



ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΔΙΑΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ-ΑΚΤΙΝΟΦΥΣΙΚΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ Ε.Κ.Π.Α.

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΙΟΝΤΙΖΟΥΣΑΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΣΕ ΙΣΤΟΥΣ ΕΚΤΟΣ ΤΟΥ ΠΕΔΙΟΥ
ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΣΗΣ ΜΕΣΩ ΣΥΣΤΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ**

ΠΟΛΛΑΚΗΣ ΧΡ. ΓΕΡΑΣΙΜΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2017

Πρόλογος

Η παρούσα εργασία αποτελεί κομμάτι της συνεργασίας μεταξύ του πανεπιστημίου της Μελβούρνης και της καθηγήτριας Olga Martin, της σχολής ΕΜΦΕ και του αναπληρωτή καθηγητή κ. Αλέξανδρου Γεωργακίλα, του τμήματος Ιστολογίας-Εμβρυολογίας της Ιατρικής Σχολής Αθηνών και του διευθυντή-καθηγητή κ. Βασίλειου Γοργούλη και του τμήματος Υγαιοφυσικής και της ερευνήτριας κα. Τερζούδη. Αποτελεί συνέχεια της διπλωματικής μου εργασίας στα πλαίσια των προπτυχιακών μου σπουδών. Για λόγους πληρότητας και συνέχειας παραθέτονται και τα προηγούμενα αποτελέσματα επιβεβαιωμένα εκ νέου με νέα πειράματα, καλύτερα επεξεργασμένες εικόνες, διαγράμματα και πιο ολοκληρωμένες αναλύσεις.

Περίληψη

Είναι γνωστό ότι η ιοντίζουσα ακτινοβολία (IR) προκαλεί βλάβες στο DNA. Η IR προκαλεί κατά κύριο λόγο σύνθετες βλάβες, δηλαδή μονόκλωνες ή δίκλωνες θραύσεις και διαφόρων ειδών αλλοιώσεις βάσεων η μία πολύ κοντά στην άλλη, εντός 10-15 ζευγών βάσεων DNA. Οι βλάβες αυτές είναι δύσκολο να επιδιορθωθούν από τα κύτταρα τα οποία συνήθως οδηγούνται σε θάνατο. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο η ακτινοθεραπεία είναι ευρέως χρησιμοποιούμενη ενάντια σε καρκινικούς όγκους. Εντούτοις, λανθασμένη αποκατάσταση των βλαβών του DNA μπορεί να οδηγήσει σε μεταλλάξεις, γενωμική αστάθεια και καρκινογένεση. Τα τελευταία χρόνια υπάρχουν αρκετές ενδείξεις ότι οι ιοντίζουσες ακτινοβολίες επιφέρουν συνέπειες όχι μόνο στα κύτταρα και τους ιστούς που ακτινοβολούνται άμεσα, αλλά και σε ιστούς εκτός του πεδίου ακτινοβολήσης. Οι συνέπειες αυτές μπορεί να αφορούν κύτταρα που γειτνιάζουν, είναι δηλαδή παρακείμενα των ακτινοβολημένων κυττάρων, φαινόμενο που αναφέρεται και ως 'bystander effect', ή κύτταρα και ιστούς απομακρυσμένους από το σημείο της ακτινοβολήσης, το λεγόμενο 'distant effect'. Οι μηχανισμοί που ευθύνονται για τα φαινόμενα αυτά δεν είναι ακόμη γνωστοί αλλά φαίνεται ότι εμπλέκεται η απελευθέρωση διάφορων παραγόντων όπως κυτοκίνες, ελεύθερες ρίζες κ.α.. Με στόχο να εξεταστούν οι συνέπειες των ιοντίζουσών ακτινοβολιών σε απομακρυσμένες θέσεις και να διερευνηθούν οι υπεύθυνοι μηχανισμοί, υγιή ποντίκια του γένους C57BL/6 ακτινοβολήθηκαν στο πόδι με δέσμη ακτίνων Χ χαμηλής ενέργειας, τόσο με ακτινοβολία ευρείας δέσμης, Broad Beam (BB) όσο και με μικροδέσμες (MRT), με δόσεις των 10 και 40 Gy και απομονώθηκαν διάφοροι ιστοί 24 και 96 ώρες μετά την ακτινοβολήση. Εξετάστηκαν ιστοί του λεπτού εντέρου των ποντικών και συγκεκριμένα του δωδεκαδάκτυλου που απέχουν 35mm από το σημείο της ακτινοβολήσης. Οι ακτινοβολήσεις και η απομόνωση των ιστών έγιναν στην επιταχυντική διάταξη Australian Synchrotron IMBL του Peter McCallum Institute στο πανεπιστήμιο της Μελβούρνης και στάλθηκαν παγωμένοι στο τμήμα Ιστολογίας-Εμβρυολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ όπου εκτελέστηκαν τα πειράματα. Εφαρμόζοντας τεχνικές in situ ανοσοϊστοχημείας σε παγωμένους ιστούς και σε ιστούς κλεισμένους σε παραφίνη βρήκαμε σημαντικά αυξημένα επίπεδα 8-οξογουανίνης (8-oxoG), μάρτυρα οξειδωτικού στρες και οξειδωτικών βλαβών DNA τόσο στα ακτινοβολημένα με 10 Gy όσο και με 40 Gy ποντίκια σε σχέση με τα μη ακτινοβολημένα, τόσο για την BB όσο και για την MRT ακτινοβολήση. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα της 8-oxoG στα στρωματικά κύτταρα ήταν έως 3,8 φορές και στα επιθηλιακά κύτταρα έως 7 φορές αυξημένα στα 40 Gy και 10Gy αντίστοιχα σε σχέση με τα μη ακτινοβολημένα για την ακτινοβολία BB. Τα αντίστοιχα επίπεδα αύξησης της 8-oxo-G στην περίπτωση της MRT για τα 10 Gy ήταν 4 και 5 φορές. Επίσης, στα ακτινοβολημένα με BB 10 Gy ποντίκια βρέθηκαν σημαντικά μειωμένα τα επίπεδα της ki67, ενός δείκτη που σχετίζεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, μείωση ακόμα πιο εμφανής στα BB 40 Gy, 2,5 φορές χαμηλότερα, σε

σύγκριση με τα μη ακτινοβολημένα. Αυτό υποδεικνύει αυξημένες βλάβες στα κύτταρα που οδηγούν στην αναστολή του κυτταρικού τους κύκλου και ενεργοποίηση επιδιορθωτικών μηχανισμών. Από τον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στα δείγματα που ακτινοβολήθηκαν με MRT δεν προέκυψαν διαφορές σε σχέση με τα μη ακτινοβολημένα. Παρατηρήθηκε μια μικρή μείωση του αριθμού των οξειδωτικών βλαβών του DNA στις 96 ώρες σε σχέση με τις 24 ώρες μετά την ακτινοβολήση. Αυτό ίσως να σημαίνει ότι ίσως κύτταρα έχουν αρχίσει να επιδιορθώνουν βλάβες αλλά σίγουρα υποδεικνύει ότι οι 24 είναι αρκετές για την εμφάνιση του φαινομένου στην μέγιστη έντασή του. Επίσης παρατηρούμε αυξημένα έως και 6,1 φορές επίπεδα κυτταρικής γήρανσης στα εντερικά κύτταρα των ακτινοβολημένων με BB ποντικών. Τέλος, προέκυψε αύξηση της φλεγμονώδους αντίδρασης των επιθηλιακών εντερικών κυττάρων των ποντικών που ακτινοβολήθηκαν στο πόδι τόσο με BB όσο και με MRT. Για την ακτινοβολήση με BB προέκυψε αύξηση της πυρηνικής p65 έως και 2,2 φορές ενώ για την MRT έως και 2,4 φορές σε σχέση με τα μη ακτινοβολημένα. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι κάποιοι από τους παράγοντες που ευθύνονται για το distant effect είναι κυτοκίνες, κύτταρα του ανοσοποιητικού, όπως μακροφάγα, κ.α. οι οποίοι προκαλούν οξειδωτικό στρες και επάγουν δευτερογενείς φλεγμονικές αντιδράσεις.

Abstract

During the last years there is a growing body of evidence showing that the effects of ionizing radiation (IR), are not restricted only to the irradiated cells, but are also extended in tissues and cells out of the irradiation field. The consequence of IR in non-irradiated cells in the vicinity of directly irradiated ones as well as at distant sites is called bystander and/or distant effect of IR respectively. The underlying mechanisms are still obscure although the release of soluble factors including cytokines is implicated in the effect of IR distantly. In order to investigate the molecular mechanisms taking place in the so called distant effect, we examined the impact of leg-irradiated treated mice with X-ray beams of low energy with 10Gy and 40Gy on their intestines as well as distant sites. We used irradiation of Broad Beam (BB) and irradiation of micro beams (MRT). We examined 24 and 96 hours after the irradiation. Irradiation and tissue isolation took place at the accelerator of Australian Synchrotron IMBL of Peter McCallum Institute in the Melbourne's University and they shipped frozen in the Department of Histology and Embryology of the Medical School of Athens where the experiments were carried out. By employing immunohistochemistry (IHC) in frozen sections we found significantly increased levels of 8-oxoguanine (8-oxoG), a marker of oxidative stress and DNA damage, in both 10 Gy and 40 Gy irradiated mice in comparison with untreated mice, in both BB and MRT IR. Specifically, 8-oxoG levels in stroma cells were up to 3.8 times and in epithelial cells 7 times elevated in 40Gy and 10Gy of BB IR respectively in relation to non-irradiated mice. As for MRT IR and 10Gy, the corresponding levels were 4 and 5 times elevated. Of note, mice irradiated with 10Gy exhibited markedly reduced levels of ki67, cellular proliferation markers, which were further decreased in mice treated with 40Gy, 2.5 times elevated, versus controls, implying increased cellular damage which leads to cell cycle arrest. As for the cellular proliferation of the intestine epithelial cells of mice which irradiated with MRT there is no differentiation in relation to non-irradiated mice. There was a small decrease in the number of oxidative damage of the DNA at the 96 hours compared to 24 hours after

irradiation. This may be interpreted that cells have begun repairing their damages, but it certainly indicates that 24 hours are enough to show the phenomenon at its maximum intensity. We also see up to 6 times elevated levels of senescence in IR treated mice with BB. Finally, there was an increase in inflammatory reaction of the epithelial intestinal cells of the mice irradiated in the foot by both BB and MRT. For BB IR, nuclear p65 was up to 2.2 times while for MRT up to 2.4 times elevated versus controls. This leads us to the conclusion that some of the responsible for the distant effect factors are cytokines, immune cells, such as macrophages, etc. These factors can cause oxidative stress and induce secondary inflammatory responses and activation of the immune system to the various sites of the organism.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου, Α. Γεωργακίλα που με εμπιστεύτηκε, μου ανέθεσε τη συγκεκριμένη εργασία και με έφερε σε επαφή με πολύ αξιόλογους ανθρώπους ανοίγοντάς μου γέφυρες. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα καθώς με στήριξε κάθε φορά που το χρειάστηκα και όχι μόνο στα θέματα της διπλωματικής μου. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Διευθυντή-Καθηγητή Β. Γοργούλη, ο οποίος με δέχτηκε στο εργαστήριό του και διαμόρφωσε όλες τις προϋποθέσεις ώστε να μπορέσω να ολοκληρώσω τη συγκεκριμένη έρευνα. Ένα απλό ευχαριστήσω δεν αρκεί για τον Ι. Πατέρα, ο οποίος αφιέρωσε πολύ από τον πολύτιμο χρόνο του στο να με κατευθύνει, να με βοηθάει και να απαντάει πάντα με ψυχραιμία στις αλλεπάλληλες και συνεχείς ερωτήσεις μου. Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω θερμά τον Πλάτωνα Σελεμενάκη, την Δέσποινα Μωυσίδου και τη Σοφία Ρίζου καθώς και τους υπόλοιπους συνεργάτες του εργαστηρίου οι οποίοι δημιούργησαν ένα ζεστό κλίμα στο εργαστήριο και με βοήθησαν να εξοικειωθώ με τις διάφορες τεχνικές.

Περιεχόμενα

1	Εισαγωγικές Έννοιες.....	18
1.1	Ιοντίζουσες Ακτινοβολίες.....	18
1.1.1	Αλληλεπίδραση ιοντίζουσας ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη.....	18
1.1.2	Φωτοηλεκτρικό Φαινόμενο	18
1.1.3	Φαινόμενο Compton.....	19
1.1.4	Δίδυμη Γένεση.....	19
1.2	Στοιχεία Κυτταρικής Βιολογίας	21
1.2.1	Γενετικό Υλικό.....	21
1.2.2	Κυτταρικός Κύκλος	22
1.2.3	Αναστολή Κυτταρικού Κύκλου	22
1.3	Λεπτό έντερο ποντικού	23
2	Συνέπειες Ιοντιζουσών Ακτινοβολιών στην έμβια ύλη.....	26
2.1	Μηχανισμοί αλληλεπίδρασης ιοντίζουσας ακτινοβολίας με τη βιολογική ύλη.....	26
2.2	Βλάβες στο γενετικό υλικό DNA.....	28
2.2.1	Ομαδοποιημένες – Σύνθετες Ομαδοποιημένες Βλάβες DNA.....	29
2.3	Απόκριση στις βλάβες του DNA. DNA Damage Response (DDR).....	30
2.4	Απόπτωση.....	34
2.5	Κυτταρική Γήρανση	35
2.6	Νέκρωση – Φλεγμονή	35
3	Μη στοχευμένες επιδράσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας (Non-targeted effects, NTE).....	37
3.1	Παρακείμενα αποτελέσματα ιοντίζουσας ακτινοβολίας- Bystander effects of IR.....	37
3.2	Απομακρυσμένα αποτελέσματα ιοντίζουσας ακτινοβολίας (Abscopal effects of IR). 37	
3.3	Οξειδωτικό στρες και ο ρόλος του στην μη στοχευμένη επίδραση	38
4	Μέθοδος εξέτασης ιστών, υλικά και εκτέλεση πειράματος.....	40
4.1	Ανοσοϊστοχημεία	40
4.2	Αντιγόνα-Αντισώματα	40
4.3	Πειραματόζωα.....	42
4.4	Ακτινοβολήση.....	42
4.5	Απομόνωση – Φύλαξη Ιστών	46
4.6	Πρωτόκολλα ανοσοϊστοχημείας για 8-οxo-G	46
4.6.1	Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για 8-οxo-G σε παγωμένους ιστούς.....	46
4.6.2	Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για 8-οxo-G σε τομές παραφίνης.....	47

4.7	Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για ki-67 σε παγωμένους ιστούς	48
4.7.1	Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για ki-67 σε παγωμένους ιστούς	48
4.7.2	Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για ki-67 σε τομές παραφίνης.....	48
4.8	Πρωτόκολλα ανοσοϊστοχημείας για p-65	49
4.8.1	Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για p-65 σε παγωμένους ιστούς	49
4.8.2	Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για p65 σε τομές παραφίνης	50
4.9	Πρωτόκολλο Sudan Black B σε παγωμένους ιστούς	50
5	Αποτελέσματα	52
5.1	Οξειδωτικό Στρες- Βλάβες DNA.....	52
5.1.1	Στρωματικά κύτταρα λεπτού εντέρου	56
5.1.2	Επιθηλιακά κύτταρα λεπτού εντέρου	59
5.2	Κυτταρικός Πολλαπλασιασμός	62
5.3	Φλεγμονώδης αντίδραση.....	68
5.4	Πρόωρη γήρανση	74
5.4.1	Στρωματικά κύτταρα – Πρόωρη Γήρανση.....	76
5.4.2	Επιθηλιακά κύτταρα – Πρόωρη Γήρανση	78
6	Συμπεράσματα - Σχολιασμός	80
6.1	Μελλοντικές κατευθύνσεις	83
	Βιβλιογραφία	85
	Παράρτημα.....	88

1 Εισαγωγικές Έννοιες

1.1 Ιοντίζουσες Ακτινοβολίες

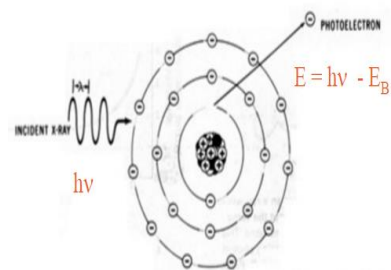
Ιοντίζουσα θεωρείται η ακτινοβολία που μεταφέρει τόση ενέργεια σε ένα άτομο της ύλης με την οποία αλληλεπιδρά ώστε να το ιονίσει, δηλαδή να απομακρύνει ένα δέσμιο ηλεκτρόνιο από το άτομο. Οι ιοντίζουσες ακτινοβολίες προέρχονται από το φυσικό περιβάλλον ή από τεχνητές πηγές. Και στις δύο περιπτώσεις, η πρωταρχική ακτινοβολία αποτελείται από φορτισμένα σωματίδια με μάζα, τα πρωτόνια και τα ηλεκτρόνια ή από ουδέτερα κβάντα ενέργειας χωρίς μάζα, τα φωτόνια και τα νετρίνα. Στην περίπτωση των φωτονίων μιλάμε για ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Από το φάσμα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, ιοντίζουσες θεωρούνται οι ακτίνες Χ, οι ακτίνες γ και η υψηλής ενέργειας υπεριώδης ακτινοβολία. Τα όρια μεταξύ ιοντίζουσας και μη ακτινοβολίας δεν είναι απόλυτα καθώς διαφορετικά άτομα ιονίζονται σε διαφορετικές ενέργειες.

1.1.1 Αλληλεπίδραση ιοντίζουσας ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη

Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία μεταφέρεται σε πακέτα ενέργειας, τα φωτόνια, η ενέργεια των οποίων δίνεται από την εξίσωση του Planck: $E=hf=\frac{hc}{\lambda}$, όπου h η σταθερά του Planck, f η συχνότητα του φωτονίου, λ το μήκος κύματος του φωτονίου και c η ταχύτητα του φωτός στο κενό. Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία αλληλεπιδρά με την ύλη με μια σειρά μηχανισμών, οι σημαντικότεροι εκ των οποίων είναι το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο, το φαινόμενο Compton και η δίδυμη γένεση.

1.1.2 Φωτοηλεκτρικό Φαινόμενο

Το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο αναφέρεται στην εκπομπή ενός δέσμιου ηλεκτρονίου από τον εσωτερικό φλοιό ενός ατόμου. Αν E_n η ενέργεια σύνδεσης του ηλεκτρονίου με $n=K,L,M\dots$ και E η ενέργεια του εισερχόμενου φωτονίου, τότε η ενέργεια του ηλεκτρονίου που αποδεσμεύεται είναι $E_k=E-E_n$.

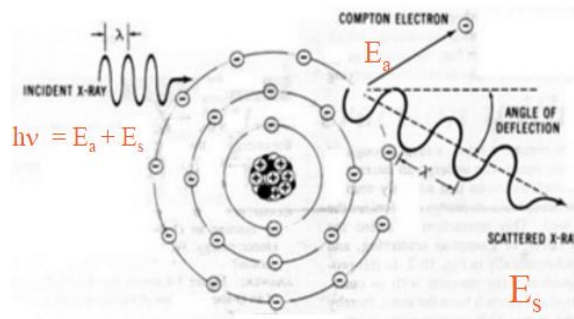


Εικόνα 1.1-1 Φωτοηλεκτρικό Φαινόμενο

Απαραίτητη προϋπόθεση για να συμβεί το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο, η ενέργεια του φωτονίου να είναι μεγαλύτερη της ενέργειας σύνδεσης του ηλεκτρονίου. Είναι ο κυρίαρχος μηχανισμός αλληλεπίδρασης με την ύλη για ακτινοβολίες ενέργειας μέχρι 50 KeV και εξαρτάται από τον ατομικό αριθμό του υλικού.

1.1.3 Φαινόμενο Compton

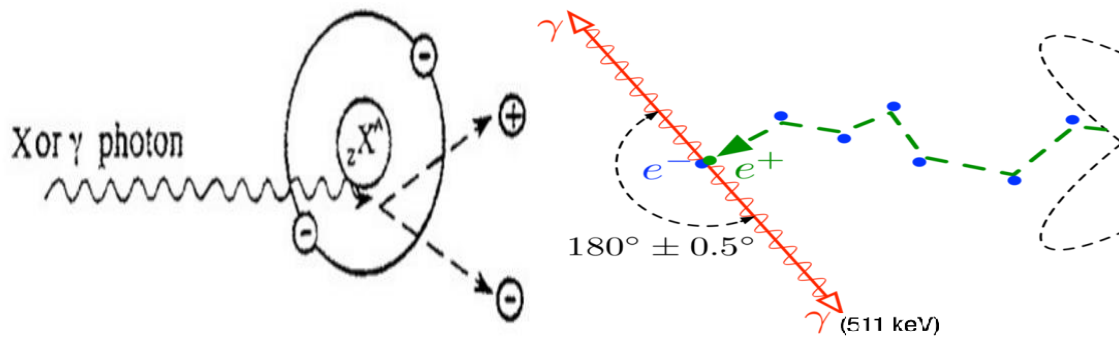
Το φαινόμενο Compton αναφέρεται στην ανελαστική αλληλεπίδραση μεταξύ ενός φωτονίου και ενός ελεύθερου ηλεκτρονίου ή ασθενώς δέσμιου ηλεκτρονίου και αφορά φωτόνια ενέργειας από 100 KeV έως 10 MeV. Κατά την είσοδό του σε ένα υλικό, το φωτόνιο αλληλεπιδρά με ένα ελεύθερο ηλεκτρόνιο, του μεταφέρει μέρος της ενέργειάς του σκεδάζεται σε γωνία έως 180° και συνεχίζει μέχρι να συναντήσει άλλο ηλεκτρόνιο και να ξανασκεδαστεί ανελαστικά. Η διαδικασία αυτή συνεχίζεται έως ότου το φωτόνιο χάσει αρκετή ενέργεια ώστε να αλληλεπιδράσει με φωτοηλεκτρικό φαινόμενο και να εξαφανιστεί δίνοντας όλη του την ενέργεια σε δέσμιο ηλεκτρόνιο ή έως ότου εξέλθει από το υλικό.



Εικόνα 1.1-2 Φαινόμενο Compton

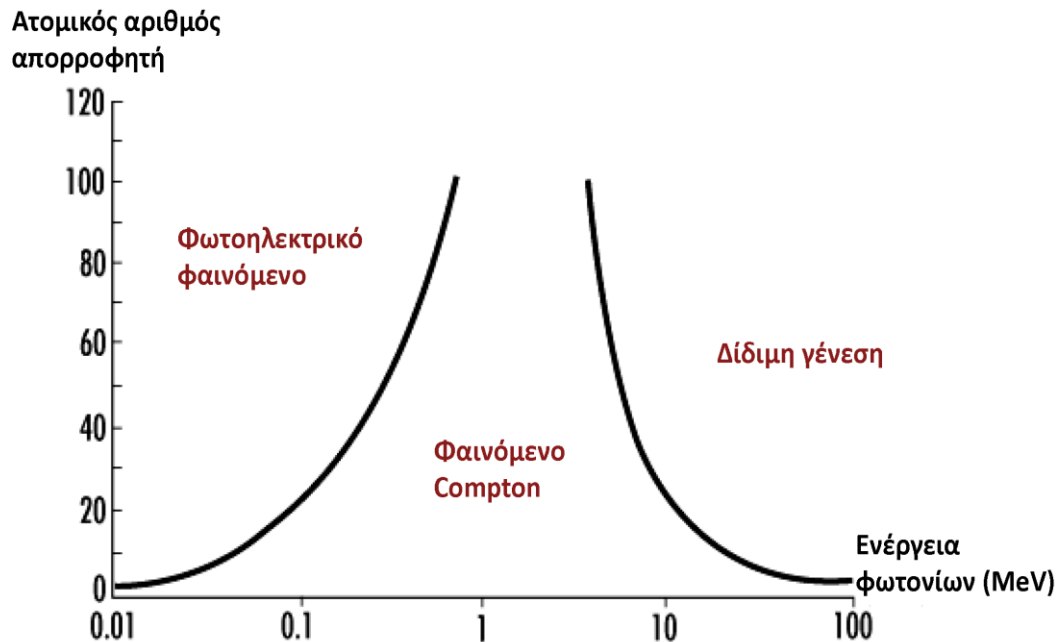
1.1.4 Δίδυμη Γένεση

Κατά τη δίδυμη γένεση ένα φωτόνιο μετατρέπεται σε ένα ηλεκτρόνιο και ένα ποζιτρόνιο. Απαραίτητες προϋποθέσεις για την πραγματοποίηση του φαινομένου αυτού είναι το φωτόνιο να έχει ενέργεια τουλάχιστον 1,022 MeV, δηλαδή τουλάχιστον ίση με τη μάζα ηρεμίας του ηλεκτρονίου συν αυτή του ποζιτρονίου που είναι 0,511 MeV και για τα δύο, όπως επίσης η ύπαρξη ισχυρού πεδίου Coulomb. Άρα η δίδυμη γένεση μπορεί αν συμβεί μόνο κοντά σε πυρήνα του υλικού στο οποίο κινείται το φωτόνιο. Το ποζιτρόνιο όταν συναντήσει ένα ηλεκτρόνιο εξαϋλώνεται και παράγεται μια ακτίνα γ . Προϋπόθεση για να συμβεί ή εξαϋλωση είναι να είναι ακίνητο το ποζιτρόνιο. Αυτό σημαίνει ότι για να εξαϋλωθεί με ένα ηλεκτρόνιο θα πρέπει να διανύσει κάποια απόσταση, με σκεδάσεις να χάσει την αρχική του ενέργεια και στη συνέχεια να συμβεί η εξαϋλωση.



Εικόνα 1.1-3 Φαινόμενο Δίδυμης Γένεσης (αριστερά). Εξαϋλωση ποζιτρονίου (δεξιά)

Στο διάγραμμα που ακολουθεί φαίνονται οι ενεργειακές περιοχές όπου κυριαρχεί το κάθε φαινόμενο και η συσχέτιση με τον ατομικό αριθμό του απορροφητή. [1] [2] [3]



Διάγραμμα 1.1-1 Μηχανισμοί αλληλεπίδρασης με την ύλη σε σύγκριση με τον ατομικό αριθμό του υλικού και την ενέργεια των φωτονίων.

1.2 Στοιχεία Κυτταρικής Βιολογίας

Το κύτταρο αποτελεί τη βασική μονάδα οργάνωσης των ζώντων οργανισμών. Το κύτταρο είναι το μικρότερο και θεμελιώδες δομικό στοιχείο της έμβιας ύλης και αποτελείται από ένα σύστημα μορίων οργανωμένων σε δυναμική αλληλεπίδραση μεταξύ τους [4]. Όλα τα κύτταρα ενός οργανισμού έχουν την ίδια χημική σύσταση και ο παράγοντας που τα διαφοροποιεί είναι ο τρόπος έκφρασης του γενετικού τους υλικού. Μια ομάδα, όμοια διαφοροποιημένων κυττάρων ονομάζεται ιστός και αποτελεί τη δεύτερη βιολογική τάξη οργάνωσης ενός οργανισμού. Το κύτταρο έχει επίσης λειτουργικό, αναπαραγωγικό και κληρονομικό ρόλο [5]. Τα κύτταρα μπορούν να διακριθούν σε προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά ανάλογα με την ενδοκυτταρική τους δομή. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα υπάρχει συγκροτημένος πυρήνας που περιέχει το γενετικό υλικό, το DNA, δομή που απουσιάζει από τα προκαρυωτικά κύτταρα [6]. Βασική κυτταρική δομή των ευκαρυωτικών κυττάρων είναι τα μιτοχόνδρια. Αποτελούν σημαντική κυτταρική μονάδα καθώς λειτουργούν ως μονάδα παραγωγής ενέργειας για το κύτταρο και ευρύτερα για τον οργανισμό. Στα μιτοχόνδρια υπάρχει τμήμα του γενετικού υλικού του κυττάρου, το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA). Λόγω του μεγέθους του μιτοχονδρίου αλλά και της ελλιπούς του προστασίας είναι επιρρεπές σε βλάβες λόγω ιοντιζουσών ακτινοβολιών. Πιθανή βλάβη του mtDNA ή γενικότερα του μιτοχονδρίου μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές κυτταρικές βλάβες [7] [8].

1.2.1 Γενετικό Υλικό

Το γενετικό υλικό διακρίνεται στο δεσοξυριβοζονουκλεϊκό οξύ, DNA και το ριβοζονουκλεϊκό οξύ, RNA. Στο DNA είναι αποθηκευμένες σε μορφή γονιδίων όλες οι πληροφορίες που καθορίζουν τις λειτουργίες και την ανάπτυξη του κυττάρου. Στο RNA αποθηκεύονται προσωρινά πληροφορίες και διακρίνουμε τρεις μορφές RNA. Το μεταφορικό RNA (tRNA), που εμπλέκεται στη μεταφορά αμινοξέων κατά τη μετάφραση, το ριβοσωμικό RNA (rRNA), που εμπλέκεται στην πρωτεϊνοσύνθεση στα ριβοσώματα και το αγγελιαφόρο RNA (mRNA), που μεταφέρει πληροφορίες από τα γονίδια στα ριβοσώματα.

