Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Σχολή Θετικών Επιστημών

Τμήμα Βιολογίας

Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής

ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΗΛΕΚΤΡΟΜΑΓΝΗΤΙΚΩΝ ΠΕΔΙΩΝ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ Δ. ΧΑΒΔΟΥΛΑ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΛΟΥΚΑΣ Χ. ΜΑΡΓΑΡΙΤΗΣ

ΑΘΗΝΑ 2012

National and Kapodistrian University of Athens
Faculty of Biology
Department of Cell Biology and Biophysics

Effects of Electromagnetic Fields on Biological Systems

Ph.D. Thesis

Evangelia D. Chavdoula

Biologist

Supervisor

Professor L.H. Margaritis

Athens 2012

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Λουκάς Χ. Μαργαρίτης Καθηγητής Πανεπιστημίου Αθηνών (Ομότιμος από 1-9-10)

ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Λουκάς Χ. Μαργαρίτης	Καθηγητής Πανεπιστημίου Αθηνών
Σταύρος Κουσουλάκος	Αν. Καθηγητής Πανεπιστημίου Αθηνών
Ισιδώρα Παπασιδέρη	Αν. Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Αθηνών

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Λουκάς Χ. Μαργαρίτης	Ομ. Καθηγητής Πανεπιστημίου Αθηνών
Σταύρος Κουσουλάκος	τ. Αν. Καθηγητής Πανεπιστημίου Αθηνών
Ισιδώρα Παπασιδέρη	Αν. Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Αθηνών
Μιλτιάδης Τύπας	Καθηγητής Πανεπιστημίου Αθηνών
Σοφία Κουγιανού-Κουτσούκου	Αν. Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Αθηνών
Δημήτριος Στραβοπόδης	Επίκ. Καθηγητής Πανεπιστημίου Αθηνών
Ιωάννης Τρουγκάκος	Επίκ. Καθηγητής Πανεπιστημίου Αθηνών

Η έγκριση διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Αθηνών, δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/1932, άρθ. 202).

«***Τὸ ζητεῖν πανταχοῦ τὸ χρήσιμον ἥκιστα ἁρμόττει τοῖς μεγαλοψύχοις καὶ τοῖς ἐλευθέροις*».**

Ἀριστοτέλης (Πολιτικά Θ΄1338b)

Εξαιρετικά αφιερωμένο στους νέους πολλά υποσχόμενους επιστήμονες

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Εγγενές συστατικό της σύγχρονης καθημερινότητας - το κινητό τηλέφωνο. Καθ'όλα απαραίτητο, αλλά ακίνδυνο;

Πλήθος μελετών, που προήλθαν από την υποψιασμένη επιστημονική κοινότητα, περί των ενδεχομένων επιπτώσεων, έδωσαν δημιουργικό κίνητρο να ξεπεραστούν οι αρχικές αντιρρήσεις που διατυπώθηκαν και να καταγραφούν οι βιολογικές επιδράσεις από το συγκεκριμένο είδος μη ιονίζουσας ακτινοβολίας.

Θεμελιώδες ζήτημα στο ερευνητικό αυτό πεδίο, καθίσταται ο προσδιορισμός του βιοφυσικού και βιοχημικού μηχανισμού, που διέπει τις παρατηρηθείσες επιδράσεις σε μία πληθώρα βιολογικών συστημάτων κάτω από ποικίλες συνθήκες έκθεσης στην ακτινοβολία.

Η παρούσα διατριβή, που διεξήχθη κατά το χρονικό διάστημα 2005-2011 στο εργαστήριο Ηλεκτρομαγνητικής Βιολογίας του Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών, φιλοδοξεί να αποτελεί συμβολή στην προσπάθεια βελτίωσης της τεχνολογίας της κινητής τηλεφωνίας, με σκοπό τη δραστική μείωση των επιπτώσεων.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον επιβλέποντα καθηγητή μου, κύριο Λουκά Μαργαρίτη, ο οποίος αποτέλεσε το πρόσωπο που μου έδωσε τη μοναδική ευκαιρία - όνειρο ετών, να συμμετάσχω σε μία λαμπρή και πρωτοπόρο ομάδα, που ασχολήθηκε, και εξακολουθεί με επιτυχία να ασχολείται, με ένα ζήτημα τόσο κρίσιμο στη σύγχρονη εποχή μας.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ για την άρτια επιστημονική καθοδήγηση, το συνεχές και αμείωτο ενδιαφέρον του, καθώς και για την καθοριστική συμβολή του στον σχεδιασμό, την διεξαγωγή των πειραμάτων και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Θα του είμαι πάντα ευγνώμων για τον πολύτιμο χρόνο που μου αφιέρωσε, την ηθική στήριξη και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλα αυτά τα χρόνια.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω:

Την αναπληρώτρια καθηγήτρια Ισιδώρα Παπασιδέρη, καθώς και τον αναπληρωτή καθηγητή Σταύρο Κουσουλάκο, για τη συμμετοχή τους στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή, τις παρατηρήσεις και τα εύστοχα σχόλιά τους.

Ιδιαίτερα, τον αγαπητό επίκουρο καθηγητή, Δημήτριο Στραβοπόδη, για τις γόνιμες επιστημονικές συζητήσεις, και τις εύστοχες παρατηρήσεις του. Ένα μεγάλο ευχαριστώ για την αμέριστη συμπαράσταση και ανεκτίμητη βοήθειά του όλα αυτά τα χρόνια, καθώς και για τη συμμετοχή του στην επταμελή εξεταστική επιτροπή.

Τον αγαπητό καθηγητή Μιλτιάδη Τύπα για τις συμβουλές και τις παρατηρήσεις του, καθώς και για την ευγενική συμμετοχή του στην επταμελή εξεταστική επιτροπή.

Την αναπληρώτρια καθηγήτρια Σοφία Κουγιανού-Κουτσούκου και τον επίκουρο καθηγητή Ιωάννη Τρουγκάκο για την ευγενική συμμετοχή τους στην επταμελή εξεταστική επιτροπή.

Τον φίλο και συνεργάτη Δρ. Δημήτριο Παναγόπουλο, καθώς και τους συναδέλφους Δρ. Ιωάννη Νέζη, Δρ. Αθανάσιο Βελέντζα, Δρ. Βασιλική Μπάκου, Δρ. Ουρανία Κωνσταντή, καθώς και τη λέκτορα Μαριάννα Αντωνέλου για την πραγματικά ανεκτίμητη βοήθειά τους στις βιολογικές τεχνικές και όχι μόνο, αλλά και για την συνεχή υποστήριξή τους σε όλα τα επίπεδα.

Ιδιαίτερα, τον αγαπημένο φίλο και συνάδελφο Δρ. Παναγιώτη Βελέντζα για την βοήθεια, την ηθική συμπαράσταση, αλλά και τις αξέχαστες στιγμές που μοιραστήκαμε μέσα από κοινές αγωνίες, χαρές και απογοητεύσεις.

Τις συναδέλφους, Δρ. Αδαμαντία Φραγκοπούλου και υποψήφια Δρ. Μαρία Ντζούνη, μέλη της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου Ηλεκτρομαγνητικής Βιολογίας, για την υποστήριξή τους, καθώς και για τις πολύτιμες πληροφορίες που προέκυψαν μέσα από το έργο τους επεκτείνοντας την έρευνα σε ανώτερους οργανισμούς και όχι μόνο.

Ευχαριστώ επίσης, την αγαπημένη φίλη και υποψήφια Δρ. Ελένη Βασιλάκη, καθώς και όλους τους διπλωματικούς φοιτητές της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου Ηλεκτρομαγνητικής Βιολογίας - αγαπημένους φίλους, χάρη στους οποίους η εμπειρία αυτή έγινε συναρπαστική!

Την αγαπημένη φίλη και γραμματέα του Τομέα Μαρίνα Αρχοντάκη, που πάντα με το χαμόγελό της στάθηκε δίπλα μου σε όλες τις όμορφες, αλλά και δύσκολες στιγμές.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου, τους φίλους μου και τον αγαπημένο μου Αλέξη, για την συμπαράστασή τους στο δύσκολο αυτό έργο, καθώς και **το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (Ι.Κ.Υ.) για τη χορήγηση υποτροφίας κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής.**

Λάμπει μέσα μου ἐκεῖνο ποὺ ἀγνοῶ
μὰ ὥστόσο λάμπει

Οδυσσέας Ελύτης
*(*ΑΚΙΝΔΥΝΟΥ, ΕΛΠΙΔΟΦΟΡΟΥ, ΑΝΕΜΠΟΔΙΣΤΟΥ
Τα ελεγεία της Οξώπετρας)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ηλεκτρομαγνητικά κύματα

Τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα μπορούν να διαδοθούν και μέσα στο κενό διάστημα, σε αντίθεση με τα μηχανικά κύματα, όπως είναι τα ηχητικά, τα κύματα του νερού ή των ελατηρίων, τα οποία απαιτούν την ύπαρξη ενός μέσου για τη διάδοσή τους. Οι εξισώσεις του Maxwell, συνιστούν το θεωρητικό υπόβαθρο των ηλεκτρομαγνητικών φαινομένων. Μία από τις εξισώσεις αυτές, προέβλεψε ότι ένα ηλεκτρικό πεδίο που μεταβάλλεται ως προς τον χρόνο παράγει μαγνητικό πεδίο και αντίστροφα. Επίσης, η θεωρία του Maxwell, προέβλεψε την ύπαρξη των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων που διαδίδονται στο κενό με την ταχύτητα του φωτός. Πειραματικά, η πρόβλεψη αυτή επαληθεύτηκε από τον Hertz, ο οποίος πρώτος παρήγαγε και ανίχνευσε τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα. Η ανακάλυψη αυτή υπήρξε σταθμός στην ανάπτυξη της τεχνολογίας των τηλεπικοινωνιών.

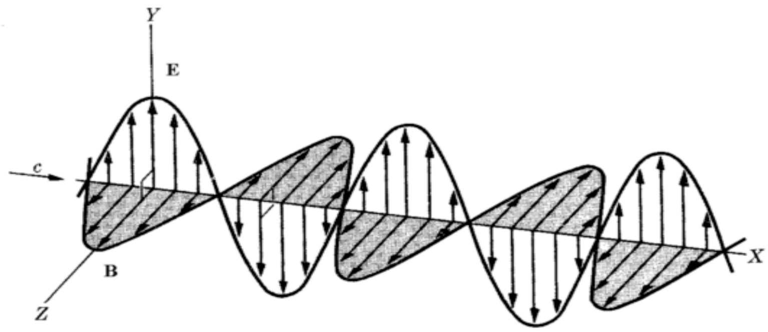
Τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα δημιουργούνται από επιταχυνόμενα ηλεκτρικά φορτία. Τα εκπεμπόμενα κύματα είναι ταλαντούμενα ηλεκτρικά και μαγνητικά πεδία, τα οποία είναι κάθετα μεταξύ τους και ταυτόχρονα κάθετα προς την κατεύθυνση διάδοσης της κυματικής διαταραχής (εικ. 1.1). Τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα είναι εγκάρσια. Η θεωρία του Maxwell αποδεικνύει ότι τα πλάτη του ηλεκτρικού και του μαγνητικού πεδίου, E και B, αντίστοιχα, ενός ηλεκτρομαγνητικού κύματος συνδέονται με τη σχέση $E=cB$. Σε μεγάλες αποστάσεις από την πηγή των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων, τα πλάτη των ταλαντουμένων πεδίων ελαττώνονται αντιστρόφως ανάλογα προς την απόσταση r από την πηγή. Τα εκπεμπόμενα κύματα μπορούμε να τα ανιχνεύσουμε σε μεγάλες αποστάσεις από την πηγή. Τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα μεταφέρουν ενέργεια, στροφορμή, και ορμή και επομένως ασκούν πίεση πάνω στις επιφάνειες που προσπίπτουν (**Serway, 1990**), ενώ καλύπτουν ένα τεράστιο φάσμα συχνοτήτων. Τα ραδιοκύματα παράγονται από ταλαντούμενα ρεύματα στις κεραίες των πομπών και έχουν συχνότητα 10^7 Hz. Το ορατό φως είναι και αυτό ηλεκτρομαγνητικό κύμα αλλά με συχνότητα 10^{14} Hz.

Τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα παράγονται από 1) μεταβαλλόμενα μαγνητικά πεδία τα οποία δημιουργούν ηλεκτρικά πεδία και 2) μεταβαλλόμενα ηλεκτρικά πεδία τα οποία δημιουργούν μαγνητικά πεδία. Τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα δεν μπορούν να παραχθούν ούτε από τα στατικά ηλεκτρικά πεδία ούτε από τα σταθερά ηλεκτρικά ρεύματα. Στην περίπτωση όμως που το ρεύμα που διαρρέει ένα σύρμα μεταβάλλεται ως προς τον χρόνο, τότε το σύρμα εκπέμπει ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Στην πραγματικότητα δηλαδή, το αίτιο που προκαλεί την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία είναι η επιτάχυνση των ηλεκτρικών φορτίων. Κάθε φορά λοιπόν που ένα **φορτισμένο σωμάτιο επιταχύνεται ή επιβραδύνεται εκπέμπει ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία** (**Serway, 1990**).

1.2 Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα

Τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα, όπως προαναφέρθηκε, διαδίδονται στο κενό με την ταχύτητα του φωτός c. Τα κύματα αυτά μεταφέρουν ορμή και ενέργεια από μία πηγή στον δέκτη ή ανιχνευτή. Την εποχή που ο Hertz (1887) παρήγαγε και ανίχνευσε ηλεκτρομαγνητικά κύματα σε ραδιοσυχνότητες σύμφωνα με τις προβλέψεις του Maxwell, ηλεκτρομαγνητικά κύματα θεωρούνταν μόνο τα ραδιοκύματα και το ορατό φως. Σήμερα γνωρίζουμε ότι υπάρχουν πολλές άλλες μορφές ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων που διαφέρουν μεταξύ τους σε συχνότητα και μήκος κύματος. Όλα τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα διαδίδονται στο κενό με την ταχύτητα του φωτός c, με συχνότητα f και με μήκος κύματος λ, και η σχέση που συνδέονται είναι η γνωστή:

$$c=\lambda f$$

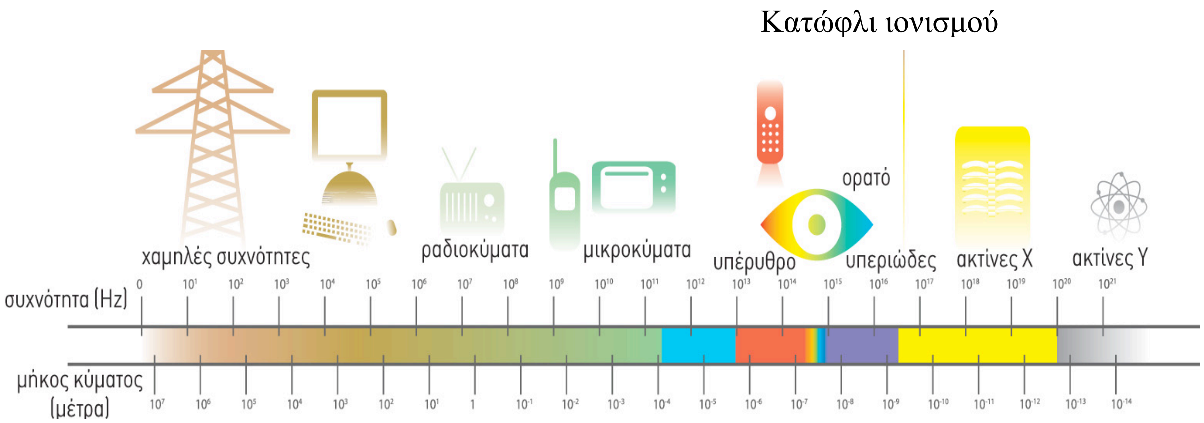


Εικόνα 1.1. Γραφική παράσταση ενός αρμονικού ηλεκτρομαγνητικού κύματος, που οδεύει προς τη θετική κατεύθυνση x με ταχύτητα ίση με την ταχύτητα του φωτός c. Το μαγνητικό (B) και το ηλεκτρικό πεδίο (E) του Η/Μ κύματος είναι κάθετα μεταξύ τους, καθώς και στη διεύθυνση διάδοσής τους (Ανατύπωση από Serway, 1990).

Ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία (ΗΜΑ), καλείται το είδος εκείνο της ενέργειας που μεταδίδεται με τη μορφή κυμάτων, δηλαδή τοπικών και χρονικών μεταβολών του ηλεκτρικού και μαγνητικού πεδίου. Ο όρος είναι γενικός και περιλαμβάνει ηλεκτρομαγνητικά κύματα διαφόρων συχνοτήτων. Το γνωστό φάσμα συχνοτήτων της ακτινοβολίας είναι τεράστιο και διαιρείται σε περιοχές ανάλογα με τις ιδιότητες της ακτινοβολίας και ανάλογα με τις εφαρμογές της. Συχνά αναφέρεται σαν ζώνη συχνοτήτων με τον όρο frequency band. Οι κοινές γραμμές μεταφοράς ηλεκτρικής ενέργειας χρησιμοποιούν χαμηλές συχνότητες επειδή είναι εύκολο να παραχθούν. Υψηλότερες συχνότητες μέχρι 20 kHz χρησιμοποιούνται για την αναπαραγωγή του ήχου επειδή αυτές συμπίπτουν με τις συχνότητες μετάδοσης του ήχου. Η ζώνη συχνοτήτων από 10^4 Hz μέχρι 10^{11} Hz χρησιμοποιούνται στις τηλεπικοινωνίες. Η περιοχή αυτή χωρίζεται σε ζώνες και κατανέμεται σε διάφορες χρήσεις. Συχνά αναφέρονται σαν ραδιοσυχνότητες (Radiofrequencies) και συμβολίζονται με τα αρχικά RF. Οι συχνότητες από 10^8 μέχρι 10^{11} Hz αναφέρονται στην περιοχή των μικροκυμάτων (microwaves). Σε μεγαλύτερες συχνότητες αντιστοιχούν οι υπέρυθρες, οι ορατές και οι υπεριώδεις ακτινοβολίες. Με αύξουσα συχνότητα ακολουθούν οι ακτίνες Χ, οι ακτινοβολίες γ και τέλος η κοσμική ακτινοβολία στα 10^{22} Hz.

Όπως παρουσιάζεται και στην εικόνα 1.2 του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, τα είδη της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας καλύπτουν ένα τεράστιο εύρος συχνοτήτων και μηκών κύματος. Οι διάφορες συνιστώσες της ακτινοβολίας κατά σειρά ελαττουμένου μήκους κύματος, μεταξύ των οποίων υπάρχει σαφής διαχωριστική γραμμή, είναι οι ακόλουθες:

Ακτινοβολία πολύ χαμηλής συχνότητας ELF: Η ακτινοβολία ELF των 60 Hz παράγεται από τα ηλεκτροφόρα καλώδια, την ηλεκτρική καλωδίωση, και τον ηλεκτρικό εξοπλισμό. Οι κοινές πηγές έντονης έκθεσης σε αυτή την ακτινοβολία περιλαμβάνουν τους κλιβάνους επαγωγής και τα υψηλής τάσεως ηλεκτροφόρα καλώδια.



Εικόνα 1.2. Το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα. Αναφέρονται οι συχνότητες που αντιστοιχούν σε κάθε περιοχή καθώς και το κατώφλι ιονισμού (Ανατύπωση από εεττ)

Ραδιοκύματα και Μικροκύματα: Δημιουργούνται από ηλεκτρονικά κυκλώματα και χρησιμοποιούνται συνήθως στη ραδιοφωνία και την τηλεόραση. Το μήκος κύματος αυτών εκτείνεται από τα 30cm έως το 1mm και παράγονται από ηλεκτρονικά κυκλώματα. Λόγω του μικρού μήκους κύματος είναι χρήσιμα στα συστήματα ραντάρ και στη μελέτη ατομικών και μοριακών ιδιοτήτων. Είναι η κύρια κατηγορία με την οποία θα ασχοληθούμε στην παρούσα διατριβή, καθώς οι συχνότητές τους χρησιμοποιούνται από τα συστήματα κινητής τηλεφωνίας. Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά λειτουργίας του συστήματος κινητής τηλεφωνίας θα αναφερθούν εκτενέστερα στα επόμενα κεφάλαια.

Υπέρυθρα κύματα: Καλύπτουν το φάσμα από περίπου από το 1mm έως το μεγαλύτερο μήκος κύματος του ορατού φωτός δηλαδή μέχρι τα $7x10^{-7}$m. Η εκπομπή τους γίνεται από διάφορα θερμά σώματα και μόρια και η απορρόφησή τους είναι εύκολη από από τα περισσότερα υλικά. Τα υπέρυθρα κύματα που απορροφώνται από την ύλη επανεμφανίζονται ως θερμότητα, καθώς αυξάνουν τις ταλαντώσεις και τις κινήσεις των ατόμων του υλικού από το οποίο απορροφώνται, αυξάνοντας τη θερμοκρασία του.

