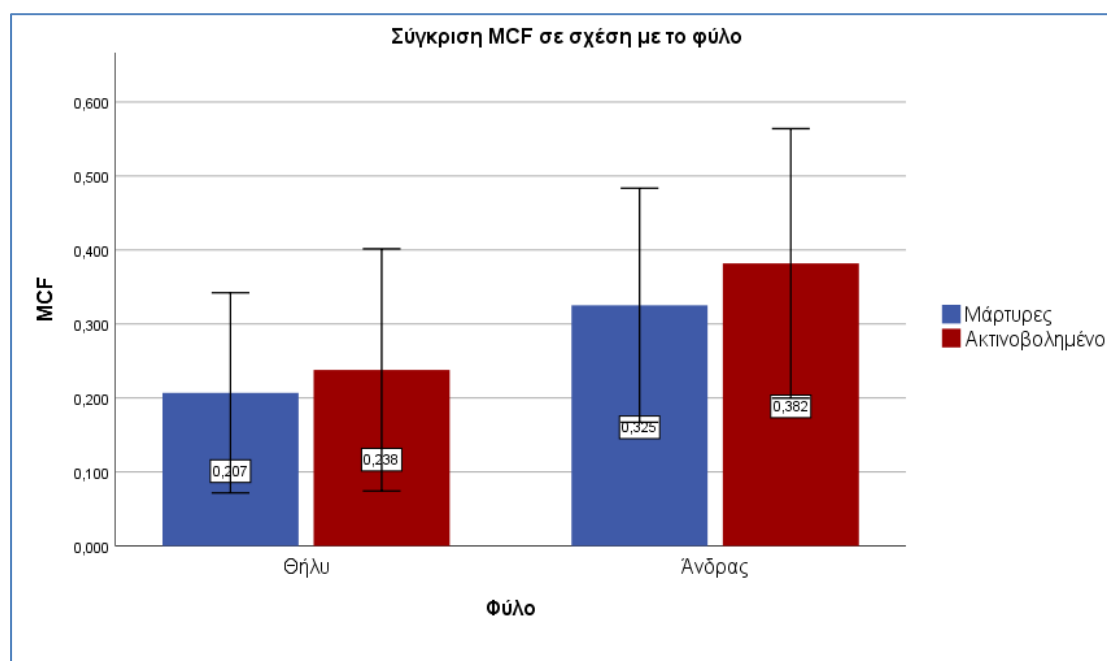


**Διάγραμμα 3:** Θηκόγραμμα (boxplot) του δείκτη MCF ακτινοβολημένων σε σχέση με την δόση.

## Β) Σύγκριση Οσμωτικής ευθραυστότητας μαρτύρων και ακτινοβολημένου αίματος σε σχέση με το φύλο

**Πίνακας 3:** Σύγκριση μέσης τιμής και τυπικής απόκλισης μαρτύρων και ακτινοβολημένων σε σχέση με το φύλο.

Φύλο	Θήλυ (N=20)	Άνδρας (N=10)
Μάρτυρας	0,207±0,135	0,325±0,158
Ακτινοβολημένο	0,238±0,164	0,382±0,182

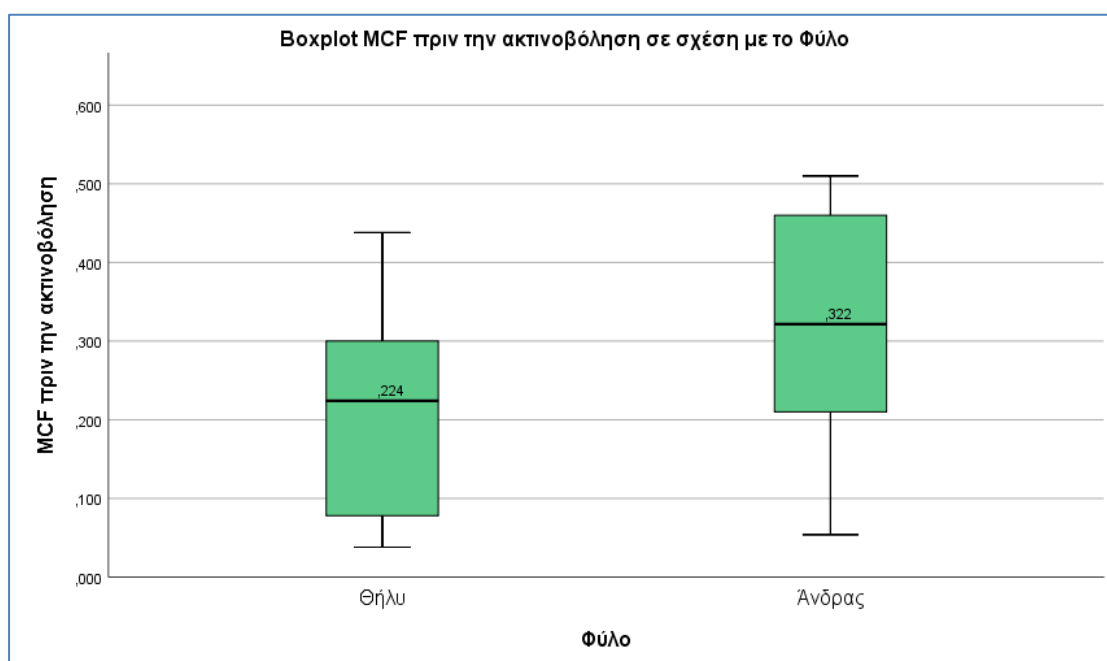


**Διάγραμμα 4:** Σύγκριση μέση τιμή ±τυπική απόκλισηανά φύλο  $p>0,05$ .

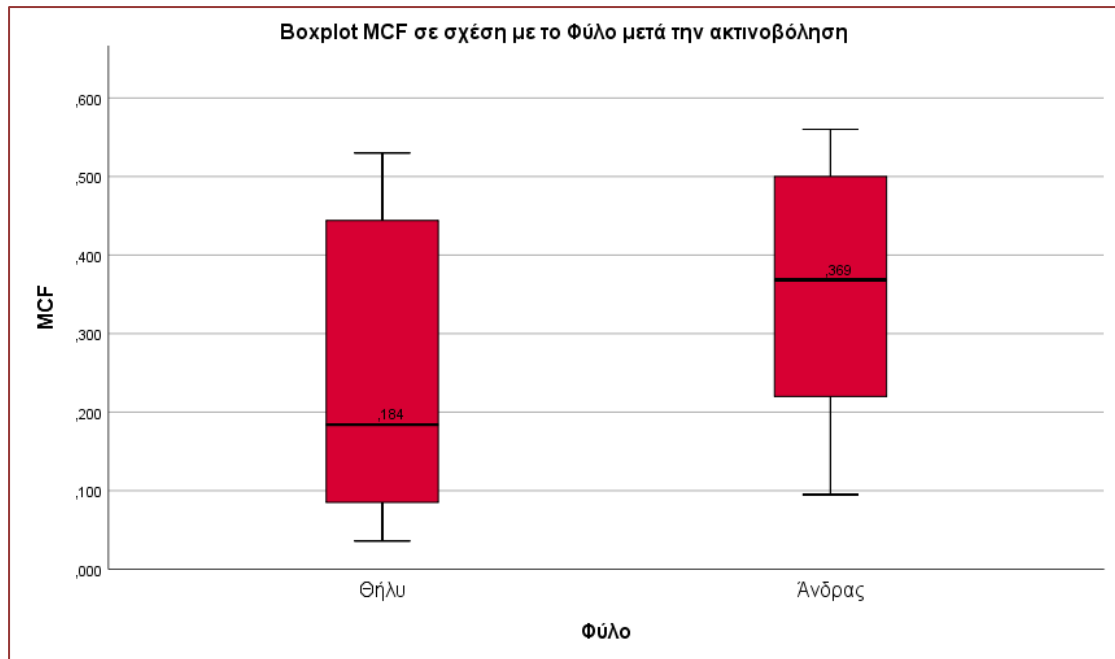
Τα δεδομένα μας φαίνεται να ακολουθούν την κανονική κατανομή (Kolmogorov-Smirnov), επομένως πραγματοποιήθηκε στατιστικός έλεγχος t-



test μεταξύ μαρτύρων και ακτινοβολημένων. Όσον αφορά τον παράγοντα φύλο η ακτινοβόλια Χ φαίνεται να προκαλεί αύξηση στο δείκτη της οσμωτικής ευθραυστότητας κατά 15% στις γυναίκες, ( $r=0,656, p=0,002 < 0,05$ ) και 18% στους άντρες, ( $r=0,670, p=0,03 < 0,05$ ). Όμως στην παρούσα περίπτωση το επίπεδο της στατιστικής σημαντικότητας αυτών των μεταβολών, είναι μεγαλύτερο του 0,05, άρα αυτές οι διαφορές δε θεωρούνται στατιστικά σημαντικές μεταξύ τους. Τέλος δε παρατηρούνται έκτοπες τιμές (outliers) πριν (Διάγραμμα 5) και μετά την ακτινοβολήση (Διάγραμμα 6) που να επηρεάζουν την στατιστική μας ανάλυση.



**Διάγραμμα 5:** Θηκόγραμμα (boxplot) των εθελοντών σε σχέση με το φύλο πριν την ακτινοβόληση.

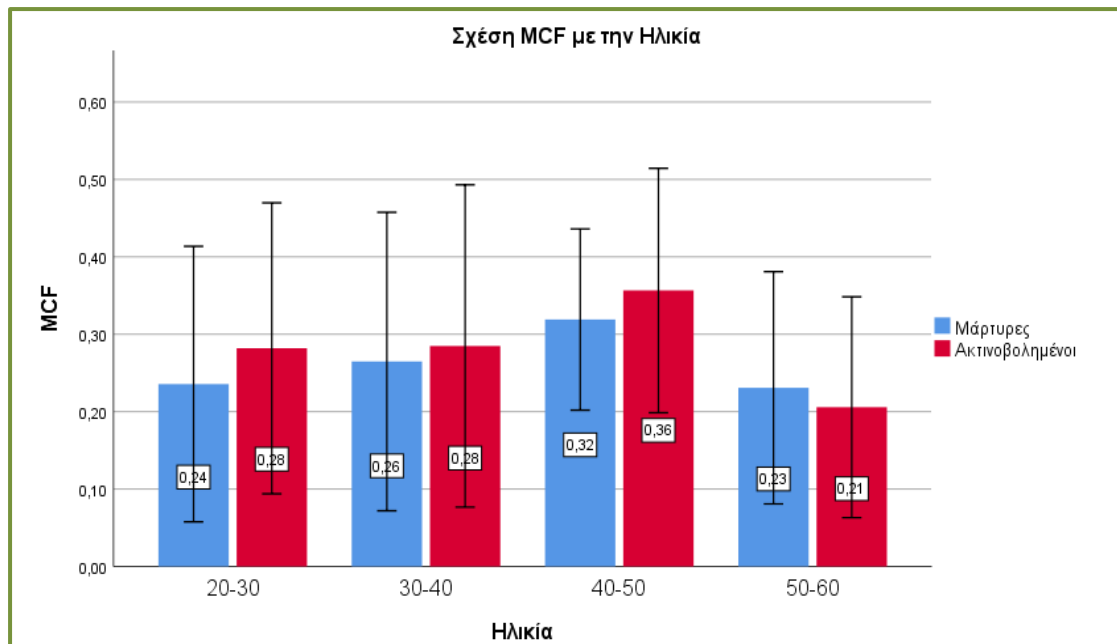


**Διάγραμμα 6:** Θηκόγραμμα (boxplot) των εθελοντών σε σχέση με το φύλο μετά την ακτινοβόληση.

### Γ) Σύγκριση Οσμωτικής ευθραυστότητας μαρτύρων και ακτινοβολημένου αίματος σε σχέση με την ηλικία

**Πίνακας 4:** Δείκτης MCF πριν την ακτινοβόληση (μάρτυρας) και μετά αναλόγως την ηλικία σε έτη.

Ηλικία	20-30	30-40	40-50	50-60
<b>Μάρτυρας</b>	0,236±0,178	0,265±0,192	0,312 ± 0,117	0,230± 0,150
<b>Ακτινοβολημένο</b>	0,282±0,180	0,285 ±0,208	0,356±0,158	0,205±0,142