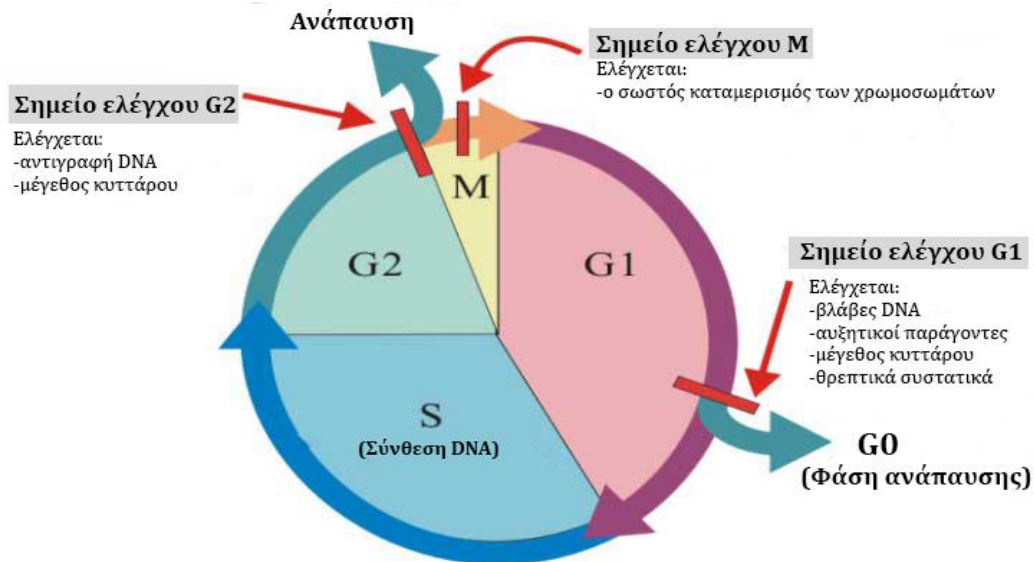
1.2.2 Κυτταρικός Κύκλος

Ο κύκλος της ζωής του κυττάρου ξεκινά από τη στιγμή της δημιουργίας του και ολοκληρώνεται με το διπλασιασμό του. Ο κυτταρικός κύκλος μπορεί να χωριστεί στη μεσόφαση και τη μίτωση ή μείωση στην περίπτωση των γαμετών. Στη μεσόφαση διακρίνουμε τις εξής φάσεις. Τη φάση G1, τη φάση S και τη φάση G2. Η φάση G1 μπορεί να χωριστεί στη φάση G1a και G1b. Κατά τη φάση G1a πραγματοποιείται η ανάπτυξη του κυττάρου και η πρωτεϊνοσύνθεση. Κατά τη φάση G1b εκτός της ανάπτυξης γίνεται η προετοιμασία του κυττάρου για την είσοδό του στη φάση S. Κατά τη φάση S (σύνθεση) γίνεται η αντιγραφή του γενετικού υλικού. Κατά τη φάση G2 γίνεται η προετοιμασία του κυττάρου για το διπλασιασμό του. Ακολουθεί η μίτωση (M) η οποία χωρίζεται στην πρόφαση, τη προμετάφαση, την ανάφαση και την τελόφαση. Κατά τη διάρκεια της μίτωσης το διπλασιασμένο γενετικό υλικό χωρίζεται σε δύο ίδιες ομάδες, διαιρείται ο πυρήνας όπως και το κυτταρόπλασμα και η κυτταρική μεμβράνη. Έτσι προκύπτουν δύο νέα κύτταρα. Κατά τη διάρκεια του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, δηλαδή στις φάσεις, G1b, S, G2 και M εκφράζεται η πρωτεΐνη ki67. Έτσι η ανίχνευσή της στο κύτταρο μαρτυρά ότι βρίσκεται σε φάση πολλαπλασιασμού [7] [9] [10].

1.2.3 Αναστολή Κυτταρικού Κύκλου

Τόσο η αντιγραφή του γενετικού υλικού όσο και η μίτωση του κυττάρου είναι πολυσύνθετες διαδικασίες όπου εμπλέκονται πολλοί μηχανισμοί και ως εκ τούτου είναι πιθανόν να προκύψουν σφάλματα. Επίσης σφάλματα στην αντιγραφή και τη μίτωση μπορεί να προκληθούν από εξωγενείς παράγοντες όπως οι ιοντίζουσες ακτινοβολίες ή το οξειδωτικό στρες. Σε περίπτωση που το κύτταρο μεταβεί σε επόμενη κυτταρική φάση χωρίς να πληρούνται οι κατάλληλες συνθήκες ή έχοντας βλάβες από την προηγούμενη φάση, μπορεί να επιβαρυνθεί με καινούργιες βλάβες στο DNA του, να υπάρξει γονιδιωματική αστάθεια ή ακόμα και να προκληθεί κυτταρικός θάνατος. Για το λόγο αυτό ένα σύνολο πρωτεϊνών και σηματοδοτικών μονοπατιών ελέγχουν σε συγκεκριμένα σημεία του κυτταρικού κύκλου αν υπάρχουν οι σωστές συνθήκες. Τέτοια σημεία ελέγχου υπάρχουν στο τέλος της φάσης G1b, στο τέλος της φάσης G2 και στη φάση M. Στη φάση G1 γίνεται έλεγχος βλαβών του DNA, ελέγχονται οι αυξητικοί παράγοντες, το μέγεθος του κυττάρου και τα θρεπτικά συστατικά. Σημαντικός είναι ο ρόλος της πρωτεΐνης p53 η οποία σε περίπτωση ύπαρξης βλαβών του DNA μπλοκάρει τη μετάβαση του κυττάρου στη φάση S. Στη φάση G2 ελέγχεται το μέγεθος του κυττάρου και η αντιγραφή του DNA που πραγματοποιήθηκε στη φάση S και τέλος στη φάση M ελέγχεται ο καταμερισμός των χρωμοσωμάτων μέσω του συμπλέγματος MPF

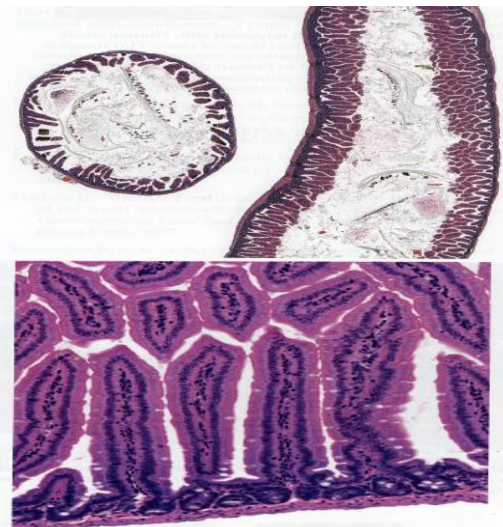
(Mitosis Promoting Factor) που αποτελείται από την κυκλίνη B και την κινάση CDK1. Στην περίπτωση που ανιχνευθούν βλάβες μπλοκάρεται ο κυτταρικός κύκλος έως ότου διορθωθούν οι βλάβες. Αν η επιδιόρθωση των βλαβών δεν είναι εφικτή τότε το κύτταρο οδηγείται είτε σε απόπτωση είτε σε πρόωρη γήρανση. [6] [7]



Εικόνα 1.2-1 Κυτταρικός κύκλος και σημεία ελέγχου

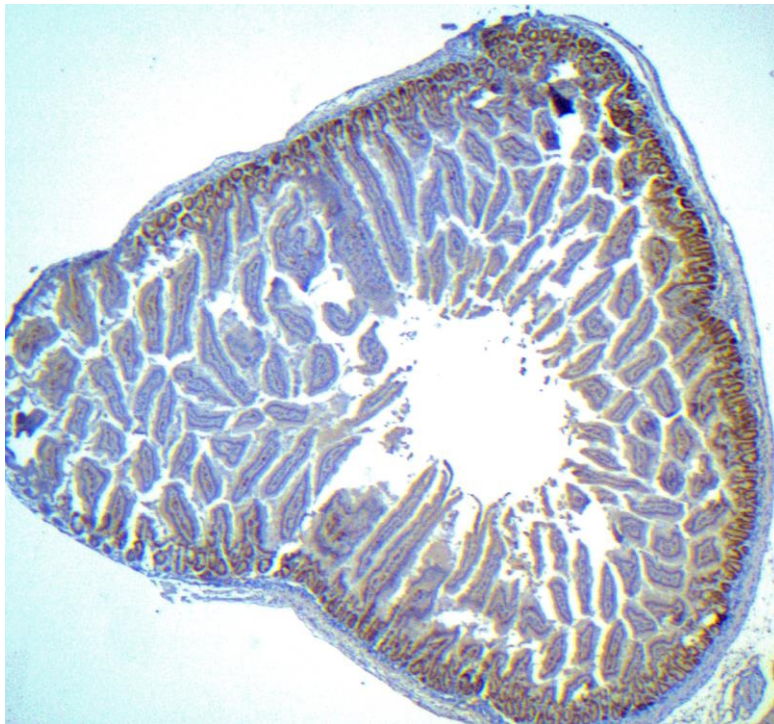
1.3 Λεπτό έντερο ποντικού

Το λεπτό έντερο αποτελεί τμήμα του πεπτικού συστήματος. Οι βασικές λειτουργίες του είναι η συνέχιση της πέψης που ξεκίνησε το στόμαχο και η απορρόφηση η απορρόφηση των τροφών που υπέστησαν πέψη από τα ένζυμα του εντερικού βλεννογόνου και του παγκρέατος. Το τοίχωμα του λεπτού εντέρου αποτελείται από το βλεννογόνο, τον υποβλεννογόνο, το μυϊκό και το περιτόναιο. Το συνολικό εμβαδόν του βλεννογόνου αυξάνει σημαντικά, κάτι που αντανακλά την απορροφητική λειτουργία του εντέρου. Η αύξηση της επιφάνειας του βλεννογόνου γίνεται με κάποιους βαθμούς αναδίπλωσης. Αυτοί είναι οι κυκλοτερείς πτυχές, οι εντερικές λάχνες, οι εντερικοί αδένες ή



Εικόνα 1.3-1 Επάνω: Τομή λεπτού εντέρου ποντικού Κάτω: Μεγέθυνση του βλεννογόνου όπου διακρίνεται το μονόστιβο επιθήλιο και κύτταρα του χορίου (Treuting, P.M., Comparative anatomy and histology : a mouse and human atlas. 2012)

κρύπτες. Ο εντερικός βλεννογόνος επενδύεται με μονόστιβο κυλινδρικό επιθήλιο. Στην Εικόνα 1.3-1 παρουσιάζεται τομή του λεπτού εντέρου ποντικού όπου διακρίνονται ο αυλός και τμήματα του τοιχώματος του εντέρου. Επίσης στη μεγέθυνση φαίνονται τα επιθηλιακά κύτταρα του λεπτού εντέρου ποντικού. Στις κρύπτες βρίσκονται τα αρχέγονα κύτταρα. Τα εντερικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται χαμηλά στις λάχνες, ωριμάζουν ανεβαίνοντας κατά μήκος των λαχνών και αποπίπτουν [11] [12]. Ακολουθεί μία εικόνα ως παράδειγμα ανοσοϊστοχημείας με ki-67 σε τομή λεπτού ποντικού όπου φαίνονται όλες οι προαναφερθείσες δομές ενώ με καφέ χρώμα τα κύτταρα που βρίσκονται σε φάση πολλαπλασιασμού.



Εικόνα 1.3-2 Ανοσοϊστοχημεία με ki-67 σε τομή λεπτού εντέρου ποντικού.

2 Συνέπειες Ιοντιζουσών Ακτινοβολιών στην έμβια ύλη

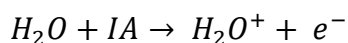
Οι ιοντίζουσες ακτινοβολίες αλληλεπιδρούν με την έμβια ύλη με διάφορους μηχανισμούς, προκαλώντας αλλαγές σε διάφορα μόρια του κυττάρου, αλλάζοντας τις βιοχημικές τους ιδιότητες. Το σημαντικότερο μακρομόριο που μπορεί να υποστεί αλλοιώσεις είναι το DNA του κυττάρου. Βλάβες στο μόριο του DNA ενεργοποιεί διάφορους μηχανισμούς επιδιόρθωσης και ανάλογα με το μέγεθος και το είδος της βλάβης, το κύτταρο μπορεί να οδηγηθεί στο θάνατο είτε να προκύψει γονιδιωματική αστάθεια και πιθανόν καρκινογένεση.

2.1 Μηχανισμοί αλληλεπίδρασης ιοντίζουσας ακτινοβολίας με τη βιολογική ύλη

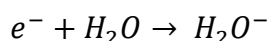
Η αλληλεπίδραση ιοντιζουσών ακτινοβολιών με την βιολογική ύλη επάγει μια σειρά φαινομένων. Τα στάδια της αλληλεπίδρασης της ακτινοβολίας με την βιολογική ύλη είναι το φυσικό, το χημικό και το βιολογικό στάδιο. Το φυσικό στάδιο της αλληλεπίδρασης έχει διάρκεια της τάξης των fsec και αφορά στους μηχανισμούς με τους οποίους εναποτίθεται η ενέργεια στα άτομα της ύλης και προκαλείται η διέγερση και ο ιονισμός τους. Οι μηχανισμοί αυτοί αναλύθηκαν στο κεφάλαιο 1. [13]

Οι ιοντισμοί που προκλήθηκαν κατά το φυσικό στάδιο είναι πιθανό να προκαλέσουν ρήξη χημικών δεσμών και δημιουργία ελεύθερων ριζών. Ελεύθερες ρίζες ονομάζουμε μόρια που φέρουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Μπορεί να είναι ανόργανα ή οργανικά μόρια και συμβολίζονται με * ή R* στην περίπτωση των οργανικών ελεύθερων ριζών. Είναι μεν ηλεκτρικά ουδέτερες αλλά είναι πολύ δραστικές γιατί έχουν ισχυρή τάση να συζευχθούν με κάποιο άλλο άτομο ή μόριο ώστε να πάψουν να έχουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Έτσι, ένα βιολογικό μακρομόριο μπορεί να σπάσει σε μικρότερα μακρομόρια με διαφορετικές βιοχημικές ιδιότητες ή να δημιουργηθεί μια ελεύθερη οργανική ρίζα R* ή οποία μετά από ένωση με κάποια άλλη οργανική ή μη ρίζα, θα δημιουργήσει ένα νέο μακρομόριο με καινούργιες βιοχημικές ιδιότητες. Αυτές είναι οι άμεσες συνέπειες τις ιοντίζουσας ακτινοβολίας σε βιολογικά μόρια.

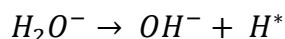
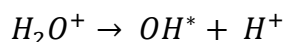
Οι έμμεσες συνέπειες της ιοντίζουσας ακτινοβολίας (IA) αφορούν σε μηχανισμούς που συνδέονται με τη ραδιόλυση του νερού. Δεδομένου ότι το νερό αποτελεί το 75% του οργανισμού, ένα σημαντικό μέρος της ενέργειας της ακτινοβολίας εναποτίθεται σε μόρια νερού και συμβαίνει η παρακάτω αντίδραση.



Το ηλεκτρόνιο μπορεί να συλληφθεί από ένα μόριο νερού:

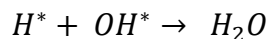
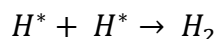


Τα ιόντα του νερού διασπώνται προς σχηματισμό ελεύθερων ριζών:

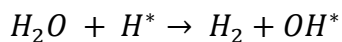


Οι ελεύθερες αυτές ρίζες λόγω τις δραστηριότητάς έχουν ένα χρόνο ζωής της τάξης των μς πριν αντιδράσουν με κάποιο από τους ακόλουθους μηχανισμούς.

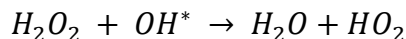
Είτε μεταξύ τους:



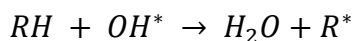
Είτε με μόρια νερού:



Είτε με κάποιο προϊόν:



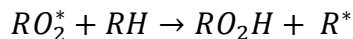
Είτε με κάποιο οργανικό μόριο RH:



Το μοριακό οξυγόνο έχει χημική συγγένεια με τις ελεύθερες ρίζες και έτσι λαμβάνει χώρα και η αντίδραση



Η τελευταία ελεύθερη ρίζα μπορεί να αντιδράσει με κάποιο οργανικό μόριο ως εξής:



Δηλαδή η αντίδραση μιας ελεύθερης οργανικής ρίζας δημιουργεί μια καινούργια. Οι διεργασίες αυτές συμβαίνουν κατά το χημικό στάδιο και έχουν χρονική διάρκεια της τάξης των msec. [13] [2] [14]

Ακολουθεί το βιολογικό στάδιο της αλληλεπίδρασης το οποίο μπορεί να χωριστεί σε βιοχημικό, κυτταρικό και συστημικό επίπεδο. Στο βιοχημικό επίπεδο, που διαρκεί 24

έως 48 ώρες και σχετίζεται κυρίως με την απόκριση στην ακτινοβολία και στην επαγωγή βλαβών στο DNA, σε πρωτεΐνες και λιπίδια. Προσβάλλονται βιομόρια των κυττάρων, ανάμεσά τους βιομόρια πολύ σημαντικά για τη λειτουργία του κυττάρου, ενεργοποιούνται διαδικασίες αναγνώρισης και επιδιόρθωσης των βλαβών και παρατηρείται αναστολή της πρωτεϊνσύνθεσης λόγω της δράσης ενζύμων. Σε κυτταρικό επίπεδο παρατηρούνται φαινόμενα που μπορεί να διαρκέσουν από ώρες έως και μήνες όπως αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και βλάβες σε ιστούς. Βλάβες που δεν επιδιορθώνονται μπορεί να οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο ή μεταλλάξεις. Έτσι, μπορεί να προκληθούν βλάβες σε συστημικό επίπεδο όπως φλεγμονικές αντιδράσεις, ανοσολογικές αποκρίσεις, ορμονικές διαταραχές, καρκινογένεση ή και θάνατο του οργανισμού. [15] [3]

2.2 Βλάβες στο γενετικό υλικό DNA

Το σημαντικότερο μόριο του κυττάρου είναι το DNA καθώς είναι αυτό που περιέχει όλες τις πληροφορίες τόσο για τη λειτουργία όσο και τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου. Οι άμεσες αλλά κυρίως οι έμμεσες συνέπειες της ακτινοβολίας, δηλαδή η δημιουργία δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive oxygen species, ROS) προκαλούν διάφορα είδη φυσικοχημικών βλαβών στο DNA όπως:

- Σπάσιμο της μιας αλυσίδας του DNA ή μονόκλωνη θραύση (Single Strand Break, SSB)
- Σπάσιμο της έλικας του DNA ή διπλόκλωνη θραύση (Double Strand Break, DSB)
- Αλλοίωση βάσης όπως οξείδωση, απαμίνωση, αλκυλίωση ή μεθυλίωση
- Αντικατάσταση βάσης με κάποια άλλη
- Απώλεια βάσης και δημιουργία αβασικού σημείου.
- Εγκάρσιες διασυνδέσεις μεταξύ των κλώνων του DNA
- Σπάσιμο των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των αλυσίδων του DNA

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα μιας βλάβης τύπου αντικατάστασης βάσης είναι το εξής. Η βάση γουανίνη όταν αντιδράσει με μια ROS προκύπτει η 8-οξογουανίνη (G=O), όπως φαίνεται παρακάτω.

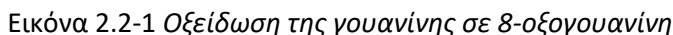


Diagram illustrating the formation of a G-T mismatch in a DNA double helix:

- wild type:** A DNA double helix with a G-C base pair.
- oxidative stress:** An arrow points to a DNA double helix where the G is oxidized (labeled with an O=), forming 8-oxoguanine.
- DNA replication:** An arrow points to a DNA double helix where the oxidized G has paired with an A (G-A mismatch).
- DNA replication:** A second arrow points to a DNA double helix where the A has paired with a T (T-A mismatch).
- mutant:** The final DNA double helix is labeled as a mutant, showing a T-A base pair.

2.2.1 Ομαδοποιημένες – Σύνθετες Ομαδοποιημένες Βλάβες DNA

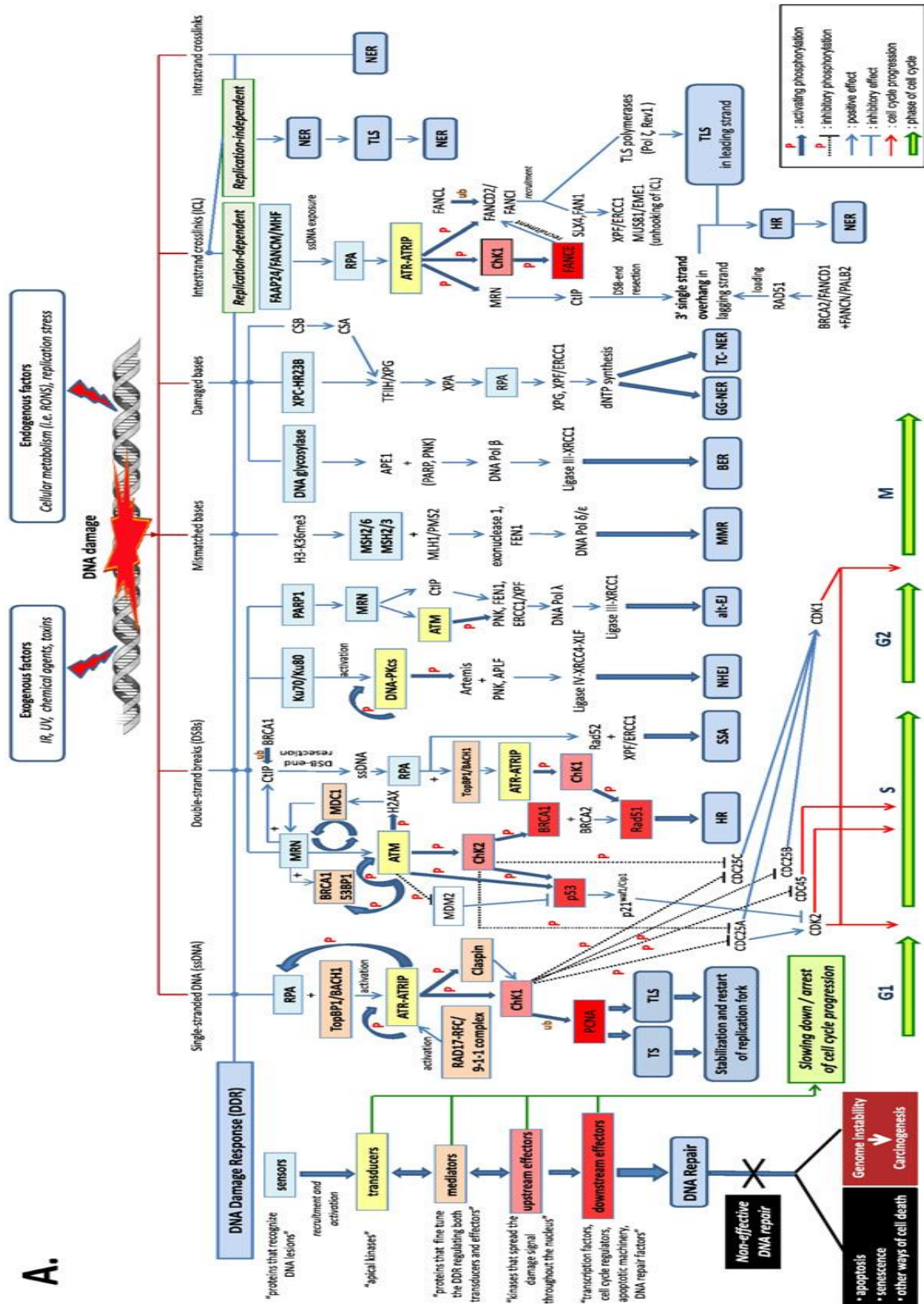
29

ενέργειά της καθορίζουν τη χωρική αποθήκευση της ενέργειας και ως εκ τούτου την κατανομή των CDLs. Ο μέσος όρος των βλαβών σε κάθε CDL αυξάνει με την αύξηση της γραμμικής μεταφοράς ενέργειας (LET) και έτσι σε μεγάλη LET οι CDLs είναι πιο σύνθετες [20]. Ακτινοβολίες χαμηλού LET προκαλούν μεγαλύτερο αριθμό CDLs αλλά πιο απλών, μέσω των δευτερογενών ηλεκτρονίων που προκαλούν βλάβες σε εύρος δεκάδων nm [1]. Ένας ακόμη σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει το είδος και το πλήθος των βλαβών του DNA είναι η συγκέντρωση του οξυγόνου στο περιβάλλον του κυττάρου. Σε υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου το κλάσμα SSB/DSB μειώνεται ενώ ο αριθμός των βλαβών ανά CDL αυξάνει, δηλαδή οι CDLs γίνονται πιο σύνθετες [20]. Οι βλάβες που προκαλούνται λόγω των ιοντιζουσών ακτινοβολιών είναι κατά κύριο λόγο CDLs και σύνθετες. Έτσι, αν και οι βλάβες στο DNA λόγω των ακτινοβολιών είναι λιγότερες από τις βλάβες που προκαλούνται από άλλους παράγοντες, έχουν καθοριστική βιολογική σημασία και οδηγούν σε χρόνιες επιπτώσεις[19].

2.3 Απόκριση στις βλάβες του DNA. DNA Damage Response (DDR)

Η ύπαρξη βλαβών στο DNA ενεργοποιεί ένα μηχανισμό σηματοδότησης, το DNA Damage Response (DDR) ο οποίος ανάλογα με τη βαρύτητα και το είδος των βλαβών οδηγεί στην ενεργοποίηση κατάλληλων επιδιορθωτικών μηχανισμών με σκοπό την επιδιόρθωση των βλαβών και μπορεί να προκαλέσει αναστολή του κυτταρικού κύκλου. Η αναστολή του κυτταρικού κύκλου μπορεί να είναι προσωρινή, έως ότου επιδιορθωθούν οι βλάβες ή μόνιμη, οπότε το κύτταρο οδηγείται είτε σε πρόωρη γήρανση είτε σε απόπτωση. Ένα σύνολο πρωτεϊνών ενεργοποιούνται υπό την ύπαρξη συγκεκριμένων βλαβών και πυροδοτούν συγκεκριμένα σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία οδηγούν το κύτταρο σε κάποια από τις αναφερθείσες διαδικασίες. Τα μονοπάτια αυτά μπορεί να είναι αλληλεπικαλυπτόμενα. Στην εικόνα που ακολουθεί παρουσιάζεται ένας χάρτης των μονοπατιών του DDR.

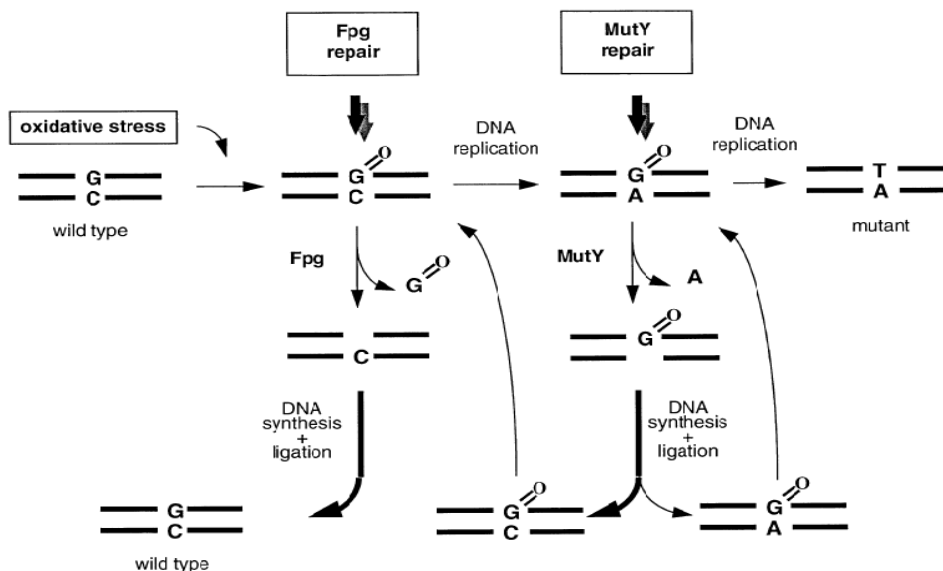
A.



Εικόνα 2.3-1 Σχηματική απεικόνιση των μονοπατιών του DNA damage response και επιδιόρθωσης του DNA που πυροδοτούνται από διάφορους ενδογενείς ή εξωγενείς παράγοντες (Pateras et al., 2015, [16]).

Βλάβη του DNA ενεργοποιεί συγκεκριμένες πρωτεΐνες ανάλογα με το είδος της βλάβης. Οι πρωτεΐνες αυτές ενεργοποιούν συγκεκριμένες κινάσες οι οποίες με τη σειρά τους φωσφορυλιώνουν το υπόστρωμά τους ώστε να ενεργοποιηθεί ο κατάλληλος μηχανισμός επιδιόρθωσης του DNA ανάλογα με τη βλάβη. Κάθε μονοπάτι επιδιόρθωσης του DNA μπορεί να λειτουργεί είτε αυτόνομα είτε σε συνεργασία με άλλους μηχανισμούς επιδιόρθωσης, ανάλογα με την πολυπλοκότητα της βλάβης του DNA. Ο απαιτούμενος χρόνος για την επιδιόρθωση του DNA παρέχεται από διάφορους παράγοντες, όπως κινάσες και πρωτεΐνες, οι οποίοι αναστέλλουν τα σύμπλοκα των κυκλινών-CDK που είτε μειώνουν το ρυθμό είτε αναστέλλουν τη διαδικασία του κυτταρικού κύκλου. Σε περίπτωση που η βλάβη είναι εκτεταμένη ή δεν επιδιορθωθεί σωστά, το κύτταρο οδηγείται είτε σε απόπτωση είτε σε πρόωρη γήρανση. Σε αντίθετη περίπτωση μπορεί να υπάρξει γονιδιωματική αστάθεια και πιθανόν καρκινογένεση [21].

Ένα παράδειγμα μηχανισμού επιδιόρθωσης του DNA είναι ο μηχανισμός εκτομής βάσης, το λεγόμενο 'Base Excision Repair' (BER). Στην περίπτωση ύπαρξης της 8-οξογυανίνης αντί της γουανίνης στο DNA ενεργοποιούνται οι πρωτεΐνες Fpg και MutY που είναι DNA γλυκοσυλάσες. Οι πρωτεΐνες αυτές αναφέρονται σε βακτήρια αλλά και στην περίπτωση των θηλαστικών και του ανθρώπου δρούν με ανάλογο τρόπο, παρόμοιες γλυκοσυλάσες, όπως η OGG1. Η Fpg ελευθερώνει τη G=O από το ζευγάρι G=O:C και μετά από τη σύνθεση DNA και την απολίνωση επανέρχεται στη σωστή μορφή G:C πριν την αντιγραφή του DNA. Στην περίπτωση που η βλάβη δεν διορθωθεί και προχωρήσει η αντιγραφή, η DNA πολυμεράση III θα αντιστοιχίσει απέναντι από την G=O, αδερίνη. Θα προκύψει δηλαδή το ζευγάρι G=O:A. Η πρωτεΐνη MutY θα πραγματοποιήσει εκτομή της αδερίνης στο ζευγάρι G=O:A και στη συνέχεια η DNA πολυμεράση I θα ενσωματώσει επιλεκτικά απέναντι από την G=O, κυτοσίνη δημιουργώντας ένα ζευγάρι G=O:C το οποίο επιδιορθώνεται από την Fpg. Η διαδικασία αυτή παρουσιάζεται σχηματικά στην εικόνα [18].