Ορατό φως: είναι η πιο γνωστή μορφή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας και ορίζεται ως το μέρος του φάσματος που ανιχνεύει ο ανθρώπινος οφθαλμός. Το ορατό φως παράγεται από την ανακατανομή των ηλεκτρονίων στα άτομα και στα μόρια.

Υπεριώδης ακτινοβολία: καλύπτει τα μήκη κύματος από 380nm έως 60 nm. Ο ήλιος είναι ισχυρή πηγή υπεριώδους ακτινοβολίας, ενώ το μεγαλύτερο μέρος αυτής απορροφάται από τα άτομα και τα μόρια των ανωτέρων στρωμάτων της ατμόσφαιρας.

Ακτίνες Χ: εκτείνονται στα μήκη κύματος από 10 nm έως 10^{-4}nm, ενώ η πιο κοινή πηγή παραγωγής τους είναι η επιβράδυνση των ταχέων ηλεκτρονίων καθώς αυτά προσκρούουν σε έναν μεταλλικό στόχο. Οι ακτίνες αυτές προκαλούν σοβαρές βλάβες στους οργανισμούς

Ακτίνες γ: εκπέμπονται από ραδιενεργούς πυρήνες και σε αντιδράσεις πυρήνων και στοιχειωδών σωματιδίων. Τα μήκη κύματος αρχίζουν από τα 10^{-10} και φτάνουν μέχρι τα 10^{-14} m. Είναι εξαιρετικά διεισδυτικές και βλάπτουν τους ζωντανούς οργανισμούς.

1.3 Ιονίζουσα ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία

Όπως γίνεται φανερό από την παραπάνω σύντομη παρουσίαση των διαφόρων περιοχών του Η/Μ φάσματος ορισμένες μορφές της ακτινοβολίας χαρακτηρίζονται από σοβαρές επιδράσεις στους ζωντανούς οργανισμούς όπως στην περίπτωση των ακτίνων Χ και γ. Το χαρακτηριστικό που τις διακρίνει από τις υπόλοιπες περιοχές του φάσματος είναι το γεγονός ότι ανήκουν στην ιονίζουσα ακτινοβολία. Ο διαχωρισμός αυτός οφείλεται στην ικανότητα ή όχι της ακτινοβολίας καθώς διέρχεται από σωματίδια της ύλης να δημιουργεί ιόντα. Οι ιονίζουσες ακτινοβολίες μπορούν να απομακρύνουν ηλεκτρόνια από τα άτομα της ύλης δημιουργώντας ιόντα. Το κατώφλι ιονισμού εντοπίζεται στο μήκος κύματος λ=100nm και ενέργεια της τάξεως των 12,4 eV ικανή να προκαλέσει τον ιονισμό ενός ατόμου, ενώ ενέργεια μικρότερης τάξεως δεν μπορεί να ιονίσει ένα άτομο αλλά απλά να το διεγείρει. Για τον λόγο αυτό η ιονίζουσα ακτινοβολία είναι ικανή να καταστρέφει την ενδομοριακή δομή, να διασπά δεσμούς μεταξύ των μορίων και να οδηγεί σε φαινόμενα καρκινογένεσης. Οι ιδιότητες και οι προκαλούμενες επιπτώσεις της ιονίζουσας ακτινοβολίας, οι οποίες οφείλονται κατά κύριο λόγο στη δημιουργία και την κυτταροτοξική δράση των ελευθέρων ριζών, αποτελούν αντικείμενο μελέτης του κλάδου της ραδιοβιολογίας (**Μαργαρίτης, 1996**).

1.4 Ηλεκτρομαγνητικά πεδία και μη ιονίζουσα ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία

Τα διάφορα είδη ηλεκτρομαγνητικών πεδίων, όπως τα τεχνητά πεδία που παράγονται από την ανθρώπινη τεχνολογία, αλλά και τα πεδία που υπάρχουν τόσο στο φυσικό περιβάλλον όσο και στους ζωντανούς οργανισμούς, μπορούν να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους ποικιλοτρόπως.

1.4.1 Ηλεκτρομαγνητικά πεδία της ανθρώπινης τεχνολογίας και η παραγόμενη από αυτά μη-ιονίζουσα ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία

Η μη-ιονίζουσα ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία όπως προαναφέρθηκε εκτείνεται στο εύρος των συχνοτήτων από $0\text{-}3x10^{11}$Hz, δηλαδή μέχρι το κάτω όριο του υπερύθρου, και εκπέμπεται από τα τεχνητά ηλεκτρομαγνητικά πεδία, (ΗΜΠ). Τα πεδία αυτά παράγονται από ηλεκτρικά κυκλώματα, είναι πολωμένα (σε αντίθεση με το φυσικό φως), και παρουσιάζουν φαινόμενα συμβολής (**Παναγόπουλος, 2001**). Τα ηλεκτρομαγνητικά πεδία ανακαλύφθηκαν το 1888 όταν περιγράφηκαν από τον Hertz. Αμέσως μετά το 1889 ανεξάρτητα οι d’ Arsonval και Tesla παρατήρησαν για πρώτη φορά τις επιδράσεις της Η/Μ ακτινοβολίας στους ζωντανούς οργανισμούς. Αξίζουν να αναφερθούν οι εργασίες του d’ Arsonval σε ανθρώπους το 1893-94 ο οποίος «παρενόχλησε» με αυτεπαγωγή ή με χωρητική σύζευξη την λειτουργία των κυττάρων και ανακοίνωσε ότι παρουσιάσθηκε σημαντική βελτίωση σε ρευματοπαθείς ασθενείς σε αντίθεση με νευρολογικούς ασθενείς. Παρά τις παρατηρήσεις αυτές η έρευνα στον τομέα αυτό ήταν ανύπαρκτη μέχρι τη δεκαετία του 1930. Τότε για πρώτη φορά η τεχνολογική πρόοδος έδωσε τη δυνατότητα δημιουργίας ισχυρών ηλεκτρομαγνητικών πεδίων και ταυτόχρονα άρχισε να διαδίδεται η βιολογική έρευνα και μελέτη της Η/Μ ακτινοβολίας. Η έρευνα και πάλι ανεστάλη στην περίοδο του δευτέρου παγκοσμίου πολέμου με την εμφάνιση των πυρηνικών όπλων και το ακόλουθο ενδιαφέρον για την ιονίζουσα ακτινοβολία. Ωστόσο ακόμα και την περίοδο αυτή υπήρξε η εφαρμογή και χρήση της μη-ιονίζουσας ακτινοβολίας στην περίπτωση των radars και διαφόρων άλλων εφαρμογών των ραδιοσυχνοτήτων.

Ενδεικτικά, μπορούμε να αναφέρουμε ορισμένες από τις πηγές ηλεκτρομαγνητικών πεδίων της σύγχρονης εποχής, όπως τα τηλεφωνικά καλώδια, τα σύρματα μεταφοράς ηλεκτρικής ενέργειας, τους πομπούς ραδιοφωνικών και τηλεοπτικών σταθμών, τους πομπούς ραντάρ, τις διάφορες ηλεκτρικές και ηλεκτρονικές συσκευές στο χώρο του σπιτιού και της εργασίας, κ.ά. (**Λιολιούσης, 1997**).

Εν αντιθέσει με την ιονίζουσα, η μη-ιονίζουσα ακτινοβολία δεν προκαλεί ιονισμό στα μόρια και άτομα της ύλης στην οποία προσπίπτει, γι' αυτό και εθεωρείτο ακίνδυνη λίγα χρόνια πριν. Σήμερα είναι πλέον αποδεκτές οι μη θερμικές επιδράσεις της μη-ιονίζουσας ακτινοβολίας (**Λιολιούσης, 1997; Παναγόπουλος, 2001**), χωρίς όμως να υπάρχει ένα απόλυτα επιβεβαιωμένο μοντέλο επίδρασής της στη ζωντανή ύλη.

1.4.2 Ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της βιολογικής δράσης των τεχνητών ΗΜΠ

Οι πρώτες μελέτες για τις ενδεχόμενες επιδράσεις της μη-ιονίζουσας ακτινοβολίας και με την ιδέα ότι αυτές είναι θερμικές., άρχισαν στο Δυτικό κόσμο το 1953, από τον Boysen με πειραματόζωα κουνέλια που εκτέθηκαν σε πυκνότητα ισχύος 100 mW/cm^2 στη συχνότητα των 300MHz διαπιστώνοντας βλάβες στο κεντρικό νευρικό σύστημα, στα νεφρά, το ήπαρ και με σημαντική αύξηση θερμοκρασίας. Ως θερμικές ορίζονται οι επιδράσεις που απαοδίδονται στη μετρήσιμη αύξηση της θερμοκρασίας των ιστών που ακτινοβολούνται. Παρατηρήσιμη αύξηση της θερμοκρασίας των ιστών προκαλείται από πυκνότητες ισχύος μεγαλύτερες του 1mW/cm^2. Ωστόσο, είναι χαρακτηριστικό ότι επιστήμονες των Ανατολικών χωρών, ήδη πριν τον δεύτερο Παγκόσμιο πόλεμο, είχαν ανιχνεύσει μη θερμικές επιδράσεις από τιμές πυκνότητας ισχύος της τάξεως ολίγων μW/cm^2. (**Λιολούσης, 1997**).

Η συνεχώς αυξανόμενη τεχνολογική πρόοδος και η αναπόφευκτη έκθεση του ανθρώπου στα διαφόρων ειδών ηλεκτρομαγνητικά πεδία οδήγησε στην ανάγκη μελέτης των βιολογικών επιδράσεων της ακτινοβολίας σε τιμές έντασης πολύ χαμηλότερες. Ωστόσο παρά τη συνεχή προσπάθεια της επιστημονικής κοινότητας κυρίως κατά τις τελευταίες δεκαετίες υφίστανται ακόμη πολλά αναπάντητα ερωτήματα σχετικά με το φάσμα των επιδράσεων, τον μηχανισμό δράσης της ακτινοβολίας, την ύπαρξη ελαχίστου ορίου έκθεσης στην ακτινοβολία που να είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση των επιδράσεων.

Βασικό χαρακτηριστικό για τη μελέτη των βιολογικών επιδράσεων των ηλεκτρομαγνητικών πεδίων αλλά και στις μετρήσεις της μη ιονίζουσας ακτινοβολίας (δοσιμετρία), αποτελεί η συχνότητα. Στις χαμηλές συχνότητες < 500 Hz, το μαγνητικό (B) και το ηλεκτρικό πεδίο (E) είναι ασύνδετα μεταξύ τους, και συνεπώς απαιτείται η μέτρηση της έντασης και των δύο πεδίων ανεξάρτητα. Αντιθέτως σε μεγαλύτερες συχνότητες >3MHz τα πεδία αυτά συνδέονται με απλές σχέσεις μεταξύ τους, καθώς και με την πυκνότητα ισχύος, δηλαδή την ισχύ ανά μονάδα επιφάνειας. Κατά συνέπεια, στις υψηλές συχνότητες είναι αρκετή η μέτρηση ενός εκ των δύο πεδίων, συνήθως του E, για τον προσδιορισμό του άλλουόπως και της πυκνότητας ισχύος. Για το λόγο αυτό τα όρια επικινδυνότητας δίνονται για τις χαμηλές συχνότητες σε τιμές των E κασι B, ενώ για τις υψηλότερες σε τιμές πυκνότητας ισχύος (**Λιολιούσης, 1997**).

Κατά την πεδιακή μελέτη τόσο οι μετρήσεις όσο και τα όρια έκθεσης στην περίπτωση των χαμηλών συχνοτήτων εκφράζονται σε μονάδες έντασης του ηλεκτρικού πεδίου δηλαδή σε Volts/m, και αντιστοίχως του μαγνητικού πεδίου σε Amperes, ενώ στις υψηλές συχνότητες εκφράζονται σε μονάδες πυκνότητας ισχύος δηλαδή σε W/m^2 (**Λιολιούσης, 1997**).

Κατά τη μελέτη των βιολογικών επιδράσεων της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας λαμβάνονται υπ'όψιν και άλλα χαρακτηριστικά πλην της συχνότητάς της που έχουν σχέση με την ισχύ (ένταση), τον τρόπο με τον οποίο εκπέμπεται (συνεχή ή διακοπτόμενο) και τον τρόπο με τον οποίο διαδίδεται στο χώρο (τρόπος διαμόρφωσης, συνεχής ή παλμική εκπομπή), ενώ βασικό ρόλο παίζει και ο χρόνος έκθεσης σε αυτήν. Η σχέση ορισμένων από τα προαναφερθέντα χαρακτηριστικά σε σχέση με την παρατηρούμενη βιολογική επίδραση αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης της παρούσας διατριβής.

Τα τεχνητά ηλεκτρομαγνητικά πεδία, (ΗΜΠ), σε εντάσεις στις οποίες εκτίθεται ο άνθρωπος και το περιβάλλον, συνήθως δεν έχουν άμεση εκφυλιστική δράση. Στις περισσότερες περιπτώσεις αποτελούν έναν παράγοντα ήπιας εξωτερικής παρενόχλησης, στον οποίο οι ζωντανοί οργανισμοί προσαρμόζονται με τους ομοιοστατικούς μηχανισμούς που διαθέτουν. Η παρενόχληση αυτή μπορεί να είναι εκφυλιστική όταν συνδυάζεται με κάποιον επιπρόσθετο παράγοντα stress, (co-stress conditions), ή με μη καλή υγεία του ζωντανού οργανισμού. Αυτό που πολύ συχνά προκαλείται είναι επιτάχυνση ή επιβράδυνση των κυτταρικών λειτουργιών (**Michel and Gutzeit, 1999; Παναγόπουλος, 2001).** Στα πειραματικά αποτελέσματα συνήθως: 1) **Δεν υπάρχει γραμμική σχέση μεταξύ αιτίου-αποτελέσματος** και 2) Ειδικά σε πειράματα με RF πεδία, συχνά εμφανίζονται **"παράθυρα" έντασης, συχνότητας, ή διάρκειας έκθεσης,** εντός των οποίων ένα φαινόμενο παρατηρείται, αλλά όχι για μεγαλύτερες ή μικρότερες τιμές των παραμέτρων αυτών (**Postow and Swicord, 1989; Blackman et al., 1985; Goodman et al., 1995).**

Αναλυτικά τα Μεγέθη Δοσιμετρίας

1) **Ένταση Ηλεκτρικού Πεδίου**, ***E,*** με μονάδα μέτρησης: V/m
2) **Ένταση Μαγνητικού Πεδίου, *B*,** με συνηθέστερη μονάδα :$1G=10^{-4}T$
3) **Ένταση Ηλεκτρομαγνητικού Κύματος (πυκνότητα ισχύος),** ***J****=P/S*, (προσπίπτουσα ισχύς/επιφάνεια του προς εξέταση αντικειμένου), χρησιμοποιείται για συχνότητες μεγαλύτερες από περίπου 10^6Hz, με συνηθέστερη μονάδα μέτρησης: $mW/cm^2 = 10^{-1} W/m^2$
4) **Ειδικός ρυθμός απορρόφησης, (SAR).**

Σαν μέτρο της βιολογικής δράσης της μη-ιονίζουσας ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, σε συγκεκριμένους ιστούς, χρησιμοποιείται ο Ειδικός Ρυθμός Απορρόφησης, (Specific Absorption Rate – SAR*).*

Ορίζεται σαν το πηλίκο της απορρόφησης ισχύος, (P), προς τη μάζα του ιστού, (m),

SAR=P/m, (W/kg), ενώ σε σχέση με την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (Ε) εντός του ιστού η σχέση γίνεται: $\mathbf{SAR=\sigma E^2/\rho}$

Όπου:

σ: η ειδική ηλεκτρική αγωγιμότητα του βιολογικού ιστού (Si/m) σε συγκεκριμένη συχνότητα,

ρ: η πυκνότητα του βιολογικού ιστού (Kg/m^3) και
Ε: είναι η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου μέσα στον ιστό (V/m).
Επομένως ο SAR ορίζεται σαν το ποσό της Η/Μ ενέργειας που απορροφά η μονάδα μάζας ενός ιστού στη μονάδα του χρόνου (**Λιολιούσης, 1997; Παναγόπουλος, 2001**).

5) **Επιφανειακή Πυκνότητα Επαγόμενου Ρεύματος, (j),** μέσα στον ιστό:

Αντίστοιχο μέγεθος του SAR, για πεδία χαμηλοτέρων συχνοτήτων, που δεν συνιστούν ηλεκτρομαγνητικό κύμα, *J=I/S*, (ένταση του επαγόμενου ρεύματος/εμβαδόν διατομής του ιστού).

1.4.3 Ειδικός ρυθμός απορρόφησης

Η τιμή του SAR, δηλ. η απορροφούμενη ισχύς από το ανθρώπινο σώμα και η κατανομή της μέσα σ' αυτό εξαρτάται από τους εξής παράγοντες:

- **τα χαρακτηριστικά της ακτινοβολίας**: συχνότητα, ένταση και πόλωση (διαφορετικός προσανατολισμός του σώματος σε σχέση με τη διεύθυνση του ηλεκτρικού Ε και του μαγνητικού Η πεδίου του κύματος), αν το κύμα είναι συνεχές ή παλμικό,
- **τα χαρακτηριστικά του βιολογικού ιστού**: μέγεθος (διάσταση). Αυτό δυσχεραίνει την αναγωγή στον άνθρωπο των μετρήσεων που γίνονται σε μικρά πειραματόζωα, την καμπυλότητα της επιφάνειάς του, την εσωτερική του δομή (πυκνότητα, ειδική αγωγιμότητα, διηλεκτρική σταθερά)
- τη σχέση (πηλίκο) του ύψους του σώματος και του μήκους κύματος της ακτινοβολίας. Παρατηρούνται φαινόμενα μεγάλης απορρόφησης της ακτινοβολίας όταν το μήκος κύματος βρίσκεται σε συγκεκριμένη σχέση με το ύψος του σώματος
- την απόσταση πηγής εκπομπής της ακτινοβολίας και βιολογικού σώματος
- τα ενδύματα (στην περιοχή των μικροκυμάτων) όπου το μήκος κύματος είναι συγκρίσιμο με το πάχος των ενδυμάτων
- την παρουσία εδάφους, ανακλαστικών επιφανειών και αγώγιμων υλικών κοντά στο ανθρώπινο σώμα

Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι το βάθος διείσδυσης της μη ιονίζουσας ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας μέσα στο ανθρώπινο σώμα ελαττώνεται με την αύξηση της συχνότητας, ενώ τέλος η παρατηρούμενη βιολογική επίδραση εξαρτάται από τη διαμόρφωση, τη μορφή των κυμάτων, τον τύπο και τη διάρκεια έκθεσης (**Levitt and Lai, 2010).**

1.5 Ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία της ζώνης ραδιοσυχνοτήτων (RF) που εκπέμπουν τα κινητά τηλέφωνα

Τα RF (radio-frequency) κύματα περιέχουν ως γνωστόν ένα ηλεκτρικό και ένα μαγνητικό πεδίο. Συνήθως όμως για τον χαρακτηρισμό ενός πεδίου RF, χρησιμοποιείται η ενεργειακή πυκνότητα ή πυκνότητα ισχύος του Η/Μ κύματος μπορεί να εκφραστεί σαν milliwatt ανά τετραγωνικό εκατοστό (mW/cm^2). Όταν ένα κινητό τηλέφωνο είναι ενεργοποιημένο, ανταποκρίνεται σε συγκεκριμένα σήματα ελέγχου από κοντινούς σταθμούς βάσης. Όταν εντοπίσει τον πιο κοντινό σταθμό βάσης του δικτύου στον οποίο ανήκει, ξεκινά μια σύνδεση. Έπειτα, το τηλέφωνο θα παραμείνει σε λανθάνουσα κατάσταση πέρα από κάποια περιστασιακή επικοινωνία με το δίκτυο για θέματα ενημέρωσης θέσης, μέχρι ο χρήστης να θελήσει να κάνει ή να δεχτεί μια κλήση. Τα κινητά τηλέφωνα χρησιμοποιούν αυτόματο έλεγχο ισχύος για να μειώνεται στο ελάχιστο δυνατόν η εκπεμπόμενη ενέργεια, ενώ παράλληλα να διατηρείται η καλή ποιότητα κλήσης. Για παράδειγμα, όταν χρησιμοποιείται το τηλέφωνο, η παραγόμενη ισχύς είναι δυνατό να κυμαίνεται ανάμεσα στο κατώτατο όριο του 0,001 watt περίπου και στο ανώτατο επίπεδο που είναι λιγότερο από 1 watt. Αυτό το χαρακτηριστικό έχει σκοπό να παρατείνει τη διάρκεια ζωής της μπαταρίας και το διαθέσιμο χρόνο ομιλίας. Μια ακόμη πτυχή ενός δικτύου κινητής τηλεφωνίας είναι ότι καθώς ο χρήστης μετακινείται ενώ συνομιλεί, το δίκτυο πρέπει να είναι σε θέση να μεταφέρει την κλήση από τον ένα σταθμό βάσης στον άλλο. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται μεταβίβαση ή μεταπομπή (handover), όταν το δίκτυο κυριολεκτικά μεταβιβάζει την κλήση από ένα σταθμό βάσης σε άλλον, και συμβαίνει αδιάλειπτα, δηλαδή χωρίς αυτός που τηλεφωνεί να αντιληφθεί την αλλαγή (**Κανάτας, 2008**).