**Διάγραμμα 7:** Σύγκριση μέσης τιμής± τυπικής απόκλισης του MCF σε σχέση με την ηλικία σε έτη  $p > 0,05$ .

Στη συγκεκριμένη περίπτωση τα δεδομένα ακολουθούν την κανονική κατανομή (Kolmogorov-Smirnov), άρα εφαρμόστηκε t-test έλεγχος. Παρατηρήθηκε μια αύξηση του δείκτη MCF κατά 25% στις νεότερες ηλικίες (20-30), (Διάγραμμα 7), παρουσιάζοντας θετική συσχέτιση με ( $r=0,750$ ,  $p<0,05$ ) μεταξύ υγιών και ακτινοβολημένων. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ήταν μεγαλύτερο του 0,05. Αρά η μηδενική υπόθεση δεν απορρίπτεται και οι διαφορές που παρατηρούνται στις διαφορετικές ηλικίες δε θεωρούνται στατιστικά σημαντικές.

### **Μετρήσεις Ελεύθερης αιμοσφαιρίνης πριν και μετά την ακτινοβόληση**

Ο υπολογισμός της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης στο πλάσμα με την μέθοδο κατά Harboe, μας δίνει δεδομένα όσον αφορά στην αιμόλυση των κυττάρων. Στην συγκεκριμένη περίπτωση πραγματοποιήθηκε σε πραγματικό χρόνο 2 ώρες μετά την ακτινοβόληση του αίματος. Παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα μετά την ακτινοβόληση, σε σχέση με τη δόση της ακτινοβολίας, παρουσιάζοντας θετική συσχέτιση μεταξύ τους. Ταυτόχρονα,

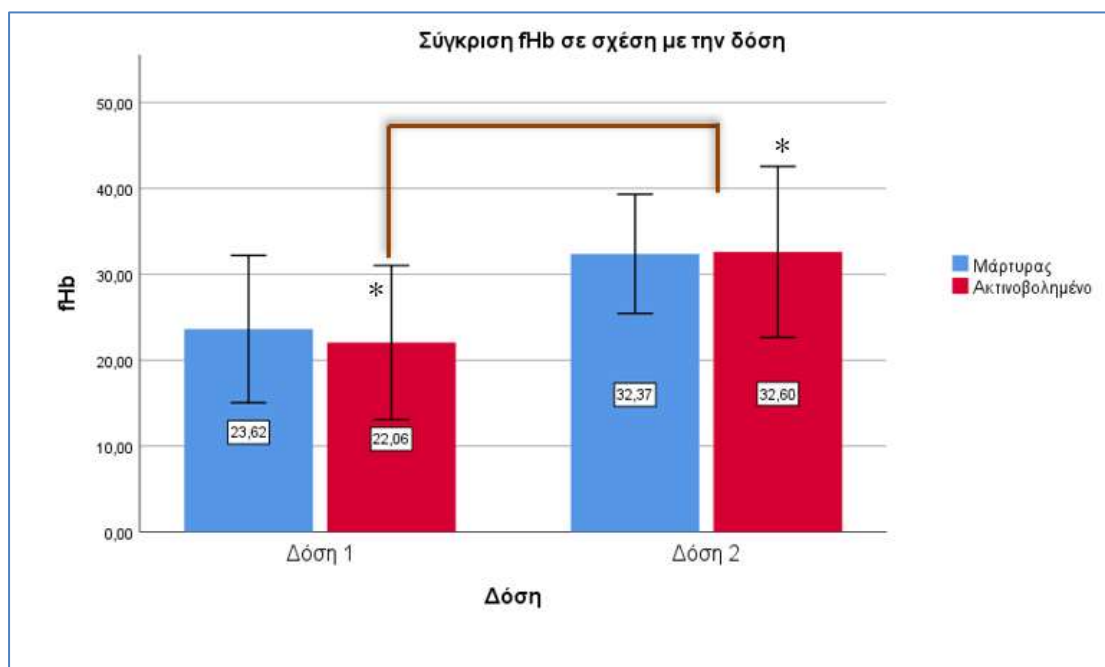
παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση της ηλικίας με την ελεύθερη αιμοσφαιρίνη, επίσης στατιστικά σημαντική. Ακολουθεί η περαιτέρω ανάλυση των δεδομένων, ιδιαίτερως αυτών που κρίθηκαν στατιστικώς σημαντικά.

### **A) Σύγκριση Ελεύθερης Αιμοσφαιρίνης μαρτύρων και ακτινοβολημένων σε διαφορετικές δόσεις**

**Πίνακας 5:** Στον παρακάτω πίνακα καταγράφονται η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης σε διαφορετικές δόσεις πριν και μετά την ακτινοβολία.

Hb mg/dL	Δ1 ( N=15)	Δ2 (N= 15)
<b>Μάρτυρας</b>	23,62±8,58	32,37±6,93
<b>Ακτινοβολημένο</b>	22,06±8,95	32,94±10,21

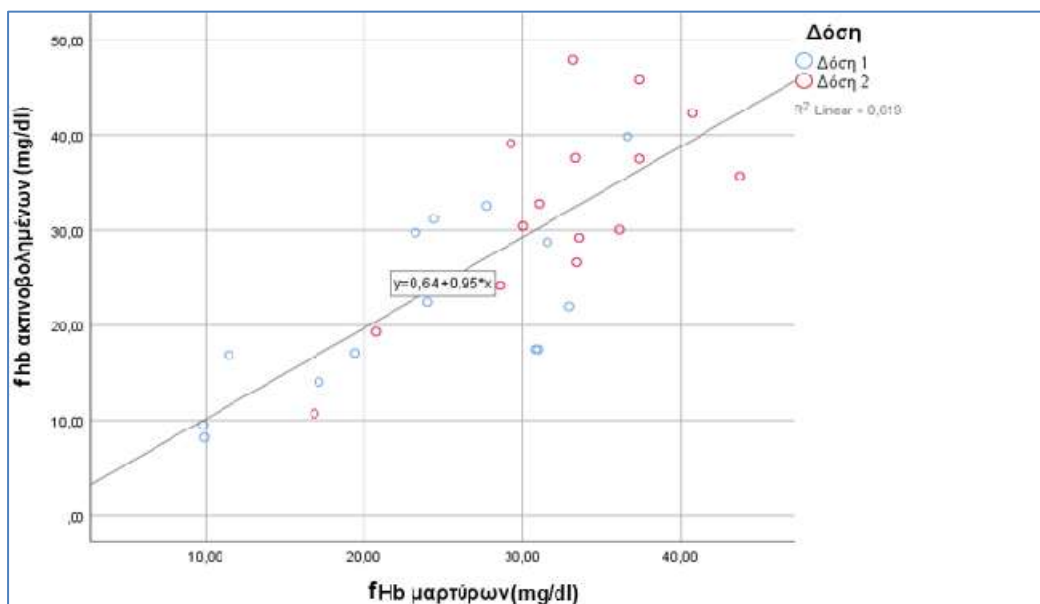
\*Σημειώνεται ότι η στήλη (Δ) καθορίζει γενικά πώς επηρεάζει η ακτινοβολία τα δείγματα ανεξαρτήτου δόσεως.



**Διάγραμμα 8:** Σύγκριση ελεύθερης αιμοσφαιρίνης ανάλογα με την δόση, δύο ώρες μετά την ακτινοβόληση σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή  $\pm$  τυπική απόκλιση. (\*) $p < 0,05$ .

Στα συγκεκριμένα δεδομένα ακολουθείται η κανονική κατανομή (Kolmogorov-Smirnov), με  $p > 0,05$ . Εφαρμόστηκε ο έλεγχος υποθέσεων t-test κατά ζεύγη για την σύγκριση της μεταβλητής δόσης με την ελεύθερη αιμοσφαιρίνης πριν και μετά την ακτινοβόληση και παρατηρήθηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ δόσης και των ακτινοβολημένων ερυθροκυττάρων (Διάγραμμα 8),  $p = 0,007 < 0,05$ . Επομένως, εφόσον τα επίπεδα της fHb παρουσιάζουν διαφορά με την αλλαγή της δόσης εφαρμόστηκε γραμμική παλινδρόμηση για την μεταξύ τους σχέση. Διαπιστώθηκε ότι οι τιμές της fHb παρουσιάζουν πολύ ισχυρή θετική συσχέτιση  $r = 0,787 < 1$ , ( $p = 0,001 < 0,05$ ), άρα η μεταξύ τους σχέση θεωρείται γραμμική. Συμπεραίνοντας, με την αύξηση της δόσης παρατηρείται και διαφορά στην δόση κατά 48%,  $p < 0,05$ .

Ο συντελεστής προσδιορισμού  $R^2 = 0,619 \leq 1$  σύμφωνα με το Διάγραμμα 9, επομένως η εξίσωση της παλινδρόμησης εξηγεί ικανοποιητικά την συσχέτιση της συνιστώσας της fHb σε προσαρμοσμένο εύρος της δόσης ακτινοβολίας.