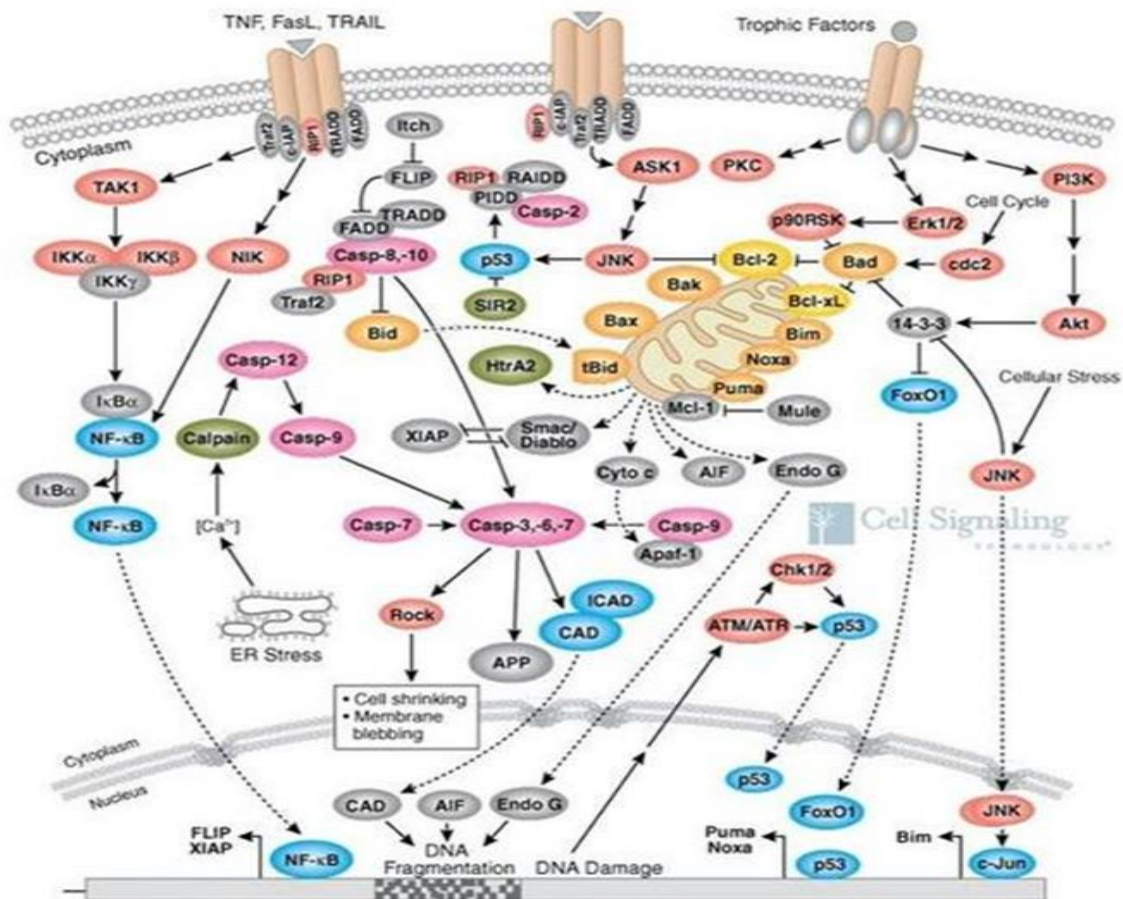


Εικόνα 2.3-2 Μηχανισμός επιδιόρθωσης λόγω ύπαρξης 8-οξογουανίνης στο DNA στην *E.coli* (Serge Boiteux et al.,1998 [15]).

Ο παραπάνω μηχανισμός αναφέρεται, όπως προαναφέρθηκε, σε βακτήρια και συγκεκριμένα στο *E.coli*. Ο μηχανισμός επιδιόρθωσης στον ανθρώπινο οργανισμό είναι ανάλογος. Αντίστοιχη της βακτηριακής Fpg στον άνθρωπο είναι η γλυκοσυλάση hOGG1 ενώ αντίστοιχη της MutY είναι η hNTH1. Οι πρώτες εξειδικεύονται κυρίως στις οξειδωμένες πουρίνες ενώ οι δεύτερες στις οξειδωμένες πυριμιδίνες [22].

2.4 Απόπτωση

Η απόπτωση αναφέρεται σε μία διαδικασία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Το κύτταρο, μετά από τη δράση αποπτωτικών σημάτων λόγω έκφρασης συγκεκριμένων πρωτεϊνών μπαίνει στη διαδικασία της απόπτωσης κατά την οποία το κύτταρο συρρικνώνεται, συρρικνώνεται η χρωματίνη και ο πυρήνας, η μιτοχονδριακή μεμβράνη διαρρηγνύεται και το κύτταρο αποδομείται σε αποπτωτικά σώματα τα οποία φαγοκυτταρώνονται. Η διαδικασία της απόπτωσης δεν προκαλεί φλεγμονή. Σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της απόπτωσης παίζουν οι κασπάσες η έκφραση των οποίων οδηγεί τελικά το κύτταρο στην απόπτωση.



Εικόνα 2.4-1 Αποπτωτικά Μονοπάτια (Cell Signaling Technology®)

2.5 Κυτταρική Γήρανση

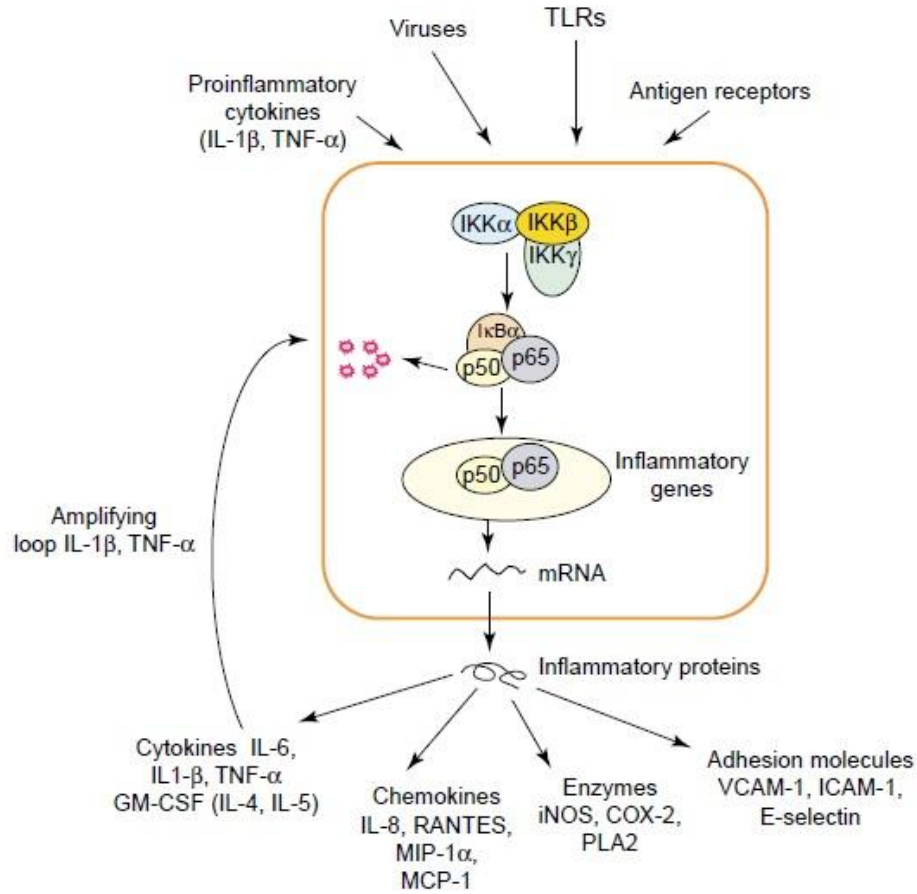
Η κυτταρική γήρανση είναι μια κατάσταση μη αντιστρεπτής διακοπής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στην οποία το κύτταρο παραμένει μεταβολικά ενεργό. Έχουν αναφερθεί δύο είδη κυτταρικής γήρανσης. Η Αναδυπλασιαστική Γήρανση, Replicative Senescence (RS) και η Πρόωρη Γήρανση που επάγεται από στρεσογόνους παράγοντες, Stress Induced Premature Senescence (SIPS). Η πρώτη ενεργοποιείται από την διακοπή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μετά από έναν αριθμό διαιρέσεων λόγω των τελομερών φθοράς. Αντίθετα, η πρόωρη γήρανση λαμβάνει χώρα υπό διάφορες συνθήκες στρες και είναι ανεξάρτητη του μήκους των τελομερών. Στο εσωτερικό των λυσοσωμάτων των κυττάρων που δεν πολλαπλασιάζονται συσσωρεύεται λιποφουσκίνη, η οποία είναι ένα μη αποικοδομήσιμο συσσωμάτωμα οξειδωμένων πρωτεϊνών, λιπιδίων και μετάλλων. Η ύπαρξη λιποφουσκίνης είναι δείγμα πρόωρης γήρανσης του κυττάρου [23].

2.6 Νέκρωση – Φλεγμονή

Η νέκρωση είναι και αυτή μια διαδικασία πρόωρου κυτταρικού θανάτου. Η διαφορά με την απόπτωση έγκειται στο γεγονός ότι η νέκρωση δεν είναι μια ελεγχόμενη διαδικασία όπου ακολουθούνται συγκεκριμένα μονοπάτια και συγκεκριμένες διαδικασίες. Στη νέκρωση, λόγω του μεγέθους των βλαβών καταστρέφεται η ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης, εμπλέκονται συγκεκριμένοι υποδοχείς και απελευθερώνονται στο κύτταρο παράγοντες κυτταρικού θανάτου. Αυτό έχει σα συνέπεια τη ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης, και την απελευθέρωση στον εξωκυττάριο χώρο όλων των κυτταροπλασματικών ουσιών και δομών, πράγμα που οδηγεί σε φλεγμονή [1] [24].

Παράγοντες όπως ιοί, προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων-α και η ιντερλευκίνη-1 και κυτοκίνες της οικογένειας TNF ενεργοποιούν τον παράγοντα NF-κΒ σε κύτταρα κάθε είδους. Ο παράγοντας αυτός ρυθμίζει πολλά γονίδια που συμμετέχουν στην ανοσολογική ή τη φλεγμονώδη αντίδραση. Ένα μέλος της οικογένειας των NF-κΒ είναι η πρωτεΐνη RelA (p65). Οι παράγοντες που προαναφέρθηκαν οδηγούν στην ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών τα οποία οδηγούν σε μια διαδικασία φωσφορυλίωσης της RelA και μετακίνησή της από το κυτταρόπλασμα στο οποίο βρίσκεται πριν ενεργοποιηθεί, στον πυρήνα του κυττάρου. Εκεί προσδένεται στο μόριο του DNA και ενεργοποιεί την μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν χημειοκίνες, κυτοκίνες, ένζυμα που παράγουν παράγοντες που ενεργοποιούν δευτερογενή φλεγμονώδη αντίδραση και αναστολές της κυτταρικής απόπτωσης. Τα μόρια αυτά είναι σημαντικά για την ενεργοποίηση της ανοσολογικής και για την προσέλκυση φαγοκυττάρων στους ιστούς όπου έχει ενεργοποιηθεί ο NF-κΒ

σαν αντίδραση σε τραυματισμό ή μόλυνση. Επίσης είναι γνωστό ότι επάγουν οξειδωτικό στρες. Στο σχήμα που ακολουθεί φαίνεται μια διαδικασία ενεργοποίησης του NF- κ B [41].



Εικόνα 2.6-1 Ενεργοποίηση του κλασικού μονοπατιού του NF- κ B εξ αιτίας μια ποικιλίας φλεγμονικών σημάτων που οδηγεί στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με φλεγμονική ή ανοσολογική απόκριση (Giuseppina Bonizzi and Michael Karin, 2004, [41]).

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

Σήμερα έχουμε ένα πλήθος κλινικών και ερευνητικών παρατηρήσεων που υποδεικνύουν πως τα βιολογικά αποτελέσματα της ιοντίζουσας ακτινοβολίας δεν περιορίζονται μόνο στα ακτινοβολημένα κύτταρα αλλά επεκτείνονται και σε κύτταρα εκτός του πεδίου ακτινοβολήσης. Έτσι παρατηρούνται φαινόμενα όπως γονιδιωματική αστάθεια, ανταλλαγές αδερφών χρωματίδων, καρκινογένεση κ.α. σε κύτταρα που θεωρητικά δεν έχουν δεχθεί δόση. Επίσης, έχει παρατηρηθεί αύξηση της ακτινοπροστασίας και περιορισμός καρκινικών όγκων σε απομακρυσμένες θέσεις [25] [26, 27]. Μπορούμε να διακρίνουμε τις μη στοχευμένες επιδράσεις της ιοντίζουσας ακτινοβολίας σε παρακείμενα αποτελέσματα, bystander effects, και σε απομακρυσμένα, distant effects.

3.1 Παρακείμενα αποτελέσματα ιοντίζουσας ακτινοβολίας- Bystander effects of IR

Τα παρακείμενα (bystander) αποτελέσματα της ιοντίζουσας ακτινοβολίας αναφέρονται σε συνέπειες που επάγονται σε κύτταρα που γειτονεύουν με τα κύτταρα που δέχτηκαν δόση ακτινοβολίας [26]. Η πρώτη τεκμηρίωση του φαινομένου έγινε με το πείραμα των Nagasawa και Little οι οποίοι ακτινοβόλησαν το 1% των κυττάρων μιας κυτταροκαλλιέργειας με σωματίδια-α και παρατήρησαν αυξημένο αριθμό ανταλλαγών αδερφών χρωματίδων στο 30% του κυτταρικού πληθυσμού της καλλιέργειας [28]. Σε άλλα πειράματα αποδείχθηκε ότι ακτινοβολημένα κύτταρα εκλύουν παράγοντες που προκαλούν αντιδράσεις στα γειτονικά, μη ακτινοβολημένα. Επίσης υπάρχει ένδειξη επικοινωνίας και επαγωγής γονιδιωματικής αστάθειας μεταξύ κυττάρων που εφάπτονται μέσω των χασμοσυνδέσεων της κυτταρικής μεμβράνης [29].

3.2 Απομακρυσμένα αποτελέσματα ιοντίζουσας ακτινοβολίας (Abscopal effects of IR)

Τα απομακρυσμένα αποτελέσματα της ιοντίζουσας ακτινοβολίας, abscopal effects, συνήθως σχετίζονται με κλινική έκθεση σε ακτινοβολία σε περιπτώσεις ακτινοθεραπείας. Σε μία ακτινοθεραπεία, ο όγκος δέχεται πολύ μεγάλες δόσεις ακτινοβολίας, της τάξης των δεκάδων Gy ενώ ο φυσιολογικός ιστός στο πεδίο της ακτινοβολίας δέχεται μεν μικρότερη αλλά αρκετά σημαντική δόση τάξης μερικών Gy

[30]. Οι επιπτώσεις σε συστημικό επίπεδο εξ αιτίας μιας τοπικής ακτινοβολήσης είναι καλά προσδιορισμένες και στην κλινική εφαρμογή παρατηρούνται φαινόμενα όπως ανορεξία, απώλεια βάρους και γενικευμένη κόπωση. Μια σπανιότερη επίδραση της θεραπείας με ακτινοβολία είναι η μείωση όγκων σε περιοχές μακριά από τον όγκο ακτινοβολήσης, επίδραση που περιγράφεται με τον όρο “abscopal effect”. Ο όρος “abscopal” εισήχθη από τον Mole το 1953 για να περιγράψει το φαινόμενο της υποχώρησης όγκου σε περιοχή σε απόσταση από την περιοχή ακτινοβολήσης [31]. Ο Paras πρότεινε ένα σύνολο μηχανισμών που θα μπορούσε να επηρεάσει την αυθόρμητη υποχώρηση των όγκων όπως το ανοσοποιητικό σύστημα, φυσικοί και ορμονικοί παράγοντες, νέκρωση όγκου και επιγενετικοί παράγοντες [32]. Παρά ταύτα, στην περίπτωση των abscopal effects, ο συγχρονισμός τους με την εφαρμογή μιας απομακρυσμένης ακτινοθεραπείας παρέχει μια ένδειξη για τον αιτιατό ρόλο της ακτινοβολίας στην επαγωγή φαινομένων όπως αυτό της οπισθοχώρησης ενός όγκου [33] [34]. Υπό άλλες προσεγγίσεις, οι παρατηρήσεις αυτές εντάσσονται αποκλειστικά στο πλαίσιο της ακτινοθεραπείας καθώς υποστηρίζουν ότι η ακτινοβολία δεν είναι απόλυτα στοχευμένη και υπάρχει διασπορά της δόσης σε όλο το σώμα [30]. Πάντως, υπάρχουν σήμερα αρκετά δεδομένα, εκτός της υποχώρησης όγκου που προαναφέρθηκε, που υποδεικνύουν την ύπαρξη του φαινομένου. Μερικά παραδείγματα είναι τα εξής. Το 1969 διαπιστώθηκε υποχώρηση της πλευρικής συλλογής υγρού στους πνεύμονες έπειτα από ακτινοβολήση για κακοήθες λέμφωμα στην κοιλιακή χώρα [35]. Σε άλλο πείραμα, η ακτινοβολήση σε πνεύμονα ποντικού προκάλεσε βλάβες στο DNA κυττάρων σε απομακρυσμένους ιστούς, ενώ η χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών περιόρισε το φαινόμενο. Το πείραμα αυτό μάλιστα ανέδειξε το ρόλο των ελεύθερων ριζών οξυγόνου και αζώτου στην επαγωγή του φαινομένου [36].

3.3 Οξειδωτικό στρες και ο ρόλος του στην μη στοχευμένη επίδραση

Με τον όρο οξειδωτικό στρες αναφερόμαστε στην αυξημένη, σε σχέση με τα φυσιολογικά επίπεδα, συγκέντρωση δραστικών μορφών οξυγόνου, Reactive Oxygen Species (ROS) και δραστικών μορφών αζώτου, Reactive Nitrogen Species (RNS). Οξειδωτικό στρες προκαλείται από ανισορροπία δημιουργίας ROS - RNS από συγκεκριμένους παράγοντες και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών των κυττάρων. Οι παράγοντες αυτοί είναι είτε ενδογενείς είτε εξωγενείς. Στους ενδογενείς παράγοντες εντάσσονται κυτταρικές λειτουργίες όπως η κυτταρική ανάπτυξη, η μιτοχονδριακή λειτουργία, η ανοσολογική απόκριση, η αποπτωτική απόκριση και η φλεγμονώδης

αντίδραση. Στους εξωγενείς παράγοντες εντάσσονται και οι ιοντίζουσες ακτινοβολίες η οποίες παράγουν ROS με τους μηχανισμούς που αναλύθηκαν στο κεφάλαιο 3. Οι ROS – RNS μπορούν να μεταφερθούν μέσω χασμοσυνδέσεων σε γειτονικά κύτταρα ή μέσω διάχυσης σε παρακείμενα κύτταρα. Αυτές οι δραστικές μορφές αντιδρούν πολύ εύκολα και έτσι έχουν πολύ μικρή εμβέλεια, της τάξης των nm, μέσα στον οργανισμό. Έτσι, μπορούν να επηρεάσουν μόνο γειτονικά κύτταρα και μοιάζει δύσκολο να επηρεάζουν κύτταρα σε απομακρυσμένες θέσεις. Το υπεροξείδιο το υδρογόνου, H_2O_2 , είναι η μόνη από αυτές τις ουσίες, που λόγω της χαμηλής δραστικότητας, του μπορεί να φθάσει σε απομακρυσμένες θέσεις. Το H_2O_2 δημιουργείται ως συνέπεια της ακτινοβολίας αλλά παράγεται και από ένζυμα [37].

Τα μακροφάγα φαίνεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στις μη στοχευμένες επιδράσεις της ακτινοβολίας. Τα κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβες λόγω της ακτινοβολίας εκλύουν κυτοκίνες που διαφοροποιούν μονοκύτταρα σε μακροφάγα και στη συνέχεια τα προσελκύουν μαζί με άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού [38]. Είναι πιθανό τα μακροφάγα αυτά και τα άλλα ανοσοκύτταρα να μπορούν, μέσω του κυκλοφορικού συστήματος, να μεταναστεύσουν σε απομακρυσμένα σημεία και μέσω της έκλυσης ROS – RNS και κυτοκινών να προκαλούν οξειδωτικό στρες. Είναι επίσης πιθανό οι κυτοκίνες που εκλύονται σε ένα σημείο που φλεγμαίνει να μπορούν να μετακινηθούν σε απομακρυσμένες περιοχές και να προκαλέσουν εκεί φλεγμονώδη αντίδραση και οξειδωτικό στρες [39].

4 Μέθοδος εξέτασης ιστών, υλικά και εκτέλεση πειράματος

4.1 Ανοσοϊστοχημεία

Πρόκειται για μια ευρέως χρησιμοποιούμενη *in situ* τεχνική για διαγνωστικούς και ερευνητικούς σκοπούς. Ο Albert Coons με μια σειρά εργασιών κατά τη διάρκεια των δεκαετιών '50 και '60 έθεσε τα θεμέλια της ανοσοϊστοχημείας (Coons ΑΗ, 1951). Βασική αρχή της τεχνικής είναι η ανάδειξη συγκεκριμένων στοιχείων (πρωτεΐνες, νουκλεϊνικά οξέα, λιπίδια, κτλ) των κυττάρων και των ιστών, μετά από την σύνδεσή τους με ειδικά αντισώματα.

4.2 Αντιγόνα-Αντισώματα

Κάθε χημική ένωση που αναγνωρίζεται από ένα οργανισμό σαν “ξένη” προκαλεί ανοσολογική απόκριση και την παραγωγή αντισωμάτων. Τέτοιες ενώσεις ονομάζονται αντιγόνα. Τα αντιγόνα δηλαδή διαθέτουν δύο κύριες ιδιότητες, την ικανότητα έκλυσης ανοσολογικής απόκρισης και την αντίδραση με το προϊόν της ανοσολογικής απόκρισης, τα αντισώματα, με ειδικό τρόπο. Η επιφάνεια ενός αντιγόνου καλύπτεται από συγκεκριμένες δραστικές περιοχές (καθοριστικές ομάδες) οι οποίες κατευθύνουν τη σύνθεση των αντισωμάτων. Άρα για ένα μόνο αντιγόνο μπορεί να παραχθεί ένα σύνολο διαφορετικών αντισωμάτων που καθένα θα αναγνωρίζει μια διαφορετική καθοριστική ομάδα, ή αλλιώς ένα διαφορετικό επίτοπο. Κάθε οργανισμός έχει την ικανότητα να διακρίνει τα δικά του μόρια από εκείνα άλλων οργανισμών, τα οποία αναγνωρίζονται ως ξένα. Αν για παράδειγμα εισάγουμε μια ανθρώπινη πρωτεΐνη σε ποντικό, ο ποντικός θα την αναγνωρίσει σαν ξένη, η ανθρώπινη πρωτεΐνη θα λειτουργήσει σαν αντιγόνο μέσα στον οργανισμό του ποντικού και θα ακολουθήσει μια ανοσολογική απόκριση. Θα παραχθούν αντισώματα από τον ποντικό που θα αντιδράσουν ειδικά με την ανθρώπινη πρωτεΐνη.

Η Ανοσοϊστοχημεία εκμεταλλεύεται την υψηλής εξειδίκευσης αντίδραση μεταξύ αντιγόνου- αντισώματος (Coons et al., 1941). Η χρήση σημασμένων αντισωμάτων, είναι ο πυρήνας της τεχνικής για την ανάδειξη πχ. μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης στην τομή του ιστού που μας ενδιαφέρει. Τα αντισώματα παρασκευάζονται μετά από ανοσοποίηση ζώων (αρουραίοι, κουνέλια, κα) και μπορεί να είναι μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά. Τα πολυκλωνικά αντισώματα είναι το μίγμα των αντισωμάτων που παράγονται εναντίον των όλων των διαφορετικών επιτόπων του αντιγόνου. Αντίθετα τα μονοκλωνικά αντισώματα είναι ειδικά για ένα μόνο αντιγονικό επίτοπο. Τα μονοκλωνικά αντισώματα έχουν το πλεονέκτημα της απόλυτα ειδικής δέσμευσης με

την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει, αντίθετα τα πολυκλωνικά μπορεί να ενισχύουν το αποτέλεσμα της δέσμευσης (ισχυρότερο σήμα κατά τη φάση της οπτικοποίησης του αποτελέσματος).

Το πρώτο βήμα λοιπόν της μεθόδου είναι η παραγωγή αντισωμάτων για το αντιγόνο που μας ενδιαφέρει. Στη συνέχεια οι τομές του ιστού που μελετάμε, επωάζονται με το αντίσωμα, το οποίο λέγεται πρωτογενές αντίσωμα. Πριν την επώαση έχει προηγηθεί επεξεργασία των τομών για την αποκάλυψη των αντιγονικών επιτόπων που μας ενδιαφέρουν (antigen retrieval). Κατά την επώαση του πρωτογενούς αντισώματος στις τομές, αυτό ενώνεται με το αντίστοιχο αντιγόνο. Στη συνέχεια πρέπει να γίνουν ορατές οι θέσεις στις οποίες είναι παρόν το σύμπλοκο αντιγόνου-αντισώματος. Αυτό επιτυγχάνεται με τις μεθόδους ανίχνευσης όπου μπορούμε να διακρίνουμε δύο κατηγορίες, τις έμμεσες και τις άμεσες μεθόδους ανίχνευσης.

Στις άμεσες, το πρωτογενές αντίσωμα σημαίνεται με έναν κατάλληλο δείκτη (φθορίζουσα ουσία, ένζυμο, σωματίδια χρυσού) και η τομή μπορεί κατόπιν να παρατηρηθεί σε φωτονικό, ηλεκτρονικό ή μικροσκόπιο φθορισμού και να αξιολογηθεί η παρουσία του αντιγόνου που μας ενδιαφέρει.

Από τις έμμεσες μεθόδους, οι πλέον χρησιμοποιούμενες είναι αυτή του ανοσο-συμπλέγματος υπεροξειδάσης-αντιυπεροξειδάσης (PAP method) και της ανοσοενζυμικής τεχνικής βιοτίνης-στρεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης (ABC).

Στη μέθοδο υπεροξειδάσης-αντιυπεροξειδάσης χρησιμοποιείται ένα δεύτερο αντίσωμα, το οποίο ονομάζεται δευτερογενές αντίσωμα. Το αντίσωμα αυτό προκύπτει με ανοσοποίηση ενός οργανισμού διαφορετικού από αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή του πρώτου. Αν για παράδειγμα το πρωτογενές αντίσωμα παρήχθη σε αρουραίο, το δευτερογενές θα παραχθεί σε κουνέλι. Το δευτερογενές αντίσωμα εντοπίζει και συνδέεται με το πρωτογενές αντίσωμα ενώ φέρει ένα πολυμερές. Στη συνέχεια εφαρμόζεται στην τομή υπεροξειδάση η οποία ενώνεται με το πολυμερές που φέρει το δευτερογενές αντίσωμα. Στη μέθοδο της βιοτίνης-στρεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης ακολουθείται η ίδια διαδικασία με τη διαφορά ότι το δευτερογενές αντίσωμα είναι βιοτινυλιωμένο, φέρει δηλαδή τη βιταμίνη βιοτίνη. Στη συνέχεια εφαρμόζεται στην τομή ένα σύμπλεγμα υπεροξειδάσης-στρεπταβιδίνης. Η στρεπταβιδίνη είναι μια πρωτεΐνη βακτηριακής προέλευσης που αποτελείται από τέσσερις πανομοιότυπες υπομονάδες, η κάθε μία από τις οποίες φέρει θέση δέσμευσης για τη βιοτίνη.

Το οπτικό σήμα είναι συνέπεια της ιδιότητας της υπεροξειδάσης να μετατρέπει το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε νερό και να οξειδώνει διάφορα χρωμογόνα σε μία χρωματισμένη μορφή. Από το σύνολο των διαθέσιμων χρωμογόνων, μόνο η διαμινοβενζιδίνη (DAB) σχηματίζει αδιάλυτο ίζημα το οποίο διατηρείται για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Η ειδικότητα της μεθόδου μπορεί να ελαττωθεί λόγω παραμέτρων όπως η ύπαρξη κοινής αλληλουχίας αμινοξέων μεταξύ του υπό μελέτη αντιγόνου και άλλων μορίων, η σύνδεση της Fc μοίρας του πρωτογενούς αντισώματος με υποδοχείς φαγοκυττάρων, μαστοκυττάρων ή συμπλήρωμα, καθώς και η επιμόλυνση του παρασκευάσματος του πρωτογενούς αντισώματος με άλλα αντισώματα. Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την ειδικότητα της ανοσοϊστοχημείας είναι η ύπαρξη ενδογενούς δραστηριότητας υπεροξειδάσης, η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων βιοτίνης. [40]

Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντισώματα: anti-80xho-G (Millipore, USA), anti-ki67 (Abcam, UK) και anti-p65 (Santa Cruz, USA).

4.3 Πειραματόζωα

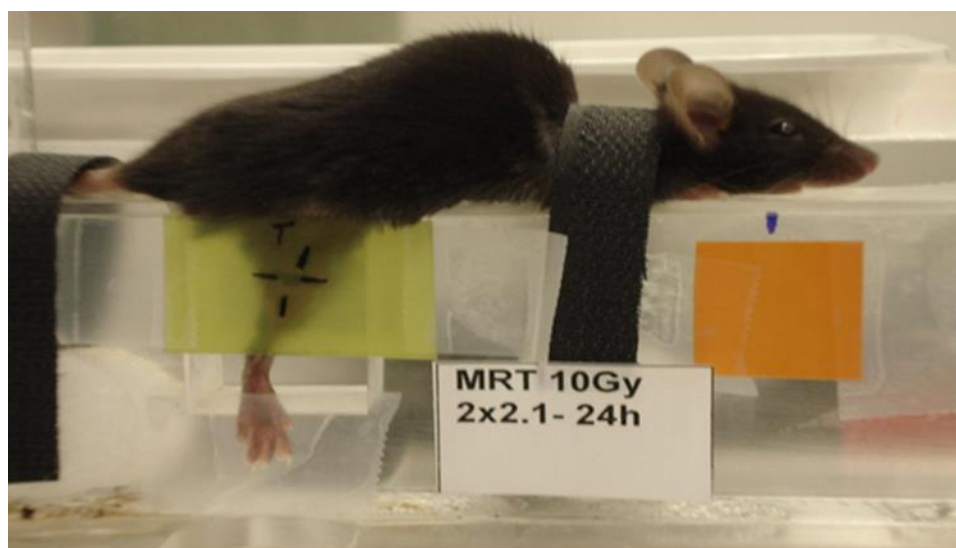
Στη συγκεκριμένη έρευνα χρησιμοποιήθηκαν υγιή, θηλυκά ποντίκια, έξη εβδομάδων του γένους C57BL/6 από το πανεπιστήμιο Monash της Μελβούρνης Αυστραλίας. Πρόκειται για το πιο συνηθισμένο είδος ποντικού που χρησιμοποιείται για εργαστηριακά πειράματα. Αυτό γιατί χαρακτηρίζεται από ευρωστία και ευκολία στην αναπαραγωγή ενώ δεν είναι επιρρεπής στην ανάπτυξη όγκων. Τα πρωτόκολλα ηθικής και δεοντολογίας εγκρίθηκαν από το πανεπιστήμιο Monash και τις αντίστοιχες επιτροπές ηθικής και δεοντολογίας του Australian Synchrotron.