1.5.1 Χαρακτηριστικά ακτινοβολίας κινητών τηλεφώνων

Περιοχή συχνοτήτων εκπομπής GSM (Global System for Mobile telecommunications) 900 MHz: 890-915 MHz

Περιοχή συχνοτήτων εκπομπής GSM/DCS (Digital Cellular System) 1800 MHz: 1760-1800 MHz

Σύστημα πολλαπλής πρόσβασης: time division multiple access (TDMA)

Παλμικό πεδίο: παλμοί των 4.615 msec σε 8 διαστήματα των 0.577 msec ανά χρήστη

Συχνότητα επανάληψης παλμών: 217 Hz

Μέγιστη Ισχύς εκπομπής συστήματος GSM: 2W και DCS: 1W

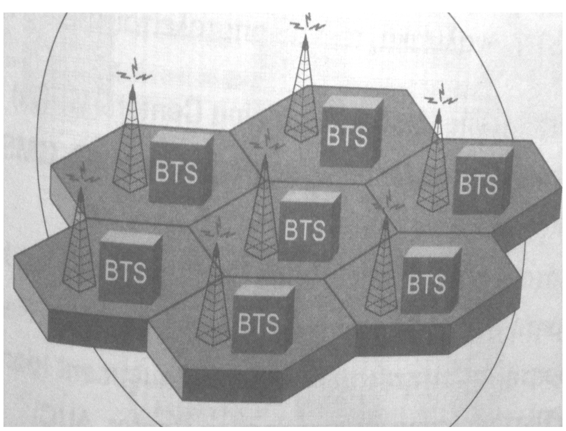
Διαμόρφωση: "Gaussian Minimum Shift Keying Modulation", (GMSK)

- Τα κινητά τηλέφωνα εκπέμπουν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία μόνον κατά τη διάρκεια της τηλεφωνικής επικοινωνίας.
- Σε κατάσταση αναμονής το κινητό στέλνει μόνο ένα βραχύ παλμό προς το δίκτυο κινητής τηλεφωνίας, ώστε να καταγραφεί η τοποθεσία του και να δηλώσει ότι είναι έτοιμο να δεχτεί κλήσεις.
- Η συνολική ισχύς που εκπέμπουν τα κινητά είναι σχετικά μικρή, ενώ διαθέτουν σύστημα αυτόματου ελέγχου της εκπεμπόμενης ισχύος τους, ώστε αυτή να περιορίζεται στην απαραίτητη για επικοινωνία με το σταθμό βάσης.
- Ο κατασκευαστής του κάθε κινητού τηλεφώνου παρέχει την τιμή για τον τοπικό SAR στο κεφάλι, μέσα στο φυλλάδιο των τεχνικών χαρακτηριστικών του κινητού.

Συνηθισμένες τιμές SAR των κινητών είναι από 0,5 έως και 1,3W/kg.

1.6 Κυψελωτό σύστημα κινητής τηλεφωνίας

Για να γίνει εφικτή η επικοινωνία θα πρέπει να παρέχεται ηλεκτρομαγνητική κάλυψη στους χρήστες. Για το λόγο αυτό χωρίζουμε μια περιοχή που θέλουμε να καλύψουμε ηλεκτρομαγνητικά σε κυψέλες. Οι κυψέλες αυτές αντιπροσωπεύουν μια γεωγραφική περιοχή κάλυψης του δικτύου του κάθε παρόχου κινητής τηλεφωνίας. Σε κάθε περιοχή (κυψέλη) χρειάζεται μια κεντρική κεραία (Base Stasion, BS) με μεγάλο εύρος μετάδοσης, για να καλύψει μια συγκεκριμένη γεωγραφική περιοχή. Υπάρχουν βέβαια και περιπτώσεις όπου ένας σταθμός βάσης εξυπηρετεί και παραπάνω κυψέλες. Οι γεωγραφικές περιοχές δηλαδή, απαρτίζονταν από ένα σύνολο κυψελών, η μορφή των οποίων εξαρτάται κυρίως από τη μορφολογία του εδάφους, αλλά για καθαρά υπολογιστικούς λόγους έχει υιοθετηθεί η αναπαράσταση μιας κυψέλης με εξάγωνο. Οι κλήσεις σε κάθε κυψέλη εξυπηρετούνται από διαύλους (κανάλια) οι οποίοι μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν συγχρόνως από άλλες κυψέλες, μη γειτονικές. Η επικοινωνία του Base Station με τον κινητό χρήστη γίνεται αμφίδρομα. Όταν το σήμα εκπέμπεται από το σταθμό βάσης προς τον χρήστη τότε έχουμε την Καθοδική Ζεύξη (DOWNLINK). Ενώ από το χρήστη προς τον σταθμό βάσης έχουμε την Ανοδική Ζεύξη (UPLINK). Η δομή αυτή των κυψελών παρέχει τη δυνατότητα εκτεταμένης επαναχρησιμοποίησης συχνότητας, έτσι ώστε χιλιάδες άνθρωποι να μπορούν να χρησιμοποιούν τα κινητά τηλέφωνα ταυτοχρόνως. Τα δίκτυα κινητής επικοινωνίας χωρίζονται σε γεωγραφικές περιοχές που ονομάζονται κυψέλες, η καθεμιά από τις οποίες εξυπηρετείται από ένα σταθμό βάσης (εικ. 1.3). Τα κινητά τηλέφωνα αποτελούν το σύνδεσμο του χρήστη με το δίκτυο. Το σύστημα είναι σχεδιασμένο έτσι ώστε να εξασφαλίζει τη διατήρηση της σύνδεσης των κινητών τηλεφώνων με το δίκτυο, καθώς οι χρήστες μετακινούνται από τη μία κυψέλη στην άλλη (**Κανάτας, 2008**).



Εικόνα 1.3. Δομή του κυψελωτού συστήματος κινητής τηλεφωνίας. Η εξαγωνική κυψέλη είναι θεμελιώδες σχήμα και αποτελεί ένα απλοποιημένο μοντέλο της ραδιοκάλυψης κάθε σταθμού βάσης που θεωρητικά τοποθετείται στο κέντρο της κυψέλης. Στο σχήμα παρουσιάζεται και ο πομποδέκτης του σταθμού βάσης (Base Transceiver Station-BTS), που παρέχει στον σταθμό βάσης τις λειτουργίες ραδιολήψης και ραδιοεκπομπής (Κανάτας, 2008).

Τα πρώτα κυψελωτά συστήματα εξυπηρετούσαν χρήστες που βρίσκονταν σε οχήματα και η ακτίνα των κυψελών εκτεινόταν σε αρκετά χιλιόμετρα. Κυψέλες με αρκετά μεγάλη ακτίνα, της τάξεως μερικών δεκάδων χιλιομέτρων, καλούνται μακροκυψέλες (macrocells). Για την υποστήριξη περισσοτέρων συνδρομητών, δηλαδή μεγαλύτερης χωρητικότητας, οι ραδιοδίαυλοι επαναχρησιμοποιούνται, μειώνοντας ταυτόχρονα την ισχύ εκπομπής από τους σταθμούς βάσης. Προκύπτουν λοιπόν μικρότερες σε έκταση κυψέλες, που καλούνται μικροκυψέλες (microcells) και έχουν ακτίνα μέχρι 1-2 Km. Τα συστήματα 2^{ης} γενιάς χρησιμοποιούν και μικροτέρες κυψέλες με ακτίνα περίπου 100-200 μέτρων, που ονομάζονται πικοκυψέλες (picocells), οι οποίες χρησιμοποιούνται ιδιαίτερα σε εσωτερικούς χώρους, αλλά και σε περιοχές υψηλής πυκνότητας τηλεπικοινωνιακής κίνησης, που ονομάζονται και hot spots (**Κανάτας, 2008**).

Με τη μείωση της ακτίνας των κυψελών επιτυγχάνεται εξυπηρέτηση υψηλής τηλεπικοινωνιακής κίνησης, αλλά απαιτείται μεγαλύτερος αριθμός σταθμών βάσης γαι την κάλυψη μίας γεωγραφικής περιοχής. Μικρές σε ακτίνα κυψέλες έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των απαιτούμενων μεταπομπών, για χρήστες που κινούνται με μεγάλη ταχύτητα. Λόγω της έκτασης της κάλυψης και των φαινομένων διάδοσης, οι μακροκυψέλες προορίζονται κυρίως για παροχή υπηρεσιών στενής ζώνης σε αγροτικές και προαστιακές περιοχές με μικρή παρεμπόδιση της διάδοσης λόγω κτιρίων αλλά με παρεμπόδιση λόγω της βλάστησης. Οι σταθμοί βάσης των μακροκυψελών τοποθετούνται συνήθως σε ψηλούς πύργους με καλή ορατότητα της περιοχής κάλυψης. Οι σταθμοί βάσης των μικροκυψελών τοποθετούνται συνήθως πάνω από στέγες κτιρίων και προορίζονται για παροχή υπηρεσιών στενής ζώνης. Οι σταθμοί βάσης των πικοκυψελών τέλος τοποθετούνται στο επίπεδο των δρόμων σε ύψη μέχρι 4 μέτρα, όπως επίσης και σε εσωτερικούς χώρους όπως διαδρόμους και ανελκυστήρες.

Όμως υπάρχει και η κατηγορία των δορυφορικών συστημάτων που καλούνται megacells καλύπτοντας μεγάλες γεωγραφικές περιοχές. Με την εξέλιξη της τεχνολογίας των κεραιών είναι πιθανή η παροχή ακόμη και μακροκυψελών από δορυφόρους χαμηλής τροχιάς ή από πλατφόρμες που παραμένουν στη στρατόσφαιρα (**Κανάτας, 2008**).

Επίσης, σημειώνεται ότι η θέση των σταθμών βάσης προσδιορίζεται και από την απαίτηση για οπτική επαφή μεταξύ τους, ώστε να είναι δυνατή η άμεση διασύνδεσή τους με μικροκυματικό κανάλι (**Λιολιούσης, 1997**).

1.7 Όρια επικινδυνότητας

Όπως και στην περίπτωση των ιονιζουσών ακτινοβολιών έτσι και στη μη ιονίζουσα ακτινοβολία έχουν καθοριστεί όρια επικινδυνότητας και όχι όρια ασφαλείας γιατί καμία δόση ακτινοβολίας δεν μπορεί να χαρακτηρισθεί ασφαλής όσο μικρή και είναι αυτή. Κατά καιρούς έχουν προταθεί όρια επικινδυνότητας όπως 0.1, 1 και 10 mW/cm^2, ενώ στην πρώην Σοβιετική Ένωση προτείνεται και το όριο των $10\mu W/cm^2$.

Τα όρια επικινδυνότητας που έχουν προταθεί έως σήμερα διαφέρουν σημαντικά και ανάλογα με τον επιστημονικό οργανισμό που τα καθιερώνει και το κράτος που τα αποδέχεται. Ο βασικότερος λόγος της διαφοράς τους είναι η διαφορετική εκτίμηση ως προς τον τρόπο αλληλεπίδρασης των πεδίων με τους βιολογικούς ιστούς. Όταν λαμβάνονται υπ'όψιν κυρίως τα **θερμικά αποτελέσματα** τα όρια είναι αρκετά **υψηλά**, ενώ όταν λαμβάνονται υπ'όψιν κυρίως οι **μη θερμικές επιδράσεις** των πεδίων αυτών στους ιστούς τα όρια αυτά είναι σημαντικά **χαμηλότερα**.

Όρια επικινδυνότητας:

1) **IRPA**. Τα όρια αυτά θεωρούνται τα πιο έγκυρα και ακολουθούνται από πολλές χώρες. Καθιερώθηκαν από την Διεθνή Επιτροπή για τη μη-ιονίζουσα ακτινοβολία ICNIRP (International Commitee of Non-Ionizing Radiation) και τη Διεθνή Εταιρεία Ακτινοπροστασίας IRPA (International Radiation Protection Association) σε συνεργασία με το τμήμα περιβαλλοντικής υγείας του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας-WHO (World Health Organization). Τα όρια επικινδυνότητας αναφέρονται σε τιμές πυκνότητας ισχύος και διαφέρουν σημαντικά για τον γενικό πληθυσμό και για τους εργαζομένους σε επιβαρυμένο από έκθεση σε Η/Μ ακτινοβολία περιβάλλον. Οι μέσες τιμές για οποιοδήποτε χρονικό διάστημα 6min κατά τη διάρκεια ενός 24ώρου για το γενικό πληθυσμό είναι η τιμή πυκνότητας ισχύος $0.45mW/cm^2$ (για τη συχνότητα των 900MHz) ή η τιμή SAR 0.08W/kg για ολόσωμη έκθεση. (**IRPA, 1988; ICNIRP, 1998**).

2) **ANSI**. Τα όρια αυτά θεσπίστηκαν από το Αμερικανικό Ινστιτούτο

Εθνικών Ορίων ANSI (American National Standard Institute) το 1992. Τα όρια αυτά μέχρι τη συχνότητα των 100 MHz δίνονται σε τιμές έντασης πεδίου, από 300MHz-300GHz σε τιμές πυκνότητας ισχύος, ενώ στα 100-300MHz και με τους δύο τρόπους.

3) **Χωρών της Ανατολικής Ευρώπης**. Τα όρια επικινδυνότητας για τις μη-ιονίζουσες ακτινοβολίες είχαν καθιερωθεί από την πρώην Σοβιετική Ένωση και ισχύουν μέχρι σήμερα. Αποτελούν χαρακτηριστικό παράδειγμα εκτίμησης των μη θερμικών επιδράσεων της Η/Μ ακτινοβολίας στα βιολογικά συστήματα. Είναι χαρακτηριστική η αυστηρότητά τους σε σχέση με τα προαναφερόμενα όρια αφού αναφέρουν για τον γενικό πληθυσμό όρια μέχρι και 200 φορές χαμηλότερα από τα προηγούμενα (**Λιολούσης, 1997**).

Τα όρια αποδεκτής έκθεσης στην ακτινοβολία από σταθμούς βάσης κινητής τηλεφωνίας σε διάφορες χώρες διαφέρουν. Για παράδειγμα στην Κίνα το όριο της τιμής πυκνότητας ισχύος είναι 40 μW/cm^2, στη Ρωσία, την Ιταλία και την Πολωνία 10 μW/cm^2. Χαρακτηριστική η απόφαση μείωσης των ορίων στο Λιχτενστάιν από 9.5 μW/cm^2 (6 V/m) σε 0.095 μW/cm^2 (0.6 V/m).

Η **ελληνική νομοθεσία** (νόμος 3431/2006 (ΦΕΚ 13 Α', άρθρο 31) εφαρμόζει **αυστηρότερα όρια,** σε επίπεδα **70%** (και κατά περίπτωση **60%** για σχολεία, βρεφονηπιακούς σταθμούς, γηροκομεία και νοσοκομεία) εκείνων που έχει προτείνει ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας, δηλαδή περίπου **630μW/cm^2** για τη συχνότητα των 1800MHZ. και **315μW/cm^2** για τη συχνότητα των 900MHz.

Παρά τη μείωση αυτή, οι τιμές εξακολουθούν να **είναι μεγαλύτερες αυστηρότερων ορίων άλλων χωρών.** Όπως προαναφέρθηκε, στην πρώην Σοβιετική Ένωση όπου οι βιολογικές επιδράσεις των ΗΜΠ και τα μη-θερμικά φαινόμενα ήταν ήδη υπό διερεύνηση αρκετές δεκαετίες πριν αρχίσει η σχετική έρευνα στη Δύση. Το αντίστοιχο όριο που είχε θεσπιστεί είναι **1 μW/cm^2** (0,4 V/m) (**Λιολιούσης, 1997**). Το αντίστοιχο όριο που ισχύει σήμερα στη Ρωσία είναι **10 μW/cm^2** (3 V/m) (Russian EMF Safety Standards).

Η συσσώρευση ενός μεγάλου όγκου δεδομένων, τα τελευταία χρόνια, που μιλούν για επιπτώσεις της ακτινοβολίας των ραδιοσυχνοτήτων, με τιμές έντασης ή SAR εντός των θεσπισμένων ορίων αποδεκτής έκθεσης, σε ποικίλα βιολογικά συστήματα, έχει κινητοποιήσει την επιστημονική κοινότητα και τους αρμόδιους Οργανισμούς, που πλέον προτείνουν νέα πολύ αυστηρότερα όρια της τάξεως των 0.00033 W/kg για την τιμή SAR και 0.17 μW/cm^2 για την τιμή πυκνότητας ισχύος (**Fragopoulou et al., 2010c**), ενώ κατατάσσουν την έκθεση σε αυτού του τύπου την ακτινοβολία ως πιθανό καρκινογόνο παράγοντα κατηγορίας 2Β, αντίστοιχο των καυσαερίων, του DDT και του μολύβδου (**WHO, 2012**). Τέλος, αναγκαίος κρίνεται ο περιορισμός της έκθεσης στα σήματα της ακτινοβολίας GSM, καθώς συγκριτικά με άλλου τύπου ακτινοβολίες, που συνυπάρχουν στο καθημερινό μας περιβάλλον, όπως ακτινοβολία από ασύρματο τηλέφωνο DECT, από ραδιοφωνικούς σταθμούς FM, από ασύρματα ευρυζωνικά δίκτυα Wimax (Worldwide Interoperability for Microwave Access), από συστήματα κινητής τηλεφωνίας 3^{ης} γενιάς (3G) UMTS (Universal Mobile Telecommunications System) και 4^{ης} γενιάς (4G) LTE (Long Term Evolution), τα σήματα GSM φαίνεται ότι είναι τα περισσότερο επιβαρυντικά (**Joseph et al., 2010**).

1.8 Καταγεγραμμένες βιολογικές επιδράσεις σε RF-μικροκυματικά πεδία

Πλήθος βιολογικών επιδράσεων και σε ποικίλα βιολογικά συστήματα έχουν καταγράψει ερευνητικές μελέτες που αφορούν σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία παγκοσμίως. Ο αριθμός των μελετών αυτών αυξάνεται όλο και περισσότερο τα τελευταία χρόνια με τη διερεύνηση των επιδράσεων αυτών σε πολλά διαφορετικά επίπεδα, με τη χρήση διαφορετικών συστημάτων έκθεσης και σε πλήθος βιολογικών συστημάτων, ενώ μέρος της έρευνας επιχειρεί να αναδείξει τους ακριβείς μηχανισμούς δράσης των πεδίων αυτών στα κύτταρα. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι επιδράσεις της ακτινοβολίας, όπως έχει διαπιστωθεί και πειραματικά, είναι μη θερμικές (**Panagopoulos et al., 2004; Panagopoulos and Margaritis, 2008),** ενώ είναι γεγονός ότι η αντίδραση π.χ. ενός κυττάρου στον στρεσογόνο παράγοντα της ακτινοβολίας εξαρτάται από τις συνθήκες έκθεσης, όπως τη συχνότητα και ένταση της ακτινοβολίας, τη διάρκεια και τον τρόπο έκθεσης, όσο και από τον κυτταρικό τύπο και την κατάσταση αυτού κατά τη διάρκεια της έκθεσης (**Remondini et al., 2006; Nylund and Leszczynski 2006**).