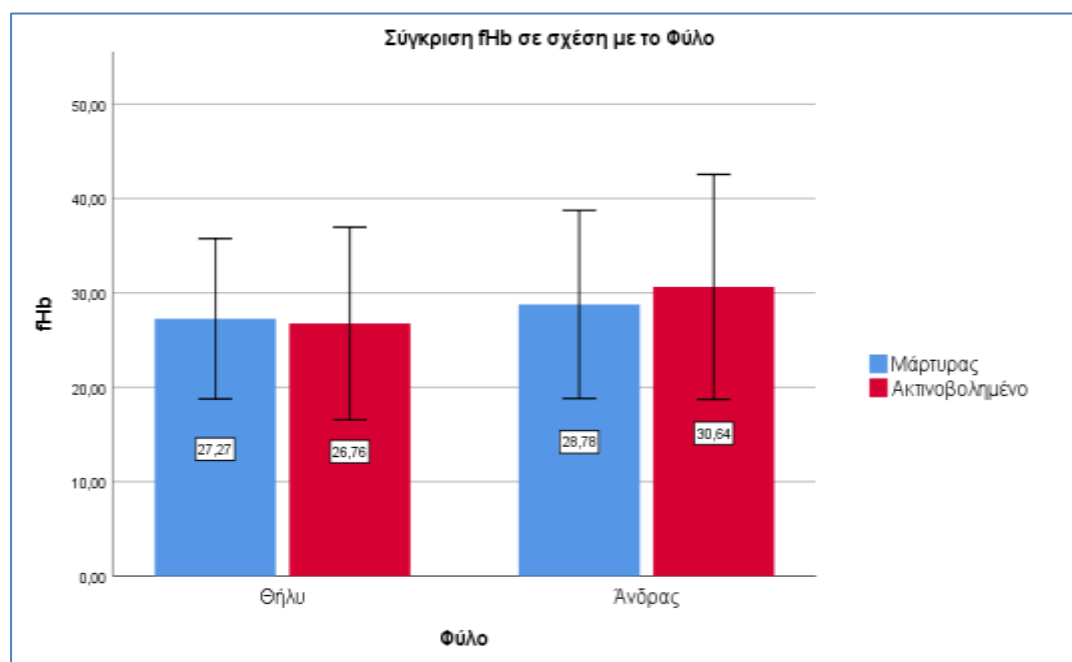


**Διάγραμμα 9:** Ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης της κύριας συνιστώσας της αιμοσφαιρίνης των μαρτύρων και της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης των ακτινοβολημένων ερυθρών σε σχέση με τον παράγοντα δόση. Οι αριθμοί που καταγράφονται στο διάγραμμα είναι ο αριθμός των δειγμάτων.

## Β) Σύγκριση Ελεύθερης Αιμοσφαιρίνης σε σχέση με το φύλο

**Πίνακας 6:** Συσχέτιση της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης μαρτύρων και ακτινοβολημένου αίματος αναλόγως του φύλου.

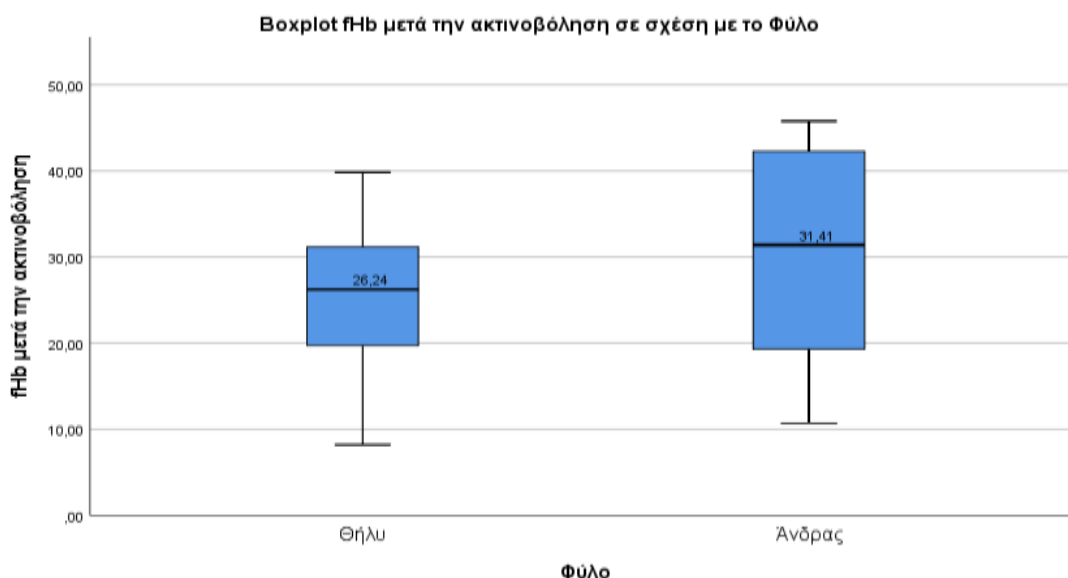
Φύλο	Θήλυ	Άνδρας
Μάρτυρας	27,27±8,49	28,78±8,96
Ακτινοβολημένο	26,76±10,20	30,64±11,92



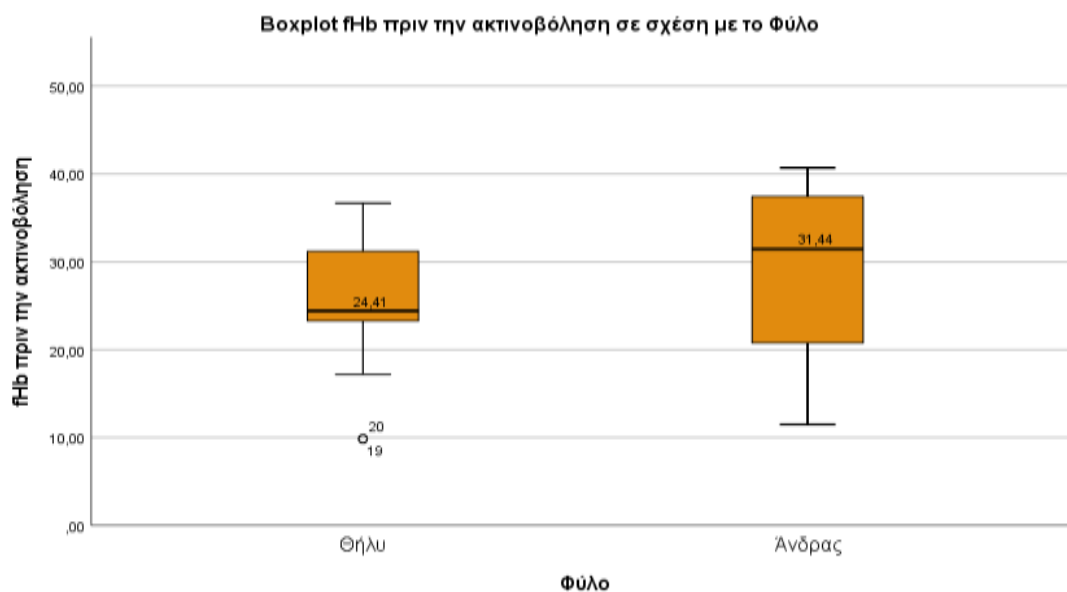
**Διάγραμμα 10:** Σύγκριση της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης σε σχέση με το φύλο. Τα δεδομένα απεικονίζονται σε μορφή μέση τιμή± τυπική απόκλιση.  $p>0,05$ .

Στα παραπάνω δεδομένα βρέθηκε ότι ακολουθούν την κανονική κατανομή όποτε εφαρμόστηκαν παραμετρικά τέστ. Σύμφωνα με το θηκόγραμμα δε παρατηρούνται έκτοπες τιμές (outliers) στις τιμές πριν (Διάγραμμα 11) και μετά την ακτινοβόληση (Διάγραμμα 12) που να επηρεάζουν

τα αποτελέσματα μας. Εν αντιθέσει, παρατηρούνται πριν την ακτινοβόληση δύο έκτοπες τιμές στο γυναικείο φύλο, οι οποίες είναι πιθανό να έχουν επίδραση στα αποτελέσματα μας (Διάγραμμα 12). Όπως παρατηρείται στο Διάγραμμα 10 δεν απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση, επομένως δεν υπάρχει κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης και του παράγοντα φύλου πριν και μετά την ακτινοβόληση,  $p > 0,05$ . Ακόμη επειδή παρατηρείται μια αύξηση της τάξεως του 6,5% μεταξύ των δειγμάτων στους άντρες βρέθηκε ότι υπάρχει ισχυρή συσχέτιση  $r = 0,895$ , χωρίς να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά  $p = 0,30 > 0,05$ . Επομένως, η ακτινοβολία δεν επηρεάζει την οσμωτική ευθραυστότητα μεταξύ των δύο φύλων.



**Διάγραμμα 11:** Θηκόγραμμα (box plot) πριν την ακτινοβόληση, σε σχέση με τα δύο φύλα. ( $p > 0,05$ )



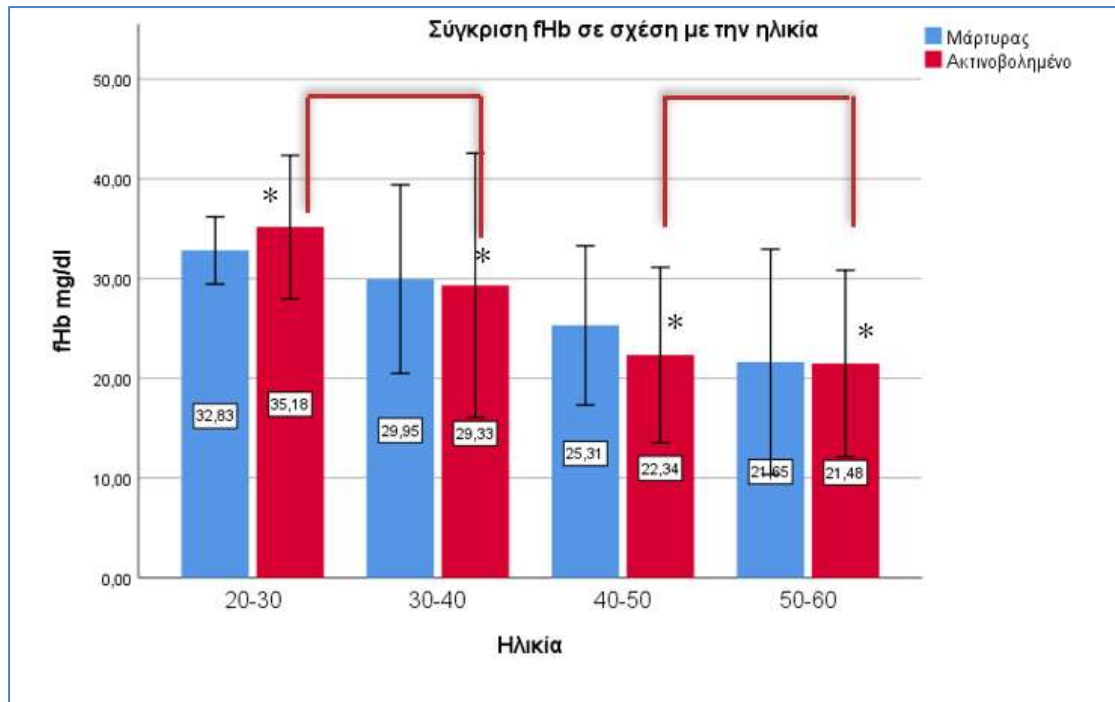
**Διάγραμμα 12:** Θηκόγραμμα (box plot) δύο ώρες μετά την ακτινοβόληση, σε σχέση με τα δύο φύλα. ( $p > 0,05$ )