4.4 Ακτινοβολήση

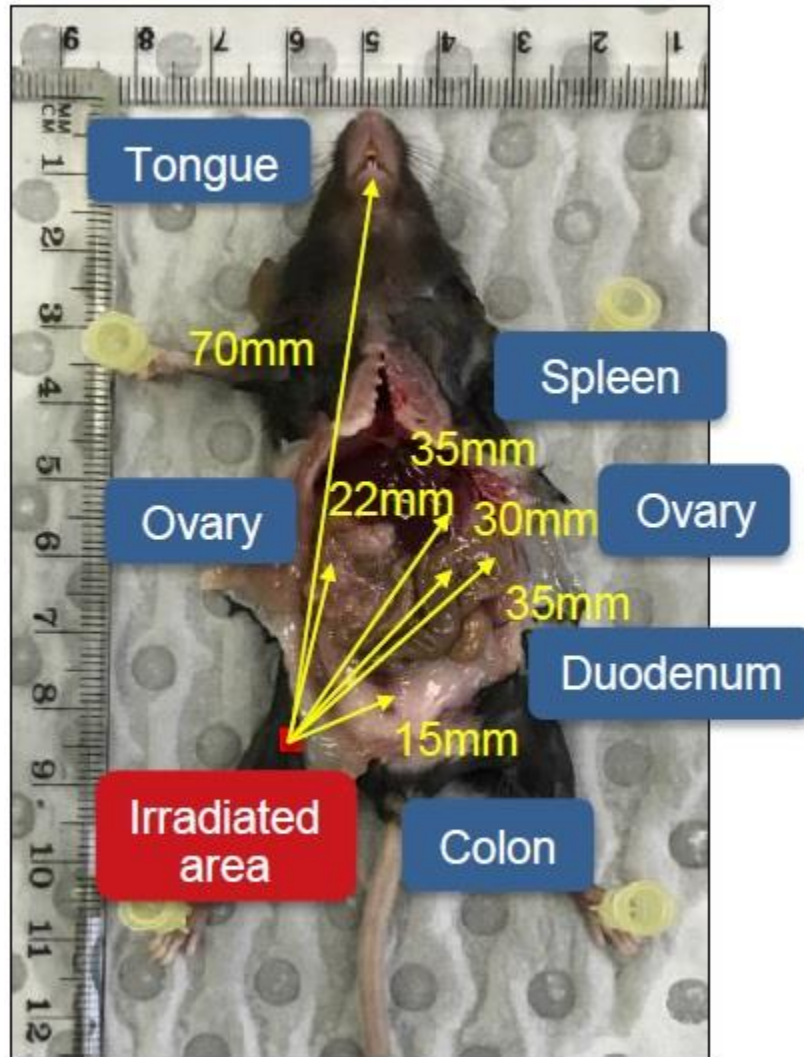
Η ακτινοβολήση έγινε σε επιταχυντική διάταξη στο Imaging Medical Beamline (IMBL) του Australian Synchrotron του Peter McCallum Institute στο πανεπιστήμιο της Μελβούρνης, το οποίο παράγει ακτίνες-χ ενέργειας 30 keV-120 keV. Τα δείγματα ακτινοβολήθηκαν με ρυθμό 49 Gy/sec που ελεγχόταν από ανιχνευτή ιονισμού με συνεχή ένταση 200mA. Τα χαρακτηριστικά αυτά και η υψηλής παραλληλότητας δέσμες που παράγει το συγκεκριμένο σύγχροτρο οδήγησαν στην ελαχιστοποίηση της διασποράς των φωτονίων. Τα ποντίκια τοποθετήθηκαν με τρόπο ώστε η δέσμη της ακτινοβολίας να κατευθύνεται μόνο στο πίσω δεξί πόδι και να μην διέρχεται από κανένα άλλο σημείο του σώματός τους. Για το έλεγχο της διασποράς αλλά και τη μέτρηση της απορρόφησης χρησιμοποιήθηκαν ειδικά ραδιοχρωμικά φιλμ τόσο στο σημείο της ακτινοβολήσης όσο και σε απομακρυσμένες περιοχές (Πίνακας και Εικόνα 4.4-1).

Πίνακας 4.4-1 Απορρόφηση και διασπορά ακτινοβολίας

Δείγματα	Απορρόφηση ακτινοβολίας (οπτική πυκνότητα)	Διασπορά στα 5 cm (mGy)	Διασπορά στο 1.5 cm (mGy)
BB 10Gy 2x2	0.0063		
BB 40Gy 2x2	0.0213		
BB 10Gy 8x8	0.0051		
BB 40Gy 8x8	0.0595	5.67	13.6
BB 10Gy 8x1	0.0208		
BB 40Gy 8x1	0.0362	2.68	

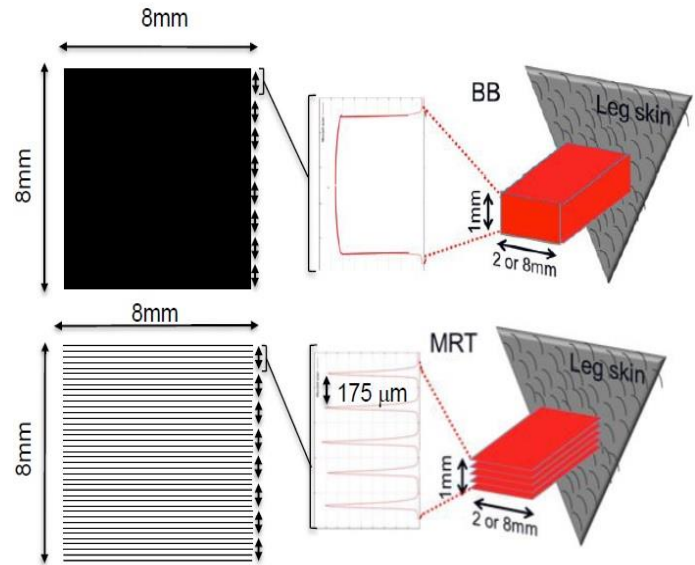


Εικόνα 4.4-1 Εικόνα από τη διαδικασία της ακτινοβόλησης όπου φαίνεται το σημείο ακτινοβόλησης και τα ραδιοχρωμικά φιλμ



Εικόνα 4.4-2 Εικόνα από τη διαδικασία απομόνωσης των ιστών μετά την ακτινοβολή όπου φαίνονται οι αποστάσεις του κάθε ιστού από το σημείο της ακτινοβολήσης.

Ο συνολικός αριθμός των ποντικών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 105. Χωρίστηκαν σε ομάδες των πέντε και η κάθε ομάδα ακτινοβολήθηκε με διαφορετικό συνδυασμό δόσης, διατομή ακτινοβολήσης, είδος δέσμη και θανατώθηκε σε διαφορετικό χρόνο μετά την ακτινοβολήση. Χρησιμοποιήθηκαν δόσεις των 10 Gy και 40 Gy, οι επιφάνειες ακτινοβολήσης ήταν 2x2mm, 8x8mm και 8x1mm, ο χρόνος θανάτωσης ήταν 24 και 96 ώρες μετά την ακτινοβολήση και χρησιμοποιήθηκε ευρεία δέσμη (Broad Beam) και ακτινοβολήση με μικροδέσμες (Microbeam Radiation Therapy, MRT). Το προφίλ της κάθε ακτινοβολίας φαίνεται στην Εικόνα 4.4-3. Επίσης, η μία ομάδα υποβλήθηκε σε όλη τη διαδικασία που υποβλήθηκαν όλες η ομάδες αλλά δεν ακτινοβολήθηκε ώστε τα ποντίκια της να χρησιμοποιηθούν σαν μάρτυρες (control). Όλοι οι συνδυασμοί φαίνονται στον Πίνακα 4.4-3.



Εικόνα 4.4-3 Πάνω: Γεωμετρία ευρείας δέσμης BB
Κάτω: Γεωμετρία δέσμης MRT

Πίνακας 4.4-2 Οι ομάδες των ποντικών που ακτινοβολήθηκαν με διαφορετική δόση, διαφορετική δέσμη, με διαφορετικό εμβαδόν ακτινοβολήσης και θανατώθηκαν σε διαφορετικούς χρόνους μετά την ακτινοβολήση

Ακτινοβολίες	Αριθμός ποντικών ανά ομάδα	Παρελθής χρόνος της ακτινοβολήσης	Δόσεις	Εμβαδόν ακτινοβολήσης	Αριθμός ποντικών
Broad Beam	5	24h,96h	10Gy, 40Gy	2x2mm ² , 8x8mm ² , 8x1mm ²	60
Microbeam Radiation Therapy	5	24h, 96h	10Gy, 40Gy	2x2mm ² , 8x8mm ²	40
Control	5	-	-	-	5
Συνολικός αριθμός ποντικών	-	-	-	-	105

4.5 Απομόνωση – Φύλαξη Ιστών

Μετά την ακτινοβολήση, και τη θανάτωση των ποντικών 24 ή 96 ώρες αντίστοιχα, απομονώθηκαν αίμα και ιστοί τόσο από το σημείο της ακτινοβολήσης όσο και από ιστούς από απομακρυσμένες περιοχές. Το αίμα, μετά από ειδική επεξεργασία και διαχωρισμό του πλάσματος αποθηκεύτηκε στους -80°C . Οι ιστοί τοποθετήθηκαν σε ένα ειδικό κρυοπροστατευτικό υλικό, το OCT και φυλάχθηκαν στους -80°C . Στη συνέχεια έγιναν σειριακές τομές πάχους $10\mu\text{m}$ οι οποίες τοποθετήθηκαν σε ειδικά πλακάκια ανοσοϊστοχημείας. Τα πλακάκια αφού αφέθηκαν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου για 20min, τυλίχθηκαν σε αλουμινόχαρτο και φυλάχθηκαν στους -80°C . Οι ιστοί μεταφέρθηκαν παγωμένοι από την



Εικόνα 4.5-1 Εντερικός ιστός σε OCT

Μελβούρνη στο Τμήμα Ιστολογίας-Εμβρυολογίας της Ιατρικής σχολής ΕΚΠΑ, όπου εκτελέστηκαν τα πειράματα. Προκειμένου να γίνει δυνατή η λήψη τομών πάχους $4\mu\text{m}$, ώστε να γίνει εφικτή η λήψη καλύτερων εικόνων με καλύτερα διατηρημένη δομή, τμήματα των ιστών εγκλείσθηκαν σε μπλοκ παραφίνης. Για το σκοπό αυτό, ιστοί καθαρίστηκαν από το OCT με φυσιολογικό, μονιμοποιήθηκαν για 12 ώρες σε φορμόλη και μετά από κατάλληλη χημική επεξεργασία εγκλείσθηκαν στην παραφίνη.

4.6 Πρωτόκολλα ανοσοϊστοχημείας για 8-oxo-G

4.6.1 Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για 8-oxo-G σε παγωμένους ιστούς

Αφήνουμε τα πλακάκια για 20 λεπτά να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου και αφαιρούμε το αλουμινόχαρτο. Μονιμοποιούμε τους ιστούς με 2% παραφορμαλδεΐδη για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Εκτελούμε δυο πλύσεις με Phosphate buffered saline (PBS) για 5 λεπτά και εφαρμόζουμε αιθανόλη 70% θερμοκρασίας -20°C για 20 λεπτά στους 4°C . Εκτελούμε δυο πεντάλεπτες πλύσεις με PBS και τοποθετούμε στους ιστούς 3% H_2O_2 διαλυμένο σε PBS για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτεινό μέρος. Μετά από δύο πεντάλεπτες πλύσεις με PBS εκτελούμε μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης του πρωτογενούς αντισώματος με διάλυμα 8% BSA, 0,5% Tween-20, 0,1% Triton-X σε PBS για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από δυο πεντάλεπτες πλύσεις με PBS επωάζουμε την 8-oxo-G συγκέντρωσης 1/750 διαλυμένη σε διάλυμα 0,05% Tween-20, 0,01% Triton-X σε PBS ολονύχτια στους 4°C . Εκτελούμε δυο πεντάλεπτες πλύσεις με PBS και επωάζουμε το

δευτερογενές αντίσωμα (Primary Antibody Enhancer) για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από δυο πεντάλεπτες πλύσεις με PBS εφαρμόζουμε horseradish peroxidase (HRP) για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτεινό μέρος. Ξεπλένουμε δυο φορές με PBS και εφαρμόζουμε στους ιστούς 1% DAB για ένα λεπτό. Ξεπλένουμε με νερό βρύσης τοποθετούμε τα πλακάκια σε αιματοξυλίνη έως ότου επιτευχθεί η επιθυμητή χρώση και ξεπλένουμε με τρεχούμενο νερό. Τοποθετούμε τα πλακάκια διαδοχικά σε 96% και 100% αιθανόλη για 10 λεπτά στην κάθε μια και έπειτα για τουλάχιστον 20 λεπτά σε ξυλόλη. Τέλος τοποθετούμε καλυπτρίδες στα πλακάκια.

4.6.2 Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για 8-οxo-G σε τομές παραφίνης

Αποπαραφινώνουμε τους ιστούς τοποθετώντας τους στους 60°C και στη συνέχεια σε ξυλόλη για 15 λεπτά. Ενυδατώνουμε τους ιστούς τοποθετώντας τους διαδοχικά σε αιθανόλη 100% για 15 λεπτά, σε αιθανόλη 96% για 10 λεπτά, σε αιθανόλη 80% για 5 λεπτά, σε αιθανόλη 70% για 3 λεπτά και σε αιθανόλη 50% για 3 λεπτά. Ακολουθούν 2 πεντάλεπτα ξεβγάλματα με TBS 1x. Στη συνέχεια οι ιστοί τοποθετούνται σε προθερμασμένα κιτρικά 1x για 25 λεπτά σε φούρνο μικροκυμάτων στα 700W. Ξεβγάζουμε τα κιτρικά με 2 πεντάλεπτες πλύσεις με TBS 1x και στη συνέχεια αδρανοποιούμε την πρωτογενή υπεροξειδάση εφαρμόζοντας H₂O₂ για 13 λεπτά σε σκοτάδι. Ακολουθούν 2 πεντάλεπτες πλύσεις με TBS 1x και μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης του πρωτογενούς αντισώματος με Ultra V Block για 7 λεπτά. Ξεβγάζουμε μια φορά με TBS 1x και επωάζουμε την 8-οxo-G συγκέντρωσης 1/1200 ολονύχτια 4 °C. Εκτελούμε δυο πεντάλεπτες πλύσεις με TBS 1x και επωάζουμε το δευτερογενές αντίσωμα (Primary Antibody Enhancer) για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από δυο πεντάλεπτες πλύσεις με TBS εφαρμόζουμε horseradish peroxidase (HRP) για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτεινό μέρος. Ξεπλένουμε δυο φορές με PBS και εφαρμόζουμε στους ιστούς 1% DAB για ένα λεπτό. Ξεπλένουμε με νερό βρύσης τοποθετούμε τα πλακάκια σε αιματοξυλίνη έως ότου επιτευχθεί η επιθυμητή χρώση και ξεπλένουμε με τρεχούμενο νερό. Ακολουθώντας αφυδατώνουμε τους ιστούς τοποθετώντας τους διαδοχικά σε αιθανόλη 50% για 3 λεπτά, σε αιθανόλη 70% για 3 λεπτά, σε αιθανόλη 80% για 5 λεπτά, σε αιθανόλη 96% για 10 λεπτά και σε αιθανόλη 100% για 15 λεπτά. Έπειτα οι ιστοί εμβαπτίζονται για τουλάχιστον 20 λεπτά σε ξυλόλη και τέλος τοποθετούμε καλυπτρίδες στα πλακάκια.

4.7 Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για ki-67 σε παγωμένους ιστούς

4.7.1 Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για ki-67 σε παγωμένους ιστούς

Αφήνουμε τα πλακάκια για 20 λεπτά να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου και αφαιρούμε το αλουμινόχαρτο. Μονιμοποιούμε τους ιστούς με 2% παραφορμαλδεΐδη για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Εκτελούμε δυο πλύσεις με Phosphate buffered saline (PBS) για 5 λεπτά και εφαρμόζουμε αιθανόλη 70% θερμοκρασίας -20 °C για 20 λεπτά στους 4 °C. Εκτελούμε δυο πεντάλεπτες πλύσεις με PBS και τοποθετούμε στους ιστούς 3% H₂O₂ διαλυμένο σε PBS για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτεινό μέρος. Μετά από δύο πεντάλεπτες πλύσεις με PBS εκτελούμε μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης του πρωτογενούς αντισώματος με διάλυμα 8% BSA, 0,5% Tween-20, 0,1% Triton-X σε PBS για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από δυο πεντάλεπτες πλύσεις με PBS επωάζουμε την ki-67 συγκέντρωσης 1/200 διαλυμένη σε διάλυμα 0,05% Tween-20, 0,01% Triton-X σε PBS ολονύχτια στους 4 °C. Εκτελούμε δυο πεντάλεπτες πλύσεις με PBS και επωάζουμε το δευτερογενές αντίσωμα (Primary Antibody Enhancer) για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από δυο πεντάλεπτες πλύσεις με PBS εφαρμόζουμε horseradish peroxidase (HRP) για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτεινό μέρος. Ξεπλένουμε δυο φορές με PBS και εφαρμόζουμε στους ιστούς 1% DAB για ένα λεπτό. Ξεπλένουμε με νερό βρύσης τοποθετούμε τα πλακάκια σε αιματοξυλίνη έως ότου επιτευχθεί η επιθυμητή χρώση και ξεπλένουμε με τρεχούμενο νερό. Τοποθετούμε τα πλακάκια διαδοχικά σε 96% και 100% αιθανόλη για 10 λεπτά στην κάθε μια και έπειτα για τουλάχιστον 20 λεπτά σε ξυλόλη. Τέλος τοποθετούμε καλυπτρίδες στα πλακάκια.

4.7.2 Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για ki-67 σε τομές παραφίνης

Αποπαραφινώνουμε τους ιστούς τοποθετώντας τους στους 60°C και στη συνέχεια σε ξυλόλη για 15 λεπτά. Ενυδατώνουμε τους ιστούς τοποθετώντας τους διαδοχικά σε αιθανόλη 100% για 15 λεπτά, σε αιθανόλη 96% για 10 λεπτά, σε αιθανόλη 80% για 5 λεπτά, σε αιθανόλη 70% για 3 λεπτά και σε αιθανόλη 50% για 3 λεπτά. Ακολουθούν 2 πεντάλεπτα ξεβγάλματα με TBS 1x. Στη συνέχεια οι ιστοί τοποθετούνται σε προθερμασμένα κιτρικά 1x για 25 λεπτά σε φούρνο μικροκυμάτων στα 700W. Ξεβγάζουμε τα κιτρικά με 2 πεντάλεπτες πλύσεις με TBS 1x και στη συνέχεια αδρανοποιούμε την πρωτογενή υπεροξειδάση εφαρμόζοντας H₂O₂ για 13 λεπτά σε σκοτάδι. Ακολουθούν 2 πεντάλεπτες πλύσεις με TBS 1x και μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης του πρωτογενούς αντισώματος με Ultra V Block για 7 λεπτά. Ξεβγάζουμε μια φορά με TBS 1x και επωάζουμε την ki-67 συγκέντρωσης 1/200

ολονύχτια 4 °C. Εκτελούμε δυο πεντάλεπτες πλύσεις με TBS 1x και επωάζουμε το δευτερογενές αντίσωμα (Primary Antibody Enhancer) για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από δυο πεντάλεπτες πλύσεις με TBS εφαρμόζουμε horseradish peroxidase (HRP) για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτεινό μέρος. Ξεπλένουμε δυο φορές με PBS και εφαρμόζουμε στους ιστούς 1% DAB για ένα λεπτό. Ξεπλένουμε με νερό βρύσης τοποθετούμε τα πλακάκια σε αιματοξυλίνη έως ότου επιτευχθεί η επιθυμητή χρώση και ξεπλένουμε με τρεχούμενο νερό. Ακολουθώντας αφυδατώνουμε τους ιστούς τοποθετώντας τους διαδοχικά σε αιθανόλη 50% για 3 λεπτά, σε αιθανόλη 70% για 3 λεπτά, σε αιθανόλη 80% για 5 λεπτά, σε αιθανόλη 96% για 10 λεπτά και σε αιθανόλη 100% για 15 λεπτά. Έπειτα οι ιστοί εμβαπτίζονται για τουλάχιστον 20 λεπτά σε ξυλόλη και τέλος τοποθετούμε καλυπτρίδες στα πλακάκια.

4.8 Πρωτόκολλα ανοσοϊστοχημείας για p-65

4.8.1 Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για p-65 σε παγωμένους ιστούς

Αφήνουμε τα πλακάκια για 20 λεπτά να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου και αφαιρούμε το αλουμινόχαρτο. Μονιμοποιούμε τους ιστούς με 2% παραφορμαλδεΐδη για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Εκτελούμε δυο πλύσεις με Phosphate buffered saline (PBS) για 5 λεπτά και εφαρμόζουμε αιθανόλη 70% θερμοκρασίας -20 °C για 20 λεπτά στους 4 °C. Εκτελούμε δυο πεντάλεπτες πλύσεις με PBS και τοποθετούμε στους ιστούς 3% H₂O₂ διαλυμένο σε PBS για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτεινό μέρος. Μετά από δύο πεντάλεπτες πλύσεις με PBS εκτελούμε μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης του πρωτογενούς αντισώματος με Ultra V Block για 7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από δυο πεντάλεπτες πλύσεις με PBS επωάζουμε την p-65 συγκέντρωσης 1/150 διαλυμένη σε διάλυμα 0,05% Tween-20, 0,01% Triton-X σε PBS ολονύχτια στους 4 °C. Εκτελούμε δυο πεντάλεπτες πλύσεις με PBS και επωάζουμε Antirabbit 1/200 σε PBS για μια ώρα στους 37 °C. Μετά από δυο πεντάλεπτες πλύσεις με PBS εφαρμόζουμε HRP Streptavidin συγκέντρωσης 1/200 σε PBS για 30 λεπτά στους 37 °C. Ξεπλένουμε δυο φορές με PBS και εφαρμόζουμε στους ιστούς 1% DAB για ένα λεπτό. Ξεπλένουμε με νερό βρύσης τοποθετούμε τα πλακάκια σε αιματοξυλίνη έως ότου επιτευχθεί η επιθυμητή χρώση και ξεπλένουμε με τρεχούμενο νερό. Τοποθετούμε τα πλακάκια διαδοχικά σε 96% και 100% αιθανόλη για 10 λεπτά στην κάθε μια και έπειτα για τουλάχιστον 20 λεπτά σε ξυλόλη. Τέλος τοποθετούμε καλυπτρίδες στα πλακάκια.

4.8.2 Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για p65 σε τομές παραφίνης

Αποπαραφινώνουμε τους ιστούς τοποθετώντας τους στους 60°C και στη συνέχεια σε ξυλόλη για 15 λεπτά. Ενυδατώνουμε τους ιστούς τοποθετώντας τους διαδοχικά σε αιθανόλη 100% για 15 λεπτά, σε αιθανόλη 96% για 10 λεπτά, σε αιθανόλη 80% για 5 λεπτά, σε αιθανόλη 70% για 3 λεπτά και σε αιθανόλη 50% για 3 λεπτά. Ακολουθούν 2 πεντάλεπτα ξεβγάλματα με TBS 1x. Στη συνέχεια οι ιστοί τοποθετούνται σε προθερμασμένα κιτρικά 1x για 25 λεπτά σε φούρνο μικροκυμάτων στα 700W. Ξεβγάζουμε τα κιτρικά με 2 πεντάλεπτες πλύσεις με TBS 1x και στη συνέχεια αδρανοποιούμε την πρωτογενή υπεροξειδάση εφαρμόζοντας H₂O₂ για 13 λεπτά σε σκοτάδι. Ακολουθούν 2 πεντάλεπτες πλύσεις με TBS 1x και μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης του πρωτογενούς αντισώματος με Ultra V Block για 7 λεπτά. Ξεβγάζουμε μια φορά με TBS 1x και επωάζουμε την p65 συγκέντρωσης 1/300 ολονύχτια 4 °C. Εκτελούμε δυο πεντάλεπτες πλύσεις με TBS 1x και επωάζουμε το δευτερογενές αντίσωμα (Primary Antibody Enhancer) για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από δυο πεντάλεπτες πλύσεις με TBS εφαρμόζουμε horseradish peroxidase (HRP) για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτεινό μέρος. Ξεπλένουμε δυο φορές με PBS και εφαρμόζουμε στους ιστούς 1% DAB για ένα λεπτό. Ξεπλένουμε με νερό βρύσης τοποθετούμε τα πλακάκια σε αιματοξυλίνη έως ότου επιτευχθεί η επιθυμητή χρώση και ξεπλένουμε με τρεχούμενο νερό. Ακολουθώντας αφυδατώνουμε τους ιστούς τοποθετώντας τους διαδοχικά σε αιθανόλη 50% για 3 λεπτά, σε αιθανόλη 70% για 3 λεπτά, σε αιθανόλη 80% για 5 λεπτά, σε αιθανόλη 96% για 10 λεπτά και σε αιθανόλη 100% για 15 λεπτά. Έπειτα οι ιστοί εμβαπτίζονται για τουλάχιστον 20 λεπτά σε ξυλόλη και τέλος τοποθετούμε καλυπτρίδες στα πλακάκια.

4.9 Πρωτόκολλο Sudan Black B σε παγωμένους ιστούς

Παρασκευάζουμε διάλυμα Sudan Black B (SSB) σε 70% αιθανόλη συγκέντρωσης 0,7% w/v. Αναδεύουμε ολονύκτια και φιλτράρουμε. Παρασκευάζουμε το Nuclear Fast Red (NFR) solution, διάλυμα για τη χρώση του πυρήνα. Το διάλυμα αυτό παρασκευάζεται με 0,1% w/v Nuclear Fast Red, 5% w/v θειικό αργίλιο σε αποσταγμένο νερό. Αφήνουμε τα πλακάκια 20 λεπτά ώστε να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου και αφαιρούμε το αλουμινόχαρτο. Εκτελούμε 2 πλυσίματα με PBS και τοποθετούμε τα πλακάκια σε κιβέτα με PBS για τουλάχιστον 24 ώρες στους 4 °C. Στη συνέχεια τοποθετούμε τα πλακάκια σε 50% και στη συνέχεια σε 70% αιθανόλη για 5 λεπτά στην κάθε μία. Ρίχνουμε μια σταγόνα SSB στον ιστό και τοποθετούμε καλυπτρίδα. Παρατηρούμε σε μικροσκόπιο για δημιουργία λιποφουσκίνης, και διακόπτουμε πριν δημιουργηθεί ίζημα στον ιστό. Αφαιρούμε την καλυπτρίδα και ξεπλένουμε τα πλακάκια σε 50% αιθανόλη

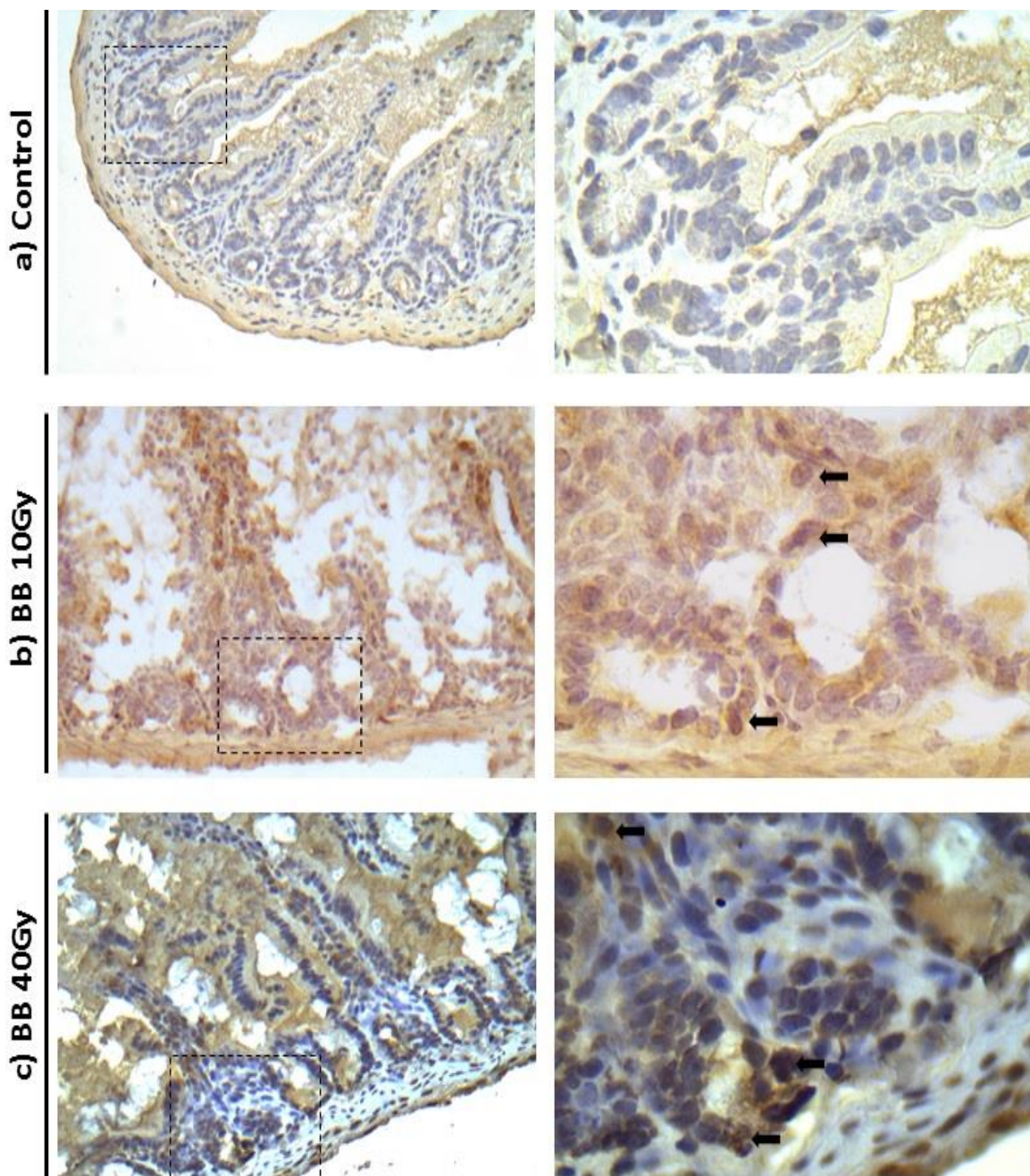
και στη συνέχεια σε αποσταγμένο νερό. Στη συνέχεια τοποθετούμε τα πλακάκια στο NFR για 10 λεπτά. Ρίχνουμε μια σταγόνα 40% γλυκερόλης διαλυμένης σε PBS και καλύπτουμε τα πλακάκια.