1.8.1 Επιδράσεις στο DNA

Η επίδραση της RF ακτινοβολίας στο DNA υπήρξε αντικείμενο μελέτης των Lai και Singh (1995, 1996), σύμφωνα με τους οποίους η έκθεση αρουραίων σε παλμικό και συνεχές κύμα συχνότητας 2450-MHz, τιμή SAR 0.6-1.2 W/kg και πυκνότητα ισχύος 2 mW/cm^2 για 2 h αυξάνει το ποσοστό των DNA μονόκλωνων και δίκλωνων θραύσεων στα εγκεφαλικά τους κύτταρα (**Lai and Singh, 1995; 1996).** Όμως και σε ανθρώπινα κύτταρα (λευχαιμικά) διαπιστώθηκαν βλάβες στο DNA μετά από έκθεση σε συχνότητες 813.5625 MHz και 836.55 MHz και μάλιστα σε πολύ χαμηλή τιμή SAR (0.0024W/kg) (**Phillips et al., 1998**). Μετέπειτα ερευνητική μελέτη (**Diem et al., 2005**) κατέγραψε επίσης υψηλό ποσοστό DNA θραύσεων σε ανθρώπινους ινοβλάστες και σε κύτταρα αρουραίων μετά από τη διακοπτόμενη έκθεση (5 min on/10 min off) στην ακτινοβολία των 1800 MHz, σε τιμή SAR 1.2 και 2 W/kg για χρονική διάρκεια 16 και 24 h. Η ερευνητική ομάδα του Belyaev (2005) αναφέρεται επίσης στην παρεμπόδιση της επιδιόρθωσης των επαγομένων από την ακτινοβολία DNA βλαβών σε συγκεκριμένες συνθήκες έκθεσης μικροκυματικών πεδίων, ενώ σε επόμενες μελέτες γίνεται λόγος για επίδραση της ακτινοβολίας GSM-915 MHz στη συμπύκνωση της χρωματίνης, καθώς και στα επίπεδα ανίχνευσης 53BP1/g-H2AX DNA συμπλόκων επιδιόρθωσης σε λεμφοκύτταρα από υγιή και υπερευαίσθητα άτομα (**Sarimov et al., 2004; Belyaev et al., 2005; Markova et al., 2005**). Αντίστοιχα εμφανίζονται και τα αποτελέσματα της μελέτης της ίδιας ερευνητικής ομάδας στα συστήματα GSM και UMTS, με ανάλυση των δειγμάτων μετά από 72 h από τη στιγμή της έκθεσης (**Belyaev et al., 2009**). Οι δύο επόμενες μελέτες των Sun και Lixia (**Sun and Lixia, 2006**) είναι σχεδόν ταυτότημες επιβεβαιώνοντας η μία τα αποτελέσματα της άλλης, καθώς αναφέρονται σε επαγωγή DNA θραύσεων και γενικά DNA βλαβών σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του φακού μετά από 2 hrs έκθεση στα 1.8GHz σε τιμές SAR 3 και 4 W/kg και έλεγχο των επιδράσεων μετά από 0 και 30 min. Επιπλέον, DNA θραύσεις και μικροπυρήνωση σε λεμφοκύτταρα χρηστών κινητών τηλεφώνων έχουν βρεθεί από τους Gandhi και Anita, (**Gandhi and Anita, 2005**). DNA βλάβες σε σπερματοζωάρια μυών μετά από την έκθεσή τους στα 900 MHz, και σε τιμή SAR 0.09 W/kg, για 7 μέρες και για 12 h ημερησίως, έχουν βρεθεί και από τη μελέτη του Aitken (2005), τόσο στο μιτοχονδριακό όσο και στο γενωμικό DNA (**Aitken et al., 2005**). Ομοίως, σε κύτταρα μυών αλλά σε αδιαφοροποίητα εμβρυονικά ανιχνεύθηκε αυξημένο ποσοστό DNA δίκλωνων θραύσεων μετά από έκθεση στην ακτινοβολία GSM-1.71GHz (**Nikolova et al., 2005**). Τέλος, σε κύτταρα πνευμόνων κινεζικών χάμστερ που εκτέθηκαν στα 1800MHz και σε SAR 3.0W/kg επήλθε αύξηση των DNA βλαβών μετά από 24ωρη έκθεση (**Zhang et al., 2006**).

Αρκετές είναι επίσης οι ερευνητικές μελέτες που δεν αναφέρουν γενοτοξικές επιδράσεις της ακτινοβολίας. Για παράδειγμα, μελέτες σε ανθρώπινα κύτταρα γλοιοβλαστώματος και σε ινοβλάστες μυών οι ακτινοβολίες των 2450MHz, 835.62MHz και 847.74 MHz και σε τιμή SAR 0.6W/kg δεν επέφεραν DNA θραύσεις (**Malyapa et al., 1997a;b**). Επίσης, σε κύτταρα Molt-4 και κατά τη σύγκριση των επιδράσεων και από τα τρία συστήματα πολλαπλής πρόσβασης (FDMA, TDMA και CDMA) δεν διαπιστώθηκε αυξημένο ποσοστό DNA βλαβών (**Hook et al., 2004**). Χαρακτηριστική είναι και η μελέτη του Verschaeve (2005), στην οποία η μακροπρόθεσμη έκθεση (2 χρόνια) αρουραίων σε ακτινοβολία GSM-900 MHz, SAR 0.3 και 0.9 W/kg, 2h/day, 5days/week δεν είχε επίδραση στο γενετικό τους υλικό (**Verschaeve, 2005**). Όσον αφορά σε ανθρώπινα κύτταρα, έρευνες δεν ανιχνεύουν επιδράσεις στο DNA των λεμφοκυττάρων μετά την έκθεση στα 2450 MHz, SAR 2W/kg, για 2h (**Vijayalaxmi et al., 2000**), ούτε σε λευκοκύτταρα μετά από έκθεση στην ακτινοβολία GSM-900 MHz, SAR 0.3 και 1 W/kg, για 2h (**Zeni et al., 2005**).

Περισσότερο πρόσφατες μελέτες, μιλούν για την επίδραση στο DNA από τη διαμορφωμένη στα 217 Hz GSM-1.8 GHz ακτινοβολία, και σε SAR 2 W/kg, που έχει ανιχνευθεί σε ανθρώπινους τροφοβλάστες μετά τις 16 και 24h έκθεσης (**Franzellitti et al., 2010**). Γενοτοξική όμως επίδραση εξαρτώμενη από τη δόση και τη διάρκεια έκθεσης στην ακτινοβολία του συστήματος UMTS-1950 MHz αυτή τη φορά, σε τιμές SAR 0.05 και 0.1 W/kg, έχει διαπιστωθεί και σε ινοβλάστες (**Schwarz et al., 2008**), ενώ έχει γίνει και σχετική ανασκόπηση των επιδράσεων της ακτινοβολίας σε αυτό το επίπεδο (**Phillips et al., 2009**). Σε νεφρικά και ηπατικά κύτταρα αρουραίων ανιχνεύθηκαν DNA θραύσεις λόγω έκθεσης στα 915MHz και SAR 0.6 W/kg (**Trosic et al., 2011**). Ευαισθησία όμως, και μάλιστα σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό, ελλείψει μηχανισμών προστασίας και επιδιόρθωσης εμφανίζει και το μιτοχονδριακό DNA, σύμφωνα με τα αποτελέσματα μελέτης σε νευρικά κύτταρα του φλοιού μετά από έκθεση στα 1800 MHz και SAR 2W/kg, που αποκάλυψε την οξειδωτική βλάβη αυτού (**Xu et. al., 2009**). Χαρακτηριστική επίσης είναι η διαπίστωση πρόκλησης μονόκλωνων DNA θραύσεων σε χρήστες μετά από έκθεση στο πεδίο κινητού τηλεφώνου για μόλις 15-30 min στα κύτταρα του τριχωτού της κεφαλής κοντά στη περιοχή επαφής με τη συσκευή του τηλεφώνου (**Cam and Seyhan, 2012**). Πολλές μελέτες, όπως θα αναφερθεί και στη συνέχεια, συνδέουν την έκθεση στα πεδία κινητών τηλαφώνων με την αυξημένη παραγωγή ενώσεων ROS και κατ'επέκταση την οξείδωση και βλάβη του DNA και στα αναπαραγωγικά κύτταρα (**De luiliis et al., 2009; Kesari et al., 2012**). Χαρακτηριστικά τέλος είναι τα αποτελέσματα πρόσφατης μελέτης, που κάνουν λόγο για DNA θραύσεις, παράλληλα με χρωμοσωμικές ανωμαλίες και μικροπυρήνωση σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων εκτεθειμένων για μικρή χρονική διάρκεια (5-30 λεπτά), σε πεδίο συχνότητας 1950 MHz και SAR 2W/kg (**El-Abd and Eltoweissy, 2012**).

1.8.2 Επιδράσεις στο γονιδίωμα και τα χρωμοσώματα

Η έρευνα του Sarkar σε ακτινοβολημένους μύες (1994) στη συχνότητα των 2450MHz και πυκνότητα ισχύος 1mW/cm^2 για 2 h/day και για μακροπρόθεσμη έκθεση των 120, 150 και 200 ημερών έδειξε ανασυνδυασμό τμημάτων DNA στους όρχεις και στα κύτταρα του εγκεφάλου (**Sarkar et al., 1994**). O Mashevich και οι συνεργάτες του (2003) μελετώντας τα ανθρώπινα περιφερειακά λεμφοκύτταρα στην συνεχή ακτινοβολία των 830-MHz EMF, SAR 1.6-8.8 W/kg, για 72 h διαπίστωσαν υψηλό ποσοστό εμφάνισης χρωμοσωμικής ανευπλοειδίας και κατ'επέκταση αυξημένη πιθανότητα καρκινογένεσης. Το γεγονός ότι οι επιδράσεις της ακτινοβολίας είναι μη θερμικές αποτέλεσε διαπίστωση και αυτής της μελέτης (**Mashevich et al., 2003**). Σύμφωνα με τη μελέτη του Gadhia (2003), οι χρήστες κινητών τηλεφώνων εμφανίζουν αύξηση δικεντρικών χρωμοσωμάτων σε κύτταρα του αίματος (**Gadhia et al., 2003**). Η μελέτη των Sarimov και συν. (2004) σχετικά με την επίδραση της ακτινοβολίας των 895-915 MHz με τιμή SAR 5.4 mW/kg στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα κατέληξε σε στατιστικά σημαντική διαφορά του βαθμού συμπύκνωσης χρωματίνης, μία επίδραση που φαίνεται να είναι αντίστοιχη με την αντίδραση στρες, ενώ οι επιδράσεις διαφέρουν στις διαφορετικές συχνότητες και μεταξύ διαφορετικών δοτών (**Sarimov et al., 2004**).

Σύμφωνα με άλλες έρευνες όπως του Takahashi (2002), σε εκτεθειμένους μύες στα 1.5 GHz στην περιοχή του κεφαλιού και σε τιμές SAR 2.0, 0.67 W/kg, για 90 min/day, για 5 days/week και συνολικά για 4 εβδομάδες δεν διαπιστώθηκε αυξημένο ποσοστό εμφάνισης μεταλλαγών (**Takahashi et al., 2002**). Στο ίδιο πειραματόζωο, αλλά σε θηλυκά άτομα και σε κατάσταση εγκυμοσύνης πραγματοποιήθηκε διακοπτόμενη έκθεση (10 seconds on, 50 seconds off, 4.3 W/kg κατά τη διάρκεια των 10 secs έκθεσης) για 16 hrs ημερησίως, από την εμβρυονική ημέρα 0 έως την 15η. Στην ηλικία των 10 εβδομάδων, οι συχνότητες μεταλλαγής του γονιδίου lacZ στον σπλήνα, το ήπαρ, τον εγκέφαλο και τους όρχεις δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ εκτεθειμένων και μη οργανισμών (**Ono et al., 2004**).

1.8.3 Επίδραση στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων

Από τις πρώτες μελέτες σχετικά με την επίδραση της ακτινοβολίας στα επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης είναι των Harvey και French, (1999) σε ανθρώπινα μονοκύτταρα HMC-1 που κατέδειξε μεταβολές στα μεταγραφικά επίπεδα 3 από τα 558 γονίδια, ενός πρωτο-ογκογονιδίου c-kit (αύξηση επιπέδων), ενός αποπτωτικού του DAD-1 (μείωση επιπέδων) και ενός γονιδίου αναστολέα όγκων NDPK (μείωση επιπέδων) μετά από έκθεση στα 864.3-MHz CW, SAR 7W/kg, 3 εκθέσεις των 20 min (4h intervals)/day x7days) (**Harvey and French, 1999**). Αυξημένα ποσοστά έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με μιτογενετικές διαδικασίες, την κυτταρική ανάπτυξη και το μονοπάτι της απόπτωσης ανιχνεύθηκαν και από την έρευνα του Pacini (**Pacini et al., 2002**) σε ανθρώπινους ινοβλάστες του δέρματος μετά από έκθεση στο πεδίο GSM 902.4 MHz, σε τιμή SAR 0.6 W/kg, για 1h. Τα αποτελέσματα των Nylund και Leszczynski (2004) στην ανθρώπινη ενδοθηλιακή κυτταρική σειρά EA.hy926, κατέγραψε μεταβολές στην έκφραση 3600 γονιδίων σχετιζομένων με την απόπτωση και τους παράγοντες Fas/TNFa ύστερα από έκθεση στην ακτινοβολία GSM-900 MHz, SAR 2.4 W/kg, για 1h (**Nylund και Leszczynski, 2004**), ενώ η σύγκριση αυτής της κυτταρικής σειράς με την EA.hy926v1 (**Nylund and Leszczynski, 2006**), επισημαίνει το διαφορετικό πρότυπο μεταβολών έκφρασης του συνόλου των γονιδίων στις 2 κυτταρικές σειρές (GSM-900 MHz, SAR 2.8 W/kg, για 1h). Η έρευνα του Belyaev (2006) σε εγκεφαλικά κύτταρα αρουραίων στο πεδίο GSM-915 MHz, SAR 0.4mW/g για 2h, κατέδειξε επίδραση στην έκφραση 12 γονιδίων χωρίς θραύσεις στο DNA ούτε μεταβολές στη διαμόρφωση της χρωματίνης (**Belyaev et al., 2006**). Επίσης, μεταβολές στην έκφραση 221 και 759 γονιδίων μετά τις 2h και 6h έκθεσης αντιστοίχως, σχετιζομένων με την απόπτωση και τον κυτταρικό κύκλο σε HL60 κύτταρα στα 2.45 GHz και με SAR 10 W/kg αναφέρονται από τον Lee (**Lee et al., 2005**). Από τις πιο χαρακτηριστικές μελέτες είναι αυτή του Remondini (2006) με τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν για ριβοσωμικές πρωτεϊνες σε διαφόρους ανθρώπινους κυτταρικούς τύπους (ενδοθηλιακά, νευροβλαστώματος, λευχαιμικά κλπ.) μετά από *in vitro* έκθεση στα 900 και 1800 MHz (**Remondini et al., 2006**).

Αντιθέτως, άλλες έρευνες δεν αποδεικνύουν επίδραση της ακτινοβολίας στα επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης, όπως των Gurisik και συν. (**Gurisik et al., 2006**) σε ανθρώπινα κύτταρα νευροβλαστώματος (SK-N-SH) μετά την έκθεση σε πεδίο GSM-900 MHz και SAR 0.2 W/kg, για 2h, όπως και σε κύτταρα μυών από τον Whitehead (Whitehead et al., 2006) με ακτινοβόληση στα 835.62 MHz (FDMA) και 847.74 MHz (CDMA) και SAR 5 W/kg, για 24h.

Πιο σύγχρονη μελέτη, σημειώνει τη σημαντική μεταβολή της έκφρασης των γονιδίων Egr-1, Mbp στους νευρώνες αρουραίων, που παρατηρήθηκε ως αποτέλεσμα τόσο της διακοπτόμενης όσο και της συνεχούς έκθεσης στην ακτινοβολία των 1800 MHz για 24h και σε τιμή SAR 2W/kg. Οι πρωτεϊνες των γονιδίων αυτών σχετίζονταν κυρίως με λειτουργίες του κυτταροσκελετού, με μονοπάτια μεταγωγής σήματος, το μεταβολισμό και άλλες κυτταρικές συνιστώσες, ενώ η επίδραση των πεδίων ήταν πολύ πιο έντονη στην περίπτωση της διακοπτόμενης έκθεσης σε σύγκριση με τη συνεχή και μάλιστα στην έκθεση των 24h και όχι σε αυτή των 6h (**Zhang et al., 2008**).

Επίσης, πλήθος μελετών μιλούν για την εμφάνιση οξειδωτικού στρες λόγω της έκθεσης στην ακτινοβολία. Η μελατονίνη, διαπιστώθηκε ότι παρέχει προστασία απέναντι στο οξειδωτικό στρες που επάγεται μετά τη χρόνια έκθεση στην ακτινοβολία των κινητών τηλεφώνων σε εγκεφαλικά κύτταρα αρουραίων (**Sokolovic et al., 2008**). Πιο συγκεκριμένα, αξιοσημείωτη αύξηση της μαλονδιαλδεϋδης (MDA) καθώς και της καρβονυλίωσης διαπιστώθηκε μετά την έκθεση για 20, 40 και 60 ημέρες των πειραματοζώων στην ακτινοβολία και σε τιμές SAR 0.043-0.135 W/kg. Παράλληλα μειώθηκε η ενεργότητα της καταλάσης ενώ αυξήθηκε η δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης. Η προσθήκη μελατονίνης είχε ως αποτέλεσμα απέτρεψε τα υψηλά επίπεδα της MDA και της ενεργούς οξειδάσης ενώ δεν επηρέασε την περιορισμένη ενεργότητα της καταλάσης και άρα την εκτεταμένη καρβονυλίωση. Προστασία όμως απέναντι στη δράση της ακτινοβολίας των τηλεφώνων παρέχει και η βιταμίνη C όπως έχει διαπιστωθεί μετά από έκθεση στον ιστό των ματιών των αρουραίων (**Balci et al., 2007**).

Μεταβολή των επιπέδων έκφρασης ενός πλήθους πρωτεϊνών, που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, το θερμικό σοκ, τον κυτταροσκελετό και την απόπτωση, κατέδειξε πολύ πρόσφατη μελέτη ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου μας, μετά από έκθεση Balb/c μυών σε τιμές SAR 0,17-0,37 W/kg ακτινοβολίας κινητού τηλεφώνου και μελέτη των εγκεφαλικών τους κυττάρων (3h/day x 8 months) (**Fragopoulou et al., 2012**).

1.8.4 Επίδραση στα επίπεδα πρωτεϊνών θερμικού σοκ

Η αντίδραση στρες των κυττάρων διαπιστώνεται κυρίως μέσω της ανίχνευσης υψηλών επιπέδων των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (HSP). Σύμφωνα με τη μελέτη του Shallom (**Shallom et al., 2002**), σε έμβρυα πτηνών, η ακτινοβολία των 915 MHz, είχε ως αποτέλεσμα επαγωγή της σύνθεσης της HSP70. Αντίστοιχη επίδραση στην ίδια πρωτεϊνη είχε και η ακτινοβολία 900 και 1900 MHz, στο έντομο *Drosophila melanogaster* από τον Weisbrot (**Weisbrot et al., 2003**). Ομοίως αυξημένα επίπεδα της HSP70 παρατηρήθηκαν από τον Czyz (**Czyz et al., 2004**), σε εμβρυονικά αδιαφοροποίητα κύτταρα με έλλειψη του γονιδίου p53 μετά από έκθεση στη διαμορφωμένη ακτινοβολία των 1.71 GHz. Ο Leszczynski (**Leszcynski et al., 2002**) καταδεικνύει την ενεργοποίηση του μονοπατιού στρες hsp27/p38MAPK στα ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα στα 900 MHz. Επίσης, η μελέτη του Caraglia (**Caraglia et al., 2005**) σε ακτινοβολημένα ανθρώπινα επιδερμικά καρκινικά κύτταρα στη συχνότητα των 1.95MHz για 3 h, αναφέρει την απενεργοποίηση του μονοπατιού ras/Erk και επαγωγή της απόπτωσης, αύξηση της JNK-1 και ενεργοποίηση της σύνθεσης των HSP70/27.

1.8.5 Επίδραση στην ενεργότητα ενζύμων

Περιορισμένη ενεργότητα επέδειξε η πρωτεϊνική κινάση C (PKC) μετά από την έκθεση λεμφοκυττάρων σε πεδίο συχνότητας 450 MHz και πυκνότητας ισχύος 1mW/cm^2 με διαμόρφωση στα 15, 40 και 60 Hz (**Byus et al., 1984**). Οι ίδιοι ερευνητές διαπίστωσαν αύξηση της ενεργότητας της δικαρβοξυλάσης της ορνιθίνης (ODC) σε ορισμένες κυτταρικές σειρές, όπως σε αυτή του μελανώματος 294T, μετά από έκθεση και πάλι στη συχνότητα των 450MHz και πυκνότητα ισχύος 1mW/cm^2 αλλά διαμορφωμένη στα 16 Hz (**Byus et al., 1988**). Πολύ χαρακτηριστική υπήρξε η διαπίστωση του Barteri (**Barteri et al., 2005**) σχετικά με τη επίδραση της ακτινοβολίας στα δομικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά της ακετυλοχολινεστεράσης, ενός ενζύμου του κεντρικού νευρικού συστήματος, μετά από 2h έκθεση του υδατικού διαλύματος αυτού στο μακρινό πεδίο της κεραίας κινητού τηλεφώνου.