### Γ) Σύγκριση Ελεύθερης Αιμοσφαιρίνης σε σχέση με την ηλικία

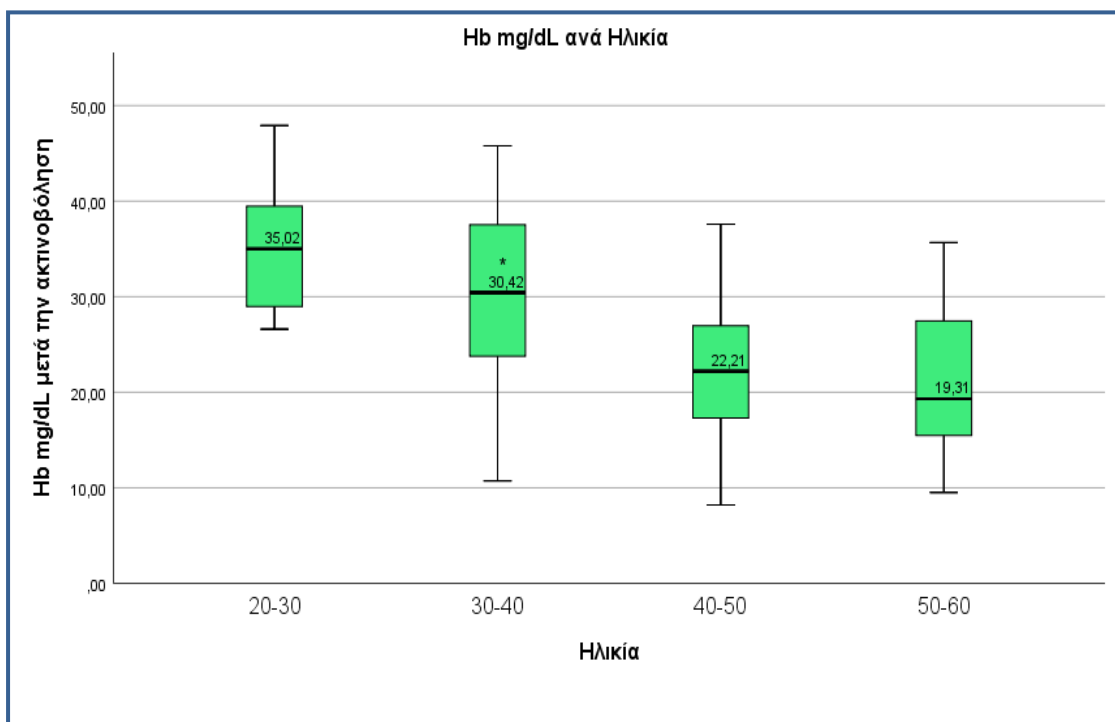
**Πίνακας 7:** Σύγκριση της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης μαρτύρων και ακτινοβολημένου αίματος με τον παράγοντα ηλικία.

Ηλικία	20-30	30-40	40-50	50-60	P value
<b>Μάρτυρας</b>	32,83± 3,38	29,95± 9,45	25,31 ± 7,98	21,65± 11,29	
<b>Ακτινοβολημένο</b>	35,18± 7,19	29,33± 13,26	22,34± 8,79	21,48± 9,35	0,02 < 0,05





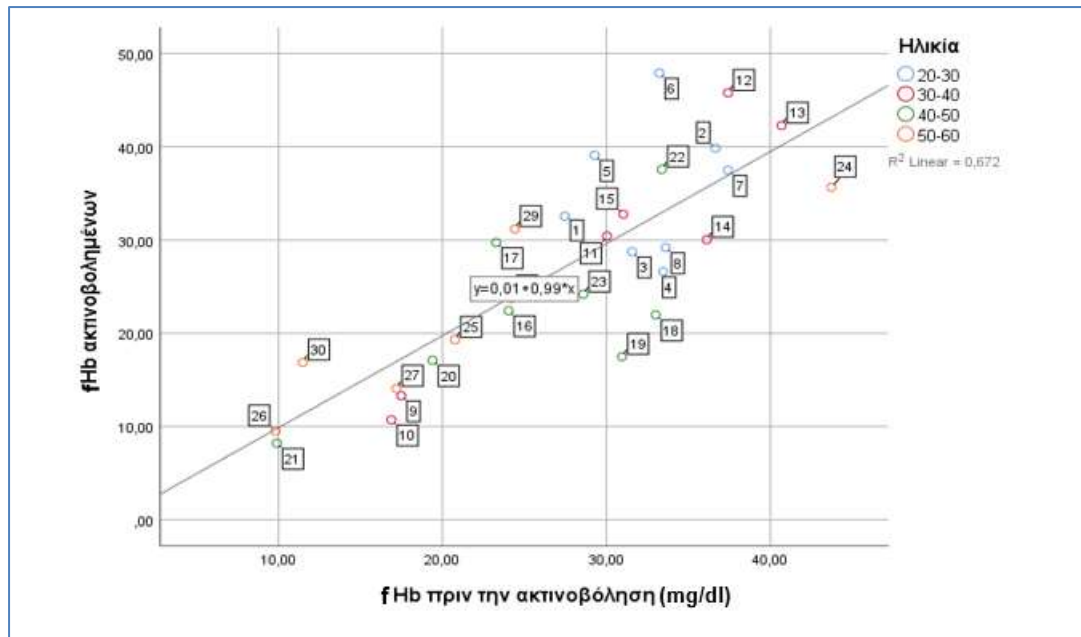
**Διάγραμμα 13:** Σύγκριση ελεύθερης αιμοσφαιρίνης μαρτύρων και ακτινοβολημένου αίματος σε σχέση με την ηλικία. (\*), ( $p < 0,05$ )



**Διάγραμμα 14:** Σύγκριση της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης στα δείγματα μετά την ακτινοβόληση (N=30) σε σχέση με την ηλικία,  $p < 0,05$ , \* Η διάμεσος (median) των δεδομένων αναλόγως την ηλικία.

Τα συγκεκριμένα δεδομένα ύστερα από εφαρμογή του τεστ κανονικότητας κατά Kolmogorov-Smirnov, κρίθηκαν ότι ακολουθούν την κανονική κατανομή με  $p > 0,05$ . Αρά εφαρμόστηκε τεστ one way Anova, σύμφωνα με το οποίο υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά του ακτινοβολημένου αίματος μεταξύ της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης και την ηλικία  $p = 0,03 < 0,05$  (Διάγραμμα 13). Εφόσον παρουσιάζεται διαφορά μεταξύ της fHb και των διαφορετικών ομάδων ηλικίας μετά την ακτινοβόληση, εφαρμόστηκε γραμμική παλινδρόμηση για την ανάλυση της μεταξύ τους σχέσης. Σύμφωνα με το Διάγραμμα 15 ο συντελεστής  $R^2$  ισούται με 0,672, ( $r = 0,819$ ) άρα υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ fhb πριν και μετά την ακτινοβόληση. Λαμβάνοντας υπόψη το παράγοντα ηλικία, στο ακτινοβολούμενο αίμα βρέθηκε ότι υπάρχει αρνητική συσχέτιση μεταξύ τους, δηλαδή όσο αυξάνεται η ηλικία τόσο μειώνεται η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη μετά την έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία X. Η συσχέτιση αυτή που παρατηρήθηκε θεωρείται στατιστικά σημαντική καθώς  $p = 0,004 < 0,05$  και μέτρια αρνητική με συντελεστή Pearson's  $r = -0,509 < 1$ . Συμπερασματικά, η ακτινοβολία προκαλεί μεγαλύτερη απελευθέρωση της fHb σε ηλικίες 20-40 έτη σε σχέση με 40-60.

Όσον αφορά τον συντελεστή προσδιορισμού  $R^2 = 0,672 < 1$ , η εξίσωση της παλινδρόμησης εξηγεί ικανοποιητικά την μεταβολή της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 15.



**Διάγραμμα 15:** Ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης της κύριας συνιστώσας της Αιμοσφαιρίνης των μαρτύρων και της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης των ακτινοβολημένων ερυθρών σε σχέση με τον παράγοντα ηλικία. Τα νούμερα που καταγράφονται στο διάγραμμα είναι ο αριθμός των δειγμάτων.

**Δ) Σύγκριση των παραμέτρων της Οσμωτικής Ευθραυστότητας και της Ελεύθερης Αιμοσφαιρίνης ανάλογα με την δόση, φύλο και ηλικία**

Η οσμωτική ευθραυστότητα και η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη αποτελούν δείκτες αιμόλυσης των ερυθροκυττάρων όταν αυτά υπόκεινται σε καταστάσεις στρες (πχ. Ακτίνες-Χ).

Τα δεδομένα ακολουθούν την κανονική κατανομή (Kolmogorov-Smirnov) με  $p > 0,05$ , επομένως εφαρμόστηκαν παραμετρικοί έλεγχοι υποθέσεων. Δεν παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των παραγόντων της οσμωτικής ευθραυστότητας και της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης  $p > 0,05$ .

Παρομοίως, ισχύει και για την σύγκριση σε σχέση με το φύλο και την ηλικία. Επομένως, στα συγκεκριμένα πειράματα δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της ευθραυστότητας των κυττάρων και της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης στο

πλάσμα, αναφορικά με την δόση της ακτινοβολίας, το φύλο και την ηλικία των εθελοντών. Πιο αναλυτικά:

- Ο δείκτης MCF και η fHb (Διάγραμμα 1 και 8) για το συγκεκριμένο πλήθος δειγμάτων, δε παρουσιάζουν συσχέτιση μεταξύ τους επομένως φαίνεται να μην επηρεάζονται παράλληλα με την αύξηση της δόσης.
- Μικρή αύξηση παρατηρείται στους άνδρες του δείκτη MCF κατά 18% (Διάγραμμα 4) και της fHb κατά 6,5% (Διάγραμμα 10), η οποία όμως δε θεωρείται στατιστικά σημαντική  $p>0,05$ . Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στο μικρό δείγμα μελέτης.
- Μια μικρή αύξηση διαπιστώνεται στις ηλικίες 20-30, του δείκτη MCF (25%) και στην fHb (7,2%), ενώ δεν υπάρχει σημαντική αλλαγή στις γηραιότερες 50-60. Οι παρατηρήσεις αυτές όμως δε θεωρούνται στατιστικά σημαντικές, γι'αυτό χρειάζεται να διεξαχθεί έρευνα σε μεγαλύτερο δείγμα υγιών εθελοντών.