5 Αποτελέσματα

5.1 Οξειδωτικό Στρες- Βλάβες DNA

Για την αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες και των βλαβών του DNA στον ιστό του λεπτού εντέρου και συγκεκριμένα του δωδεκαδάκτυλου των ποντικών που ακτινοβολήθηκαν με BB και με MRT ακτινοβολία, καταμετρήθηκαν ξεχωριστά τα θετικά στην 8-οχο-G επιθηλιακά και τα στρωματικά εντερικά κύτταρα και έγινε σύγκρισή τους με τα αντίστοιχα κύτταρα του λεπτού εντέρου ποντικών που δεν ακτινοβολήθηκαν (control). Η καταμέτρηση έγινε ανά οπτικό πεδίο σε μεγέθυνση 630x και 400x, ανάλογα με το πάχος των τομών που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε πείραμα, με οπτικό μικροσκόπιο. Για την ακτινοβολία BB καταμετρήθηκαν τέσσερα περιστατικά για κάθε δόση, 10 και 40 Gy, και για κάθε διαφορετικό χρόνο απομόνωσης των ιστών μετά την ακτινοβολήση, 24 και 96 ώρες, δηλαδή συνολικά 16 περιστατικά και 5 control. Για την ακτινοβολία MRT καταμετρήθηκαν πέντε δείγματα για τα 10 Gy και τις 24 ώρες και τέσσερα δείγματα για τα 10 Gy και τις 96 ώρες, δηλαδή συνολικά 9 περιστατικά. Από κάθε περιστατικό καταμετρήθηκαν 3-4 διαφορετικές περιοχές. Αναλυτικά οι μετρήσεις φαίνονται στους πίνακες του παραρτήματος και από τις τιμές αυτές υπολογίστηκε η μέση τιμή και το σφάλμα τους. Για την εκτίμηση της στατιστικής σημαντικότητας των αποτελεσμάτων εκτελέστηκε t-test, μια στατιστική μέθοδος με την οποία μπορούμε να συμπεράνουμε αν τα αποτελέσματα της αξιολόγησης ενός δείγματος είναι στατιστικά σημαντικά και έτσι αν είναι ενδεικτικά για το σύνολο του πληθυσμού. Το t-test δίνει σαν αποτέλεσμα μια τιμή p-value. Αν το p-value είναι μικρότερο του 0,05 τότε θεωρούμε το εύρημα στατιστικά σημαντικό. Τα στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα σημειώνονται με αστερίσκο στα διαγράμματα.

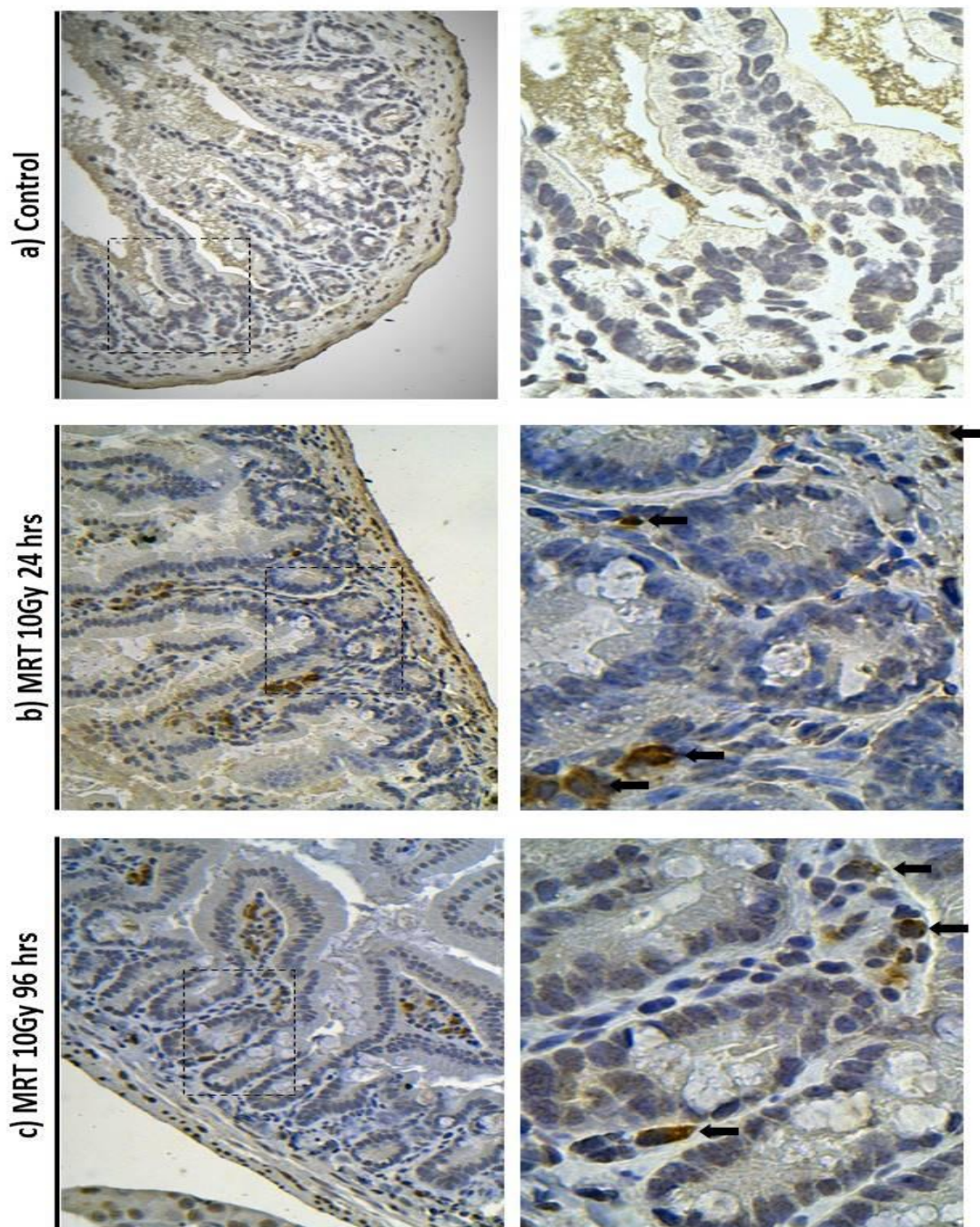
Ακολουθούν αντιπροσωπευτικές εικόνες όπου παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημείας με 8-οχο-G στους ιστούς του λεπτού εντέρου των ποντικών που ακτινοβολήθηκαν με BB. Στην εικόνα 5.1-1.α παρουσιάζεται ιστός λεπτού εντέρου μη ακτινοβολημένου (control) ποντικού, στην εικόνα 5.1-1.b ιστός λεπτού εντέρου ποντικού που ακτινοβολήθηκε με BB 10 Gy ενώ στην εικόνα 5.1-1.c ιστός λεπτού εντέρου ποντικού που ακτινοβολήθηκε με BB 40 Gy.



Εικόνα 5.1-1. **Αντιπροσωπευτική εικόνα ανοσοϊστοχημείας σε παγωμένο ιστό, 8-οχο-G.** Παρατηρείται αυξημένη παρουσία 8-οξογουανίνης τόσο στα BB 10Gy όσο και στα BB 40Gy σε σύγκριση με τα control. α) Ιστός εντέρου μη ακτινοβολημένου ποντικού (control). β) Ιστός εντέρου ποντικού ακτινοβολημένου με BB 10Gy. γ) Ιστός εντέρου ποντικού ακτινοβολημένου με BB 40Gy. Αριστερά μεγέθυνση 200x, δεξιά μεγέθυνση 630x. Τα βέλη υποδεικνύουν θετικούς στην 8-οξογουανίνη κυτταρικούς πυρήνες.

Παρατηρούμε αυξημένη παρουσία 8-οξογουανίνης τόσο στα 40 Gy BB ακτινοβολίας όσο και στα 10 Gy BB ακτινοβολίας, τόσο 24 ώρες όσο και 96 ώρες μετά την ακτινοβολήση σε σύγκριση με τον ιστό του μη ακτινοβολημένου ποντικού. Αυτή η αύξηση παρατηρείται τόσο στα επιθηλιακά όσο και στα στρωματικά κύτταρα.

Εξετάστηκαν επίσης ως προς το οξειδωτικό στρες και τις βλάβες DNA ιστοί δωδεκαδάκτυλου ποντικών που ακτινοβολήθηκαν στο πόδι με MRT ακτινοβολία και συγκρίθηκαν με μη ακτινοβολημένα δείγματα. Η αξιολόγηση και η καταμέτρηση έγινε με τον ίδιο τρόπο μόνο που στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκε οπτικό πεδίο 400x. Ακολουθούν αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοϊστοχημείας με 8-οxo-G στα MRT δείγματα.



Εικόνα 5.1-2. **Αντιπροσωπευτική εικόνα ανοσοϊστοχημείας σε παγωμένο ιστό, 8-οχο-G.** Παρατηρείται αυξημένη παρουσία 8-οχο-G στα MRT 10Gy, τόσο 24 όσο και 96 ώρες μετά την ακτινοβολήση, σε σύγκριση με τα control. *a)* Ιστός εντέρου μη ακτινοβολημένου ποντικού (control). *b)* Ιστός εντέρου ποντικού ακτινοβολημένου με MRT 10Gy 24 ώρες μετά την ακτινοβολήση. *c)* Ιστός εντέρου ποντικού ακτινοβολημένου με MRT 10Gy 96 ώρες μετά την ακτινοβολήση. Αριστερά μεγέθυνση 200x, δεξιά μεγέθυνση 630x. Τα βέλη υποδεικνύουν θετικούς στην 8-οξογουανίνη κυτταρικούς πυρήνες.

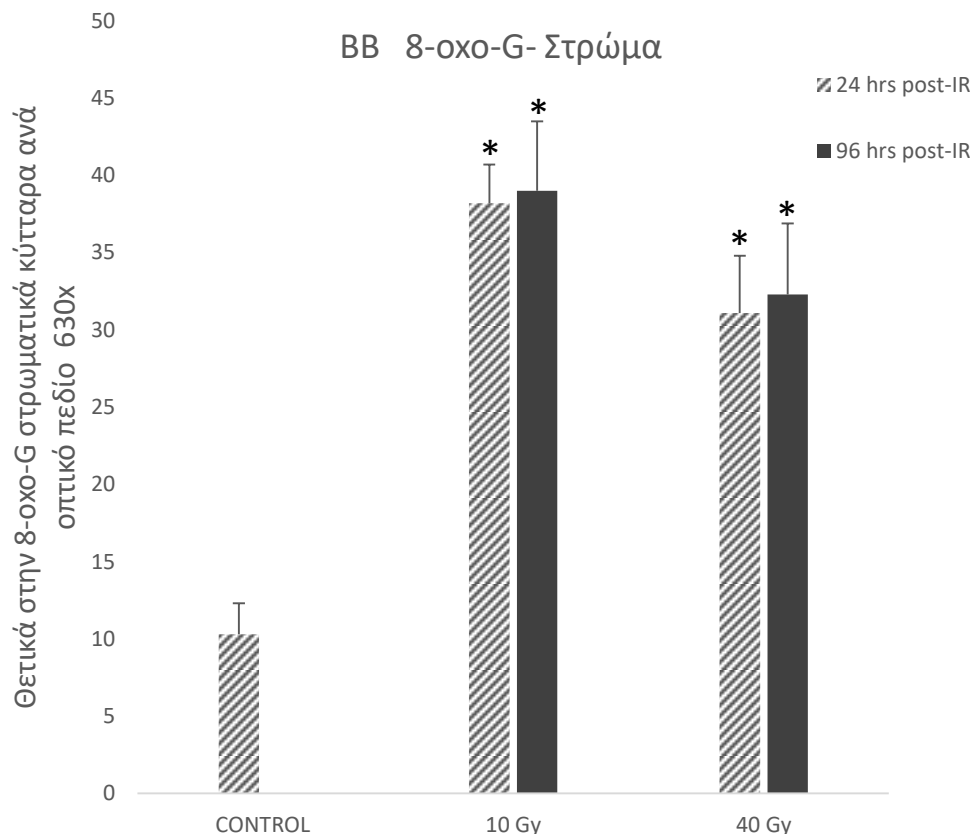
Και στην περίπτωση της MRT ακτινοβολίας με δόση 10 Gy παρατηρούμε αυξημένα επίπεδα 8-οχο-G, τόσο 24 όσο και 96 ώρες μετά την ακτινοβολήση σε σχέση με τα μη ακτινοβολημένα ποντίκια. Και στην περίπτωση αυτή η αύξηση παρουσιάζεται και στα επιθηλιακά και στα στρωματικά κύτταρα

5.1.1 Στρωματικά κύτταρα λεπτού εντέρου

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της καταμέτρησης των θετικών στην 8-οχο-G στρωματικών εντερικών κυττάρων τόσο των ακτινοβολημένων με BB όσο και των μη ακτινοβολημένων ποντικών. Στο διάγραμμα φαίνονται σχηματικά τα αποτελέσματα. Ο αστερίσκος υποδηλώνει στατιστική σημαντικότητα.

Πίνακας 5.1.1-1 Αποτελέσματα καταμέτρησης των θετικών στην 8-οχο-G στρωματικών κυττάρων

Θετικά στρωματικά εντερικά κύτταρα στην 8-οχο-G ανά οπτικό πεδίο 630x					
	CONTROL	BB 10 Gy 24 hrs	BB 10 Gy 96 hrs	BB 40 Gy 24 hrs	BB 40 Gy 96 hrs
Αριθμός θετικών κυττάρων ανά οπτικό πεδίο 630x	10,3	38,2	39	31,1	32,3
Τυπική απόκλιση	2	2,5	4,5	3,7	4,6
p-value	-	0,001	0,001	0,001	0,001



Διάγραμμα 5.1.1-1 Θετικά στην 8-oxo-G στρωματικά εντερικά κύτταρα σε διαφορετικές δόσεις BB ακτινοβολίας και διαφορετικούς χρόνους μετά την ακτινοβολήση. Σύγκριση των ακτινοβολημένων στο πόδι ποντικών με τα μη ακτινοβολημένα controls. Ο αστερίσκος υποδηλώνει στατιστική σημαντικότητα. Οι μπάρες σφαλμάτων είναι +/-.

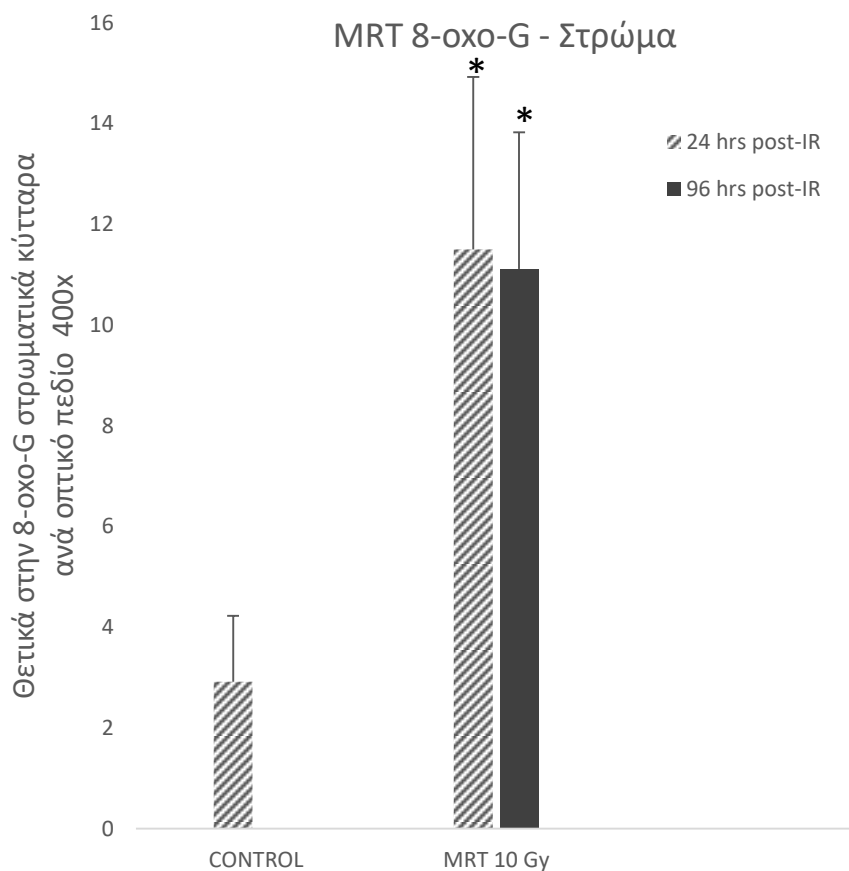
Παρατηρούμε εμφανώς αυξημένα ποσοστά θετικών στρωματικών εντερικών κυττάρων στην 8-oxo-G τόσο στα BB 40 Gy όσο και στα BB 10 Gy σε σύγκριση με τα στρωματικά εντερικά κύτταρα των μη ακτινοβολημένων ποντικών. Τα αποτελέσματα αυτά είναι στατικά σημαντικά καθώς το p-value είναι 0,001. Δεν παρατηρούμε κάποια διαφορά μεταξύ 24 και 96 ωρών μετά την ακτινοβολήση ούτε στα BB 40 Gy ούτε στα BB 10 Gy. Οι αυξημένες τιμές στα BB 10 Gy σε σχέση με τα BB 40 Gy που φαίνονται στο διάγραμμα δεν είναι στατιστικά σημαντικές καθώς δίνουν p-value 0,1 έως 0,2

Έτσι, στα BB 40 Gy έχουμε 3 και 3,1 ενώ στα BB 10 Gy, 3,7 και 3,8 φορές αυξημένη 8-oxoγουανίνη για τις 24 και τις 96 ώρες αντίστοιχα σε σύγκριση με τα μη ακτινοβολημένα.

Όσον αφορά στα ακτινοβολημένα με MRT δείγματα, τα αποτελέσματα της αντίστοιχης καταμέτρησης παρουσιάζονται στον πίνακα και στο διάγραμμα που ακολουθούν.

Πίνακας 5.1.1-2 Αποτελέσματα καταμέτρησης των θετικών στην 8-οχο-G στρωματικών κυττάρων

Θετικά στρωματικά εντερικά κύτταρα στην 8-οχο-G ανά οπτικό πεδίο 400x			
	CONTROL	MRT 10 Gy 24 hrs	MRT 10 Gy 96 hrs
Αριθμός θετικών κυττάρων ανά οπτικό πεδίο 400x	2,9	11,5	11,1
Τυπική απόκλιση	1,3	3,4	2,7
p-value	-	0,002	0,002



Διάγραμμα 5.1.1-2 **Θετικά στην 8-οχο-G στρωματικά εντερικά κύτταρα στα 10 Gy ακτινοβολίας για διαφορετικούς χρόνους μετά την ακτινοβολήση.** Σύγκριση των ακτινοβολημένων στο πόδι ποντικών με τα μη ακτινοβολημένα controls. Ο αστερίσκος υποδηλώνει στατιστική σημαντικότητα. Οι μπάρες σφαλμάτων είναι +/-.

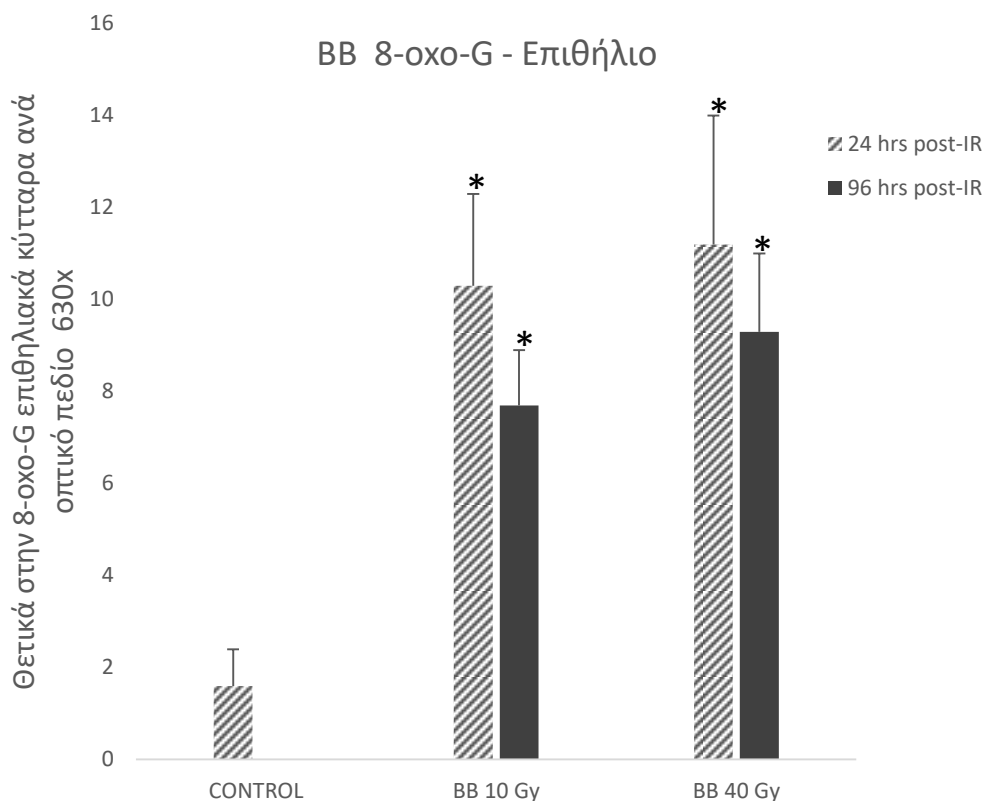
Και στην περίπτωση της MRT ακτινοβολίας παρατηρούμε σημαντική αύξηση των βλαβών του DNA και αυξημένη παρουσία της 8-οχο-G στα στρωματικά κύτταρα του λεπτού εντέρου των ποντικών που ακτινοβολήθηκαν στο πόδι με δόση 10 Gy σε σχέση με τα αντίστοιχα κύτταρα των μη ακτινοβολημένων ποντικών. Δεν παρατηρούμε σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων που συλλέχθηκαν 24 και 96 ώρες μετά την ακτινοβολήση. Συγκεκριμένα για την MRT 10 Gy και για τις 24 ώρες, η 8-οχο-G είναι αυξημένη 4 φορές και για τις 96 ώρες 3,8 φορές σε σχέση με τα μη ακτινοβολημένα. Τα αποτελέσματα αυτά είναι στατιστικά σημαντικά και οι αντίστοιχες p-values είναι 0,002 και 0,002.

5.1.2 Επιθηλιακά κύτταρα λεπτού εντέρου

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της καταμέτρησης των θετικών στην 8-οχο-G επιθηλιακών εντερικών κυττάρων τόσο των ακτινοβολημένων με ακτινοβολία BB όσο και των μη ακτινοβολημένων ποντικών. Στο διάγραμμα φαίνονται σχηματικά τα αποτελέσματα. Ο αστερίσκος υποδηλώνει στατιστική σημαντικότητα.

Πίνακας 5.1.2-1. Αποτελέσματα καταμέτρησης των θετικών στην 8-οχο-G επιθηλιακών κυττάρων

Θετικά επιθηλιακά εντερικά κύτταρα στην 8-οχο-G ανά οπτικό πεδίο 630x					
	CONTROL	BB 10 Gy 24 hrs	BB 10 Gy 96 hrs	BB 40 Gy 24 hrs	BB 40 Gy 96 hrs
Αριθμός θετικών κυττάρων ανά οπτικό πεδίο 630x	1,6	10,3	7,7	11,2	9,3
Τυπική απόκλιση	0,8	2	1,2	2,8	1,7
p-value	-	0,001	0,001	0,002	0,003



Διάγραμμα 5.1.2-1. Θετικά στην 8-οxo-G επιθηλιακά εντερικά κύτταρα σε διαφορετικές δόσεις BB ακτινοβολίας και διαφορετικούς χρόνους μετά την ακτινοβολήση. Σύγκριση των ακτινοβολημένων στο πόδι ποντικών με τα μη ακτινοβολημένα controls. Ο αστερίσκος υποδηλώνει στατιστική σημαντικότητα. Οι μπάρες σφαλμάτων είναι +/-.

Παρατηρούμε αυξημένα ποσοστά θετικών επιθηλιακών εντερικών κυττάρων στην 8-οxo-G τόσο στα 40 Gy όσο και στα 10 Gy, για την ακτινοβολία BB, σε σύγκριση με τα επιθηλιακά εντερικά κύτταρα των μη ακτινοβολημένων ποντικών. Τα αποτελέσματα αυτά είναι στατιστικά σημαντικά καθώς το p-value κυμαίνεται από 0,001 έως 0,003. Συγκεκριμένα, στα 40 Gy έχουμε 7 και 5,8 ενώ στα 10 Gy, 6,4 και 4,8 φορές αυξημένη 8-οξογουανίνη για τις 24 και τις 96 ώρες αντίστοιχα σε σύγκριση με τα μη ακτινοβολημένα.

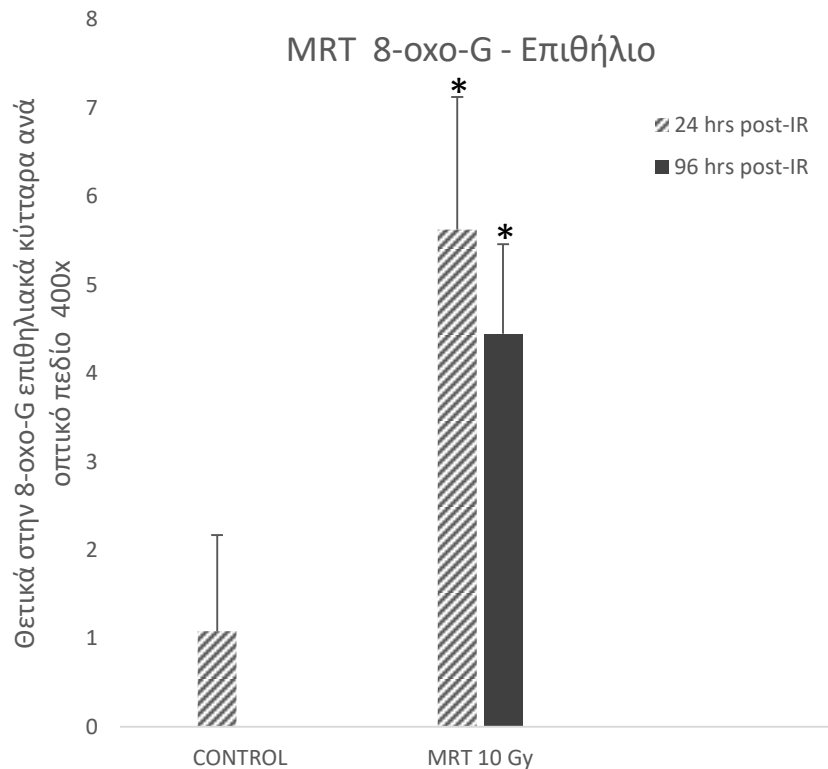
Στο διάγραμμα φαίνεται να υπάρχει μείωση των ποσοστών της 8-οxo-G από τις 24 στις 96 ώρες τόσο για τα 40 Gy όσο και για τα 10 Gy. Σε αντίθεση με τα στρωματικά κύτταρα που υπήρχε μια ένδειξη αύξησης της 8-οxo-G στα 10Gy σε σύγκριση με τα 40 Gy, στα επιθηλιακά κύτταρα παρατηρούμε ακριβώς το αντίθετο. Εντούτοις, οι παρατηρήσεις αυτές δεν είναι στατιστικά σημαντικές.

Στη περίπτωση των δειγμάτων που ακτινοβολήθηκαν με MRT, τα αποτελέσματα της καταμέτρησης των θετικών στην 8-οxo-G επιθηλιακών εντερικών κυττάρων και η

σύγκριση με τα μη ακτινοβολημένα παρουσιάζονται στον πίνακα και το διάγραμμα που ακολουθούν.