1.8.6 Επιδράσεις στα ιόντα Ca^{+2}

Σύμφωνα με πρόσφατη σχετικά μελέτη η RF ακτινοβολία είναι ικανή να μεταβάλλει τα ενδοκυτταρικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος που σχετίζονται με πρωτεΐνες, η δράση των οποίων εξαρτάται από τα ιόντα Ca, γεγονός που καταδεικνύει τη διαταραχή της ομοιόστασης των ιόντων ως αποτέλεσμα της έκθεσης στο πεδίο. Παράδειγμα αποτελούν οι πρωτεΐνες καλμπιντίνη CB και καλρετινίνη CR όπως διαπιστώθηκε στα εγκεφαλικά κύτταρα του ιπποκάμπου μυών εκτεθειμένων σε συχνότητα 835 MHz για διαφορετικούς χρόνους και τιμές SAR (1 h/day (5x24h) SAR=1.6 W/kg, 1 h/day (5x24h) SAR=4.0 W/kg, 5 h/day (24h) at SAR=1.6 W/kg, 5 h/day (24h) SAR=4.0 W/kg, ημερήσια έκθεση για 30 ημέρες SAR=1.6 W/kg) (**Maskey et al., 2010**). Αυξημένα επίπεδα mRNA που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που σχετίζονται με την Ca-ATPάση και τους αυξητικούς παράγοντες των νευρικών και ενδοθηλιακών κυττάρων ανιχνεύθηκαν στα εγκεφαλικά κύτταρα αρουραίων μετά την μακροπρόθεσμη έκθεση στην ακτινοβολία (6h/day x 126 days) (**Yan et al., 2008**). Πρόσφατη έρευνα σε νευρικά κύτταρα επεκτείνει τη δράση των πεδίων στη μεταβολική δραστηριότητα και πιο συγκεκριμένα στο μεταβολισμό της γλυκόζης. Η επίδραση αυτή αποδίδεται στην απελευθέρωση των ιόντων Ca από τα κύτταρα, λόγω της αλληλεπίδρασής τους με την πλασματική μεμβράνη, συνοδευόμενη από αυξημένη έκκριση νευροδιαβιβαστών (**Volkow et al., 2011**). Όσον αφορά στη δράση των RF πεδίων με την πλασματική μεμβράνη, στοιχεία προκύπτουν και από διερεύνηση σχετικά με τις «αιχμές» (spikes) των ιόντων Ca, που σημείωσαν σημαντική αύξηση σε προγονικά νευρικά κύτταρα (**Rao et al., 2008**).

1.8.7 Επαγωγή οξειδωτικού στρες

Πιο συγκεκριμένα, τα επίπεδα της λιπιδικής υπεροξειδάσης στην πλασματική μεμβράνη των ερυθροκυττάρων αυξήθηκαν, ενώ η ενεργότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως της υπεροξειδικής δυσμουτάσης (SOD) και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης μειώθηκαν (GSH-Px) σημαντικά μετά από 1, 2 και 4 h έκθεσης των χρηστών στην ακτινοβολία και σε κατάσταση αναμονής του κινητού τηλεφώνου (**Moustafa et al., 2001**). Επίσης, μεταβολές στα επίπεδα των αντιοξειδωτικών ενζύμων, αλλά και των οξειδωτικών παραγόντων μετά από έκθεση κουνελιών στο πεδίο GSM-900MHz παρατηρήθηκαν και σε επόμενη μελέτη (**Irmak et al., 2002**). Σε μετέπειτα μελέτες εκτεταμένη οξειδωτική βλάβη διαπιστώθηκε και στο νεφρό αρουραίων μέσα από τα υψηλά επίπεδα της MDA σε συνδυασμό με τη μείωση αυτών των αντιοξειδωτικών ενζύμων SOD, καταλάσης (CAT) και GSH-Px λόγω της έκθεσης στα 900 MHz για 30min/day για 10x24h, ενώ στην ίδια μελέτη αποκαλύφθηκε ο προστατευτικός ρόλος της μελατονίνης (**Oktem et al., 2005**). Η αντιοξειδωτική δράση της μελατονίνης επιβεβαιώθηκε και από άλλες ερευνητικές μελέτες στο ίδιο πειραματόζωο εκτεθειμένο σε παρόμοιες συνθήκες και πιο συγκεκριμένα στα κύτταρα του ιπποκάμπου και του εγκεφαλικού φλοιού (**Köylü et al., 2006**), αλλά και στα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς (**Ozguner et al., 2006**). Στα εγκεφαλικά κύτταρα του ίδιου οργανισμού δεδομένα και από άλλες ομάδες καταλήγουν στην επαγωγή του οξειδωτικού στρες μετά την έκθεση στα 900 MHz για 1h/day για 7x24h. Οι μεταβολές ανιχνεύθηκαν μέσω της καταμέτρησης των επιπέδων της MDA και του νιτρικού οξέος (NO), επίπεδα τα οποία σημείωσαν αύξηση, αλλά των ενζύμων SOD και GSH-Px που αντιθέτως μειώθηκαν (**Ilhan et al., 2004**).

Τα επίπεδα της MDA όμως βρέθηκαν αυξημένα και σε μελέτη που διεξήχθη με πειραματόζωα χοίρους μετά από έκθεση στην ακτινοβολία των 890 και 915 MHz (217-Hz παλμικό πεδίο, 2-W μέγιστη ισχύς, SAR 0.95 W/kg) για 12 h/day (11-h 45-min stand-by and 15-min κατάσταση ομιλίας) για 30x24h. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν τα επίπεδα της MDA αυξήθηκαν, αντιθέτως αυτά των αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως GSH και της CAT μειώθηκαν, ενώ τα επίπεδα των βιταμινών A, E και D δεν εμφάνισαν μεταβολή στους εγκεφαλικούς ιστούς των εκτεθειμένων οργανισμών. Τα ποσοστά της MDA, των βιταμινών A, D και E, καθώς και της καταλάσης αυξήθηκαν στα δείγματα αίματος των εκτεθειμένων πειραματοζώων (**Meral et al., 2007**). Επαγωγή του οξειδωτικού στρες όμως έχει διαπιστωθεί και στο ήπαρ χοίρων ως αποτέλεσμα της έκθεσης στο GSM πεδίο των 1800 MHz και σε τιμή SAR 0.38W/kg για 10 ή 20 min /day για 7x24h. Τα επίπεδα τόσο της MDA όσο και του νιτρικού οξέος σημείωσαν αύξηση σε αντίθεση με την ενεργότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων της υπεροξειδικής δυσμουτάσης (SOD), της μυελοϋπεροξειδάσης (MPO) και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GSH-Px) (**Ozgur et al., 2010**). Παρομοίως, μελέτη σε κουνέλια έδειξε την επαγωγή του οξειδωτικού στρες μέσω των αυξημένων επιπέδων της MDA και της 8-υδρόξυ-2-δεοξυγουανοσίνης (8-OHdG) ως επακόλουθο της έκθεσης στο GSM πεδίο των 1800 MHz, σε ένταση πεδίου 18V/m για 15min/day για 7x24h (**Guler et al., 2010**). Αντίστοιχη μελέτη από την ίδια ερευνητική ομάδα επέδειξε την οξειδωτική βλάβη στο ήπαρ αλλά και τα αυξημένα επίπεδα της λιπιδικής υπεοξείδωσης σε κουνέλια που κυοφορούσαν ή όχι αλλά και στα νεογέννητα (**Tomruk et al., 2010**). Πρόσφατα δεδομένα μιλούν για αυξημένα επίπεδα καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών στα εγκεφαλικά κύτταρα αρουραίων που εκτέθηκαν σε γεννήτρια που προσομοίαζε την ακτινοβολία των κινητών τηλεφώνων με συχνότητα 900 MHz για 2h/day, 7x24h για 10 μήνες (**Dasdag et al., 2012**). Τέλος, χαρακτηριστική μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών, που σχετίζονται και με το οξειδωτικό στρες, εκτός από άλλες πτυχές της κυτταρικής λειτουργίας, επιφέρει η έκθεση Balb/c μυών σε τιμές SAR 0,17-0,37 W/kg ακτινοβολίας κινητού τηλεφώνου (**Fragopoulou et al., 2012**).

Προστασία απέναντι στη δράση της ακτινοβολίας των τηλεφώνων παρέχει και η βιταμίνη C όπως έχει διαπιστωθεί μετά από έκθεση ιστού των οφθαλμών των αρουραίων (**Balci et al., 2007**).

Επίσης, στον επιθηλιακό ιστό στο φακό των ανθρώπινων οφθαλμών μετά την έκθεση στα 1800 MHz (SAR) of 1, 2, 3, and 4 W/kg, 2 h διακοπτόμενης έκθεσης, διαπιστώθηκαν αυξημένα ποσοστά μονόκλωνων θραύσεων DNA (SAR 3 και 4 W/kg) καθώς και ενώσεων ROS (SAR 2, 3, και 4 W/kg), με την υπόθεση ότι τα ποσοστά των DNA θραύσεων σχετίζονται με την υψηλή συγκέντρωση των ROS (**Yao et al., 2008**).

1.8.8 Επαγωγή αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου

Σε ακτινοβολημένα ανθρώπινα επιδερμικά καρκινικά κύτταρα στη συχνότητα των 1.95MHz για 3 h, διαπιστώθηκε η απενεργοποίηση του μονοπατιού ras/Erk και η επαγωγή της απόπτωσης, παράλληλα με την ενεργοποίηση της σύνθεσης των HSP70/27 και το μονοπάτι της JNK κινάσης (**Caraglia et al., 2005**). Τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την απόπτωση, όπως των κασπασών-2 και 6 αλλά και της πρωτεϊνης Bax, εξετάστηκαν μετά την έκθεση καλλιεργειών νευρώνων και αστροκυττάρων στην ακτινοβολία του GSM πεδίου στα 1900 MHz για 2h. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης των κασπασών καταγράφηκε στους νευρώνες τόσο σε κατάσταση “on” όσο και σε κατάσταση αναμονής του τηλεφώνου, ενώ στην περίπτωση των αστροκυττάρων μόνο στην κατάσταση “on” στην οποία σημειώθηκε και μεταβολή της έκφρασης του γονιδίου Bax (**Zhao et al., 2007**). Παρόμοια μελέτη στον ίδιο τύπο κυττάρων κατέδειξε τη συμμετοχή των πρωτεϊνών Bax, Bcl-2 και της κασπάσης-3, στην επαγόμενη απόπτωση μετά από έκθεση στην ακτινοβολία των 1950 MHz για 48h (**Liu et al., 2012).** Η επαγωγή της εξαρτώμενης από τις κασπάσες απόπτωσης, έχει βρεθεί στην περίπτωση των κυττάρων του θυρεοειδούς, μετά από έκθεση αρουραίων ηλικίας 2 μηνών στο παλμικό RF πεδίο των 900 MHz διαμορφωμένο στα 217 Hz, σε τιμή SAR 1.35 W/kg, 20 min/day, για 3 εβδομάδες. Οι ερευνητές διαπίστωσαν αυξημένα επίπεδα της εναρκτήριας κασπάσης 9 και της κασπάσης τελεστή 3, καθώς και εμφάνιση αποπτωτικών σωματίων, ενώ τα επίπεδα έκκρισης των θυρεοειδικών ορμονών βρέθηκαν μειωμένα (**Eşmekaya et al., 2010**). Επαγωγή της απόπτωσης, αλλά σε αυτή την περίπτωση μη εξαρτώμενη από τις κασπάσες, έχει διαπιστωθεί και σε νευρικά κύτταρα αρουραίων από το συνεχές κύμα RF των 900 MHz, σε SAR 2 W/kg για 24 h (**Joubert et al., 2008**). Από την άλλη πλευρά, σε κύτταρα Jurkat στο GSM900 MHz και sAR 1.35W/kg και για 1h έκθεση, παρατηρήθηκε αυξημένη ενεργότητα της κασπάσης-3, χωρίς όμως να συνοδεύεται από την ενεργοποίηση του αποπτωτικού μονοπατιού (**Palumbo et al., 2008**). Αυξημένη ενεργότητα και πάλι της κασπάσης-3 ανιχνεύθηκε σε ινοβλάστες μυών μετά από έκθεση στη συχνότητα των 872 MHz, στο διαμορφωμένο σήμα GSM κινητού τηλεφώνου, σε τιμή SAR 5 W/kg (**Höytö et al., 2008).** Μελέτη των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης σε εγκεφαλικά κύτταρα μυών κατέδειξε την αύξηση, μεταξύ άλλων, πρωτεϊνών που σχετίζονται με την απόπτωση μετά από έκθεση Balb/c μυών σε τιμές SAR 0,17-0,37 W/kg ακτινοβολίας κινητού τηλεφώνου (3h/day x 8 months) (**Fragopoulou et al., 2012**) Απόπτωση μέσω του μιτοχονδριακού μονοπατιού, με τη μεσολάβηση των ενώσεων ROS και της κασπάσης-3 έχει βρεθεί και σε μονοπύρηνα κύτταρα του αίματος λόγω της έκθεσής τους στην ακτινοβολία των 900 MHz με τιμή SAR ~0.4 W/kg και διάρκεια έκθεσης περισσότερο από 2h (**Lu et al., 2012**).

Αντιθέτως, άλλες ερευνητικές ομάδες δεν διαπιστώνουν σύνδεση ανάμεσα στην έκθεση στην ακτινοβολία και τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο (**Capri et al., 2004; Joubert et al., 2007; Moquet et al., 2008; Falzone et al., 2010**).

1.8.9 Επιδράσεις σε ολόκληρους οργανισμούς

Ο Testylier (**Testylier et al., 2002**) μελετώντας τα εγκεφαλικά κύτταρα αρουραίων μετά από έκθεση 1) στη συχνότητα των 2.45-GHz, σε πυκνότητα ισχύος 2 ή 4 mW/cm^2, για 1h και 2) στη συχνότητα των 800-MHz διαμορφωμένης στα 32 Hz, με πυκνότητα ισχύος 200 mW/cm^2, για 1 ή 14h διαπίστωσε 1) 40% μείωση στην απελευθέρωση της ακετυλοχολίνης από τον ιππόκαμπο μετά την έκθεση στα 4 mW/cm^2 και 2) 43% μείωση στην απελευθέρωση της ακετυλοχολίνης από τον ιππόκαμπο μετά τις 14h έκθεσης. Ομοίως σε εγκεφαλικά κύτταρα αρουραίων μετά από ακτινοβόληση στο πεδίο GSM 900-MHz, SAR 6.0 W/kg, για 15min ο Mausset-Bonnefont (**Mausset-Bonnefont et al., 2004**) παρατήρησε μεταβολές στη συγγένεια δέσμευσης και στη συγκέντρωση των υποδοχέων NMDA και GABA, καθώς και επίδραση στους μεταφορείς της ντοπαμίνης. Επίσης, οι νευρώνες του ιπποκάμπου των αρουραίων φάνηκε να επηρεάζονται από την ακτινοβολία GSM-1800 MHz, με SAR 2.4 W/kg, για 15min/day και για 8 μέρες έκθεση, καθώς παρατηρήθηκε μειωμένη διεγερτική ικανότητα σύναψης και μειωμένος αριθμός διεγερτικών συνάψεων (**Xu et al., 2006a**). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Salford (2003), το πεδίο GSM σε τιμές πυκνότητας ισχύος 0.24, 2.4 και 24 W/m^2, και SAR 2, 20, και 200 W/kg, για 2h σε αρουραίους, προκάλεσε βλάβες και κυτταρικό θάνατο στον φλοιό, τον ιππόκαμπο και τα βασικά γάγγλια του εγκεφάλου (**Salford et al., 2003**).

Όσον αφορά στις λειτουργίες αναγνώρισης του χώρου, καθώς και μάθησης και μνήμης σε πειραματόζωα, χαρακτηριστικές είναι οι μελέτες των Wang και Lai (**Wang and Lai, 2000)** στα 2450-MHz, με τιμές πυκνότητας ισχύος 2mW/cm^2 και SAR 1.2 W/kg, για 1h σε αρουραίους, που κατέγραψε επίδραση στη λειτουργία αναγνώρισης του χώρου καθώς και μείωση στην ταχύτητα αναγνώρισης της πλατφόρμας διάσωσης εντός λαβυρίνθου. Ωστόσο, στη μελέτη του Dubreuil (**Dubreuil et al., 2002; 2003**) δεν βρέθηκε διαφορά στη συμπεριφορά των πειραματοζώων εντός είτε εκτός του λαβυρίνθου.

Μελέτη από την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου μας με τη βοήθεια υδάτινου λαβυρίνθου κατέδειξε τις επιπτώσεις της ακτινοβολίας των κινητών τηλεφώνων (SAR 0.41-0.98 W/kg, 2hx4 days) στη διαδικασία εκμάθησης του χώρου και στη μνήμη των μυών Balb/c (**Fragopoulou et al., 2010a**).Η ίδια ομάδα και πάλι σε μυς διαπίστωσε την επίδραση της ακτινοβολίας GSM900 MHz με SAR 0.6-0.94 W/kg στη διαδικασία της οστεοποίησης κατά την εμβρυονική τους ανάπτυξη (**Fragopoulou et al., 2010b**). Πιο πρόσφατη μελέτη της ίδιας ομάδας αποκάλυψε τη χαρακτηριστική μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης μεγάλου αριθμού πρωτεϊνών, που σχετίζονται με πολλές πτυχές της λειτουργίας των νευρικών κυττάρων, πρωτεϊνών του θερμικού σοκ, του κυτταροσκελετού, καθώς και πρωτεϊνών ενδεικτικές του αυξημένου οξειδωτικού στρες και της επαγόμενης απόπτωσης. Η έκθεση των Balb/c μυών πραγματοποιήθηκε σε τιμές έντασης 15-22 V/m και SAR 0,17-0,37 W/kg ακτινοβολίας κινητού τηλεφώνου (3 h/dayx8 months) (**Fragopoulou et al., 2012**).

1.8.10 Επιδράσεις στην αναπαραγωγική ικανότητα των οργανισμών

Σχετικά με την ενδεχόμενη δράση της ακτινοβολίας στην αναπαραγωγική ικανότητα και τη βιωσιμότητα των ζωντανών οργανισμών, μπορούμε να παραθέσουμε τα αποτελέσματα του Grigor'ev (**Grigor'ev, 2003**) και της αυξημένης θνησιμότητας σε έμβρυα κοτόπουλου (75% στην εκτεθειμένη ομάδα έναντι 16% στον μάρτυρα) λόγω της ακτινοβολίας GSM των κινητών τηλεφώνων. Τα δεδομένα αυτά είναι αντίστοιχα με τα αποτελέσματα αυξημένης θνησιμότητας γονιμοποιημένων αυγών του ίδιου οργανισμού μετά από ακτινοβόληση στα 9.152 GHz παλμικά και συνεχή μικροκύματα (**Xenos and Magras, 2003**). Σε προγενέστερη μελέτη τους οι ίδιοι ερευνητές σε μύες, είχαν διαπιστώσει μειωμένο αριθμό απογόνων, κατάσταση η οποία ήταν μη αναστρέψιμη μετά από την συνεχή έκθεση στην ακτινοβολία 0.168-1.053 μW/cm^2 σε πάρκο RF κεραίων (**Magras and Xenos, 1997**).

Η εκπεμπόμενη ακτινοβολία των κινητών τηλεφώνων σε ημερήσια έκθεση 30 min (15min/12h) βρέθηκε υπεύθυνη και για τη μείωση του αριθμού των ωοθυλακίων στους αρουραίους (**Gul et al., 2009**).

Αρκετές μελέτες όμως έχουν λάβει χώρα και στα αρσενικά αναπαραγωγικά κύτταρα. Η επαγωγή οξειδωτικού στρες και η επίδραση της ακτινοβολίας GSM-900 και 1800MHz, (1h/day για 28 μέρες), στην κινητικότητα του σπέρματος σε αρουραίους αναφέρεται από τους Mailankot (**Mailankot et al., 2009**). Επίσης, πρόσφατη μελέτη σε αρσενικούς αρουραίους έδειξε τη μείωση των επιπέδων της τεστοστερόνης του ορού μετά από 60 min ημερήσια έκθεση για 3 μήνες στην ακτινοβολία των κινητών τηλεφώνων (**Meo et al., 2010**), ενώ αντιθέτως, η διακοπτόμενη έκθεση (45min on/ 15 min off) αρσενικών αρουραίων στα 848.5 MHz, SAR 2.0 W/kg για 12 εβδομάδες δεν κατέδειξε επίπτωση στην διαδικασία της σπερματογένεσης (**Lee et al., 2010**).