## **E. Συζήτηση- Συμπεράσματα**

Στη σύγχρονη εποχή ο άνθρωπος εκτίθεται συχνά σε δόσεις ιονίζουσας ακτινοβολίας είτε από το φυσικό του περιβάλλον είτε από τεχνητό.

Αρκετές έρευνες έχουν διεξαχθεί για τη μελέτη των επιδράσεων της ιονίζουσας ακτινοβολίας σε υψηλές δόσεις ακτίνων X και γ (βλ. ενότητα 6.2 Επιδράσεις της Ιονίζουσας ακτινοβολίας στα ώριμα ερυθροκύτταρα) στο επίπεδο των ερυθροκυττάρων, σε δείγματα φρέσκου και αποθηκευμένου αίματος.

Στην παρούσα διπλωματική μελετήθηκε η επίδραση των διαγνωστικών ακτίνων X (low doses X-ray) *in vitro*, όσον αφορά στην οσμωτική ευθραυστότητα και την ελεύθερη αιμοσφαιρίνη του πλάσματος των ερυθροκυττάρων, από αίμα υγιών εθελοντών. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων βασίστηκε στις επιπτώσεις που είναι δυνατό να προκαλέσει η ακτινοβολία- X σε χαμηλές δόσεις, στις αιμολυτικές παραμέτρους των ερυθροκυττάρων.

Για τον έλεγχο των αρνητικών επιδράσεων που προκαλεί η ακτινοβολία X σε χαμηλές εξετάσεις πραγματοποιήθηκε η ακτινοβολήση του αίματος, (σε πραγματικό χρόνο) των ασθενών *in vitro* σε ακτινολογικό μηχάνημα ακτίνων X σε δόσεις, διατηρώντας σταθερά τα  $Kvp=100$  και αυξάνοντας την κλίμακα των mAs. Παρατηρήθηκε ότι η οσμωτική ευθραυστότητα αυξάνεται με την αύξηση της δόσης της ακτινοβολίας κατά 22%, χωρίς όμως να θεωρείται στατιστικά σημαντική διαφορά. Το γεγονός αυτό, υποδηλώνει ότι χρειάζεται να χρησιμοποιηθεί μεγαλύτερο δείγμα εθελοντών ή πιθανότατα τα ερυθροκύτταρα σε μικρές δόσεις να μην υπόκεινται σε οσμωτικό στρες. Σε παρόμοιες μελέτες με χρήση μικρότερης δόσης ακτινοβολίας (0,03, 0,05,1 mGy), δεν παρατηρήθηκε αλλαγή ύστερα από την ακτινοβολήση του ποσοστού της οσμωτικής ευθραυστότητας, αλλά στην προκειμένη περίπτωση το δείγμα ήταν μικρό ( $N<10$ ) (Tungjai et al., 2019). Σε μεγαλύτερες δόσεις ακτινοβολίας  $p\chi \geq 0,1Gy$  παρατηρείται αύξηση της οσμωτικής ευθραυστότητας, δηλαδή μετατόπιση της καμπύλης προς τα δεξιά, ενώ σε μικρότερες δόσεις παρατηρείται το αντίθετο μετατόπιση προς τα αριστερά, πράγμα, το οποίο σημαίνει ότι τα κύτταρα είναι πιο ανθεκτικά σε υποτονικό διάλυμα NaCl, άρα παρουσιάζουν μειωμένη ευθραυστότητα και συνεπώς η μεμβράνη τους είναι περισσότερο ανθεκτική (Mahmoud S.S et al., 2010).

Επομένως σε υψηλές δόσεις ακτινοβολήσης με ιονίζουσα ακτινοβολία και κυρίως γ, τα κύτταρα υπόκεινται οσμωτικό στρες με αύξηση του δείκτη

ευθραυστότητας, ενώ σε χαμηλές δόσεις είτε δεν επηρεάζονται είτε παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα.

Η ακτινοβόληση των συστατικών του αίματος προκαλεί αύξηση των επιπέδων της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης του πλάσματος με την οξειδωση της σε μεθαιμοσφαιρίνη, προκαλώντας διαταραχές στη μεμβράνη του κυττάρου με συνοδό απώλεια της ερυθροκυτταρικής επιφάνειας, μέσω της απελευθέρωσης μικροκυστιδίων.

Στην μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην συγκεκριμένη διπλωματική με την μέθοδο κατά Harboe, επιβεβαιώνεται η θετική συσχέτιση της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης με τον παράγοντα δόση πριν και μετά την ακτινοβόληση. Αυτό υποδεικνύει πιθανότατα ότι με την αύξηση της δόσης, αυξήθηκαν τα ποσοστά της αιμοσφαιρίνης στο πλάσμα, με αποτέλεσμα την καταστροφή των ερυθροκυττάρων και παράλληλη διαταραχή του σχήματος τους σε σφαιροκύτταρα, κατάσταση η οποία θα επιβεβαιώνονταν με την παρατήρηση των ερυθροκυττάρων σε SEM.

Σε μεγαλύτερη διάρκεια έκθεσης σε ιονίζουσα ακτινοβολία (40 λεπτά) με παράλληλη αύξηση της δόσης, όπως αναφέρεται και από τον Krylon και τους συν., παρατηρείται μεγαλύτερη αύξηση του ποσοστού της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης στον εξωκυττάριο χώρο που οδηγεί στην υπεροξειδωση των λιπιδίων (LPO), προκαλώντας την δημιουργία πόρων στην μεμβράνη και την αυξημένη αιμόλυση. Επομένως όσο αυξάνεται η δόση τόσο περισσότερο απελευθερώνεται ελεύθερη αιμοσφαιρίνη, γεγονός που συνεπάγεται με την επιταχυνόμενη αιμόλυση και την σηματοδότηση των πρώιμων σταδίων της ερυθροκυτταρικής γήρανσης (Krylon et al., 2015).

Τέλος, έχει διερευνηθεί η χρήση των μικροκυστιδίων ως βιοδείκτης εντόπισης των βλαβών της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης ύστερα από έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία. Το γεγονός αυτό, έχει ερευνηθεί σε υγιείς εργαζόμενους που εκτίθενται μακροχρόνια σε χαμηλές δόσεις ιονίζουσας ακτινοβολίας και έχει παρατηρηθεί ο αυξημένος πληθυσμός των μικροκυστιδίων, στα οποία εξωτερικεύεται η PS στην επιφάνεια τους (Al-Massarani et al., 2018).

Στην συγκεκριμένη διπλωματική, ερευνήθηκε εάν υπάρχει και συσχέτιση μεταξύ των αιμολυτικών παραμέτρων του ερυθροκυττάρου ως προς το φύλο και την ηλικία. Βρέθηκε ότι ο δείκτης της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης παρουσιάζει

μέτρια αρνητική συσχέτιση με την παράμετρο της ηλικίας. Αναλυτικά, η εφαρμογή χαμηλών δόσεων ακτίνων Χ επηρεάζει περισσότερο τις ηλικιακές ομάδες από 20-30 και από 30-40, σε σχέση με τις ηλικιακές ομάδες από 40-50 και 50-60. Η ερμηνεία του αποτελέσματος αυτού δεν έχει μελετηθεί από άλλες υπόλοιπες επιστημονικές ομάδες, καθώς σε βιβλιογραφικές αναφορές δεν έχει πραγματοποιηθεί συσχέτιση μεταξύ της δόσης και της ηλικίας στα ακτινοβολημένα ερυθροκύτταρα. Σε έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί, όσον αφορά την διαφορά, όπως πχ. στον πληθυσμό των ερυθροκυττάρων, σε νέες και μεγαλύτερες ηλικίες, έχει διαπιστωθεί ότι ο γερασμένος πληθυσμός αποτελείται από κύτταρα που έχουν μικρότερη διάρκεια ζωής άρα είναι και πιο γηρασμένα (Shperling et al., 1990). Επομένως, θα περιμέναμε ότι η ιονίζουσα ακτινοβολία, η οποία αναστέλλει τα αντιοξειδωτικά μονοπάτια θα προκαλεί μεγαλύτερες επιπτώσεις σε ηλικίες 50-60.

Συνεπώς, η αρνητική συσχέτιση που παρατηρήθηκε μπορεί να αιτιολογηθεί πιθανόν από το γεγονός ότι τα ερυθροκύτταρα γηραιότερων ατόμων έχουν μεταβολές που τα καθιστούν ανθεκτικότερα στην αιμόλυση. Για να είναι πιο σαφή τα αποτελέσματα, είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί: α) έλεγχος των αιμολυτικών παραμέτρων έπειτα από 4 ώρες μετά την ακτινοβολήση και β) μελέτη ενδοκυττάρων επιπέδων ROS για να ερμηνευθεί εάν αυτή η αλλαγή οφείλεται στην αντίδραση του οργανισμού στο οξειδωτικό στρες ή είναι αποτέλεσμα πρόωρης γήρανσης.

Η παρούσα ερευνητική εργασία παρουσιάζει ορισμένους περιορισμούς, όπως το μικρό δείγμα πληθυσμού, και ότι δεν πραγματοποιήθηκε μελέτη των ενδοκυττάρων επιπέδων ROS και των εξωκυστιδίων.

Συμπερασματικά, κάποια αρχικά συμπεράσματα είναι ότι οι χαμηλές δόσεις της ιονίζουσας ακτινοβολίας επιδρούν στον ανθρώπινο οργανισμό και ειδικότερα στα ώριμα ερυθροκύτταρα, προκαλώντας αύξηση της καταστροφής των ερυθροκυττάρων (αιμόλυση), κυρίως όσον αφορά στην ελεύθερη αιμοσφαιρίνη. Επίσης, ο βαθμός της αύξησης της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης φαίνεται να επηρεάζει διαφορετικά την κάθε ηλικία. Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με τα ευρήματα της εν λόγω εργασίας διπλωματικής, πιθανότατα η ακτινοβολία να επιδρά περισσότερο στις νεότερες ηλικίες.

Είναι απαραίτητο σε μελλοντικό χρόνο, να εφαρμοστούν περισσότερες ερευνητικές μελέτες με μεγαλύτερο δείγμα εθελοντών, σε σχέση με την επίδραση των χαμηλών δόσεων ακτίνων Χ, που χρησιμοποιούνται για διαγνωστικούς σκοπούς. Επιπλέον, είναι αναγκαίο να εφαρμοστούν περισσότερες τεχνικές ανάλυσης, σχετικές με τις βλάβες, που προκαλεί η ακτινοβολία στα ερυθροκύτταρα. Ειδικότερα, χρειάζεται να πραγματοποιηθεί μελέτη των ενδοκυττάρων επιπέδων ROS καθώς και των επιπέδων της κυστιδιοποίησης της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, γεγονότα που σηματοδοτούν τη γήρανση των ερυθροκυττάρων. Επιπροσθέτως, σε περιπτώσεις που δεν παρατηρούνται διαταραχές στην οσμωτική ευθραυστότητα των κυττάρων, θα ήταν δυνατό να διεξαχθεί μελέτη, σχετική με τον βαθμό του δείκτη MCF και την κλίση που παρουσιάζει η καμπύλη της αιμόλυσης, η οποία μας δίνει δεδομένα για την κατανομή των οσμωτικών ιδιοτήτων των μελετημένων κυττάρων (Walski et al., 2014). Τέλος, χρειάζεται να διενεργηθεί επιπλέον έρευνα, αναφορικά με την επίπτωση ακτινοβολίας με χρήση ακτίνων Χ σε διαφορετικές ομάδες ηλικιών και να γίνει συσχέτιση με την δόση της ακτινοβολίας.