Πίνακας 5.1.2-2. Αποτελέσματα καταμέτρησης των θετικών στην 8-οxo-G επιθηλιακών κυττάρων

Θετικά επιθηλιακά εντερικά κύτταρα στην 8-οxo-G ανά οπτικό πεδίο 400x			
	CONTROL	MRT 10 Gy 24 hrs	MRT 10 Gy 96 hrs
Αριθμός θετικών κυττάρων ανά οπτικό πεδίο 400x	1,1	5,6	4,4
Τυπική απόκλιση	1,1	1,5	1,0
p-value	-	0,001	0,004



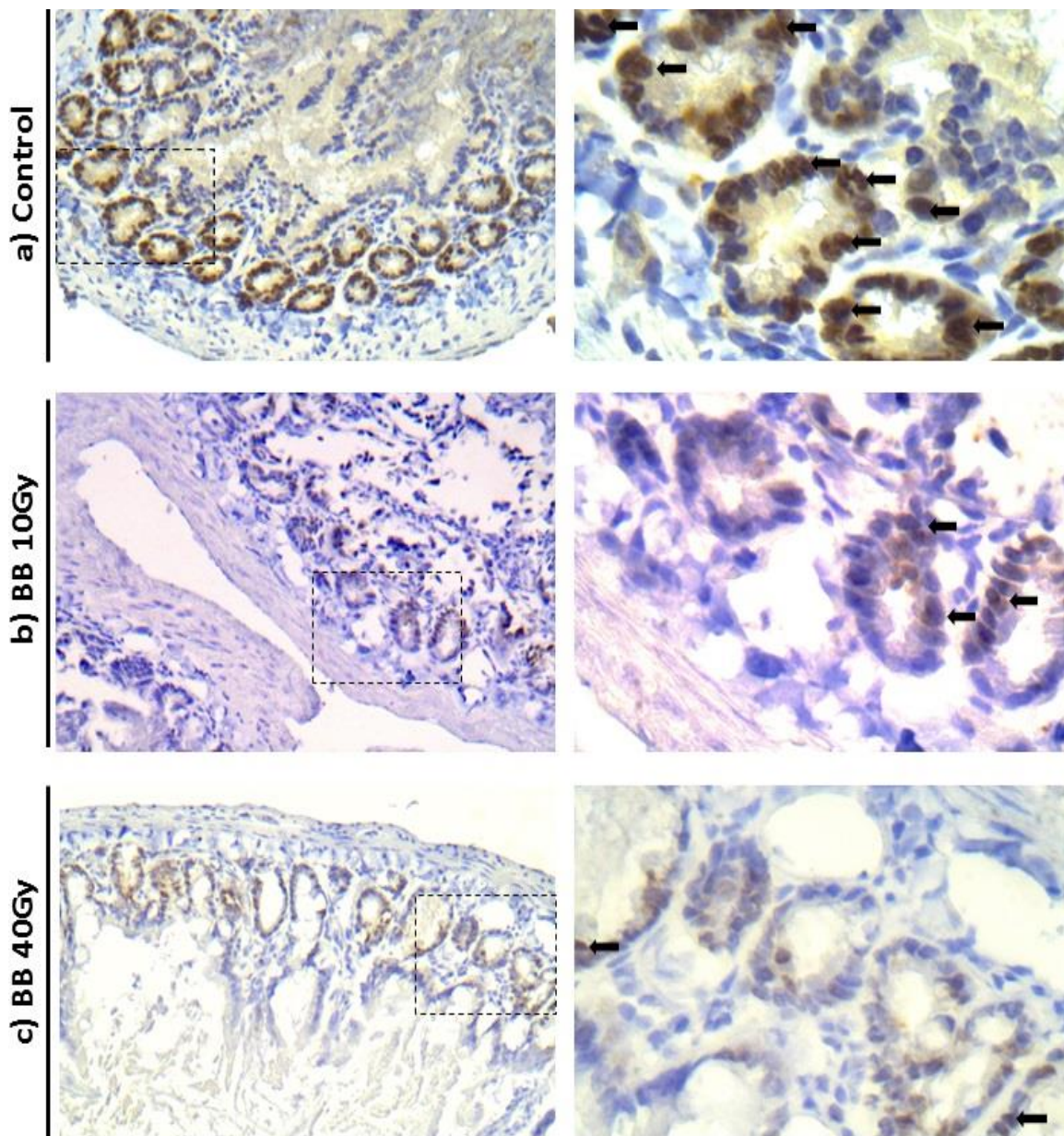
Διάγραμμα 5.1.2-1. Θετικά στην 8-οξογουανίνη επιθηλιακά εντερικά κύτταρα σε διαφορετικές δόσεις ΒΒ ακτινοβολίας και διαφορετικούς χρόνους μετά την ακτινοβολήση. Σύγκριση των ακτινοβολημένων στο πόδι ποντικών με τα μη ακτινοβολημένα controls. Ο αστερίσκος υποδηλώνει στατιστική σημαντικότητα. Οι μπάρες σφαλμάτων είναι +/-.

Και στην περίπτωση της MRT ακτινοβολήσης παρατηρούμε αυξημένες βλάβες στο DNA των επιθηλιακών κυττάρων του λεπτού εντέρου των ποντικών που ακτινοβολήθηκαν με 10 Gy στο πόδι σε σχέση με τα μη ακτινοβολημένα. Για τις 24 ώρες τα θετικά στην 8-οχο-G είναι 5,1 φορές και για τις 96 ώρες 4 φορές περισσότερα από τα αντίστοιχα των μη ακτινοβολημένων. Τα αποτελέσματα αυτά είναι στατιστικά σημαντικά με p-values 0,001 και 0,004 αντίστοιχα. Η παρατηρούμενη μείωση της 8-οχο-G στις 96 ώρες σε σχέση με τις 24 ώρες είναι εντός των ορίων των σφαλμάτων και μη στατιστικά σημαντική καθώς προκύπτει p-value 0,214.

5.2 Κυτταρικός Πολλαπλασιασμός

Για την αξιολόγηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στον ιστό του λεπτού εντέρου των ποντικών που ακτινοβολήθηκαν καταμετρήθηκαν τα θετικά κύτταρα στην ki-67, ύπαρξη της οποίας μαρτυρά κυτταρικό πολλαπλασιασμό, και έγινε σύγκριση με τα αντίστοιχα θετικά κύτταρα στην ki-67 των μη ακτινοβολημένων ποντικών. Η καταμέτρηση έγινε ανά εντερική κρύπτη. Για την ακτινοβολία BB καταμετρήθηκαν τέσσερα περιστατικά για κάθε δόση, 10 και 40 Gy, και για κάθε διαφορετικό χρόνο απομόνωσης των ιστών μετά την ακτινοβολήση, 24 και 96 ώρες, δηλαδή συνολικά 16 περιστατικά και 5 control. Για την ακτινοβολία MRT καταμετρήθηκαν πέντε δείγματα για τα 10 Gy και τις 24 ώρες και τέσσερα δείγματα για τα 10 Gy και τις 96 ώρες, δηλαδή συνολικά 9 περιστατικά. Αναλυτικά οι μετρήσεις φαίνονται στους πίνακες του παραρτήματος και από της τιμές αυτές υπολογίστηκε η μέση τιμή και το σφάλμα τους. Από κάθε περιστατικό καταμετρήθηκαν 10 διαφορετικές περιοχές. Για την εκτίμηση της στατιστικής σημαντικότητας των αποτελεσμάτων εκτελέστηκε t-test, μια στατιστική μέθοδος με την οποία μπορούμε να συμπεράνουμε αν τα αποτελέσματα της αξιολόγησης ενός δείγματος είναι στατιστικά σημαντικά και έτσι αν είναι ενδεικτικά για το σύνολο του πληθυσμού. Το t-test δίνει σαν αποτέλεσμα μια τιμή p-value. Αν το p-value είναι μικρότερο του 0,05 τότε θεωρούμε το εύρημα στατιστικά σημαντικό. Τα στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα σημειώνονται με αστερίσκο στα διαγράμματα.

Στην εικόνα που ακολουθεί παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της ανοσοϊστοχημείας για την ki-67 για τα ακτινοβολημένα δείγματα με BB. Παρουσιάζεται ιστός λεπτού εντέρου ποντικού που ακτινοβολήθηκε με BB 40 Gy και απομονώθηκε 24 ώρες μετά την ακτινοβολήση, εικόνα 5-2-1.a, ιστός λεπτού εντέρου ποντικού που ακτινοβολήθηκε με BB 40 Gy και απομονώθηκε 96 ώρες μετά την ακτινοβολήση, εικόνα 5-2-1.b, και ιστός λεπτού εντέρου μη ακτινοβολημένου ποντικού, εικόνα 5-2-1.c.

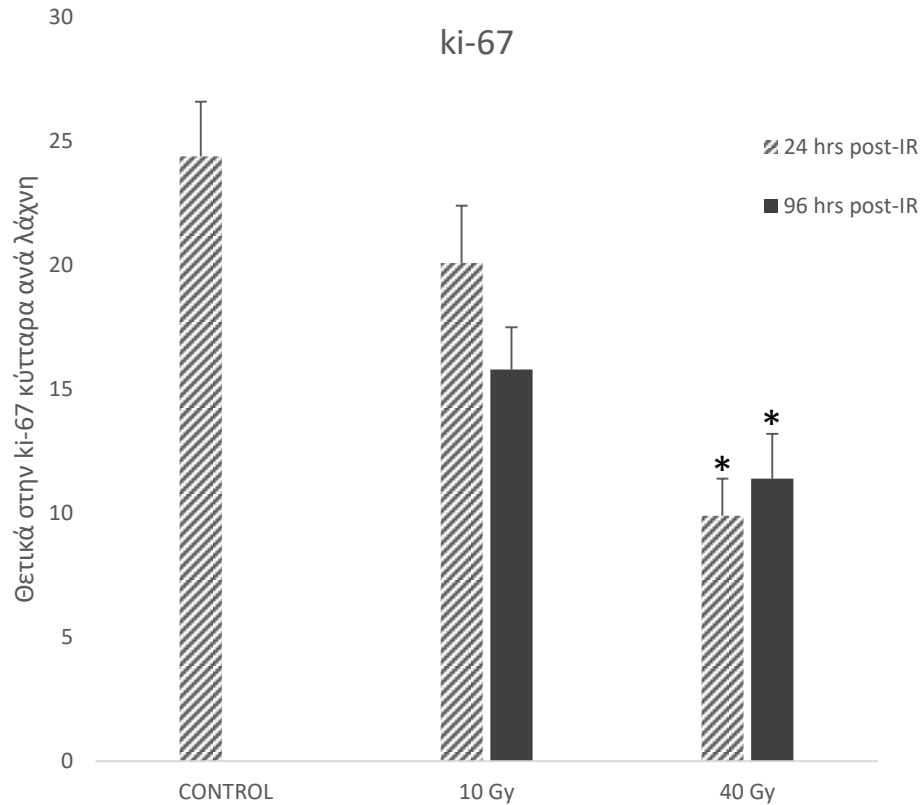


Εικόνα 5-2-1. **Αντιπροσωπευτική εικόνα ανοσοϊστοχημείας σε παγωμένο ιστό, ki-67.** Παρατηρείται μειωμένη παρουσία ki-67 στα BB 10Gy και πολύ περισσότερο στα BB 40Gy σε σύγκριση με τα control. *a)* Ιστός εντέρου μη ακτινοβολημένου ποντικού (control). *b)* Ιστός εντέρου ποντικού ακτινοβολημένου με BB 10Gy. *c)* Ιστός εντέρου ποντικού ακτινοβολημένου με BB 40Gy. Αριστερά μεγέθυνση 200x, δεξιά μεγέθυνση 630x. Τα βέλη υποδεικνύουν θετικούς στην ki-67 κυτταρικούς πυρήνες.

Αναμένουμε έντονη παρουσία της ki-67 χαμηλά στις εντερικές λάχνες καθώς εκεί πολλαπλασιάζονται ταχέως τα επιθηλιακά κύτταρα, τα οποία στη συνέχεια ωριμάζοντας ανεβαίνουν κατά μήκος των λαχνών όπου και αποπίπτουν. Παρατηρούμε στην εικόνα 5.2-1.a ότι στο λεπτό έντερο του μη ακτινοβολημένου ποντικού έχουμε έντονο κυτταρικό πολλαπλασιασμό όπως αναμέναμε. Αντίθετα, στο λεπτό έντερο των ακτινοβολημένων ποντικών με BB 40 Gy, τόσο 24 όσο και 96 ώρες μετά την ακτινοβολήση παρουσιάζεται μειωμένος κυτταρικός πολλαπλασιασμός όπως φαίνεται στην εικόνα 5.2-1.c. Μείωση παρατηρήθηκε και στην περίπτωση της BB 10 Gy, εικόνα 5.2-1.b. Τα αποτελέσματα της καταμέτρησης παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα και στο διάγραμμα που ακολουθεί. Ο αστερίσκος υποδηλώνει στατιστική σημαντικότητα.

Πίνακας 5.2-1 Αποτελέσματα καταμέτρησης των θετικών στην ki-67 εντερικών κυττάρων

Θετικά επιθηλιακά εντερικά κύτταρα στην ki-67 ανά λάχνη					
	CONTROL	BB 10 Gy 24 hrs	BB 10 Gy 96 hrs	BB 40 Gy 24 hrs	BB 40 Gy 96 hrs
Αριθμός θετικών κυττάρων ανά λάχνη	24,4	20,1	15,8	9,9	11,4
Τυπική απόκλιση	2,2	2,3	1,7	1,5	1,8
p-value	-	0,418	0,088	0,024	0,024



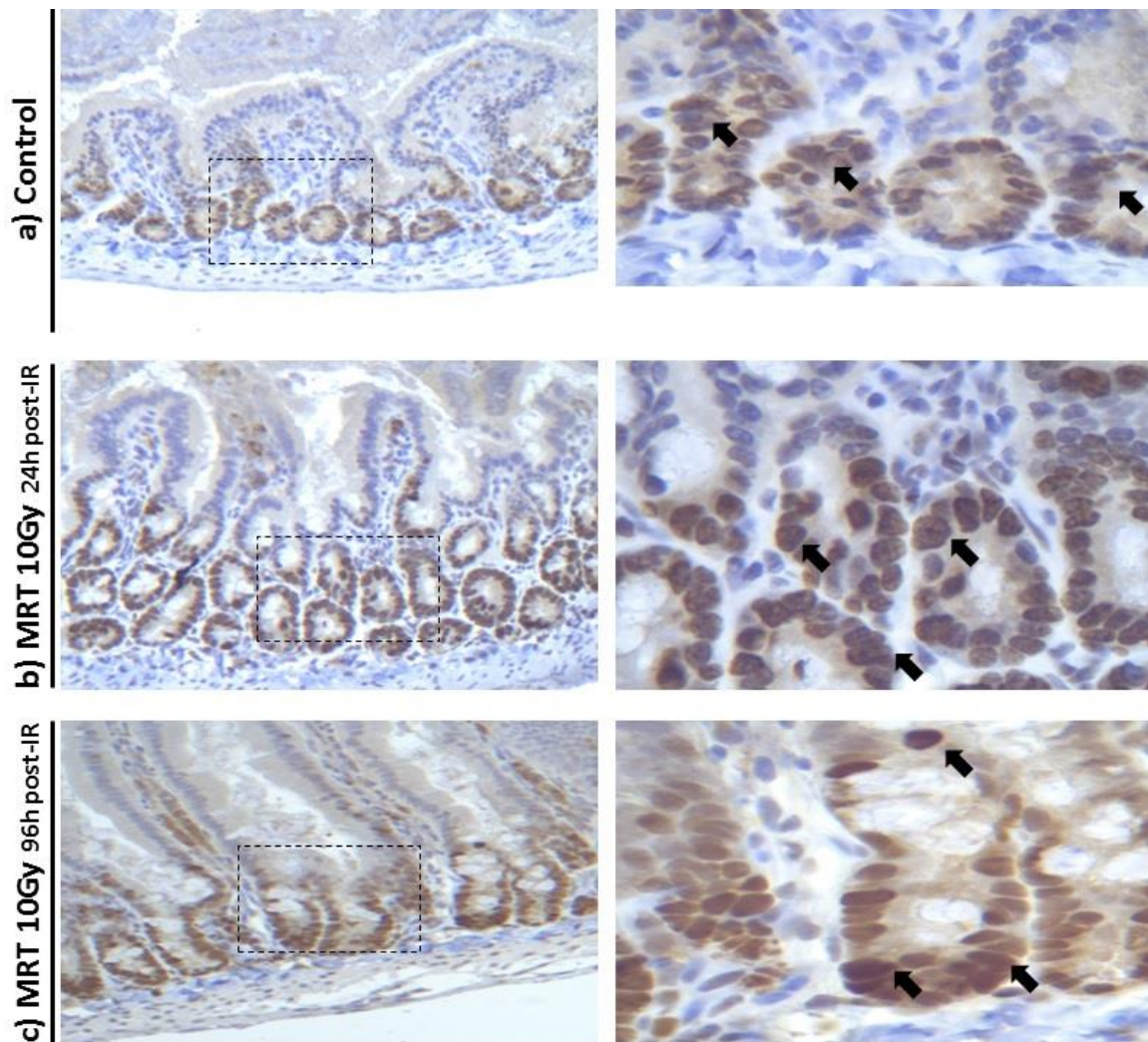
Διάγραμμα 5.2-1 Θετικά στην ki-67 εντερικά κύτταρα δειγμάτων ακτινοβολημένων με διαφορετικές δόσεις BB ακτινοβολίας και για διαφορετικούς χρόνους μετά την ακτινοβολήση. Σύγκριση των ακτινοβολημένων στο πόδι ποντικών με τα μη ακτινοβολημένα controls. Ο αστερίσκος υποδηλώνει στατιστική σημαντικότητα. Οι μπάρες σφαλμάτων είναι +/-.

Παρατηρούμε μειωμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό στα εντερικά κύτταρα των ποντικών που ακτινοβολήθηκαν στο πόδι με BB σε σύγκριση με τα μη ακτινοβολημένα. Συγκεκριμένα, στα 40 Gy έχουμε 2,5 και 2,1 φορές λιγότερα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα στις 24 και 96 ώρες αντίστοιχα σε σύγκριση με τα μη ακτινοβολημένα. Το αποτέλεσμα είναι στατιστικά σημαντικό καθώς έχουμε p-value 0,024.

Στα 10 Gy έχουμε μια σαφή ένδειξη μείωσης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού αλλά δεν προκύπτουν στατιστικά σημαντικές διαφορές αφού το p-value κυμαίνεται από 0,088 έως 0,418. Τέλος, ούτε στην περίπτωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού υπάρχει σαφής ένδειξη που να μαρτυρά διαφορές μεταξύ των 24 και των 96 ωρών μετά την ακτινοβολήση.

Στη συνέχεια εξετάστηκαν ως προς τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό οι ιστοί των ποντικών που ακτινοβολήθηκαν με MRT 10 Gy. Εφαρμόστηκε ανοσοϊστοχημεία με ki-67 κατά την οποία έγινε συγκρίθηκαν τα ακτινοβολημένα με MRT δείγματα με τα μη ακτινοβολημένα (controls) που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες κυτταρικού

πολλαπλασιασμού καθώς και με δείγματα που ακτινοβολήθηκαν με BB 40 Gy που χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες. Στην περίπτωση αυτή, για την καλύτερη διατήρηση της μορφολογίας οι παγωμένοι ιστοί εγκλείστηκαν σε μπλοκ παραφίνης, ενέργεια που επέτρεψε τη λήψη καλύτερων τομών πάχους 4μm, στις οποίες εφαρμόστηκε η ανοσοϊστοχημεία. Στην εικόνα που ακολουθεί παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της ανοσοϊστοχημείας .



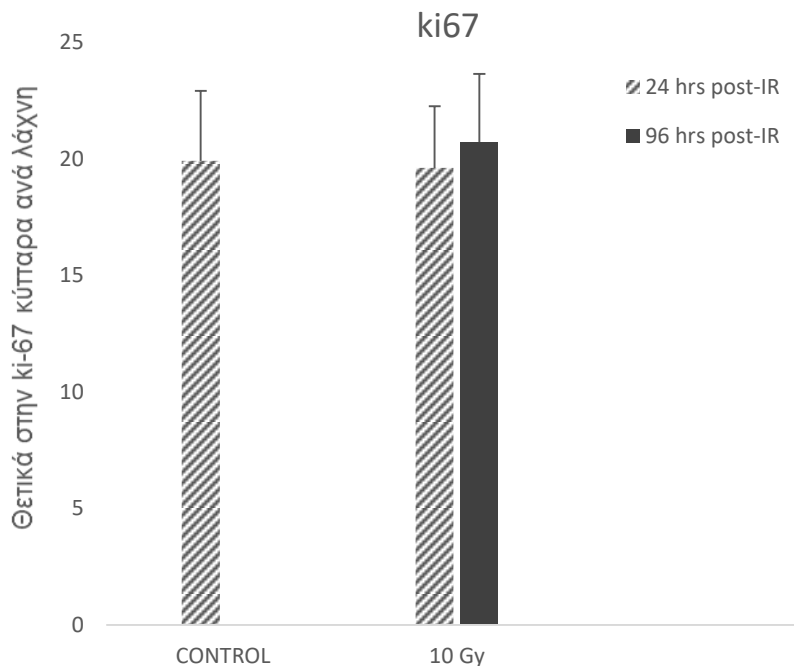
Εικόνα 5-2-2. **Αντιπροσωπευτική εικόνα ανοσοϊστοχημείας ιστό, ki-67.** Δεν παρατηρείται ουσιαστική διαφορά στην παρουσία της ki-67 στα κύτταρα του εντερικού ιστού μεταξύ των ποντικών που δεν ακτινοβολήθηκαν και αυτών που ακτινοβολήθηκαν με MRT 10 Gy και MTR 40 Gy. *a)* Ιστός εντέρου μη ακτινοβολημένου ποντικού (control). *b)* Ιστός εντέρου ποντικού ακτινοβολημένου με BB 10Gy. *c)* Ιστός εντέρου ποντικού ακτινοβολημένου με BB 40Gy.

Αριστερά μεγέθυνση 200x, δεξιά μεγέθυνση 630x. Τα βέλη υποδεικνύουν θετικούς στην ki-67 κυτταρικούς πυρήνες.

Σε αντίθεση με την περίπτωση της BB ακτινοβολίας, στα ακτινοβολημένα με MRT δείγματα δεν παρατηρείται κάποια ουσιαστική διαφοροποίηση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στους ιστούς του λεπτού εντέρου σε σύγκριση με τα μη ακτινοβολημένα δείγματα. Τα αποτελέσματα της καταμέτρησης των θετικών στην παρουσία της ki-67 επιθηλιακών εντερικών κυττάρων φαίνεται στον πίνακα και στο διάγραμμα που ακολουθούν.

Πίνακας 5.2-2. Αποτελέσματα καταμέτρησης των θετικών στην ki-67 εντερικών κυττάρων

Θετικά επιθηλιακά εντερικά κύτταρα στην ki-67 ανά λάχνη			
	CONTROL	MRT 10 Gy 24 hrs	MRT 10 Gy 96 hrs
Αριθμός θετικών κυττάρων ανά λάχνη	20	19,6	20,7
Τυπική απόκλιση	3	2,6	2,9
p-value	-	0,876	0,716



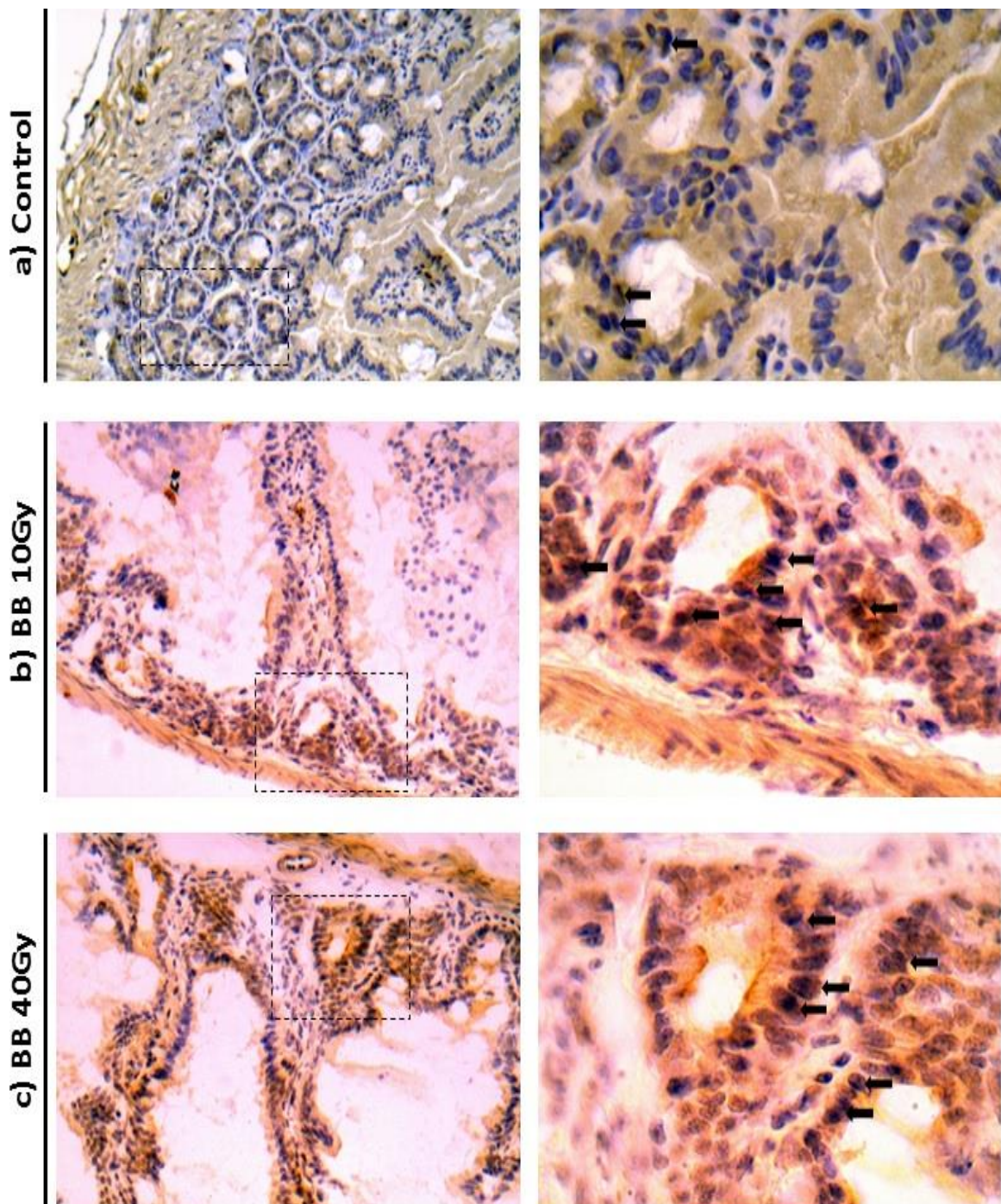
Διάγραμμα 5.2-2 Θετικά στην ki-67 εντερικά κύτταρα δειγμάτων ακτινοβολημένων με MRT 10 Gy για διαφορετικούς χρόνους μετά την ακτινοβολήση. Σύγκριση των ακτινοβολημένων στο πόδι ποντικών με τα μη ακτινοβολημένα controls. Ο αστερίσκος υποδηλώνει στατιστική σημαντικότητα. Οι μπάρες σφαλμάτων είναι +/-.

Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν την εκτίμηση μη ύπαρξης διαφορών στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Οι διαφορές που φαίνονται στο διάγραμμα είναι εντός των ορίων των σφαλμάτων και μη στατιστικά σημαντικές ($p\text{-value} > 0,5$).

5.3 Φλεγμονώδης αντίδραση

Για τον έλεγχο ύπαρξης φλεγμονώδους αντίδρασης εξετάστηκε η παρουσία πυρηνικής p65. Καταμετρήθηκε ο αριθμός των θετικών σε πυρηνικό σήμα επιθηλιακών εντερικών κυττάρων, ανά οπτικό πεδίο υψηλής ευκρίνειας (400X), στους ιστούς των ακτινοβολημένων δειγμάτων και έγινε σύγκριση με τα αντίστοιχα μη ακτινοβολημένα (control). Για την ακτινοβολία BB καταμετρήθηκαν τέσσερα περιστατικά για κάθε δόση, 10 και 40 Gy, και για κάθε διαφορετικό χρόνο απομόνωσης των ιστών μετά την ακτινοβολή, 24 και 96 ώρες, δηλαδή συνολικά 16 περιστατικά και 5 control. Για την ακτινοβολία MRT καταμετρήθηκαν πέντε δείγματα για τα 10 Gy και τις 24 ώρες και τέσσερα δείγματα για τα 10 Gy και τις 96 ώρες, δηλαδή συνολικά 9 περιστατικά.

Στην εικόνα 5-3.1 παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της ανοσοϊστοχημείας για την p65 στα δείγματα που ακτινοβολήθηκαν με BB. Στην εικόνα 5-3.1.a φαίνεται μη ακτινοβολημένο περιστατικό (control), στην 5-3.1.b ακτινοβολημένο περιστατικό με BB 10 Gy ενώ στην 5-3.1.c με BB 40 Gy.

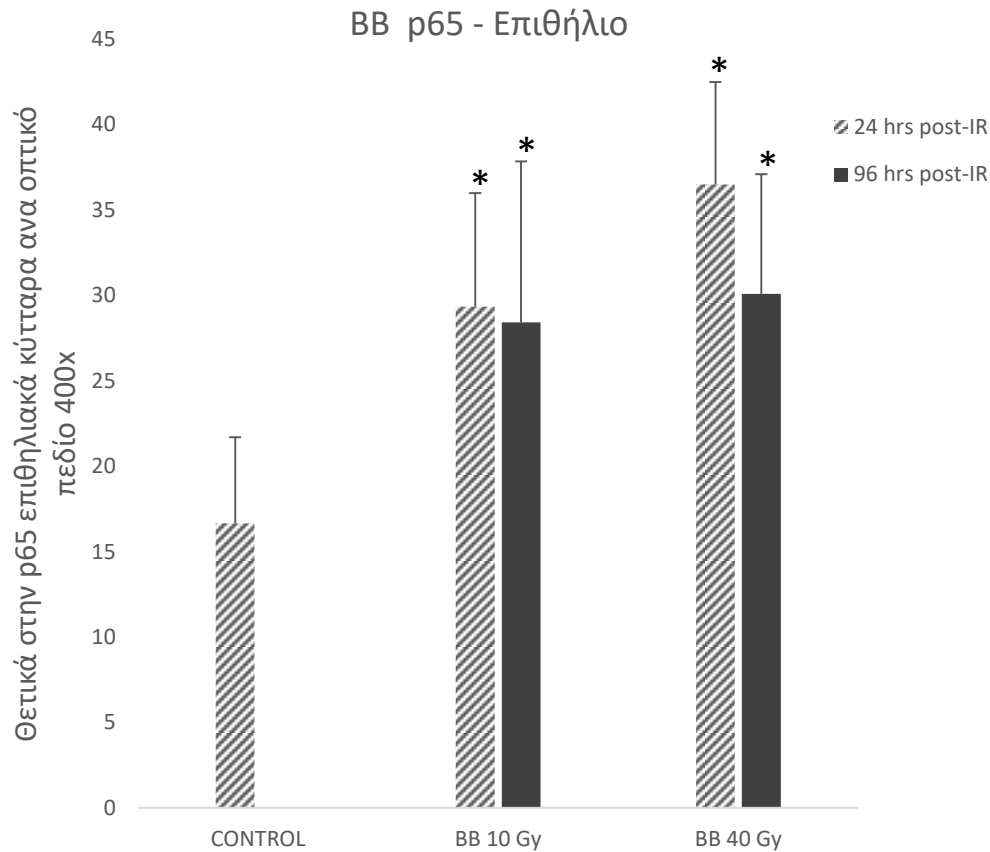


Εικόνα 5-3-1. **Αντιπροσωπευτική εικόνα ανοσοϊστοχημείας σε παγωμένο ιστό, p65.** Παρατηρείται αυξημένη παρουσία p65 τόσο στα ακτινοβολημένα δείγματα με BB 10Gy όσο και σε εκείνα με BB 40Gy σε σύγκριση με τα control. a) Ιστός εντέρου μη ακτινοβολημένου ποντικού (control). b) Ιστός εντέρου ποντικού ακτινοβολημένου με BB 10Gy. c) Ιστός εντέρου ποντικού ακτινοβολημένου με BB 40Gy. Αριστερά μεγέθυνση 200x, δεξιά μεγέθυνση 630x. Τα βέλη υποδεικνύουν θετικούς στην p65 κυτταρικούς πυρήνες.