Αξίζει στο σημείο αυτό να αναφερθούμε στο πλήθος ερευνών που συνδέει τη χρήση των κινητών τηλεφώνων με την ανδρική υπογονιμότητα διαπιστωμένη τόσο από πειραματικές όσο και από κλινικές και επιδημιολογικές μελέτες (**Fejes et al., 2005; Agarwal et al., 2008 a; b; Baste et al., 2008; Wdowiak et al., 2007).** Το οξειδωτικό στρες φαίνεται να είναι υπεύθυνο και για την επίδραση της ακτινοβολίας στα ανθρώπινα σπερματοζωάρια, καθώς αυτή ενισχύει την παραγωγή ενώσεων ROS από τα μιτοχόνδρια των σπερματοζωαρίων, γεγονός που επηρεάζει την κινητικότητα και βιωσιμότητά τους, ενώ παράλληλα επάγει την αποδόμηση του DNA σε συνθήκες έκθεσης RF-EMR 1.8 GHz, SAR 0.4-27.5 W/kg (**De luiliis et al., 2009**). Μείωση σε διάφορες παραμέτρους σε δείγματα σπέρματος έχει αναφερθεί και από άλλη ερευνητική ομάδα (**Erogul et al., 2006**). Η παρατηρηθείσα δράση των πεδίων στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων ενδέχεται να διαμεσολαβείται από τη δράση αυτών στη ενεργότητα της κασπάσης-3, που έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με τη μειωμένη κινητικότητα, τη συγκέντρωση του σπέρματος, αλλά και τη μορφολογία αυτού (**La Vignera et al., 2012**). Νωρίτερα, η ομάδα του Aitken είχε αναφέρει βλάβες στο μιτοχονδριακό και πυρηνικό γονιδίωμα στα σπερματοζωάρια της επιδιδυμίδας εκτεθειμένων μυών (Έκθεση στα 900 MHz για 12 hrs /day x 7 days) (**Aitken et al., 2005**). Η υπερευαισθησία των σπερματοζωαρίων στο οξειδωτικό στρες οφείλεται στο αυξημένο ποσοστό των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων PUFA (poly unsaturated fatty acids) στις κυτταρικές τους μεμβράνες (**Desai et al., 2009**). Αναφορά όμως και μάλιστα στον υπεύθυνο μηχανισμό, που συνδέει την έκθεση στα πεδία κινητών τηλεφώνων και τον καρκίνο των όρχεων εξαιτίας των αυξημένων ενώσεων ROS, που οδηγούν σε ορμονικές μεταβολές, DNA βλάβες και απόπτωση, γίνεται σε πολύ πρόσφατη μελέτη (**Kesari et al., 2012**).

Σύμφωνα με τους Agarwal και συν. DNA βλάβες δεν παρατηρήθηκαν μετά από 1 hr έκθεση στο πεδίο και για το λόγο αυτό προτείνεται ότι τα Η/Μ πεδία RF ενδέχεται να επάγουν εξωκυτταρικά αυξημένη παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου, λόγω της δράσης στην NADH οξειδάση της μεμβράνης. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η μειωμένη κινητικότητα και βιωσιμότητα του σπέρματος, ενώ είναι πιθανό βλάβη του DNA να μην επάγεται σε όλες τις συνθήκες έκθεσης (**Agarwal et al., 2008b**).

Όμως, αντίστοιχα αποτελέσματα μείωσης της συγκέντρωσης σπέρματος, καθώς και της κινητικότητάς του διαπιστώθηκαν και σε μελέτες άλλων οργανισμών, όπως σε κουνέλια (**La Vignera et al., 2012**).

1.8.11 Κλινικές μελέτες

Μία σημαντική και από τις πρώτες σχετικά κλινική μελέτη υπήρξε του Burch και των συνεργατών του (2002), που κατέληξε στη διαπίστωση ότι η έκθεση χρηστών για παραπάνω από 25min ημερησίως στην ακτινοβολία των κινητών τηλεφώνων μειώνει τον ρυθμό σύνθεσης της μελατονίνης. Η μελατονίνη είναι μία ορμόνη που εκκρίνεται από την επίφυση και η δράση της σχετίζεται με την ρύθμιση του ημερησίου βιολογικού κύκλου και του μηνιαίου κύκλου γονιμότητας, ενώ παράλληλα ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα και παρέχει ογκοκατασταλτική δράση στον οργανισμό (**Burch et al., 2002**). Ακολουθεί η έρευνα των Gadhia και συν. (**Gadhia et al., 2003**), σύμφωνα με την οποία σε δείγματα λεμφοκυττάρων παρατηρήθηκε αύξηση στο ποσοστό χρωμοσωμικών βλαβών, ενώ τα μεγαλύτερα ποσοστά βρέθηκαν σε χρήστες που εκτίθονταν και σε άλλους τοξικούς παράγοντες, όπως κάπνισμα και αλκοόλ. Σύμφωνα με τους Krause και συν. (**Krause et al., 2006**), η έκθεση παιδιών 10-14 ετών στην ακτινοβολία GSM κατά τη διάρκεια διεξαγωγής διαδικασίας ελέγχου της μνήμης, οδήγησε σε μεταβολές του εγκεφαλογραφήματος στις συχνότητες των 4-8 Hz και 15 Hz. Επιπλέον, αύξηση της φασματικής ισχύος του εγκεφαλογραφήματος διαπιστώθηκε σε εθελοντές μετά από έκθεση σε ακτινοβολία κινητών τηλεφώνων πριν τον ύπνο για τις συχνότητες των 11.5-12.5 Hz (**Loughran et al., 2005**). Η ερμηνεία των παρατηρήσεων αυτών μπορεί να αποδοθεί λαμβάνοντας υπ'όψιν τις συχνότητες των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων του εγκεφάλου, που εντοπίζονται σε αντίστοιχες περιοχές (**Λιολιούσης, 1997**).

Αντιθέτως, άλλες μελέτες δεν αναφέρουν επιδράσεις της ακτινοβολίας (**Wagner, 1998; Regel, 2006**).

1.8.12 Επιδημιολογικές μελέτες

Σε επίπεδο επιδημιολογικών μελετών παρατηρούμε μία συσχέτιση ανάμεσα στη χρήση των κινητών τηλεφώνων και της αυξημένης πιθανότητας εμφάνισης ορισμένων τύπων όγκων. Χαρακτηριστικά αναφέρουμε την έρευνα του Auvinen (**Auvinen et al., 2002**) με τους χρήστες των αναλογικών τηλεφώνων να παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης γλοιώματος, ενώ δεν αποδείχθηκε μία αντίστοιχη συσχέτιση ανάμεσα στη χρήση ψηφιακού κινητού τηλεφώνου και εμφάνισης όγκου των σιελογόνων αδένων. Την εμφάνιση γλοιώματος επισημαίνει και ο Lönn (**Lönn et al., 2005**) επίσης σε χρήστες 20-69 ετών όταν το κινητό χρησιμοποιείται στην ίδια πλευρά του κεφαλιού για περισσότερο από δέκα χρόνια. Ωστόσο, προγενέστερη μελέτη αναφέρεται σε αυξημένη πιθανότητα πρόκλησης νευροεπιθηλιώματος μόλις μετά από 2.8 χρόνια χρήσης κινητού τηλεφώνου (**Muscat et al., 2000**). Χαρακτηριστική είναι και η ανασκόπηση του Kundi (2004) που συνοψίζοντας τα συμπεράσματα επιδημιολογικών και πειραματικών ερευνών υπάρχει μία σαφής σύνδεση της χρήσης αναλογικών και ψηφιακών τηλεφώνων με συγκεκριμένους τύπους καρκίνου (**Kundi, 2004**). Ένα άλλος τύπος όγκου που εξετάστηκε είναι αυτός του ακουστικού νευρινώματος στην έρευνα του Christensen (**Christensen et al., 2004**), αλλά και από τις μελέτες του Hardell (**Hardell et al., 2006; 2007**), στις οποίες επισημαίνεται ο κίνδυνος για εμφάνιση τόσο ακουστικού νευρινώματος όσο και γλοιώματος όταν η χρήση περιορίζεται στην μία πλευρά του κεφαλιού, ενώ γίνεται και μία συσχέτιση της χρήσης αναλογικών και ψηφιακών τηλεφώνων και εμφάνισης συγκεκριμένων τύπων όγκων στον εγκέφαλο μετά τα 10 έτη χρήσης.

Επιδημιολογικές μελέτες όμως έχουν πραγματοποιηθεί και στις περιπτώσεις κατοίκων πλησίον σταθμών βάσης κινητής τηλεφωνίας, στους οποίους επισημαίνεται ο αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης διαφόρων νευρολογικών-ψυχιατρικών προβλημάτων όπως πονοκέφαλοι, ζαλάδες, δυσκολία συγκέντρωσης, αϋπνίες, κατάθλιψη, σύνολο συμπτωμάτων που αποτελούν το λεγόμενο “μικροκυματικό σύνδρομο” (**Navarro et al., 2003; Abdel Rassoul et al., 2007**). Σε παρόμοια συμπεράσματα καταλήγουν και άλλες έρευνες (**Santini et al., 2003; Hutter et al., 2006**).

Αντιθέτως, ορισμένες έρευνες δεν έχουν καταλήξει σε κάποια σχέση ανάμεσα στην έκθεση σε αυτού του είδους ακτινοβολία και στην εμφάνιση όγκων (**Inskip et al., 2001, Johansen et al., 2001**).

1.8.13 Βιολογικές επιδράσεις σε πολύ χαμηλές τιμές έντασης ακτινοβολίας και δεδομένα μακροπρόθεσμης έκθεσης

Ορισμένες επιδράσεις έχουν καταγραφεί σε πολύ χαμηλές τιμές έντασης και SAR, αντίστοιχες με αυτές που εκτίθενται οι κάτοικοι πλησίον σταθμών βάσης κινητής τηλεφωνίας, όπως αναφέρεται και σε σχετικά πρόσφατη ανασκόπηση (**Levitt and Lai, 2010**). Ενδεικτικά μπορούμε να κάνουμε λόγο για τις μελέτες των Dutta και συν. (**Dutta et al., 1984; 1989**) με την αυξημένη εκροή ιόντων Ca από ανθρώπινα νευροβλαστικά κύτταρα μετά την έκθεση σε πεδίο RF συχνότητας 915MHz με διαμόρφωση στα 16Hz και σε τιμή SAR=0.05W/kg (**Dutta et al., 1984**), αλλά και στη συχνότητα των 147 MHz και διαμόρφωση στα 16Hz, σε τιμή SAR=0.005W/kg (**Dutta et al., 1989**). Επίσης, σε πολύ χαμηλή τιμή πυκνότητας ισχύος 0.001mW/cm^2 στο RF πεδίο συχνότητας 8.15–18 GHz υπήρξαν μεταβολές στο ανοσοποιητικό σύστημα μυών (**Fesenko et al., 1999**). Σε αρουραίους διαπιστώθηκε μία αύξηση των επιπέδων τεστοστερόνης που εκτέθηκαν σε τιμές SAR 0.018–0.025 W/kg στη συχνότητα των 1800MHz με παλμούς στα 217Hz (**Forgacs et al., 2006**).

Σε ορισμένες όμως από αυτές τις μελέτες διερευνήθηκε ταυτόχρονα η επίδραση μετά από μακροπρόθεσμη έκθεση στο πεδίο RF χαμηλής έντασης προσομοιάζοντας με τον τρόπο αυτό σε μεγαλύτερο βαθμό τις συνθήκες έκθεσης κατοίκων πλησίον σταθμών βάσης κινητής τηλεφωνίας, οι οποίοι υφίστανται πολύωρη έκθεση στο πεδίο. Ενδεικτικά μπορούμε να αναφέρουμε μελέτη σχετικά με τη μείωση της αναπαραγωγικής ικανότητας μυών που εκτέθηκαν σε τιμές πυκνότητας ισχύος 0.000168–0.001053 mW/cm^2, ενώ είναι χαρακτηριστικό ότι η δυσλειτουργία αυτή παρέμεινε για 5 γενιές. Επίσης, αύξηση της διαπερατότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού παρατηρήθηκε στο ίδιο πειραματόζωο μετά από έκθεση σε τιμή SAR 0.0004W/kg για 2-960min, παρέχοντας ενδείξεις αθροιστικής δράσης της ακτινοβολίας (**Margas and Xenos, 1997**), ενώ τέλος, βλάβες στο DNA σε ανθρώπινα λευχαιμικά κύτταρα παρατηρήθηκαν σε τιμές SAR 0.0024–0.024 W/kg μετά από 24ωρη έκθεση (**Phillips et al., 1998**).

1.9 Επιδράσεις ηλεκτρομαγνητικών πεδίων στο έντομο *Drosophila melanogaster*

Σημαντική είναι η μελέτη επίδρασης πραγματικού σήματος κινητού τηλεφώνου (GSM900/1900 MHz και SAR 1.4W/kg) κατά την ανάπτυξη του εντόμου *Drosophila melanogaster* από την στιγμή απόθεσης των αυγών μέχρι το στάδιο της χρυσαλίδας. Τα ευρήματα αφορούσαν στον αυξημένο αριθμό ενηλίκων εντόμων λόγω των αυξημένων κυτταρικών διαιρέσεων, που ενδεχομένως σχετίζονταν με την ενισχυμένη έκφραση αντιστοίχων γονιδίων. Παράλληλα, σημειώθηκαν υψηλά επίπεδα της πρωτεΐνης Hsp70 και ενισχυμένη φωσφορυλίωση του μεταγραφικού παράγοντα ELK-1 (**Weisbrot et al., 2003**). Μελέτες της ίδιας ερευνητικής ομάδας νωρίτερα είχαν διαπιστώσει μεταβολή των επιπέδων μεταγραφικής δραστηριότητας στους σιελογόνους αδένες του εντόμου λόγω της έκθεσης σε πεδία πολύ χαμηλών συχνοτήτων (**Goodman et al., 1992a;b;c**).

Σύμφωνα με δεδομένα από μελέτη του εργαστηρίου μας, η συνεχής 6 min ημερήσια έκθεση εντόμων, κατά τη διάρκεια των πρώτων 5 ημερών της ενήλικης ζωής τους, στην διαμορφωμένη από την ανθρώπινη φωνή ακτινοβολία κινητού τηλεφώνου του συστήματος GSM900 MHz και με πυκνότητα ισχύος 0.436 mW/cm^2, προκάλεσε σημαντική μείωση της αναπαραγωγικής ικανότητας του εντόμου (**Panagopoulos et al., 2004**).

Εφόσον στην Ευρώπη χρησιμοποιούνται ευρύτατα δύο συχνότητες κινητής τηλεφωνίας 900 και 1800MHz, σε ερευνητική μελέτη του εργαστηρίου μας διερευνήθηκε ο ρόλος της φέρουσας συχνότητας της ακτινοβολίας στην αναπαραγωγική ικανότητα και την ωογένεση του εντόμου. Οι ομάδες που συγκρίθηκαν προέρχονταν από την 6 min ημερήσια συνεχή έκθεση των οργανισμών για τα πρώτα 5 24ωρα της ενήλικης ζωής τους και στις δύο συχνότητες κινητής τηλεφωνίας και σε αντίστοιχες τιμές έντασης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, και τα δύο συστήματα GSM-900MHz και DCS-1800MHz κινητής τηλεφωνίας, προκαλούν σημαντική μείωση της μέσης ωοτοκίας, καθώς και εμφάνιση υψηλών ποσοστών αποδομημένου DNA στα κύτταρα των ωοθυλακίων της πρώιμης και μέσης ωογένεσης σε σύγκριση με τις ομάδες μάρτυρα. Στις άμεσα συγκρίσιμες ομάδες, GSM900A και DCS1800 που χαρακτηρίζονταν από παρόμοια ένταση, αλλά διαφορετική συχνότητα, οι διαφορές στα ποσοστά των δύο προαναφερθεισών επιδράσεων διαπιστώθηκε ότι είναι εντός της τυπικής απόκλισης. Αντιθέτως, σημαντική διαφορά στα ποσοστά βιολογικής επίδρασης καταγράφηκε μεταξύ των ομάδων GSM900 και GSM900A που έφεραν ίδια συχνότητα, αλλά διαφορετική ένταση. Σύμφωνα με τα παραπάνω, η διαφορά στη βιοδραστικότητα μεταξύ των συστημάτων GSM900MHz και DCS1800MHz οφείλεται κυρίως στη διαφορά έντασης και όχι στη διαφορετική φέρουσα συχνότητα (**Panagopoulos DJ, Chavdoula ED, Nezis IP, Margaritis LH, 2007a; Panagopoulos DJ, Chavdoula ED, Karabarbounis A., Margaritis LH, 2007b**).

Αντικείμενο διερεύνησης αποτέλεσε όμως και η παράμετρος της έντασης της ακτινοβολίας στην αναπαραγωγική ικανότητα του ίδου εντόμου. Για το σκοπό αυτό, η έκθεση των ομάδων πραγματοποιήθηκε και πάλι και στις δύο συχνότητες συστημάτων κινητής τηλεφωνίας, GSM-900 MHz και DCS-1800 MHz, και σε διάφορες εντάσεις, αυξανομένης της απόστασης των εκτεθειμένων ομάδων από τη συσκευή του κινητού τηλεφώνου (0-100 cm/10cm). Μείωση της τιμής του βιολογικού δείκτη παρατηρήθηκε σε όλες τις εκτεθειμένες ομάδες των αποστάσεων από 0 έως 50 cm. Μία σχετική και όχι απόλυτη γραμμικότητα φάνηκε να χαρακτηρίζει τη σχέση ανάμεσα στην τιμή της μέσης ωοτοκίας και την ένταση της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας. Ωστόσο, χαρακτηριστική υπήρξε η αποκάλυψη των δύο "παραθύρων" έντασης υψηλής βιοδραστικότητας. Πιο συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα της ενότητας αυτής κατέδειξαν το μέγιστο της επίδρασης στην απόσταση των 0cm δηλ. σε επαφή με τη συσκευή του κινητού τηλεφώνου, καθώς και στην απόσταση 20cm και 30cm για τα συστήματα DCS-1800MHz και GSM-900MHz αντιστοίχως. Οι τιμές έντασης της ακτινοβολίας στην απόσταση 0 cm ήταν >200μW/cm^2, ενώ στις άλλες δύο αποστάσεις η τιμή έντασης κυμάνθηκε περίπου στα 10μW/cm^2. Όπως προαναφέρθηκε, σε αποστάσεις μεγαλύτερες των 50 cm οι τιμές της αναπαραγωγικής ικανότητας βρέθηκαν μέσα στα όρια της τυπικής απόκλισης και χωρίς διαφορές από την τιμή της μέσης ωοτοκίας του μάρτυρα. Σημειώνεται ότι, στις αποστάσεις αυτές οι τιμές έντασης της ακτινοβολίας είναι πολύ χαμηλές της τάξεως των 2-3 μW/cm^2, ενώ οι αντίστοιχες τιμές εντάσεων των ELF συνιστωσών έχουν σχεδόν μηδενιστεί.

Στόχος της παρούσας πειραματικής σειράς, πλην της διερεύνησης της παραμέτρου της έντασης στην τιμή της μέσης ωοτοκίας ήταν η προσομοίωση της έκθεσης κατοίκων πλησίον και απέναντι από σταθμούς βάσης κινητής τηλεφωνίας, με τη διαφορά ότι στην περίπτωση αυτή, αντίστοιχες τιμές έντασης της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας εντοπίζονται σε εκατονταπλάσιες αποστάσεις από τον σταθμό βάσης (**Panagopoulos DJ, Chavdoula ED, Margaritis LH, 2010**).

Επίδραση της ακτινοβολίας συχνοτήτων κινητής τηλεφωνίας (835 MHz-έκθεση σε γεννήτρια) έχει διαπιστωθεί και από άλλη ερευνητική ομάδα με την αυξημένη παραγωγή των ενεργών ενώσεων οξυγόνου (ROS) στην ωοθήκη και τον εγκέφαλο του εντόμου. Τα επίπεδα ROS εμφάνισαν εξάρτηση από την τιμή SAR, με την τιμή των 1.6 W/kg να προκαλεί την ενεργοποίηση των μονοπατιών επιβίωσης (ERK κινάσες) και αυτή των 4.0 W/kg να σχετίζεται με τον κυτταρικό θάνατο (JNK κινάσες). Η έκθεση στην τιμή SAR 4.0 W/kg επηρέασε σημαντικά και τη βιωσιμότητα των οργανισμών (**Lee et al., 2008**).

Πρόσφατα δεδομένα από ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου μας επίσης κάνουν λόγο για πρόκληση οξειδωτικού στρες σε νεοεκδυθέντα αρσενικά και θηλυκά έντομα μετά από έκθεση στην ακτινοβολία ασυρμάτου τηλεφώνου DECT έντασης E = 1,2 V/m, συχνότητας 1890 MHz για 24 και 96 h. Σημαντική αύξηση των επιπέδων ROS καταμετρήθηκε στις ωοθήκες και τα σώματα των θηλυκών ατόμων και σε μικρότερο βαθμό στα σώματα των αρσενικών ατόμων. Το σύστημα της ωογένεσης εμφάνισε μεγαλύτερη ευαισθησία στο οξειδωτικό στρες, ενώ τα επίπεδα ROS στην περίπτωση των 96h βρέθηκαν χαμηλότερα, γεγονός ενδεικτικό της ενδεχόμενης ενεργοποίησης προσαρμοστικών μηχανισμών του βιολογικού συστήματος απέναντι σε αυτόν τον παράγοντα στρες (**Manta and Margaritis, υπό δημοσίευση**).