## Περίληψη

Είναι γνωστό ότι, τα τελευταία χρόνια η ιονίζουσα ακτινοβολία χρησιμοποιείται ευρέως για διαγνωστικούς σκοπούς στην Ιατρική. Οι



επιπτώσεις, που προκαλούν οι διαγνωστικές ακτινολογικές εξετάσεις αποτελούν αντικείμενο προς διερεύνηση.

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε με σκοπό την μελέτη των διαταραχών των αιμολυτικών παραμέτρων των ώριμων ερυθροκυττάρων *in vitro*, πριν και μετά την ακτινοβόληση αίματος υγιών εθελοντών σε χαμηλές δόσεις διαγνωστικών ακτίνων X.

Πραγματοποιήθηκε η λήψη δείγματος 5 ml από 30 υγιείς εθελοντές, το οποίο διαχωρίστηκε σε δύο σωληνάρια EDTA των 2,5ml, εκ των οποίων τα τριάντα ακτινοβολήθηκαν σε δύο διαφορετικές δόσεις  $2 \times 32,52 \mu\text{Gy}$  (0,03mGy) και σε  $2 \times 187,84 \mu\text{Gy}$  (0,2 mGy) και τα υπόλοιπα αποτελούσαν τους μάρτυρες.

Εφαρμόστηκε έλεγχος της οσμωτικής ευθραυστότητας των ερυθρών καθώς και της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης του πλάσματος, πριν την ακτινοβόληση και δύο ώρες μετά την ακτινοβόληση. Στις συγκεκριμένες δόσεις, παρατηρείται αυξημένη αιμόλυση των ερυθροκυττάρων, συγχρόνως με την αύξηση της δόσης και αύξηση των επιπέδων της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης στο πλάσμα, γεγονός το οποίο υποδηλώνει αυξημένη οξειδωτική βλάβη και γήρανση των ερυθροκυττάρων. Επίσης, πραγματοποιήθηκε συσχέτιση των δύο παραμέτρων σε σχέση με τη δόση, το φύλο και την ηλικία. Παρατηρήθηκε, ότι οι χαμηλές δόσεις των ακτίνων X προκαλούν μεγαλύτερη αύξηση της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης στις ηλικίες 20-40 σε σχέση με τις ηλικίες 41-60, πράγμα το οποίο απαιτεί περαιτέρω μελέτη. Ο δείκτης οσμωτικής ευθραυστότητας φαίνεται να μην επηρεάζεται σε τόσο χαμηλές δόσεις.

Συμπερασματικά, ο δείκτης οσμωτικής ευθραυστότητας δεν επηρεάζεται σε χαμηλές δόσεις ακτίνων X σε αντίθεση με την ελεύθερη αιμοσφαιρίνη. Για να εξαχθούν ακριβή συμπεράσματα, είναι απαραίτητο να εφαρμοσθούν μελέτες σε μεγαλύτερο πλήθος εθελοντών και να εφαρμοστούν περισσότερες τεχνικές ελέγχου, όσον αφορά στη μορφολογία των ερυθροκυττάρων, την ερυθροκυτταρική μεμβράνη και την γήρανση. Τέλος, τα δεδομένα αυτά μπορούν να συσχετισθούν σε σχέση με την ηλικία.

## **Abstract**

Ionizing radiation is widely used in the medical Radiology for diagnostic purposes. The harmful effects of the radiological examinations are yet to be

discussed in the research community. This current study investigates the effects on hemolytic parameters of red blood cells *in vitro*, before and after the exposure of low doses of X-ray radiation, in blood taken from human healthy volunteers.

Blood samples were collected from 30 healthy volunteers, in EDTA tubes (2,5ml). The tubes were exposed to doses of 32,52 $\mu$ Gy (2\*0,03mGy) and 187,84 $\mu$ Gy (2\*0,2 mGy) used for medical diagnostic X-rays, whereas control tubes were not exposed. The osmotic fragility test and the measurement of free hemoglobin in plasma (Harboe method), are tested before the irradiation and two hours after blood irradiation. In these particular doses, there has been an augmentation in the hemolysis and in free hemoglobin of plasma that might be induced by ROS and the senescence of irradiated red blood cells. Therefore, a Pearson's correlation has been conducted between the two hemolytic parameters depending on the x-ray doses, gender and age. It was observed that low doses of medical x-rays have higher effect on the age group of 20-40 than the group of 40-60, therefore it needs further investigation. Low doses of X-rays seem not to have an effect in the mean corpuscular fragility (MCF) index.

In conclusion, low doses X-rays do not affect the MCF index, in comparison with free plasma hemoglobin. In order to have more accurate results, it is important further studies to be conducted with a larger sample, while different techniques should be performed in order to study the morphology of erythrocytes, the composition of erythrocyte membrane and erythrocytes' senescence markers. Last but not least, these data are correlated with age.

## **ΣΤ. Βιβλιογραφικές αναφορές**

**Adams, F., Bellairs, G. R., Bird, A. R., & Oguntibeju, O. O.** (2018). Metabolic effects occurring in irradiated and non-irradiated red blood cellular components

for clinical transfusion practice: An in vitro comparison. *African Journal of Laboratory Medicine*, 7(1). doi:10.4102/ajlm.v7i1.606

**Al-Massarani, G., Najjar, F., Aljapawe, A., & Ikhtiar, A.** (2018). Evaluation of circulating microparticles in healthy medical workers occupationally exposed to ionizing radiation: A preliminary study. *International journal of occupational medicine and environmental health*, 31(6), 783–793. <https://doi.org/10.13075/ijomeh.1896.01106>

**Als-Nielsen, J., & Mcmorrow, D.** (2011). *Elements of Modern X-ray Physics*. doi:10.1002/9781119998365

**Andersen, O. S., & Koeppe, R. E.** (2007). Bilayer Thickness and Membrane Protein Function: An Energetic Perspective. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 36(1), 107-130. doi:10.1146/annurev.biophys.36.040306.132643

**Antonelou, M. H., Kriebardis, A. G., & Papassideri, I. S.** (2010). Aging and death signalling in mature red cells: from basic science to transfusion practice. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue*, 8 Suppl 3(Suppl 3), s39–s47. <https://doi.org/10.2450/2010.007S>

**Antosik, A., Czubak, K., Gajek, A., Marczak, A., Glowacki, R., Borowczyk, K., & Zbikowska, H. M.** (2015). Influence of Pre-Storage Irradiation on the Oxidative Stress Markers, Membrane Integrity, Size and Shape of the Cold Stored Red Blood Cells. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*,

**Aoki, T.** (2017). A Comprehensive Review of Our Current Understanding of Red Blood Cell (RBC) Glycoproteins. *Membranes*, 7(4), 56. doi:10.3390/membranes7040056

**Arashiki, N., Kimata, N., Manno, S., Mohandas, N., & Takakuwa, Y.** (2013). Membrane Peroxidation and Methemoglobin Formation Are Both Necessary for Band 3 Clustering: Mechanistic Insights into Human Erythrocyte Senescence. *Biochemistry*, 52(34), 5760-5769. doi:10.1021/bi400405p

**Arese, P., Turrini, F., & Schwarzer, E.** (2005). Band 3/Complement-mediated Recognition and Removal of Normally Senescent and Pathological Human Erythrocytes. *Cellular Physiology and Biochemistry*,16(4-6), 133-146. doi:10.1159/000089839

**Azhari, S. F. Diba** (2018). The effects of X-rays radiation on active and passive transport of erythrocytes membrane. *Journal of International Dental and Medical Research* ISSN 1309-100X , σσ. pp. 261-264.

**Badalyan H., Baghdasaryan N., Ohanyan K., Stepanyan M., Kishmiryan A.** (2016). Dependence of Erythrocyte Shape Parameter on the Low Dose  $\gamma$ -Irradiation. *Armenian Journal of Physics*, 2016, vol. 9, issue 1, pp. 95-99

**Beir V.** (1990): Health Effects of Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation, Washington (DC): National Academies Press (US); 1990.

**Bernhardt, I., Nguyen, D. B., Wesseling, M. C., & Kaestner, L.** (2020). Intracellular Ca<sup>2</sup> Concentration and Phosphatidylserine Exposure in Healthy Human Erythrocytes in Dependence on in vivo Cell Age. *Frontiers in Physiology*,10. doi:10.3389/fphys.2019.01629

**Bernhardt, J. H.** (1992). Non-ionizing radiation safety: radiofrequency radiation, electric and magnetic fields. *Physics in Medicine and Biology*, 37(4), 807–844. doi:10.1088/0031-9155/37/4/001

**Bissinger, R., Bhuyan, A. A., Qadri, S. M., & Lang, F.** (2018). Oxidative stress, eryptosis and anemia: A pivotal mechanistic nexus in systemic diseases. *The FEBS Journal*,286(5), 826-854. doi:10.1111/febs.14606

**Bresciani, F., Auricchio, F., & Fiore, C.** (1964). Effect of X-Rays on Movements of Sodium in Human Erythrocytes. *Radiation Research*, 21(3), 394. doi:10.2307/3571589

**Brosche, T.** (1989). Red Blood Cell Membrane — Composition and Aging. *Gerontology*, 67-80. doi:10.1007/978-3-642-74996-4\_5

**Brugnara, C., & Churchill, W.** (1992). Effect of irradiation on red cell cation content and transport. *Transfusion*, 32(3), 246-252. doi:10.1046/j.1537-2995.1992.32392213809.x

**Burger, P., Hilarius-Stokman, P., Korte, D. D., Berg, T. K., & Bruggen, R. V.** (2012). CD47 functions as a molecular switch for erythrocyte phagocytosis. *Blood*, 119(23), 5512-5521. doi:10.1182/blood-2011-10-386805

**Calvente, I., Fernandez, M. F., Villalba, J., Olea, N., & Nuñez, M. I.** (2010). Exposure to electromagnetic fields (non-ionizing radiation) and its relationship with childhood leukemia: A systematic review. *Science of The Total Environment*, 408(16), 3062-3069. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.03.039