Από κάθε περιστατικό καταμετρήθηκαν τα θετικά σε πυρηνικό σήμα από 3-4 διαφορετικές περιοχές. Αναλυτικά οι μετρήσεις φαίνονται στους πίνακες του παραρτήματος. Από τις τιμές αυτές υπολογίστηκε η μέση τιμή και το σφάλμα τους, στοιχεία που παρουσιάζονται στον πίνακα και στο διάγραμμα που ακολουθούν. Για την εκτίμηση της στατιστικής σημαντικότητας των αποτελεσμάτων εκτελέστηκε t-test. Τα στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα, αυτά με p-value μικρότερο του 0,05, σημειώνονται με αστερίσκο στα διαγράμματα.

Πίνακας 5.3-1. Αποτελέσματα καταμέτρησης των θετικών στην *ki-67* εντερικών κυττάρων

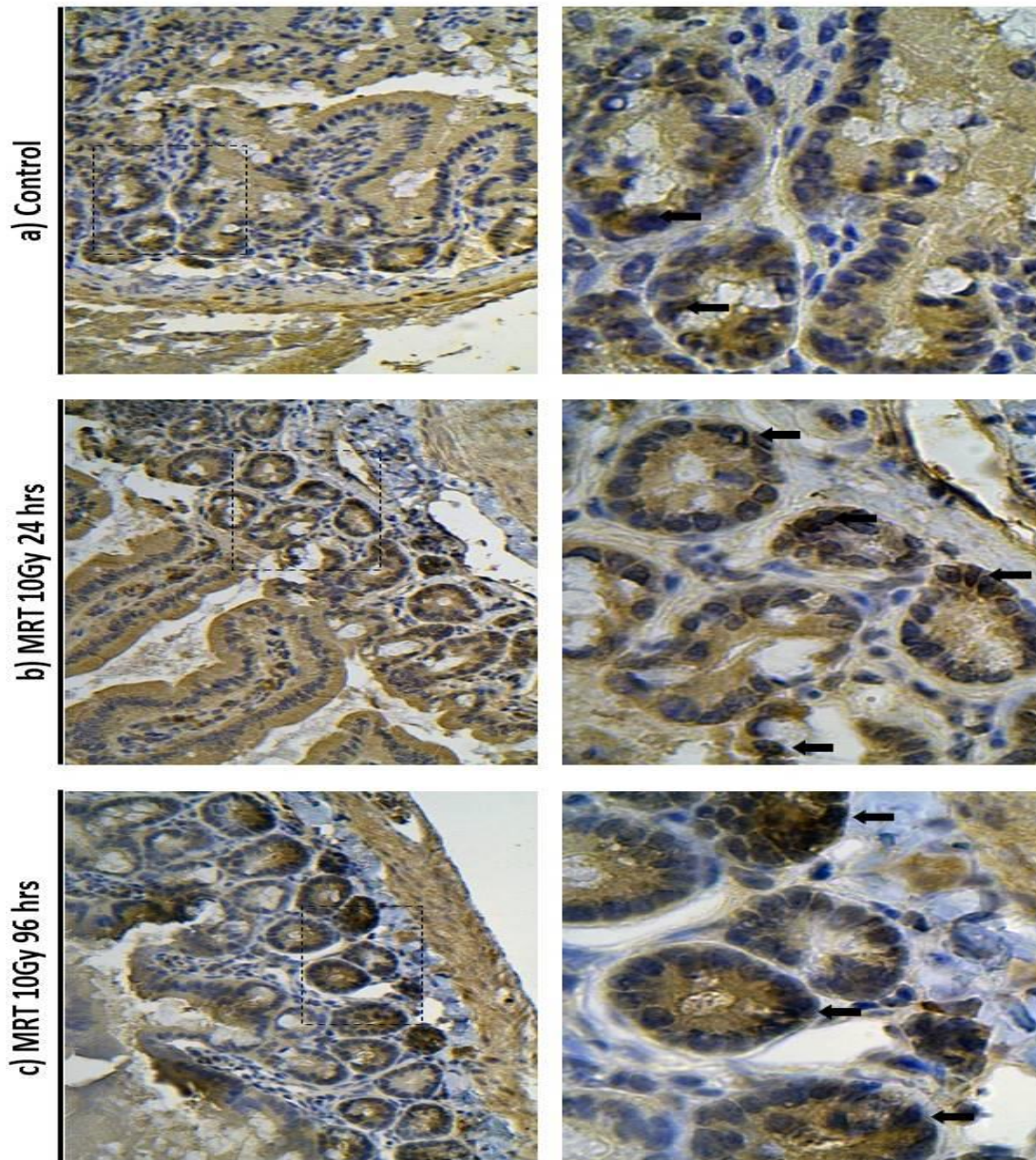
Θετικά επιθηλιακά εντερικά κύτταρα στην p65 ανά οπτικό πεδίο 400x					
	CONTROL	BB 10 Gy 24 hrs	BB 10 Gy 96 hrs	BB 40 Gy 24 hrs	BB 40 Gy 96 hrs
Αριθμός θετικών κυττάρων ανά οπτικό πεδίο 400x	16,7	29,3	28,4	36,5	30,1
Τυπική απόκλιση	5,0	6,7	9,4	0,7	0,4
p-value	-	0,002	0,001	0,001	0,009



Διάγραμμα 5.3-1 Θετικά στην p65 επιθηλιακά εντερικά κύτταρα δειγμάτων ακτινοβολημένων με BB 10 Gy και BB 40 Gy για διαφορετικούς χρόνους μετά την ακτινοβολήση. Σύγκριση των ακτινοβολημένων στο πόδι ποντικών με τα μη ακτινοβολημένα controls. Ο αστερίσκος υποδηλώνει στατιστική σημαντικότητα. Οι μπάρες σφαλμάτων είναι +/-.

Από την παραπάνω ανάλυση προκύπτουν αυξημένα ποσοστά πυρηνικής p65 τόσο στα δείγματα που ακτινοβολήθηκαν με BB 10 Gy όσο και σε εκείνα που ακτινοβολήθηκαν με BB 40 Gy σε σχέση με τα μη ακτινοβολημένα τόσο για τις 24 όσο και για τις 96 ώρες μετά την ακτινοβολήση. Συγκεκριμένα για την BB στα 10 Gy, 24 ώρες μετά την ακτινοβολήση η p65 είναι αυξημένη 1,76 φορές σε σχέση με τα μη ακτινοβολημένα controls ενώ για τις 96 ώρες 1,71 φορές. Για την BB στα 40 Gy και τις 24 ώρες διαπιστώθηκε αύξηση 2,19 και για τις 96 ώρες 1,81 φορές σε σχέση με τα controls. Η διαφορά μεταξύ των 10 και των 40 Gy όπως και μεταξύ των 24 και των 96 ωρών είναι και σε αυτή την περίπτωση εντός των ορίων των σφαλμάτων και μη στατιστικά σημαντικές.

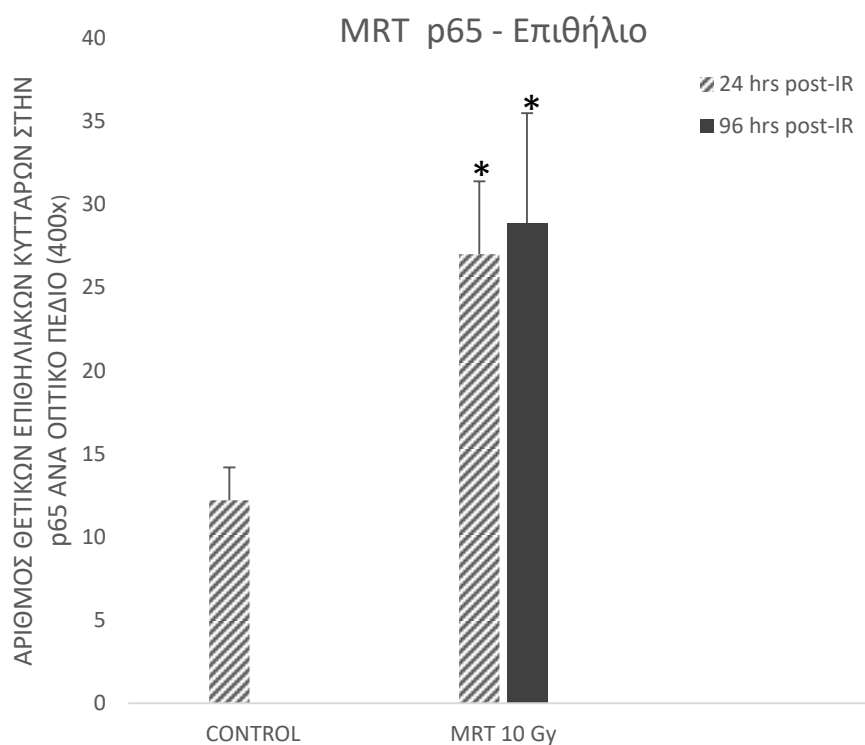
Εξετάστηκαν, επίσης, ως προς την ύπαρξη φλεγμονώδους αντίδρασης και παρουσίας πυρηνικής p65, ιστοί λεπτού εντέρου ποντικών που ακτινοβολήθηκαν στο πόδι με MRT ακτινοβολία και συγκρίθηκαν με τα μη ακτινοβολημένα. Ακολουθούν ενδεικτικές εικόνες ανοσοϊστοχημείας με p56 στα MRT δείγματα.



Εικόνα 5-3-2. **Αντιπροσωπευτική εικόνα ανοσοϊστοχημείας σε παγωμένο ιστό, p65.** Παρατηρείται αυξημένη παρουσία p65 τόσο στα ακτινοβολημένα δείγματα με ακτινοβολία MRT και δόση 10Gy σε σύγκριση με τα control. *α)* Ιστός εντέρου μη ακτινοβολημένου ποντικού (control). *β)* Ιστός εντέρου ποντικού ακτινοβολημένου με 10Gy 24 ώρες μετά την ακτινοβολήση. *γ)* Ιστός εντέρου ποντικού ακτινοβολημένου με 10Gy 96 ώρες μετά την ακτινοβολήση. Αριστερά μεγέθυνση 200x, δεξιά μεγέθυνση 630x. Τα βέλη υποδεικνύουν θετικούς στην p65 κυτταρικούς πυρήνες.

Πίνακας 5.3-2. Αποτελέσματα καταμέτρησης των θετικών στην p65 επιθηλιακών εντερικών κυττάρων

Θετικά επιθηλιακά εντερικά κύτταρα στην p65 ανά οπτικό πεδίο 400x			
	CONTROL	MRT 10 Gy 24 hrs	MRT 10 Gy 96 hrs
Αριθμός θετικών κυττάρων ανά οπτικό πεδίο 400x	12,2	27	28,9
Τυπική απόκλιση	1,9	4,4	6,6
p-value	-	0,001	0,003



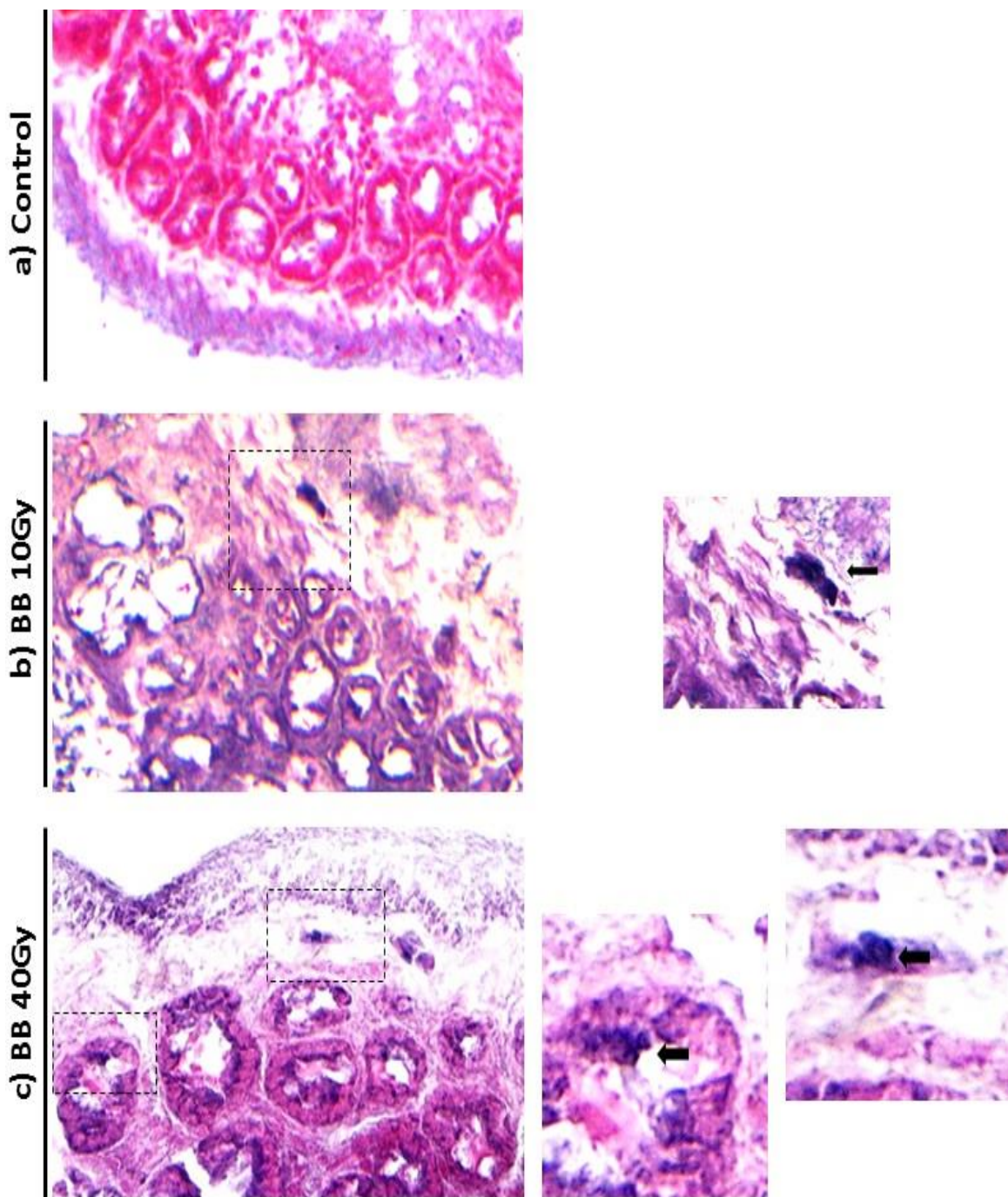
Διάγραμμα 5.3-2 **Θετικά στην p65 επιθηλιακά εντερικά κύτταρα δειγμάτων ακτινοβολημένων με MRT και δόση 10 Gy για διαφορετικούς χρόνους μετά την ακτινοβολήση.** Σύγκριση των ακτινοβολημένων στο πόδι ποντικών με τα μη ακτινοβολημένα controls. Ο αστερίσκος υποδηλώνει στατιστική σημαντικότητα. Οι μπάρες σφαλμάτων είναι +/-.

Και στην περίπτωση της MRT ακτινοβολίας παρατηρούμε αντίστοιχη αύξηση του σήματος της πυρηνικής $p65$ σε σχέση με τα μη ακτινοβολημένα controls. Για τη δόση των 10 Gy και τις 24 ώρες τα επίπεδα της $p65$ είναι 2,2 φορές αυξημένα ενώ για τις 96 ώρες 2,4 σε σχέση με τα μη ακτινοβολημένα. Τα αποτελέσματα είναι στατιστικά σημαντικά καθώς το p -value είναι 0,001 και 0,003 αντίστοιχα. Οι διαφορές μεταξύ των 24 και των 96 ωρών δεν είναι σημαντικές.

5.4 Πρόωρη γήρανση

Για καλύτερη διατήρηση της μορφολογίας, οι ιστοί εγκλείστηκαν σε μπλοκ παραφίνης τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τη λήψη τομών πάχους 4 μ m. Για την αξιολόγηση της πρόωρης γήρανσης των κυττάρων του ιστού του λεπτού εντέρου των ποντικών που ακτινοβολήθηκαν, καταμετρήθηκαν ξεχωριστά τα θετικά στην ύπαρξη λιποφουσκίνης επιθηλιακά και στρωματικά εντερικά κύτταρα και έγινε σύγκρισή τους με τα αντίστοιχα κύτταρα των ποντικών που δεν ακτινοβολήθηκαν (control). Η καταμέτρηση έγινε ανά οπτικό πεδίο σε μεγέθυνση 400x με οπτικό μικροσκόπιο. Καταμετρήθηκαν τέσσερα περιστατικά για κάθε δόση, 10 Gy και 40 Gy, BB ακτινοβολίας και από κάθε διαφορετικό χρόνο απομόνωσης των ιστών μετά την ακτινοβολή, 24 και 96 ώρες, δηλαδή συνολικά 16 περιστατικά και 4 control. Από κάθε περιστατικό καταμετρήθηκαν 3 διαφορετικές περιοχές. Αναλυτικά οι μετρήσεις φαίνονται στους πίνακες του παραρτήματος και από τις τιμές αυτές υπολογίστηκε η μέση τιμή και το σφάλμα τους. Για την εκτίμηση της στατιστικής σημαντικότητας των αποτελεσμάτων εκτελέστηκε t-test.

Ακολουθεί αντιπροσωπευτική εικόνα όπου παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της χρήσης του compound για τον εντοπισμό συσσωματωμάτων λιποφουσκίνης. Στην εικόνα 5.1-1.a παρουσιάζεται ιστός λεπτού εντέρου μη ακτινοβολημένου (control) ποντικού, στην εικόνα 5.1-1.b ιστός λεπτού εντέρου ποντικού που ακτινοβολήθηκε με BB 10 Gy ενώ στην εικόνα 5.1-1.c ιστός λεπτού εντέρου ποντικού που ακτινοβολήθηκε με BB 40 Gy.



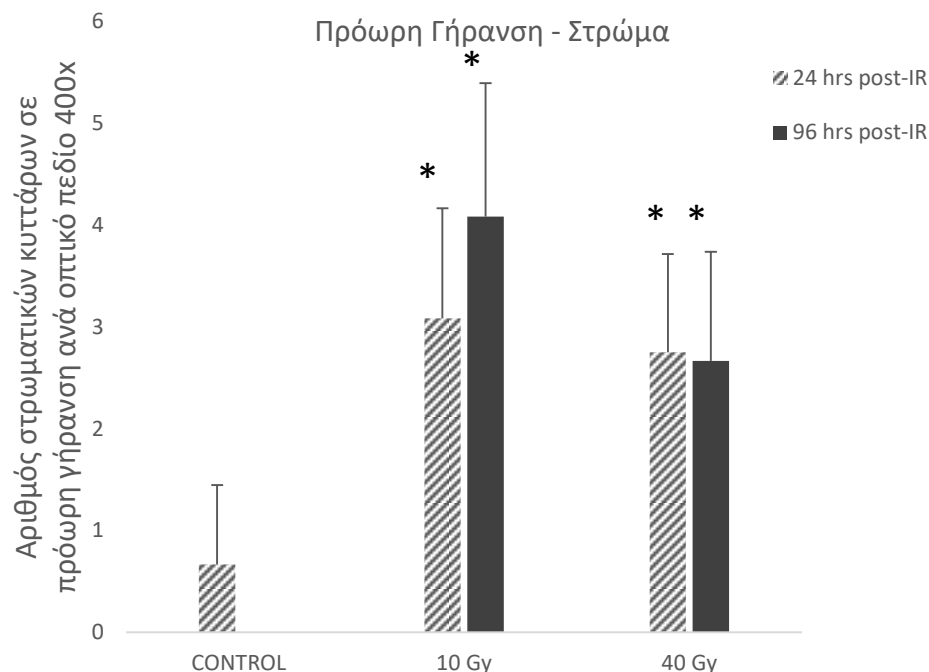
Εικόνα 5-4-1. Αντιπροσωπευτική εικόνα εφαρμογής compound για τον εντοπισμό κυττάρων σε πρόωρη γήρανση. Παρατηρείται αυξημένη παρουσία compound τόσο στα ακτινοβολημένα δείγματα με BB 10Gy όσο και σε εκείνα με BB 40Gy σε σύγκριση με τα control. Η αύξηση αυτή παρατηρείται και σε κύτταρα του επιθηλίου και του στρώματος α) Ιστός εντέρου μη ακτινοβολημένου ποντικού (control). b) Ιστός εντέρου ποντικού ακτινοβολημένου με BB 10Gy. c) Ιστός εντέρου ποντικού ακτινοβολημένου με BB 40Gy. Αριστερά μεγέθυνση 200x, δεξιά μεγέθυνση 630x. Τα βέλη υποδεικνύουν θετικά σε compound κύτταρα.

5.4.1 Στρωματικά κύτταρα – Πρόωρη Γήρανση

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της καταμέτρησης των θετικών στην ύπαρξη λιποφουσκίνης στρωματικών εντερικών κυττάρων τόσο των ακτινοβολημένων όσο και των μη ακτινοβολημένων ποντικών. Στο διάγραμμα φαίνονται σχηματικά τα αποτελέσματα. Ο αστερίσκος υποδηλώνει στατιστική σημαντικότητα.

Πίνακας 5.4.1-1 Αποτελέσματα καταμέτρησης των θετικών σε λιποφουσκίνη στρωματικών κυττάρων

Θετικά στρωματικά εντερικά κύτταρα σε λιποφουσκίνη ανά οπτικό πεδίο 400x					
	CONTROL	BB 10 Gy 24 hrs	BB 10 Gy 96 hrs	BB 40 Gy 24 hrs	BB 40 Gy 96 hrs
Αριθμός θετικών κυττάρων ανά οπτικό πεδίο 400x	0,7	3,1	4,1	2,75	2,7
Τυπική απόκλιση	0,8	1,1	1,3	1,0	1,1
p-value	-	0,01	0,004	0,001	0,02



Διάγραμμα 5.4.1-1 Θετικά σε λιποφουσκίνη στρωματικά εντερικά κύτταρα δειγμάτων ακτινοβολημένων με BB 10 Gy και BB 40 Gy για διαφορετικούς χρόνους μετά την ακτινοβολήση. Σύγκριση των ακτινοβολημένων στο πόδι ποντικών με τα μη ακτινοβολημένα controls. Ο αστερίσκος υποδηλώνει στατιστική σημαντικότητα. Οι μπάρες σφαλμάτων είναι +/-.

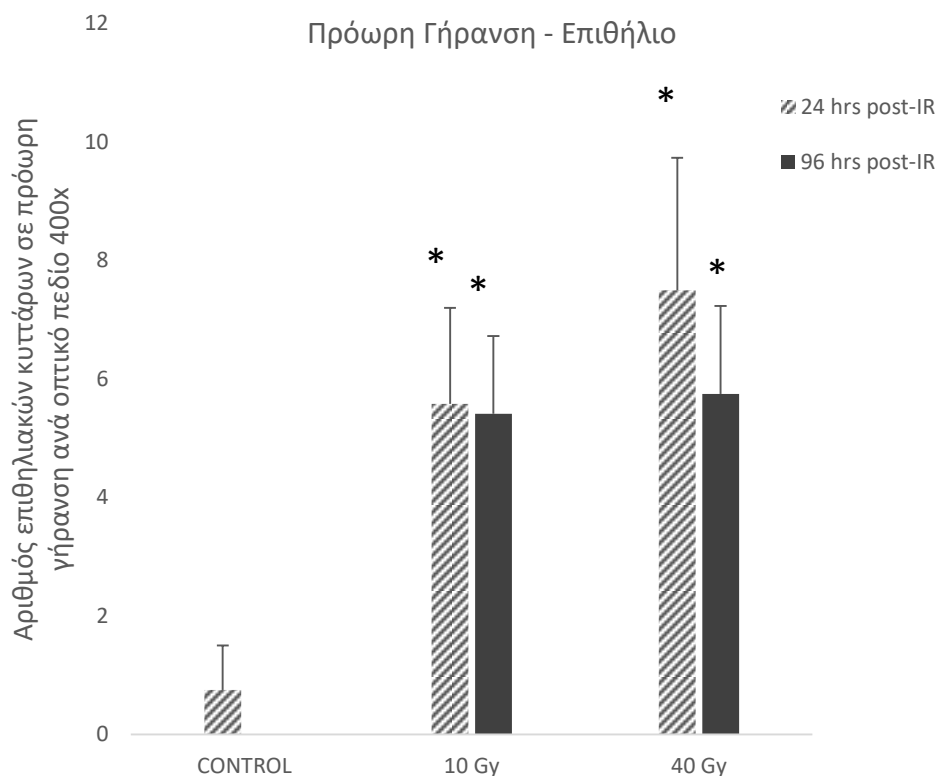
Από την παραπάνω ανάλυση προκύπτουν αυξημένα ποσοστά πρόωρης κυτταρικής γήρανσης στα κύτταρα του εντερικού ιστού των δειγμάτων που ακτινοβολήθηκαν με BB 40 και 10 Gy, τόσο για τις 24 όσο και για τις 96 ώρες μετά την ακτινοβολήση σε σχέση με τα μη ακτινοβολημένα. Συγκεκριμένα, για τα 10 Gy και τις 24 ώρες έχουμε 4,6 ενώ για τις 96 ώρες 6,1 φορές περισσότερα στρωματικά κύτταρα σε πρόωρη γήρανση σε σχέση με τα controls. Για τα 40 Gy οι αντίστοιχες τιμές είναι 4,1 και 4. Τα αποτελέσματα είναι στατιστικά σημαντικά. Δεν προκύπτουν ουσιαστικές διαφοροποιήσεις ούτε μεταξύ των 10 και 40 Gy ούτε μεταξύ των 24 και 96 ωρών μετά την ακτινοβολήση καθώς οι διαφορές είναι εντός των ορίων των σφαλμάτων και μη στατιστικά σημαντικές.

5.4.2 Επιθηλιακά κύτταρα – Πρόωρη Γήρανση

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της καταμέτρησης των θετικών στην ύπαρξη λιποφουσκίνης επιθηλιακών εντερικών κυττάρων τόσο των ακτινοβολημένων με BB όσο και των μη ακτινοβολημένων ποντικών. Στο διάγραμμα φαίνονται σχηματικά τα αποτελέσματα. Ο αστερίσκος υποδηλώνει στατιστική σημαντικότητα.

Πίνακας 5.4.2-2 Αποτελέσματα καταμέτρησης των θετικών σε λιποφουσκίνη επιθηλιακών κυττάρων

Θετικά επιθηλιακά εντερικά κύτταρα σε λιποφουσκίνη ανά οπτικό πεδίο 400x					
	CONTROL	BB 10 Gy 24 hrs	BB 10 Gy 96 hrs	BB 40 Gy 24 hrs	BB 40 Gy 96 hrs
Αριθμός θετικών κυττάρων ανά οπτικό πεδίο 400x	0,8	5,6	5,4	7,5	5,8
Τυπική απόκλιση	0,8	1,6	1,3	2,2	1,5
p-value	-	0,002	0,001	0,001	0,009



Διάγραμμα 5.4.2-1 Θετικά σε λιποφουσκίνη επιθηλιακά εντερικά κύτταρα δειγμάτων ακτινοβολημένων με BB 10 Gy και BB 40 Gy για διαφορετικούς χρόνους μετά την ακτινοβολήση. Σύγκριση των ακτινοβολημένων στο πόδι ποντικών με τα μη ακτινοβολημένα controls. Ο αστερίσκος υποδηλώνει στατιστική σημαντικότητα. Οι μπάρες σφαλμάτων είναι +/-.

Από την παραπάνω ανάλυση προκύπτουν αυξημένα ποσοστά πρόωρης κυτταρικής γήρανσης στα κύτταρα του επιθηλίου του εντερικού ιστού των δειγμάτων που ακτινοβολήθηκαν με BB 40 και 10 Gy, τόσο για τις 24 όσο και για τις 96 ώρες μετά την ακτινοβολήση σε σχέση με τα μη ακτινοβολημένα. Για τα 10 Gy και τις 24 ώρες έχουμε 7,4 ενώ για τις 96 ώρες 7,2 φορές περισσότερα στρωματικά κύτταρα σε πρόωρη γήρανση σε σχέση με τα controls. Για τα 40 Gy οι αντίστοιχες τιμές είναι 10 και 7,7. Τα αποτελέσματα είναι στατιστικά σημαντικά. Δεν προκύπτουν ουσιαστικές διαφοροποιήσεις ούτε μεταξύ των 10 και 40 Gy ούτε μεταξύ των 24 και 96 ωρών μετά την ακτινοβολήση καθώς οι διαφορές είναι εντός των ορίων των σφαλμάτων και μη στατιστικά σημαντικές.

6 Συμπεράσματα - Σχολιασμός

Εκτελώντας τεχνικές ανοσοϊστοχημείας σε παγωμένο ιστό και σε ιστό κλεισμένου σε παραφίνη, και συγκεκριμένα λεπτού εντέρου (δωδεκαδάκτυλου), μη ακτινοβολημένων ποντικών και ποντικών που ακτινοβολήθηκαν με ακτίνες-Χ χαμηλής ενέργειας, με ακτινοβολία ευρείας δέσμης (BB) και ακτινοβολία με μικροδέσμες (MRT) και δέχτηκαν δόσεις 10 Gy και 40 Gy στο πίσω δεξί τους πόδι, βρήκαμε σημαντικά αυξημένα επίπεδα βλαβών DNA και οξειδωτικού στρες στο έντερο των ακτινοβολημένων ποντικών. Πρόκειται για συνέπεια της ακτινοβολίας σε απομακρυσμένο ιστό καθώς η ακτινοβολήση έγινε με τρόπο τέτοιο που το έντερο των ποντικών που ακτινοβολήθηκε δεν δέχτηκε δόση ενώ απέχει 35mm από το σημείο ακτινοβολήσης.