Επιδράσεις στην αναπαραγωγική ικανότητα του εντόμου και τη διαδικασία ωογένεσης αναφέρονται και από άλλες πηγές ακτινοβολίας, όπως: ασύρματο τηλέφωνο DECT, Wifi, γεννήτρια συχνοτήτων κινητής τηλεφωνίας κ.ά. (**Margaritis et al., submitted, Aug 2012**).

1.10 Το έντομο *Drosophila melanogaster*

Τα έντομα παρουσιάζουν διακριτά στάδια ανάπτυξης και σχετικά μικρό κύκλο ζωής, γεγονός που τα καθιστά ιδανικά ως πειραματικά συστήματα για τους ερευνητές προκειμένου να προσδιοριστούν οι μηχανισμοί που αφορούν τη μορφογένεση, τη διαφοροποίηση και τη λειτουργία βασικών βιολογικών συστημάτων. Στις μελέτες χρησιμοποιούνται ολομετάβολα έντομα, τα οποία χαρακτηρίζονται από περιορισμένου χρόνου κύκλο ζωής με διακριτά μορφολογικά στάδια ανάπτυξης, ενώ συγκεκριμένα το έντομο *Drosophila melanogaster* (εικ. 1.4) έχει αποτελέσει ένα σημαντικό εργαλείο σε εκτενείς μελέτες γενετικής, μοριακής και κυτταρικής βιολογίας, αλλά και μελέτες εξελικτικές.

Η *Drosophila melanogaster* κατατάσσεται στην τάξη των Διπτέρων και στην οικογένεια *Drosophilidae*.

Εικόνα 1.4. Φωτογραφία αρσενικού (αριστερά) και θηλυκού εντόμου (δεξιά) *Drosophila melanogaster*.

Ορισμένα σημαντικά πλεονεκτήματα που φέρει ο συγκεκριμένος οργανισμός, όσον αφορά στη χρήση του ως πειραματόζωο γενικότερα αλλά και ειδικά για τις μελέτες της παρούσας διατριβής, συνοψίζονται στα ακόλουθα: ο μικρός κύκλος ζωής, το μικρό μέγεθος, η εύκολη ανάπτυξη και διατήρηση της καλλιέργειας στο εργαστήριο, ο μεγάλος αριθμός απογόνων, η καλή χρονική ακρίβεια των σταδίων ανάπτυξής του σε σταθερές συνθήκες περιβάλλοντος, (θερμοκρασία, υγρασία, τροφή, ατμοσφαιρική πίεση κ.λ.π.), η καλή γνώση των λειτουργιών γοναδιακής, εμβρυϊκής και μετεμβρυϊκής ανάπτυξης, στάδια πολύ λειτουργικά από βιολογική άποψη που αποτελούν, πρότυπο βιολογικό σύστημα ανάπτυξης και διαφοροποίησης. Εκτεταμένη γνώση από το εργαστήριό μας της διαδικασίας ωογένεσης και των παραγόντων που την επηρεάζουν.

Το σώμα των τελείων εντόμων έχει μήκος 2-3 mm και αποτελείται από τρία βασικά μέρη: α) κεφάλι, (head), με ένα ζεύγος κεραιών, στοματικά εξαρτήματα και κόκκινα μάτια αποτελούμενα από πολλά οφθαλμίδια, (800 ομματίδια), β) θώρακα, (thorax), με 3 μεταμερή, (προθώρακα Τ1, μεσοθώρακα Τ2, μεταθώρακα Τ3), 3 ζεύγη ποδιών (L1-3), ένα ζεύγος φτερών στον μεσοθώρακα και αλτήρες, (halteres- δηλαδή υπολείμματα δεύτερου ζεύγους φτερών), στον μεταθώρακα, γ) κοιλιά, (abdomen), με 8 μεταμερή, (Α1 – Α8) (**Αλαχιώτης, 1989**) Η κοιλιά είναι περισσότερο μαυρισμένη στο πίσω και κάτω μέρος (εικ. 1.4). Είναι φυτοφάγο έντομο με μυζητικά στοματικά εξαρτήματα.

Η *Drosophila melanogaster* φέρει 4 ζεύγη χρωμοσωμάτων (τρία επιμηκυσμένα και ένα σφαιρικό) από τα οποία το πρώτο (Ι) είναι το ζεύγος των φυλετικών χρωμοσωμάτων, ενώ τα επόμενα τρία (II-IV) είναι τα ζεύγη των σωματικών χρωμοσωμάτων. Είναι χαρακτηριστικό το γεγονός ότι ο φυλοκαθορισμός του εντόμου εξαρτάται από την αναλογία του αριθμού των X χρωμοσωμάτων προς τις δύο σειρές των αυτοσωμάτων. Τα δύο φύλα μπορούν να αναγνωριστούν εύκολα από εξωτερικά χαρακτηριστικά στο στάδιο του τέλειου εντόμου (εικ. 1.4). Τα σημαντικότερα από αυτά τα χαρακτηριστικά είναι τα εξής: i) Η μορφολογία του τελικού τμήματος της κοιλιάς. Στα αρσενικά άτομα το τμήμα αυτό είναι στρογγυλό, ενώ στα θηλυκά οξύληκτο λόγω του ωοθέτη. ii) Το χρώμα του τελικού τμήματος της κοιλιάς. Στα αρσενικά είναι σκουρότερο σε σύγκριση με τα θηλυκά. Το στοιχείο αυτό εξυπηρετεί στη μακροσκοπική αναγνώριση του φύλου. iii) Τα αρσενικά άτομα φέρουν στο πρώτο ζεύγος ποδιών ένα σύνολο σμηρίγγων, που σχηματίζουν το φυλετικό χτένι. Κάτι τέτοιο δεν παρατηρείται στα θηλυκά. iv) Τα αρσενικά έχουν στην κοιλιακή τους χώρα πέντε τμήματα, ενώ τα θηλυκά επτά.

1.11 Κύκλος ζωής του εντόμου *Drosophila melanogaster*

Ο κύκλος ζωής των εντόμων περιλαμβάνει μία σειρά διακριτών αναπτυξιακών μορφολογικά σταδίων, τα οποία είναι εμφανή στην περίπτωση των ολομετάβολων εντόμων. Είναι χαρακτηριστική η διαφορά ανάμεσα στα ολομετάβολα και τα ημιμετάβολα έντομα, καθώς στα πρώτα διακρίνονται τα ακόλουθα στάδια: αυγό-προνύμφη-νύμφη-ενήλικο έντομο, ενώ στα ημιμετάβολα απουσιάζει το στάδιο της προνύμφης. Το έντομο *Drosophila melanogaster* είναι ένα ολομετάβολο έντομο που διαθέτει έναν πολύπλοκο κύκλο ζωής δηλ. το στάδιο του αβγού και την εμβρυϊκή φάση που συμβαίνει σε αυτό, τα επόμενα τρία προνυμφικά στάδια, τα τρία στάδια της νύμφης και τέλος το ενήλικο έντομο. Το στάδιο της νύμφης χαρακτηρίζεται από μία ολοκληρωτική μεταμόρφωση κατά την οποία όλες σχεδόν οι προνυμφικές δομές ιστολύονται και αντικαθίστανται από τις δομές του ενηλίκου εντόμου (εικ. 1.5) (**Alberts et al. 1994**). Τα ολομετάβολα έντομα χαρακτηρίζονται από μία δραματική και ξαφνική μεταμόρφωση από τη μορφή της προνύμφης σε αυτή του ενηλίκου ατόμου (**Roberts, 1998**). Η νεαρή προνύμφη εξωτερικά καλύπτεται από επιδερμίδιο, ενώ υφίσταται μία σειρά από εκδύσεις, καθώς μεγαλώνει, κατά τη διάρκεια των οποίων παράγει καινούριο επιδερμίδιο, αποβάλλοντας το αμέσως προηγούμενο. Η διαδικασία αυτή καθίσταται δυνατή, καθώς τα επιδερμικά κύτταρα αποικοδομούν, με κατάλληλα ένζυμα, το παλιό επιδερμίδιο, ενώ εκκρίνουν το καινούριο σε κάθε έκδυση. Το πειραματικό μας είδος υποβάλλεται σε τέσσερις συνολικά εκδύσεις καθ’ όλη τη διάρκεια ζωής του.

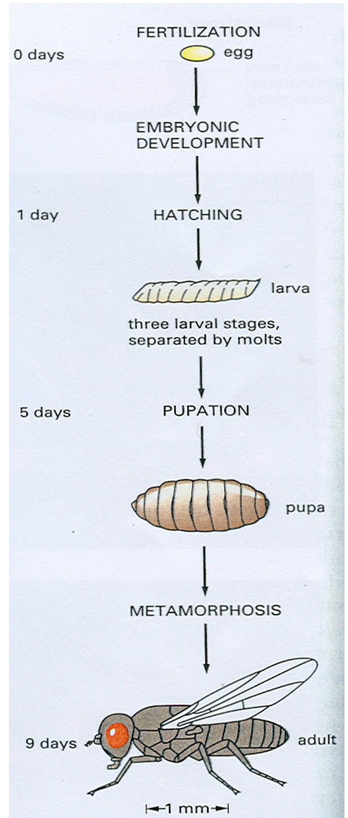
Ο κύκλος ζωής του εντόμου περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

<u>Εμβρυϊκό στάδιο</u>: διαρκεί περίπου 20-24h ανάλογα με τη θερμοκρασία. Ξεκινά με τη γονιμοποίηση του ωαρίου και τελειώνει με την εκκόλαψη της προνύμφης.

<u>Μετεμβρυϊκό στάδιο</u>: αρχίζει με την εκκόλαψη της προνύμφης και τελειώνει με την εκκόλαψη του τελείου εντόμου. Το στάδιο αυτό διακρίνεται στα ακόλουθα:

- **Στάδιο προνύμφης (larva)** που περιλαμβάνει την προνύμφη του 1^{ου} σταίου (first instar larva), 2^{ου} σταδίου (second instar larva) και 3^{ου} σταδίου (third instar larva)
- **Στάδιο νύμφης (pupa)** που περιλαμβάνει τη νύμφη 1^{ου} σταδίου (white pupa-first instar pupa), 2^{ου} σταδίου (second instar pupa), και 3^{ου} σταδίου (third instar pupa).

<u>Τέλειο έντομο</u>: αρχίζει με την εκκόλαψη του ενηλίκου εντόμου.



Εικόνα 1.5. Κύκλος ζωής του εντόμου, περιλαμβάνει: το αυγό (egg) μετά τη γονιμοποίηση (fertilization), την εμβρυονική ανάπτυξη (embryonic development) και την εκκόλαψη (hatching) του αυγού για μία ημέρα που καταλήγει στα τρία στάδια της λάρβας, τα οποία διαχωρίζονται από εκδύσεις (moults), μετά από πέντε ημέρες τη χρυσαλιδοποίηση (pupation) και τελικά το σχηματισμό της χρυσαλίδας (pupa), και τέλος την ένατη ημέρα τη μεταμόρφωση (metamorphosis) και την ανάπτυξη του ενηλίκου (adult) εντόμου (Alberts et al., 1994).

Οι εξωτερικές δομές προκύπτουν από την ανάπτυξη των εμβρυϊκών δίσκων (imaginal discs), ενώ οι μεσοδερμικοί ιστοί προέρχονται από ένα ξεχωριστό στρώμα κυττάρων ή από μεσοδερμικούς ιστούς της προνύμφης (**Blair, 1995**). Οι εμβρυϊκοί δίσκοι προκύπτουν κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη ως δομές που μοιάζουν με μικρά συσσωματώματα 10-40 κυττάρων τα οποία διαιρούνται κατά τα πρώτα προνυμφικά στάδια για να σχηματίσουν μεγάλους επιθηλιακούς σάκους που λαμβάνουν την τελική τους μορφή στο στάδιο της προνύμφης του τρίτου σταδίου. Τα ζεύγη των εμβρυϊκών δίσκων είναι δέκα και το κάθε ζεύγος έχει συγκεκριμένο σχήμα και μέγεθος ενώ παίρνει το όνομά του από το μέρος του σώματος που σχηματίζει. Επομένως υπάρχουν οι εμβρυϊκοί δίσκοι των φτερών, των ποδιών, των ματιών-κεραιών κ.ά. (**Alberts et al., 1994**).

Κατά τη διάρκεια της μεταμόρφωσης, διαφορετικές περιοχές του επιθηλίου των δίσκων διαφοροποιούνται σε εξωδερμικούς ιστούς του κάθε άκρου, σχηματίζοντας δομές όπως οι σμήριγγες, αρθρώσεις, φλέβες και επιθηλιακά κύτταρα.

Αμέσως μετά τη σύντηξη ωαρίου-σπερματοζωαρίου ακολουθούν γρήγορες πυρηνικές διαιρέσεις, χωρίς σχηματισμό κυττάρων, με αποτέλεσμα ένα συγκύτιο, το οποίο φέρει πολλούς πυρήνες σε ένα κοινό κυτταρόπλασμα. Μετά την ένατη διαίρεση, οι πυρήνες μεταναστεύουν προς την επιφάνεια του αυγού και διαιρούνται εννέα φορές συγχρόνως. Η πλασματική μεμβράνη εγκολπώνεται και περικλείει κάθε ένα πυρήνα σε ξεχωριστή πλασματική μεμβράνη, σχηματίζοντας το βλαστόδερμα (**Alberts et al., 1994).**

1.11.1 Εμβρυογένεση, Μετεμβρυϊκή ανάπτυξη, Μεταμόρφωση και σεξουαλική ωρίμανση των ενηλίκων εντόμων

Η εμβρυϊκή ανάπτυξη είναι μία συνεχής διαδικασία κατά την οποία συμβαίνουν ριζικές και σημαντικές αλλαγές σε μία πρωταρχική μορφή ζωής δηλ. στο γονιμοποιημένο ωάριο, που οδηγούν στη δημιουργία ενός ολοκληρωμένου οργανισμού μέσα σε ορισμένο χρόνο. Στη *Drosophila* τα βασικότερα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης περιλαμβάνουν σύμφωνα με τους **Campos-Ortega and Hartenstein, 1997 και Bate and Martinez-Arias, 1993**: 1) Το σχηματισμό του συγκυτιακού βλαστοδέρματος (μετά από συνεχείς πυρηνικές διαιρέσεις που ξεκινούν αμέσως μετά τη γονιμοποίηση), 2) Τη διαφοροποίηση των πολικών κυττάρων, τα οποία θα σχηματίσουν τις γονάδες, 3) την κυτταροποίηση του βλαστοδέρματος, 4) τη γαστριδίωση (δηλ. κατά την οποία διαφοροποιούνται το ενδόδερμα, το μεσόδερμα, το μεσοεξώδερμα και το εξώδερμα, δομές που αργότερα θα σχηματίσουν τα τμήματα του πεπτικού σωλήνα και του νευρικού συστήματος), 5) την επιμήκυνση της βλαστικής ζώνης (κατά την οποία διαφοροποιούνται τα τμήματα του πεπτικού συστήματος-οισοφάγος, μεσέντερο και ορθό έντερο, σχηματίζονται οι νευροβλάστες και τα κύτταρα γλοίας, καθώς επίσης και τα τραχειακά κοιλώματα, από τα οποία θα προκύψει το τραχειακό σύστημα), 6) τη σύμπτυξη της βλαστικής ζώνης, κατά την οποία συμβαίνει η τμηματοποίηση του εμβρύου με την οποία παίρνει τη μορφή της προνύμφης, συνδέονται τα τμήματα του πεπτικού συστήματος και σχηματίζουν τον πεπτικό σωλήνα, αναπτύσσονται το τραχειακό και το νευρικό σύστημα και σχηματίζονται οι γονάδες, 7) την ανάπτυξη του κεφαλιού και την ολοκλήρωση της μορφογένεσης με τη ραχιαία συρραφή. Κατά τις τελευταίες αυτές μορφογενετικές κινήσεις, κλείνει το ραχιαίο άνοιγμα με την κατά μήκος επέκταση της επιδερμίδας και αρχίζει η σύνθετη ανάπτυξη του κεφαλιού με τος σχηματισμό των στοματικών εξαρτημάτων και των τμημάτων του εγκεφάλου. Μετά από όλες τις παραπάνω δαδικασίες η εμβρυϊκή ανάπτυξη ολοκληρώνεται και η ανάπτυξη του ατόμου συνεχίζεται στα προνυμφικά στάδια (εικ. 1.6).

Μετά το σχηματισμό του βλαστοδέρματος, πολύπλοκες αναδιπλώσεις αυτής της κοίλης ελλειψοειδούς σφαίρας κυττάρων δίνουν μία λάρβα με μεταμερίδια, την προνύμφη πρώτου σταδίου. Η λάρβα αυτή αποτελείται από μία κεφαλή, τρία θωρακικά και οκτώ κοιλιακά μεταμερίδια, ενώ έχει μία χαρακτηριστική μορφή λευκού σκουληκιού. Το στάδιο αυτό είναι το πρώτο εκ των τριών σταδίων λάρβας, τα οποία χωρίζονται από εκδύσεις, κατά τις οποίες η προνύμφη αλλάζει επιδερμίδιο. Κατά τη διάρκεια των τριών προνυμφικών σταδίων, η αύξηση στο μέγεθος της λάρβας δεν οφείλεται στη διαίρεση των κυττάρων της, αλλά στην αύξηση του όγκου των κυττάρων, ο οποίος συνοδεύεται από αντιγραφή του DNA. Τα αντίγραφα του DNA σχηματίζουν τα λεγόμενα πολυταινικά χρωμοσώματα. Εξαίρεση αποτελούν τα κύτταρα των εμβρυϊκών δίσκων, τα οποία διαιρούνται κανονικά, (**Roberts, 1998**). Οι προνύμφες και των τριών σταδίων τρέφονται από την ίδια τροφή που τρέφονται και τα ενήλικα έντομα, με τη διαφορά ότι αυτές έχουν την ικανότητα να σκάβουν στοές μέσα στην τροφή. Είναι γεγονός ότι η ύπαρξη πολλών τέτοιων στοών στην τροφή του σωλήνα καλλιέργειας υποδηλώνει επιτυχή ανάπτυξη του πληθυσμού των εντόμων. Τα στάδια των προνυμφών έχουν διάρκεια 4 ημέρες, ενώ ακολουθεί ένα μεταβατικό στάδιο μισής περίπου ημέρας κατά το οποίο το έντομο ακινητοποιείται στα τοιχώματα του σωλήνα, μικραίνει σε μέγεθος, δεν τρέφεται, ενώ είναι καλυμμένο με ημιδιαφανές κουκούλι. Το στάδιο αυτό διαρκεί 4 ακόμη ημέρες και το έντομο καλείται νύμφη/χρυσαλίδα. Κατά το στάδιο αυτό σχηματίζονται όλα τα εξωτερικά μέρη του τέλειου εντόμου από τα κύτταρα των εμβρυϊκών δίσκων που τώρα δεν διαιρούνται, παρά μόνο αναπτύσσονται και διαφοροποιούνται, (**Roberts, 1998**). Οι εμβρυϊκοί δίσκοι, είναι μικρές ομάδες από σχετικά αδιαφοροποίητα κύτταρα, οι οποίες προϋπάρχουν στην προνύμφη, ενώ στη συνέχεια δίνουν συγκεκριμένες δομές του ενηλίκου ατόμου. Οι δίσκοι αυτοί, που διακρίνονται σε εννέα ζεύγη και έναν γεννητικό δίσκο, αναπτύσσονται σχηματίζοντας σάκκους από επιθήλια, ενώ παραμένουν κοντά στην επιφάνεια του σώματος της προνύμφης μέχρι να αλλάξουν τα επίπεδα των ορμονών κατά τη διαδικασία της μεταμόρφωσης.