**Cember, H., & Johnson, T. E.** (2009). *Introduction to health physics*. McGraw-Hill Medical.

**Chung, H-J, Chung, J-W, Yi, J, et al.** (2020). Automation of Harboe method for the measurement of plasma free hemoglobin. *J Clin Lab Anal.*; 34:e23242. <https://doi.org/10.1002/jcla.23242>

**Conran, N., & Almeida, C. B.** (2016). Hemolytic vascular inflammation: an update. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*, 38(1), 55–57. <https://doi.org/10.1016/j.bjhh.2015.10.004>

**Corre, I., Niaudet, C., & Paris, F.** (2010). Plasma membrane signaling induced by ionizing radiation. *Mutation research*, 704(1-3), 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2010.01.014>

**Cunha, S. R., & Mohler, P. J.** (2009). Ankyrin protein networks in membrane formation and stabilization. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(11-12), 4364-4376. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00943.x

**Dainiak, N.** (2002). Hematologic consequences of exposure to ionizing radiation. *Experimental Hematology*, 30(6), 513-528. doi:10.1016/s0301-472x(02)00802-0

**Daleke, D. L.** (2008). Regulation of phospholipid asymmetry in the erythrocyte membrane. *Current Opinion in Hematology*,15(3), 191-195. doi:10.1097/moh.0b013e3282f97af7

**Dean, L.** (1970, January 01). Blood Groups and Red Cell Antigens. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2261/>

**Desouky, O., et al.**(2015). Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation, *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jrras.2015.03.003>

**Domenech Haydee.** (2017). Radiation Safety Management and Programs. Switzerland: Springer, Cham.

**Duvigneau, J. C., Esterbauer, H., & Kozlov, A. V.** (2019). Role of Heme Oxygenase as a Modulator of Heme-Mediated Pathways. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 8(10), 475. <https://doi.org/10.3390/antiox8100475>

**EDIMECHEVA P., KISEL M. A., O. I. S, I. (1997).** The damage to phospholipids caused by free radical attack on glycerol and sphingosine backbone. *International Journal of Radiation Biology*, 71(5), 555–560. doi:10.1080/095530097143888

**Giger, K., Habib, I., Ritchie, K., & Low, P. S.** (2016). Diffusion of glycophorin A in human erythrocytes. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*,1858(11), 2839-2845. doi:10.1016/j.bbamem.2016.08.012

**Greer, J. P.** (2014). Wintrobe's clinical hematology. Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins Health.

**Han, V., Serrano, K. and Devine, D.V.** (2010), A comparative study of common techniques used to measure haemolysis in stored red cell concentrates. *Vox Sanguinis*, 98: 116-123. doi:[10.1111/j.1423-0410.2009.01249.x](https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2009.01249.x)

**Hedayat, K. M., & Lapraz, J.** (2019). A new approach to biological modeling: Introduction to the biology of functions. *The Theory of Endobiogeny*, 215-254. doi:10.1016/b978-0-12-816903-2.00015-x

**HENRI, V., MAYER, A.** (1904), Action des radiations du radium sur les colloïdes d'hémoglobine, les ferments, et les globules rouges, *Compt. Rend.* 138 521-524.

**Holinstat, M.** (2017). Normal platelet function. *Cancer and Metastasis Reviews*,36(2), 195-198. doi:10.1007/s10555-017-9677-x

**Holthusen, H.** (1923), Blutveränderungen durch Röntgenstrahlen und deren Sensibilisierung, *Strahlentherapie* 14 561-570.

**Hoppe W., Lohmann W., Markl H., Ziegler H.** , (1983) *Biophysics*. Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-68877-5.

**Ingle, E., & Klinken, S.** (2006). Erythrocytes. *Encyclopedia of Respiratory Medicine*, 142-146. doi:10.1016/b0-12-370879-6/00141-1

**K, M., & M.p, B.** (2017). Comparison Of Platelet Count By Peripheral Smear Method And By Electronic Counter Method. *International Journal of Advanced Research*,5(4), 1437-1434. doi:10.21474/ijar01/3964

**Kaufman, R. (2017).** Red Blood Cell Life Span, Senescence, and Destruction. *Anemia*, 19-22. doi:10.1017/9781108586900.004

**Kemal Dervić, Vladimir Šinik, Željko Despotović,** (2019, October). BASICS OF ELECTROMAGNETIC RADIATION. IX International Conference Industrial Engineering and Environmental Protection 2019 (IIZS 2019) .

**Kodippili, G. C., Spector, J., Sullivan, C., Kuypers, F. A., Labotka, R., Gallagher, P. G., . . . Low, P. S.** (2009). Imaging of the diffusion of single band 3 molecules on normal and mutant erythrocytes. *Blood*,113(24), 6237-6245. doi:10.1182/blood-2009-02-205450

**Kralj-Iglič, V. (2015).** Membrane Microvesiculation and its Suppression. *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, 177-204. doi:10.1016/bs.adplan.2015.06.003

**Kriebardis, A. G., Antonelou, M. H., Stamoulis, K. E., Economou-Petersen, E., Margaritis, L. H., & Papassideri, I. S.** (2007). Progressive oxidation of

cytoskeletal proteins and accumulation of denatured hemoglobin in stored red cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*,11(1), 148-155. doi:10.1111/j.1582-4934.2007.00008.x

**Kriebardis, A., Antonelou, M., Stamoulis, K., Economou-Petersen, E., Margaritis, L. and Papassideri, I.** (2007), Storage-dependent remodeling of the red blood cell membrane is associated with increased immunoglobulinG binding, lipid raft rearrangement, and caspase activation. *Transfusion*, 47: 1212-1220. doi:[10.1111/j.1537-2995.2007.01254.x](https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2007.01254.x)

**Krylov, V.N., Deriugina, A.V., Pleskova, S.N. et al.** (2015), Apoptotic nature of erythrocyte hemolysis induced by low doses of ionizing radiation. *BIOPHYSICS* **60**, 79–84.  
<https://doi.org/10.1134/S0006350915010170>

**Kuhn, V., Diederich, L., Keller, T. S., Kramer, C. M., Lückstädt, W., Panknin, C., Cortese-Krott, M. M.** (2017). Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia. *Antioxidants & Redox Signaling*,26(13), 718-742. doi:10.1089/ars.2016.6954

**Lang, F., Gulbins, E., Lerche, H., Huber, S. M., Kempe, D. S., & Föller, M.** (2008). Eryptosis, a Window to Systemic Disease. *Cellular Physiology and Biochemistry*,22(5-6), 373-380. doi:10.1159/000185448

**Lang, F., Lang, E., & Föller, M.** (2012). Physiology and Pathophysiology of Eryptosis. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*,39(5), 308-314. doi:10.1159/000342534

**Lefrançais, E., Ortiz-Muñoz, G., Caudrillier, A., Mallavia, B., Liu, F., Sayah, D. M.,Looney, M. R.** (2017). The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature*,544(7648), 105-109. doi:10.1038/nature21706

**LESSLER M. A.** (1959). Low-level x-ray damage to amphibian erythrocytes. *Science* (New York, N.Y.), 129(3362), 1551–1553.  
<https://doi.org/10.1126/science.129.3362.1551>



- Li, H., & Lykotrafitis, G.** (2014). Study of Protein Diffusion in Defective Erythrocyte Membrane. *Biophysical Journal*, 106(2). doi:10.1016/j.bpj.2013.11.3905
- Lu, Y., & Liu, J.** (2007). Erythrocyte membrane proteins and membrane skeleton. *Frontiers of Biology in China*, 2(3), 247-255. doi:10.1007/s11515-007-0035-1
- Mahmoud, S. S., El-Sakhawy, E., Abdel-Fatah, E. S., Kelany, A. M., & Rizk, R. M.** (2010). Effects of acute low doses of Gamma-radiation on erythrocytes membrane. *Radiation and Environmental Biophysics*, 50(1), 189–198. doi:10.1007/s00411-010-0333-x
- Marengo-Rowe, A. J.** (2006). Structure-Function Relations of Human Hemoglobins. *Baylor University Medical Center Proceedings*, 19(3), 239-245. doi:10.1080/08998280.2006.11928171
- Menon, A. K., & Herrmann, A.** (2013). Lipid Flip-Flop. *Encyclopedia of Biophysics*, 1261-1264. doi:10.1007/978-3-642-16712-6\_551
- Menon, S., & Gupton, S. L.** (2016). Building Blocks of Functioning Brain: Cytoskeletal Dynamics in Neuronal Development. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 183-245. doi:10.1016/bs.ircmb.2015.10.002
- Mohandas, N., & Gallagher, P. G.** (2008). Red cell membrane: Past, present, and future. *Blood*, 112(10), 3939-3948. doi:10.1182/blood-2008-07-161166
- Myers, D. K., & Bide, R. W.** (1966). Biochemical Effects of X-Irradiation on Erythrocytes. *Radiation Research*, 27(2), 250. doi:10.2307/3571914
- Neu, B., Sowemimo-Coker, S. O., & Meiselman, H. J.** (2003). Cell-Cell Affinity of Senescent Human Erythrocytes. *Biophysical Journal*, 85(1), 75-84. doi:10.1016/s0006-3495(03)74456-7
- Ng Kwan-Hoong,** (2003) Emissions and Exposures: Proceedings of the International Conference on Non-Ionizing Radiation at UNITEN (ICNIR2003).

**Nguyen, D. B., Ly, T. B., & Bernhardt, I.** (2017). Microvesicles Released from Human Red Blood Cells: Properties and Potential Applications. Novel Implications of Exosomes in Diagnosis and Treatment of Cancer and Infectious Diseases. doi:10.5772/intechopen.69599

**Oliveira, S. D., & Saldanha, C.** (2010). An overview about erythrocyte membrane. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*,44(1), 63-74. doi:10.3233/ch-2010-1253

**Parpart, A. K., Lorenz, P. B., Parpart, E. R., Gregg, J. R., & Chase, A. M.** (1947). THE OSMOTIC RESISTANCE (FRAGILITY) OF HUMAN RED CELLS. *The Journal of clinical investigation*, 26(4), 636–640. <https://doi.org/10.1172/JCI101847>

**Partridge, C. G., Campbell, J. H., & Alvarado, F.** (2008). The Effect of Platelet-Altering Medications on Bleeding From Minor Oral Surgery Procedures. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*,66(1), 93-97. doi:10.1016/j.joms.2005.11.055

**Pribush, A., Agam, G., Yermiahu, T., Dvilansky, A., Meyerstein, D., & Meyerstein, N.** (1994). Radiation Damage to the Erythrocyte Membrane: The Effects of Medium and Cell Concentrations. *Free Radical Research*,21(3), 135-146. doi:10.3109/10715769409056565

**Qureshi, A. I.** (2016). Structure and Genetics of Ebola Virus Disease. *Ebola Virus Disease*, 105-116. doi:10.1016/b978-0-12-804230-4.00008-x