Συγκεκριμένα, ανιχνεύτηκαν αυξημένα επίπεδα 8-oxo-G στο έντερο των ακτινοβολημένων δειγμάτων. Στα στρωματικά εντερικά κύτταρα των ποντικών που ακτινοβολήθηκαν με BB 40 Gy η 8-oxo-G ήταν 3 και 3,1 φορές αυξημένη, 24 και 96 ώρες μετά την ακτινοβολήση αντίστοιχα, σε σύγκριση με τα μη ακτινοβολημένα δείγματα. Στην ακτινοβολήση με BB 10 Gy παρατηρήσαμε 3,7 και 3,8 φορές αυξημένη 8-oxo-G σε αντιστοιχία. Δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά μεταξύ των 24 και των 96 ωρών

Στα επιθηλιακά εντερικά κύτταρα των ποντικών που ακτινοβολήθηκαν με BB 40 Gy η 8-oxo-G ήταν 7 και 5,8 φορές αυξημένη, 24 και 96 ώρες μετά την ακτινοβολήση αντίστοιχα, σε σύγκριση με τα μη ακτινοβολημένα δείγματα. Στην ακτινοβολήση με BB 10 Gy παρατηρήσαμε 6,4 και 4,8 φορές αυξημένη 8-oxo-G αντίστοιχα. Η μείωση της 8-oxo-G στις 96 ώρες σε σχέση με τις 24 ώρες δεν είναι μεν στατιστικά σημαντική αλλά μπορεί να έχει ενδιαφέρον καθώς δείχνει ότι ο χρόνος που παρέρχεται της ακτινοβολήσης ίσως έχει κάποια επιρροή. Συγκρίνοντας τα στρωματικά με τα επιθηλιακά κύτταρα βλέπουμε ότι τα δεύτερα επηρεάζονται περισσότερο καθώς εμφανίζουν σαφώς μεγαλύτερη αύξηση της 8-oxo-G.

Στην περίπτωση της ακτινοβολήσης με μικροδέσμες (MRT) παρατηρούμε ανάλογη αύξηση των βλαβών του DNA. Σε δόση 10 Gy, τα στρωματικά εντερικά κύτταρα παρουσιάζουν αύξηση της 8-oxo-G 4 και 3,8 φορές, για τις 24 και τις 96 ώρες μετά την ακτινοβολήση αντίστοιχα, σε σχέση με τα μη ακτινοβολημένα controls. Αύξηση των επιπέδων της 8-oxo-G παρατηρήθηκε και στα επιθηλιακά κύτταρα. Για τις 24 ώρες μετά την ακτινοβολήση η αύξηση ήταν 5,1 φορές ενώ για τις 96 ώρες 4 φορές σε σχέση με τα μη ακτινοβολημένα περιστατικά. Και σε αυτή την περίπτωση παρατηρούμε μια μείωση των βλαβών στο DNA στις 96 σε σχέση με τις 24 ώρες μετά την ακτινοβολήση, αν και ούτε εδώ αυτή η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική.

Όσον αφορά στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, παρατηρείται μειωμένος στα ακτινοβολημένα με BB ακτινοβολία δείγματα καθώς η ki-67 παρουσιάζει μείωση στα δείγματα αυτά. Αυτό παραπέμπει σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου λόγω ενεργοποίησης του μηχανισμού απόκρισης σε βλάβες του DNA, (DNA Damage Response-DDR), ώστε τα κύτταρα να επιδιορθώσουν τις βλάβες στο DNA τους και να επανέλθουν σε φυσιολογική λειτουργία ή αλλιώς να οδηγηθούν σε απόπτωση ή πρόωρη γήρανση ώστε να επανέλθει μια φυσιολογική κατάσταση σε συστημικό επίπεδο. Πιο συγκεκριμένα στα εντερικά κύτταρα των ποντικών που ακτινοβολήθηκαν με BB 40 Gy έχουμε μειωμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό 2,5 και 2,1 φορές για τις 24 και τις 96 ώρες αντίστοιχα σε σχέση εκείνα των μη ακτινοβολημένων δειγμάτων. Επίσης υπάρχει σαφής ένδειξη για μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στα 10 Gy BB ακτινοβολίας, αλλά το αποτέλεσμα δεν είναι στατιστικά σημαντικό και για την επιβεβαίωση της ένδειξης αυτής απαιτείται η εξέταση περισσότερων περιστατικών. Επίσης, δεν είναι στατιστικά σημαντική η διαφορά του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μεταξύ των δειγμάτων που ακτινοβολήθηκαν με 10 Gy και 40 Gy. Και στην περίπτωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού παρατηρούμε μια μικρή, αν και όχι ιδιαίτερα σημαντική αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των επιθηλιακών κυττάρων στις 96 σε σχέση με τις 24 ώρες μετά την ακτινοβολήση.

Στην περίπτωση της MRT ακτινοβολήσης και τη δόση των 10 Gy δεν παρατηρείται αντίστοιχη μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Τα αποτελέσματα για την περίπτωση της BB 10 Gy δεν δείχνουν καμία διαφοροποίηση στα ποσοστά της ki-67.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων για την ανίχνευση λιποφουσκίνης, ως μάρτυρα πρόωρης κυτταρικής γήρανσης, υποδεικνύουν ύπαρξη αυξημένης πρόωρης γήρανσης στους ιστούς των ακτινοβολημένων δειγμάτων με BB ακτινοβολία. Στα BB 10 Gy έχουμε 4,6 και 6,1 φορές περισσότερα κύτταρα να παρουσιάζουν πρόωρη γήρανση στις 24 και τις 96 ώρες μετά την ακτινοβολήση αντίστοιχα. Τα αντίστοιχα ποσοστά για τα BB 40 Gy είναι 4,1 και 4. Ούτε σε αυτή την περίπτωση παρατηρούμε διαφορές μεταξύ των 24 και 96 ωρών μετά την ακτινοβολήση με εξαίρεση μια αύξηση με την πάροδο του χρόνου στη δόση των 10 Gy, η οποία επίσης δεν είναι στατιστικά σημαντική.

Δεν κρίθηκε άμεσης προτεραιότητας και δεν διεξήχθησαν αντίστοιχα πειράματα στα ακτινοβολημένα δείγματα με MTR καθώς δεν παρατηρήσαμε μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Παρ' όλα αυτά, μελλοντικά θα διεξαχθούν και σε αυτά τα περιστατικά ώστε να επιβεβαιωθεί η εικόνα που έχουμε.

Η εφαρμογή ανοσοϊστοχημείας με p65 έδειξε αυξημένη φλεγμονική αντίδραση στα επιθηλιακά κύτταρα των ιστών του λεπτού εντέρου των δειγμάτων που ακτινοβολήθηκαν με BB ακτινοβολία στο πόδι. Συγκεκριμένα για την BB και δόση 10 Gy βρήκαμε 1,8 και 1,7 φορές αυξημένα επίπεδα πυρηνικής p65, για τις 24 και τις 96 ώρες αντίστοιχα, σε σχέση με τα μη ακτινοβολημένα δείγματα. Τα αποτελέσματα για την BB στα 40 Gy έδωσαν 2,2 και 1,8 φορές αυξημένη p65 για τις 24 και τις 96 ώρες μετά την

ακτινοβολήση αντίστοιχα, σε σύγκριση με τα controls. Και στην περίπτωση της φλεγμονώδους αντίδρασης διαφαίνεται μια μείωση στις 96 ώρες σε σχέση με τις 24, αλλά ούτε εδώ το εύρημα αυτό είναι στατιστικά σημαντικό.

Η εξέταση των περιστατικών που ακτινοβολήθηκαν με MRT και δόση 10 Gy ως προς την ύπαρξη φλεγμονώδους αντίδρασης έδωσε ανάλογα αποτέλεσμα με τα προηγούμενα. Συγκεκριμένα 24 ώρες μετά την ακτινοβολήση τα επίπεδα της πυρηνικής p65 βρέθηκαν 2,2 φορές αυξημένα ενώ 96 ώρες μετά την ακτινοβολήση 2,4 φορές, σε σχέση με τα μη ακτινοβολημένα.

Αυτό σημαίνει πως ένας από τους παράγοντες που ευθύνονται για το φαινόμενο που παρατηρούμε είναι η φλεγμονώδης αντίδραση. Στοιχεία που απελευθερώνονται κατά την φλεγμονώδη αντίδραση όπως κυτοκίνες ή κύτταρα που ενεργοποιούνται, όπως μακροφάγα, προκαλούν οξειδωτικό στρες. Αν αυτά μεταναστεύσουν μπορούν να αυξήσουν το οξειδωτικό στρες σε απομακρυσμένες περιοχές του σημείου ακτινοβολήσης.

Ο αριθμός των βλαβών DNA, δηλαδή τα επίπεδα της 8-oxo-G, στα ακτινοβολημένα στο πόδι δείγματα είναι σημαντικά αυξημένος σε σχέση με τα μη ακτινοβολημένα. Η αύξηση αυτή αφορά τόσο τα στρωματικά όσο και τα επιθηλιακά κύτταρα, με τα δεύτερα να επηρεάζονται περισσότερο. Επιπλέον, στην περίπτωση των επιθηλιακών κυττάρων υπάρχει μια ένδειξη ότι στις 96 ώρες μετά την ακτινοβολήση παρουσιάζονται λιγότερες βλάβες σε σχέση με τις 24 ώρες. Ο μικρός αριθμός των δειγμάτων καθώς και οι μικρές διαφορές μεταξύ των 96 και των 24 ωρών δεν επιτρέπουν την εξαγωγή σίγουρου συμπεράσματος αν και είναι μια εικόνα που παρουσιάζεται σε όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν και αφορά τόσο στην ακτινοβολήση με BB όσο και στην ακτινοβολήση με MRT. Μια αντίστοιχη εικόνα παρατηρείται και στα επίπεδα φλεγμονώδους αντίδρασης των επιθηλιακών εντερικών κυττάρων των ποντικών που ακτινοβολήθηκαν με BB. Μεγαλύτερο δείγμα θα βοηθούσε στην επαλήθευση ή την απόρριψη της υπόθεσης αυτής. Τα επιθηλιακά κύτταρα είναι ταχέως πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα και ως εκ τούτου πιο επιρρεπή στη ανάπτυξη μεταλλάξεων όταν βρίσκονται σε περιβάλλον με οξειδωτικό στρες και υπάρχουν βλάβες στο DNA τους. Άρα είναι χρήσιμο να κατανοήσουμε πώς συμπεριφέρονται με την πάροδο του χρόνου μετά από μια ακτινοβολήση και ως εκ τούτου η παραπάνω ένδειξη είναι σημαντική. Μπορούμε με σιγουριά, παρ' όλα αυτά να συμπεράνουμε ότι οι 24 ώρες είναι αρκετός χρόνος για την εκδήλωση του φαινομένου στην πλήρη του ένταση. Για την περαιτέρω μελέτη της χρονικής εξέλιξης του φαινομένου απαιτούνται πειράματα με περισσότερα δείγματα καθώς και πειράματα όπου θα αφήσουμε τα ποντίκια να ζήσουν αρκετές μέρες μετά την ακτινοβολήση.

6.1 Μελλοντικές κατευθύνσεις

Στην προσπάθεια συγκεκριμενοποίησης των παραγόντων που οδηγούν στα φαινόμενα που αναφέραμε στους ιστούς εκτός του πεδίου ακτινοβολήσης ήδη βρίσκονται σε εξέλιξη πειράματα με τα οποία θα εξεταστούν τα επίπεδα οξειδωτικού στρες και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε ποντίκια που ακτινοβολήθηκαν με τον ίδιο τρόπο αφού πρώτα υπέστησαν κάποιες τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα, σε κάποια από αυτά με χρήση ειδικών αντισωμάτων έγινε αναστολή της δράσης των φαγοκυττάρων. Σε κάποια άλλα μπλοκαρίστηκαν κυτοκίνες ενώ σε μία άλλη ομάδα χορηγήθηκαν αντιοξειδωτικές ουσίες. Με αυτό τον τρόπο θα εξεταστεί πιο ειδικά η επιρροή του κάθε παράγοντα στο συγκεκριμένο φαινόμενο. Επίσης θα μας δώσει μια εικόνα για το κατά πόσο κάποια από αυτές τις δράσεις μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της έκτασης του φαινομένου.

Σε δεύτερο χρόνο, θα πρέπει να εξεταστούν περισσότερα είδη ιστών όπως επίσης και των άμεσα ακτινοβολημένων ιστών ώστε να γίνει σύγκριση και αν είναι δυνατόν συσχέτιση των συνεπειών της ακτινοβολίας σε απομακρυσμένους ιστούς με τους άμεσα ακτινοβολημένους. Σήμερα, κατά το σχεδιασμό μιας ακτινοθεραπείας, λαμβάνονται υπόψη μόνο οι συνέπειες στους ιστούς γύρω από το σημείο ακτινοβολήσης, οι οποίοι θα δεχθούν άμεσα δόση. Αν υπάρξει τέτοιου είδους συσχέτιση ίσως θα πρέπει να αρχίσουμε να σκεφτόμαστε ότι για το σχεδιασμό της θεραπείας θα πρέπει να εξετάζονται και οι συνέπειες σε απομακρυσμένες θέσεις. Φυσικά κάτι τέτοιο απαιτεί περισσότερα πειράματα με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων ώστε να είναι δυνατή η καλύτερη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων ώστε να έρθουμε σε θέση να μπορούμε να προβλέπουμε τη συνέπεια μιας συγκεκριμένης δόσης σε κάποιο συγκεκριμένο απομακρυσμένο ιστό. Σε αντίθεση με τους άμεσα ακτινοβολημένους ιστούς, για τους οποίους υπάρχουν πολλά δεδομένα και μπορούμε να προβλέψουμε με ακρίβεια τη συμπεριφορά τους, δεν υπάρχουν δεδομένα για τους απομακρυσμένους.

Αν εντοπίσουμε με ακρίβεια τους υπεύθυνους για το φαινόμενο παράγοντες, ίσως να γίνει εφικτό να μπορούμε να τους εντοπίσουμε και να τους απομονώσουμε από το αίμα των ασθενών που υποβάλλονται σε ακτινοθεραπεία, πριν και μετά την πράξη. Σε περίπτωση που βρεθούν αυξημένα ποσοστά μετά την ακτινοβολήση, θα μπορέσουμε, χορηγώντας αντίστοιχη ποσότητα των παραγόντων αυτών είτε σε πειραματόζωα είτε σε κυτταροκαλλιέργειες να κάνουμε μια πολύ καλύτερη εκτίμηση των συνεπειών της ακτινοθεραπείας σε ιστούς του ασθενή που προστατεύονται και δεν δέχονται δόση.

Βιβλιογραφία

1. Agency, I.A.E., *Radiation Biology*. 2010.
2. Μαργαρίτης, Λ., *Ραδιοβιολογία ακτινοβολίες και ζωή*. 1996: Συμμετρία. 184 p.
3. Γαζής, Ε.Ν., *ΙΟΝΤΙΖΟΥΣΕΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΕΣ Εφαρμογές στην Ιατρική και Βιολογία*. 2002, Αθήνα: Παπασωτηρίου. 336 p.
4. Σαρρής, Π.Φ., *Εισαγωγή στην Κυτταρική Βιολογία και Γενετική*. 2004.
5. Wolfe, S.L., *Biology of the cell*. 1972, Belmont, Calif.: Wadsworth Pub. Co. 545 p.
6. Alberts, B., *Essential cell biology*. 3rd ed. 2010, New York: Garland Science.
7. Lodish, H.F., *Molecular cell biology*. 6th ed. 2007, New York: W.H. Freeman. xxxvii, 1150, 76 p.
8. Azzam, E.I., J.P. Jay-Gerin, and D. Pain, *Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury*. *Cancer Lett*, 2012. **327**(1-2): p. 48-60.
9. Cooper, G.M. and R.E. Hausman, *The cell : a molecular approach*. 6th ed. 2013, Sunderland, MA: Sinauer Associates. xxv, 832 p.
10. Scholzen, T. and J. Gerdes, *The Ki-67 protein: from the known and the unknown*. *J Cell Physiol*, 2000. **182**(3): p. 311-22.
11. Treuting, P.M., *Comparative anatomy and histology : a mouse and human atlas*. 2012, Amsterdam: Elsevier/Academic Press. xii, 461 p.
12. Kierszenbaum, A.L., *Histology and cell biology : an introduction to pathology*. 2nd ed. 2007, Philadelphia, PA: Mosby Elsevier. xiv, 671 p.
13. Κυριάκος Ψαρράκος, Ε.Μ.-Α., Άννα Γκοτζαμάνη - Ψαρράκου, Αναστάσιος Σιούντας, *Επίτομη ιατρική φυσική*. 2010, Θεσσαλονίκη: University Studio Press. 300 p.
14. Lilley, J.S., *Nuclear physics : principles and applications*. The Manchester physics series. 2001, Chichester ; New York: J. Wiley. xvi, 393 p., 1 p. of col. plate.
15. Alpen, E.L., *Radiation biophysics*. Prentice Hall biophysics and bioengineering series. 1990, Englewood Cliffs, N.J.: Prentice Hall. xx, 392 p.
16. Tchou, J. and A.P. Grollman, *Repair of DNA containing the oxidatively-damaged base, 8-oxoguanine*. *Mutat Res*, 1993. **299**(3-4): p. 277-87.
17. Nash, H.M., et al., *Cloning of a yeast 8-oxoguanine DNA glycosylase reveals the existence of a base-excision DNA-repair protein superfamily*. *Curr Biol*, 1996. **6**(8): p. 968-80.
18. Boiteux, S. and J.P. Radicella, *Base excision repair of 8-hydroxyguanine protects DNA from endogenous oxidative stress*. *Biochimie*, 1999. **81**(1-2): p. 59-67.
19. Hada, M. and A.G. Georgakilas, *Formation of clustered DNA damage after high-LET irradiation: a review*. *J Radiat Res*, 2008. **49**(3): p. 203-10.
20. Georgakilas, A.G., P. O'Neill, and R.D. Stewart, *Induction and repair of clustered DNA lesions: what do we know so far?* *Radiat Res*, 2013. **180**(1): p. 100-9.
21. Pateras, I.S., et al., *The DNA damage response and immune signaling alliance: Is it good or bad? Nature decides when and where*. *Pharmacol Ther*, 2015. **154**: p. 36-56.

22. Yang, N., M.A. Chaudhry, and S.S. Wallace, *Base excision repair by hNTH1 and hOGG1: a two edged sword in the processing of DNA damage in gamma-irradiated human cells*. DNA Repair (Amst), 2006. **5**(1): p. 43-51.
23. Georgakopoulou, E.A., et al., *Specific lipofuscin staining as a novel biomarker to detect replicative and stress-induced senescence. A method applicable in cryo-preserved and archival tissues*. Aging (Albany NY), 2013. **5**(1): p. 37-50.
24. Majno, G. and I. Joris, *Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death*. Am J Pathol, 1995. **146**(1): p. 3-15.
25. Smilenov, L.B., et al., *A microbeam study of DNA double-strand breaks in bystander primary human fibroblasts*. Radiat Prot Dosimetry, 2006. **122**(1-4): p. 256-9.
26. Hatzi, V.I., et al., *Non-targeted radiation effects in vivo: a critical glance of the future in radiobiology*. Cancer Lett, 2015. **356**(1): p. 34-42.
27. Siva, S., et al., *Abscopal effects of radiation therapy: a clinical review for the radiobiologist*. Cancer Lett, 2015. **356**(1): p. 82-90.
28. Nagasawa, H. and J.B. Little, *Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles*. Cancer Res, 1992. **52**(22): p. 6394-6.
29. Shao, C., et al., *Targeted cytoplasmic irradiation induces bystander responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(37): p. 13495-500.
30. Morgan, W.F. and M.B. Sowa, *Non-targeted effects induced by ionizing radiation: mechanisms and potential impact on radiation induced health effects*. Cancer Lett, 2015. **356**(1): p. 17-21.
31. Mole, R.H., *Whole body irradiation; radiobiology or medicine?* Br J Radiol, 1953. **26**(305): p. 234-41.
32. Papac, R.J., *Spontaneous regression of cancer*. Cancer Treat Rev, 1996. **22**(6): p. 395-423.
33. Brush, J., et al., *Molecular mechanisms of late normal tissue injury*. Semin Radiat Oncol, 2007. **17**(2): p. 121-30.
34. Stone, H.B., et al., *Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms*. Lancet Oncol, 2003. **4**(9): p. 529-36.
35. Nobler, M.P., *The abscopal effect in malignant lymphoma and its relationship to lymphocyte circulation*. Radiology, 1969. **93**(2): p. 410-2.
36. Khan, M.A., R.P. Hill, and J. Van Dyk, *Partial volume rat lung irradiation: an evaluation of early DNA damage*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1998. **40**(2): p. 467-76.
37. Havaki, S., et al., *The role of oxidative DNA damage in radiation induced bystander effect*. Cancer Lett, 2015. **356**(1): p. 43-51.
38. Sprung, C.N., et al., *Immunological markers that predict radiation toxicity*. Cancer Lett, 2015. **368**(2): p. 191-7.
39. Redon, C.E., et al., *Tumors induce complex DNA damage in distant proliferative tissues in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(42): p. 17992-7.
40. Κούτρης, Α.Κ., *Διδακτορική Διατριβή ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ p27kip1 ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ p34cdc2 ΣΕ ΕΝΤΟΠΙΣΜΕΝΟ ΠΟΡΟΓΕΝΕΣ ΔΙΗΘΗΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΜΕ ΣΤΟΧΟ ΤΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΠΙΘΑΝΗΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΜΕ*

ΚΛΑΣΣΙΚΟΥΣ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΛΙΚΗ ΕΚΒΑΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ. 2003: ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ.

41. Giuseppina Bonizzi and Michael Karin, The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *TRENDS in Immunology* Vol.25 No.6 June 2004

Παράρτημα

ΠΙΝΑΚΕΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

ΘΕΤΙΚΑ ΣΤΡΩΜΑΤΙΚΑ ΕΝΤΕΡΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΤΗΝ 8-oxoguanine BB IR					
	CONTROL	BB 40 Gy 24 hrs	BB 40 Gy 96 hrs	BB 10 Gy 24 hrs	BB 10 Gy 96 hrs
Αριθμός θετικών κυττάρων ανά οπτικό πεδίο	9	23	33	35	41
	10	30	27	34	32
	17	40	26	39	36
	12	20	31	42	56
	3	27	35	36	28
	7	35	40	39	39
	9	27	43	45	36
	10	34	36	40	45
	13	35	37	35	38
	11	40	23	43	42
	15	29	37	37	37
	8	33	19	33	38
	9				
	8				
	14				
Μέση τιμή	10,3	31,1	32,3	38,2	39
Σφάλμα	2	3,7	4,6	2,5	4,5
p-value	-	0,001	0,001	0	0

ΘΕΤΙΚΑ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΕΝΤΕΡΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΤΗΝ 8-oxoguanine BB IR					
	CONTROL	BB 40 Gy 24 hrs	BB 40 Gy 96 hrs	BB 10 Gy 24 hrs	BB 10 Gy 96 hrs
Αριθμός θετικών κυττάρων ανά οπτικό πεδίο	1	9	18	10	12
	3	10	10	15	8
	2	18	11	9	7
	0	6	9	8	7
	0	10	7	5	6
	2	11	12	9	10
	3	5	9	13	5
	2	7	8	10	8
	4	19	12	15	6
	0	11	5	12	9
	3	15	7	11	6
	2	13	4	7	8
	0				
	2				
	0				
Μέση τιμή	1,6	11,2	9,3	10,3	7,7
Σφάλμα	0,8	2,8	1,7	2	1,2
p-value	-	0,002	0,003	0,001	0,001

Θετικά εντερικά κύτταρα στην ki-67 BB IR					
	CONTROL	BB 40 Gy 24hrs	BB 40 Gy 96hrs	BB 10 Gy 24hrs	BB 10 Gy 96hrs
Αριθμός θετικών κυττάρων ανά κρύπτη	25	15	8	18	15
	23	3	19	24	22
	39	1	14	19	16
	37	9	22	15	17
	36	8	17	14	28
	21	2	11	20	18
	27	10	3	17	19
	21	7	1	16	20
	34	5	9	18	15

	36	9	6	20	21
	23	10	11	33	15
	19	13	8	29	10
	17	15	7	36	10
	15	9	2	33	7
	18	2	12	22	16
	20	6	10	30	10
	12	1	19	28	5
	26	8	15	25	14
	20	0	5	27	9
	25	10	4	23	18
	24	9	17	11	20
	27	12	14	28	14
	16	14	12	12	16
	20	13	5	7	11
	29	2	13	15	16
	31	8	23	6	14
	17	9	16	14	17
	32	4	12	10	17
	34	10	10	13	19
	30	19	9	9	13
	18	16	20	24	25
	26	20	11	21	16
	24	19	19	26	5
	21	17	10	20	17
	28	10	13	22	20
	19	14	10	18	24
	18	13	5	23	23
	25	15	6	19	15
	22	18	13	17	10
	20	9	15	22	14
Μέση Τιμή	24,4	9,9	11,4	20,1	15,8
Σφάλμα	2,2	1,5	1,8	2,3	1,7
p-value	-	0,024	0,024	0,418	0,088

Θετικά κύτταρα στην ki-67 MRT IR			
	CONTROLS	MRT 10 Gy 24 hrs	MRT 10Gy 96 hrs
Αριθμός θετικών κυττάρων στην ki-67 ανά λάχνη	20	19	18
	17	18	22
	19	16	25
	15	15	19
	21	18	24
	23	20	17
	18	22	19
	20	17	19
	19	24	21
	18	20	22
	24	20	22
	23	18	21
	25	15	24
	22	19	25
	23	22	22
	26	21	18
	18	17	26
	26	16	17
	17	23	22
	25	18	24
	20	21	22
	18	20	17
	22	17	15
	19	23	20
	22	16	21
	16	18	23
	17	20	17
	21	17	19
	22	18	18
	18	20	20
	22	24	25
	21	19	24
	17	20	16
	16	18	19
	18	23	22

	19	18	23
	15	19	18
	20	22	17
	19	20	25
	16	21	21
		27	
		20	
		21	
		18	
		19	
		25	
		19	
		17	
		19	
		24	
Μέση τιμή	19.925	19.62	20.725
Τυπική απόκλιση	2.9990383	2.648757891	2.935088344
p-value	-	0.876	0.716

Θετικά σε πρόωρη γήρανση στρωματικά κύτταρα BB IR					
	CONTROL	BB 10 Gy 24 hrs	BB 10 Gy 96 hrs	BB 40Gy 24 hrs	BB 40Gy 96 hrs
Αριθμός στρωματικών κυττάρων σε πρόωρη γήρανση ανά οπτικό πεδίο 400x	0	2	5	4	4
	0	3	3	3	4
	1	5	6	4	3
	2	3	5	2	2
	0	4	4	3	3
	0	1	3	3	4
	2	2	3	2	1
	0	3	4	4	2
	1	3	2	1	3
	0	4	5	2	2
	1	3	6	2	1
	1	4	3	3	3
Average	0.66667	3.083333333	4.083333333	2.75	2.666666667
SD	0.7785	1.083624669	1.311372171	0.965307299	1.07308674
p-value	-	0.01	0.004	0.001	0.02

Θετικά σε πρόωρη γήρανση επιθηλιακά κύτταρα BB IR					
	CONTROL	BB 10 Gy 24 hrs	BB 10 Gy 96 hrs	BB 40Gy 24 hrs	BB 40Gy 96 hrs
Αριθμός επιθηλιακών κυττάρων σε πρόωρη γήρανση ανά οπτικό πεδίο 400x	0	3	3	6	6
	1	4	4	7	5
	1	8	5	8	7
	1	8	6	8	7
	0	6	7	9	6
	0	5	5	5	9
	2	4	7	11	4
	0	6	6	6	5
	1	4	7	12	4
	0	7	5	7	6
	1	6	4	5	4
	2	6	6	6	6
Average	0.75	5.583333333	5.416666667	7.5	5.75
SD	0.75377836	1.62135372	1.311372171	2.236067977	1.48477118
p-value	-	0.002	0.001	0.001	0.009

ΘΕΤΙΚΑ ΣΤΡΩΜΑΤΙΚΑ ΕΝΤΕΡΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΤΗΝ 8-oxoguanine MRT IR			
	CONTROL	MRT 10 Gy 24 hrs	MRT 10 Gy 96 hrs
Αριθμός θετικών κυττάρων ανά οπτικό πεδίο	4	16	11
	3	11	14
	3	18	7
	3	9	8
	2	12	9
	2	7	11
	3	14	15
	1	10	13
	1	8	12
	5	7	11
	3	16	14
	5	13	7

		12	8
		11	9
		7	11
Μέση τιμή	2,9	11,5	11,1
Σφάλμα	1,3	3,4	2,7
p-value	-	0,002	0,002

ΘΕΤΙΚΑ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΕΝΤΕΡΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΤΗΝ 8-oxoguanine MRT IR			
	CONTROL	MRT 10 Gy 24 hrs	MRT10 Gy 96 hrs
Αριθμός θετικών κυττάρων ανά οπτικό πεδίο	4	5	3
	1	7	5
	0	4	6
	1	6	4
	1	8	5
	1	5	5
	0	4	4
	1	4	3
	0	5	5
	2	6	3
	1	5	5
	1	7	6
		6	4
		7	5
		8	5
Μέση τιμή	1,1	5,6	4,4
Σφάλμα	1,1	1,5	1,0
p-value	-	0,001	0,004

Θετικά κύτταρα στην p65 MRT IR			
	CONTROLS	MRT 10 Gy 24 hrs	MRT 10Gy 96 hrs
Αριθμός θετικών κυττάρων στην ki-67 ανά οπτικό πεδίο 400x	10	27	33
	13	28	30
	14	23	24
	12	33	25
	15	25	40
	10	21	15
	12	29	28
	15	22	38
	11	35	35
	10	21	26
	10	29	24
	13	31	37
	14	33	23
	12	25	32
	15	22	27
	10	25	25
	12	31	
	15	26	
Μέση τιμή	12,2	27	28,875
Τυπική απόκλιση	1.9990383	2.648757891	6,612
p-value	-	0.001	0.003