**Reisz, J. A., Bansal, N., Qian, J., Zhao, W., & Furdul, C. M.** (2014). Effects of Ionizing Radiation on Biological Molecules—Mechanisms of Damage and Emerging Methods of Detection. *Antioxidants & Redox Signaling*, 21(2), 260–292. doi:10.1089/ars.2013.5489

**Repsold, L., & Joubert, A. M.** (2018). Eryptosis: An Erythrocyte's Suicidal Type of Cell Death. *BioMed Research International*,2018, 1-10. doi:10.1155/2018/9405617

**Saldana-Gonzalez, G., Reyes, U., Salazar, H., Martnez, O., Moreno, E., & Conde, R.** (2012). High Density Devices Applied to a Gamma-Camera Implementation. *Advanced Image Acquisition, Processing Techniques and Applications I*. doi:10.5772/33990

**Saliev, T., Begimbetova, D., Masoud, A., & Matkarimov, B.** (2019). Biological effects of non-ionizing electromagnetic fields: Two sides of a coin. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 141, 25-36. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2018.07.009

**Satchwell, T. J., Shoemark, D. K., Sessions, R. B., & Toye, A. M.** (2009). Protein 4.2 : A complex linker. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 42(3), 201-210. doi:10.1016/j.bcmed.2009.01.005

**Schaer, D. J., Buehler, P. W., Alayash, A. I., Belcher, J. D., & Vercellotti, G. M.** (2013). Hemolysis and free hemoglobin revisited: Exploring hemoglobin and hemin scavengers as a novel class of therapeutic proteins. *Blood*, 121(8), 1276-1284. doi:10.1182/blood-2012-11-451229

**Shaffer, T. M., Drain, C. M., & Grimm, J.** (2016). Optical Imaging of Ionizing Radiation from Clinical Sources. *Journal of Nuclear Medicine*, 57(11), 1661-1666. doi:10.2967/jnumed.116.178624

**Shperling, T., & Danon, D.** (1990). *Age population distribution of erythrocytes in young and old healthy donors. Experimental Gerontology*, 25(5), 413-422. doi:10.1016/0531-5565(90)90030-6

**Seibert, J. A.** (2004). X-Ray Imaging Physics for Nuclear Medicine Technologists. Part 1: Basic Principles of X-Ray Production. *J. Nucl. Med. Technol.*, σσ. vol32 no. 3 139-147.

**Shapiro, B., & Kollmann, G.** (1968). The Nature of the Membrane Injury in Irradiated Human Erythrocytes. *Radiation Research*, 34(2), 335. doi:10.2307/3572559

**Siddon, A. J., & Tormey, C. A.** (2019). The chemical and laboratory investigation of hemolysis. Retrieve

from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065242318300787?via=ihub>

**Smith, T. A., Kirkpatrick, D. R., Smith, S., Smith, T. K., Pearson, T., Kailasam, A. . . . Agrawal, D.K.** (2017), Radioprotective agents to prevent cellular damage due to ionizing radiation, *Journal of Translational Medicine*, 15 (1). doi:10.1186/s12967-017-1338-x

**Sokolov, A.A.** (1961), The effect of ionising radiation on stored blood, *Problems of Hematology and Blood Transfusion* 6 186-189.

**Soszyński, M., & Schuessler, H.** (1991). Effect of X-irradiation on Erythrocyte Membrane Proteins. Primary Radicals. *International Journal of Radiation Biology*, 60(6), 859-875. doi:10.1080/09553009114552671

**Suzuki Y. , Tateish N., Cicha I., Shiba M., Muraoka M., Tadokoro K., Maeda N.** (2000). Deformability of the X-ray irradiated red blood cells stored in mannitol-adenine-phosphate medium. *Clinical hemorheology and microcirculation*, **22** 131.

**Szutmári, T., Kis, D., Bogdándi, E. N., Benedek, A., Bright, S., Bowler, D., . . . Lumniczky, K.** (2017). Extracellular Vesicles Mediate Radiation-Induced Systemic Bystander Signals in the Bone Marrow and Spleen. *Frontiers in Immunology*, 8. doi:10.3389/fimmu.2017.00347

**Thaul Susan, O. H.** (1999). *Potential Radiation Exposure in Military Operations: Protecting the Soldier Before, During, and After*. Washington (DC): National Academies Press (US); 1999.:National Academies Press (US).

**TING, T.P., ZIRCLE, R.E.** (1940), The kinetics of the diffusion of salts into and out of X-irradiated erythrocytes, *J. Cell. Comp. Physiol.* 16 (1940) 197-206.

**Tungjai, M., Sopapang, J., Tasri, N. et al., (2019).** The Effects of Medical Diagnostic Low Dose X-rays after in vitro Exposure of Human Red Blood Cells: Hemolysis and Osmotic Fragility. *Toxicol. Environ. Health Sci.* **11**, 237–243 . <https://doi.org/10.1007/s13530-019-0409-1>

**University of Florida, Office of Administrative Affairs, Division of Environmental Health and Safety**, (2011) "Radiation Safety Short Course Study Guide: Biological Effects of Ionizing Radiation", Department of Radiation Control and Radiological Services, 212 NSC

**Viskupicova J, Blaskovic D, Galiniak S, Bartosz G, Horakova L, Sadowska-bartosz I.** (2015), Redox Biology Effect of high glucose concentrations on human erythrocytes in vitro. *Redox Biol.* 5:381-387

**Walski, T., Chludzińska, L., Komorowska, M., & Witkiewicz, W.** (2014). Individual Osmotic Fragility Distribution: A New Parameter for Determination of the Osmotic Properties of Human Red Blood Cells. *BioMed Research International*, 2014, 1-6. doi:10.1155/2014/162102

**Ward, J. M., Cherian, S., & Linden, M. A.** (2018). Hematopoietic and Lymphoid Tissues. *Comparative Anatomy and Histology*, 365-401. doi:10.1016/b978-0-12-802900-8.00019-1

**Zhang B, Liu B, Zhang H, Wang J** (2014) Erythrocyte Stiffness during Morphological Remodeling Induced by Carbon Ion Radiation. *PLoS ONE* 9(11): e112624. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112624>

**Zhang, R., Zhang, C., Zhao, Q., & Li, D.** (2013). Spectrin: Structure, function and disease. *Science China Life Sciences*, 56(12), 1076-1085. doi:10.1007/s11427-013-4575-0

**Zuo, S., Hellman, U., & Lundahl, P.** (2003). On the oligomeric state of the red blood cell glucose transporter GLUT1. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1618(1), 8-16. doi:10.1016/j.bbamem.2003.10.001

**Xu, D., Peng, M., Zhang, Z., Dong, G., Zhang, Y., & Yu, H.** (2012). Study of damage to red blood cells exposed to different doses of  $\gamma$ -ray irradiation. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue*, 10(3), 321–330. <https://doi.org/10.2450/2012.0076-11>

**ΜαργαρίτηςΧ. Λουκάς.** (1996). ΠΑΔΙΟΒΙΟΛΟΓΙΑ Ακτινοβολίες και Ζωή. Αθήνα: ΣΥΜΜΕΤΡΙΑ.

## **Βιβλιογραφία εικόνων**

**Εικόνα 1:** Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. (2002). Biochemistry. 5<sup>th</sup> edition. New York: W H Freeman.

**Εικόνα 2 και 8:** Hugel, B., Martínez, M. C., Kunzelmann, C., & Freyssinet, J. M. (2005). Membrane microparticles: two sides of the coin. Physiology (Bethesda, Md.), 20,22-27. <https://doi.org/10.1152/physiol.00029.2004>

**Εικόνα 3:** Cooper M. G. (2000). The Cell: A Molecular Approach. 2<sup>nd</sup> edition. Sunderland: Sinauer Associates.

**Εικόνα 4:** Kodippili, G. C., Spector, J., Sullivan, C., Kuypers, F. A., Labotka, R., Gallagher, P. G., . . . Low, P. S. (2009). Imaging of the diffusion of single band 3 molecules on normal and mutant erythrocytes. Blood,113(24), 6237-6245. doi:10.1182/blood-2009-02-205450

**Εικόνα 5:** Aoki, T. (2017). A Comprehensive Review of Our Current Understanding of Red Blood Cell (RBC) Glycoproteins. Membranes,7(4), 56. doi:10.3390/membranes7040056

**Εικόνα 6:** Van den Akker E, Satchwell TJ, Williamson RC, Toye AM (2010) Band 3 multiprotein complexes in the red cell membrane; of mice and men. Blood Cells Mol Dis 45: 1–8.

**Εικόνα 7:** Föller, M., Huber, S. M., & Lang, F. (2008). Erythrocyte programmed cell death. IUBMB Life, 60(10), 661-668. doi:10.1002/iub.106

**Εικόνα 9:** Arashiki, N., Kimata, N., Manno, S., Mohandas, N., & Takakuwa, Y. (2013). Membrane Peroxidation and Methemoglobin Formation Are Both Necessary for Band 3 Clustering: Mechanistic Insights into Human Erythrocyte Senescence. Biochemistry,52(34), 5760-5769. doi:10.1021/bi400405p

**Εικόνα 10:** Schaer, D. J., Buehler, P. W., Alayash, A. I., Belcher, J. D., & Vercellotti, G. M. (2013). Hemolysis and free hemoglobin revisited: Exploring

hemoglobin and hemin scavengers as a novel class of therapeutic proteins. *Blood*, 121(8), 1276-1284. doi:10.1182/blood-2012-11-451229

**Εικόνα 11:Saliev, T., Begimbetova, D., Masoud, A., & Matkarimov, B.** (2019). Biological effects of non-ionizing electromagnetic fields: Two sides of a coin. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 141, 25-36.

**Εικόνα 12:Seibert, J. A.** (2004). X-Ray Imaging Physics for Nuclear Medicine Technologists. Part 1: Basic Principles of X-Ray Production. *J. Nucl. Med. Technol.* , σσ. vol32 no. 3 139-147.

**Εικόνα 13: Venugopal Vinay, Bhagdikar. P.** (2013). de Broglie Wavelength and Frequency of Scattered Electrons in the Compton Effect. Division of Physics, School of Advanced Sciences VIT University, Chennai Campus, Vandalur Kelambakkam Road Chennai 600127, India .

**Εικόνα 14: Mekki Julien**(2009): “Characterization and performance optimization of radiation monitoring sensors for high energy physics experiments at the CERN LHC and Super-LHC”; Phd Thesis, Centre Européen de Recherche Nucléaire (CERN) Genève 23, CH-1211, Suisse

**Εικόνα 15:Saldana-Gonzalez, Griselda, et al.** (2012):“High Density Devices Applied to a Gamma-Camera Implementation.” *Advanced Image Acquisition, Processing Techniques and Applications I*, doi:10.5772/33990.

**Εικόνα 16:Domenech Haydee.** (2017). *Radiation Safety Management and Programs*. Switzerland: Springer, Cham.

**Εικόνα 17:Hall, E. J., & Giaccia, A. J.** (2011). *Radiobiology for the radiologist* (7thed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.