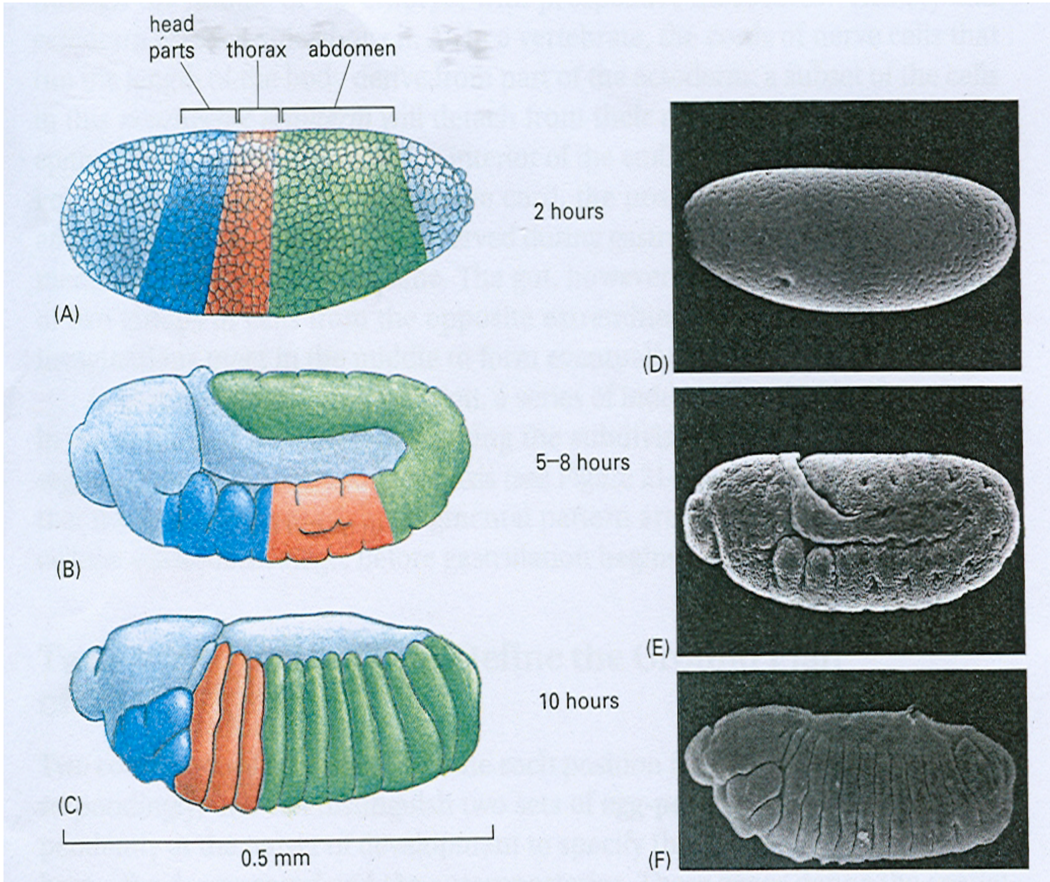
Η ανάπτυξη και μεταμόρφωση του εντόμου, (αλλαγή της μορφής κατά τη διάρκεια της μετεμβρυϊκής του ανάπτυξης), βρίσκεται κάτω από ενδοκρινικό έλεγχο με την βοήθεια 3 ορμονών: 1) **Της εγκεφαλικής ορμόνης**, η οποία εκκρίνεται από νευροεκκριτικά κύτταρα του εγκεφάλου διεγείροντας τους προθωρακικούς αδένες να απελευθερώσουν την εκδυσόνη στην αιμολέμφο, 2) **της στεροειδούς ορμόνης, εκδυσόνης**, η οποία διεγείρει τον διαχωρισμό του προηγουμένου επιδερμιδίου από το νέο υποκείμενο επιδερμίδιο, (φαινόμενο απόλυσης), 3) **της νεανικής ορμόνης ή νεοτενίνης (JH),** που εκκρίνεται από τα αλλαντοειδή σωμάτια του εγκεφάλου και είναι υπεύθυνη για την διατήρηση των προνυμφικών δομών αναστέλλοντας τη μεταμόρφωση.

Για τον λόγο αυτό, στο στάδιο της νύμφης αναστέλλεται η παραγωγή της προωθώντας την πορεία της μεταμόρφωσης σε τέλειο έντομο. Όταν ολοκληρωθεί η ανάπτυξη του τελείου εντόμου, τότε εκκολάπτεται από το βομβύκιο το έντομο ανοίγοντας οπή στο πρόσθιο τμήμα του. Το νεοεκδυθέν έντομο έχει επιμηκυσμένο σώμα με χρώμα πιο ανοιχτό από το κανονικό, αναδιπλωμένα, μικρά και μαλακά φτερά. Μέσα στα επόμενα όμως λεπτά, οι αποχρώσεις όλων των μερών του σώματός του γίνονται πιο έντονες, τα φτερά εκτείνονται και δυναμώνουν, ενώ μέσα στην επόμενη ώρα αποκτά την τελική του μορφή ως ενήλικο έντομο. Συνολικά, ως τέλεια έντομα ζουν 20-25 περίπου 24ωρα.

Τα θηλυκά άτομα καθυστερούν να ωριμάσουν, σε σύγκριση με τα αρσενικά, και απαιτούν δύο 24ωρα μετά την έκδυσή τους, μέχρις ότου ολοκληρωθεί η διαδικασία ωρίμανσης των πρώτων ωοθυλακίων. Κατά τη σεξουαλική ωρίμανση η ωοθήκη συσσωρεύει ώριμα ωοθυλάκια σταδίου 14, έτοιμα για απόθεση. Ωστόσο, τα σεξουαλικά ώριμα παρθένα έντομα σπάνια κάνουν απόθεση. Η παραγωγή νέων ωοθυλακίων αναστέλλεται, ενώ σε περιορισμένο βαθμό παρατηρούνται ωοθυλάκια σταδίου 10. Ένα σημείο ελέγχου κατά το στάδιο 9 της βιτελλογένεσης είναι κρίσιμο για τη ρύθμιση της περαιτέρω ανάπτυξης του ωοκυττάρου (**Soller et al., 1997**). Μετά το ζευγάρωμα, δηλαδή την έκθεση των θηλυκών εντόμων στην πρωτεϊνη sex-peptide, τα ωοθυλάκια προχωρούν από το στάδιο 9 στο στάδιο 10 με μία χαρακτηριστική αύξηση μεγέθους λόγω της συσσώρευσης της λεκίθου (**Chen et al., 1988; Kubli, 1996**).

Σύζευξη αρχίζει να συμβαίνει κατά τη διάρκεια του 2^{ου} 24ώρου. Η σύζευξη αρσενικού-θηλυκού διαρκεί περίπου 10min και κατά τη διάρκειά της το αρσενικό αφήνει σπέρμα, αλλά και τις ουσίες που συντίθεται στους συμπληρωματικούς του αδένες (**Chen et al., 1988; Soller et al., 1997).**

Τα θηλυκά έντομα αποθέτουν τα γονιμοποιημένα αυγά μέσα στην τροφή τους. Τα αναπνευστικά νημάτια προεξέχουν από την τροφή για να αναπνέει το έμβρυο. Τα αυγά του εντόμου, είναι εφοδιασμένα εξωτερικά με ουσία που τα κάνει να κολλάνε στην τροφή. Το μέγιστο της ωοτοκίας, παρατηρείται μεταξύ του 3^{ου} και 6^{ου} 24ώρου της ζωής τους, ως τέλεια έντομα. Η ωοτοκία του εντόμου εξαρτάται από πληθώρα παραγόντων, όπως τον γονότυπο, τη θερμοκρασία, από το εάν έχει προηγηθεί μία αναισθησία, τον αριθμό των αρσενικών εντόμων στο ίδιο περιβάλλον, την ατμοσφαιρική πίεση, την υγρασία, την διαθεσιμότητα, την ποιότητα, καθώς και την επιφάνεια της τροφής (**King, 1970; Ashburner, 1989; Bownes and Blair, 1986**), την πρωτεϊνη sex peptide (**Chen et al., 1988; Soller et al., 1997**), τη νεανική ορμόνη (**Riddiford and Ashburner, 1991; Soller et al., 1999**) την εκδυσόνη (**Buszczak et al., 1999; Carney and Bender, 2000)**, καθώς και το μονοπάτι της ινσουλίνης (**Drummond-Barbosa and Spradling, 2001**). Αξίζει επίσης να σημειωθεί ο κρίσιμος ρόλος της ηλικίας των εντόμων στην παραγωγή των ωοθυλακίων (**Zhan et al., 2007; Zhao et al., 2008**). Τα τελευταία 5 περίπου 24ωρα της ζωής τους, τα έντομα θεωρούνται γερασμένα. Τα θηλυκά συνεχίζουν να αποθέτουν αυγά, πολλά από τα οποία όμως δεν αναπτύσσονται (**Zhao et al., 2008**).

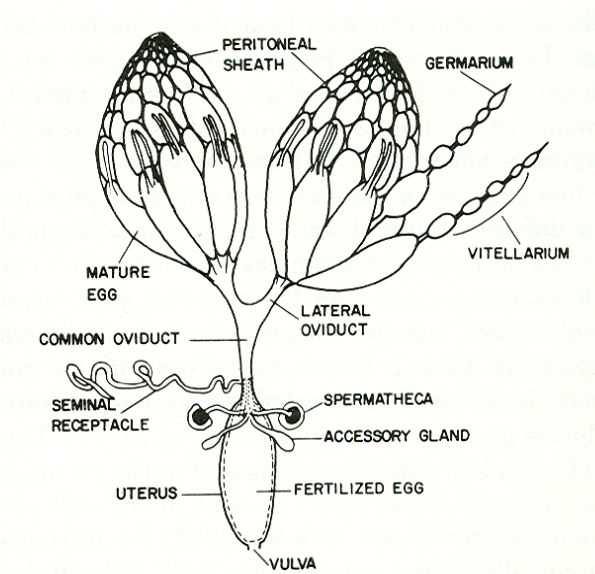


Εικόνα 1.6. Προέλευση των σωματικών μεταμεριδίων κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Σχηματική αναπαράσταση, (αριστερές εικόνες), και αντίστοιχες ηλεκτρονιογραφίες SEM, (δεξιές εικόνες). Στις 2 ώρες το έμβρυο είναι στο στάδιο του συγκυτιακού βλαστοδέρματος ενώ ο μεταμερισμός δεν είναι ακόμη ορατός (A, D). Στις 5-8 ώρες έχει ολοκληρωθεί το στάδιο της γαστριδίωσης και ο μεταμερισμός έχει αρχίσει να είναι ορατός (B, E). Στις 10 ώρες όλα τα μεταμερίδια έχουν σχηματιστεί , ενώ τα πρόσθια τμήματα του εμβρύου υποχωρούν προς τον θώρακα και αρχίζει να σχηματίζεται το κεφάλι (C, F). head parts: τμήματα κεφαλιού, thorax: θώρακας, abdomen: κοιλιά (Alberts et al., 1994).

1.12 Θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα του εντόμου

Κάθε θηλυκό ενήλικο άτομο του είδους *Drosophila melanogaster* φέρει δύο ωοθήκες, που ανήκουν στον πολυτροφικό, μεροϊστικό, (το ωοκύτταρο συνοδεύεται από τροφοκύτταρα) τύπο. Οι ωοθήκες συνδέονται μέσω δικτύου αγγείων με το λιπαρό σώμα του εντόμου σε όλη την επιφάνειά τους και στην οπίσθια πλευρά καταλήγουν σε ωαγωγό. Οι δύο ωαγωγοί ενώνονται και σχηματίζουν τον κόλπο. Ένα ζεύγος σπερματοθηκών συνδεδεμένων με τον κόλπο, αποθηκεύει το σπέρμα μετά από κάθε συνουσία με αρσενικό άτομο, για τη γονιμοποίηση όλων των ωαρίων, που θα κατέρχονται μέσω του ωαγωγού και θα περνούν μπροστά από τις σπερματοθήκες, (εικ. 1.7). Κάθε μία από τις δύο ωοθήκες αποτελείται από 15-20 παράλληλα ωοθηκάρια (ovarioles), καθένα εκ των οποίων φέρει ωογόνια και μία σειρά ωοθυλακίων διαδοχικών αναπτυξιακών σταδίων (**King, 1970; Spradling, 1993**). Το κάθε ωοθηκάριο αποτελείται από 1) **το τελικό νημάτιο** (terminal filament), 2) το πρόσθιο τμήμα που ονομάζεται **γερμάριο** (germarium), το οποίο τροφοδοτείται με αιμολέμφο από το λιπαρό σώμα του εντόμου, ενώ φέρει τα προγονικά κύτταρα (stem cells) που δίνουν γένεση στα ωοθυλάκια, και 3) το οπίσθιο τμήμα που καλείται **βιτελλάριο** (vitellarium), που χαρακτηρίζεται από τα διαδοχικά στάδια ανάπτυξης των ωοθυλακίων (**Ashburner and Wright, 1980**) (εικ. 1.7).

Τα ωοθυλάκια (follicles ή egg chambers) συνιστούν τη βασική δομική και λειτουργική μονάδα της ωοθήκης. Κατά την πολύπλοκη αναπτυξιακή διαδικασία της ωογένεσης το νεαρό ωοθυλάκιο διαφοροποιείται σε ώριμο ωάριο, το οποίο φέρει κωδικοποιημένες όλες οι απαραίτητες πληροφορίες για την ανάπτυξη ενός πλήρους οργανισμού μετά τη γονιμοποίηση. Οι τρεις τύποι κυττάρων που συναντώνται στα ωοθυλάκια είναι οι εξής: το ωοκύτταρο (oocyte), τα τροφοκύτταρα (nurse cells) και τα θυλακοκύτταρα (follicle cells) (εικ. 1.14).



Εικόνα 1.7. Το ζεύγος ωοθηκών του θηλυκού εντόμου με τις δέσμες των ωοθηκαρίων. Διακρίνονται: η περιτοναϊκή θήκη (peritoneal sheath) το γερμάριο, (germarium), το βιτελλάριο, (vitellarium), τα ώριμα αυγά (mature eggs) οι ωαγωγοί (oviducts): πλευρικός (lateral) και κοινός-κεντρικός (common), η σπερματοθήκη, (spermatheca, seminal receptacle), ο βοηθητικός αδένας, (accessory gland), η μήτρα, (uterus), και ο ωαποθέτης, (vulva) μέσα από τον οποίο περνά το γονιμοποιημένο αυγό (fertilized egg), (Ashburner and Wright, 1980).

Η προέλευση τόσο του ωοκυττάρου όσο και των τροφοκυττάρων είναι από τη γενετική ή βλαστική κυτταρική σειρά (germline cells), ενώ τα θυλακοκύτταρα είναι σωματικά κύτταρα μεσοδερμικής προέλευσης (somatic line cells). Τα τροφοκύτταρα και τα θυλακοκύτταρα παρέχουν στο ωοκύτταρο κατά τη διάρκεια της ωογένεσης τα απαραίτητα συστατικά για τη δημιουργία του εμβρύου: 1) Το **ωοκύτταρο** είναι ο πιο πολύπλοκος κυτταρικός τύπος και έχει τη δυνατότητα να αναπτυχθεί σε στάδια προνύμφης (larva), νύμφης (pupa) και τελείου εντόμου. Η πορεία παραγωγής του ελέγχεται ορμονικά (**Dobens and Raftery, 2000**). 2) Τα **τροφοκύτταρα** είναι υπεύθυνα για τον εφοδιασμό του ωοκυττάρου με ριβοσώματα, πρωτεΐνες, RNA και άλλα κυτταρικά συστατικά που είναι απαραίτητα για την εμβρυογένεση. Ο εφοδιασμός αυτός επιτυγχάνεται μέσω της σύνδεσης των τροφοκυττάρων με το ένα άκρο του ωοκυττάρου. Η παρουσία ή απουσία τους, όπως επίσης και η διευθέτηση τους καθορίζουν τον τύπο του ωοθυλακίου στα διάφορα είδη εντόμων. 3) Τα

θυλακοκύτταρα περιβάλλουν το ωοκύτταρο με τη μορφή ενός μονόστιβου επιθηλίου. Οι λειτουργίες των θυλακοκυττάρων είναι: α) να συμμετέχουν ενεργά στη βιτελλογένεση, δηλαδή στη μεταφορά και συσσώρευση λεκίθου από την αιμολέμφο στο ωοκύτταρο όπως και να συνθέτουν ένα ποσοστό των πρωτεϊνών της λεκίθου, β) να παράγουν και να εκκρίνουν το κέλυφος του ωοκυττάρου (βιττελινική μεμβράνη, στρώμα κεριού, εσώτερη χοριονική ζώνη, ενδοχόριο και εξωχόριο) και γ) να αλληλεπιδρούν με το ωοκύτταρο σε όλες τις φάσεις της ωογένεσης και, μέσω μιας ανταλλαγής μηνυμάτων με αυτό, να συμμετέχουν ενεργά στον καθορισμό της πολικότητας του (**Margaritis, 1985; Dobens and Raftery, 2000; Trougakos and Margaritis, 2002).** Το σχήμα τους είναι πολυεδρικό και η πλασματική τους μεμβράνη διαθέτει τρεις κυρίως τύπους δεσμών: ζώνες πρόσδεσης, χασμοσυνδέσμους και φραγμοσυνδέσμους για την ταχύτερη ανταλλαγή μορίων και μεταβολιτών (**Μαργαρίτης, 1974**). Το κυτταρόπλασμα των κυττάρων αυτών είναι πλούσιο σε συστήματα Golgi, ενώ η πυρηνική μεμβράνη διαθέτει μικρό σχετικά αριθμό πόρων.

1.12.1 Διαφοροποίηση του ωοκυττάρου και ανάπτυξη ωοθυλακίου

Τα ωοθυλάκια προέρχονται από μία εξειδικευμένη περιοχή του προσθίου άκρου του κάθε ωοθυλακίου, το γερμάριο. Στην περιοχή του γερμαρίου, κάθε προγονικό γενετικό κύτταρο-GSC (germline stem cell) διαιρείται ασύμμετρα για να αυτοανανεωθεί και να παράγει έναν κυστοβλάστη (cystoblast) (εικ. 1.10). Ο κυστοβλάστης με τη σειρά του υπόκειται σε τέσσερις μιτωτικές διαιρέσεις χωρίς πλήρη κυτταροκίνηση, με αποτέλεσμα να προκύπτει μία κύστη 16 κυστοκυττάρων (16-cell cyst) που συνδέονται μεταξύ τους μέσω των λεγομένων δακτυλιοειδών καναλιών (ring canals). Ένα από τα δύο κύτταρα της πρώτης μιτωτικής διαίρεσης εξελίσσεται σε ωοκύτταρο και ξεκινά τη διαδικασία της μείωσης, ενώ τα υπόλοιπα 15 διαφοροποιούνται και συνιστούν τα λεγόμενα τροφοκύτταρα (**Lin and Spradling, 1993**). Κατά τη διάρκεια των παραπάνω διαιρέσεων μία κυτταροπλασματική δομή, το λεγόμενο συνάπτωμα (fusome) αγκιστρώνεται στον ένα πόλο της μιτωτικής ατράκτου καθορίζοντας το πρότυπο διαίρεσης των κυττάρων (**Lin et al., 1994**). Με τον τρόπο αυτό προκύπτει μία συμμετρική κύστη, που αποτελείται από δύο κύτταρα με τέσσερις διαύλους, δύο με τρεις διαύλους, τέσσερα με δύο και οκτώ με έναν δίαυλο. Το πρότυπο αυτό είναι κεφαλαιώδους σημασίας, καθώς ένα εκ των δύο κυττάρων που φέρει τέσσερις διαύλους θα διαφοροποιηθεί σε ωοκύτταρο.

Η διαφοροποίηση του ωοκυττάρου παρατηρείται στην περιοχή 2β του γερμαρίου και χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη διαφόρων πρωτεϊνών όπως τις BicD, Orb, Btz, Cup και πλήθος ειδικών μορίων mRNAs, όπως τα osk, BicD και orb. Τα παραπάνω μόρια συγκεντρώνονται στα δύο κύτταρα με τους τέσσερις διαύλους (προ-ωοκύτταρα) πλησίον του διαύλου που τα συνδέει. Με τη διέλευσή τους από την περιοχή 2a τα μόρια αυτά συσσωρεύονται τελικά στο ωοκύτταρο (**Suter et al., 1989; Lantz et al., 1994; Van Eeden et al., 2001**).

Στην περιοχή 2β το ωοθυλάκιο γίνεται περισσότερο δισκοειδές εκτεινόμενο σε όλο το πλάτος του γερμαρίου, στο ωοκύτταρο εμφανίζεται το κέντρο οργάνωσης των μικροσωληνίσκων (ΚΟΜ), ενώ τα θυλακοκύτταρα αρχίζουν να περιβάλλουν το ωοθυλάκιο (εικ. 1.10). Με την προώθηση του τελευταίου (στάδιο 1) στην περιοχή 3 του γερμαρίου, μιτοχόνδρια, κεντροσωμάτια, κυστίδια Golgi, και πλήθος πρωτεϊνικών μορίων και mRNAs οργανώνονται στον εμπρόσθιο πόλο και συγκροτούν το λεγόμενο σωμάτιο Balbiani (**Cox and Spradling, 2003**). Το ωοθυλάκιο αρχίζει να γίνεται σφαιρικό με το ωοκύτταρο τοποθετημένο στον οπίσθιο πόλο-PP (posterior pole), ενώ εξερχόμενο από το γερμάριο εισέρχεται ως ωοθυλάκιο σταδίου 2 στο βιτελλάριο, με τα γειτονικά ωοθυλάκια να παραμένουν ενωμένα μεταξύ τους μέσω των θυλακοκυττάρων στελέχους (stalk follicle cells) (εικ. 1.10, 1.11). Το ωοκύτταρο εμφανίζει πολικότητα με πρωτεϊνικά και μόρια mRNA, κεντροσωμάτια και μιτοχόνδρια να συγκεντρώνονται στον οπίσθιο φλοιό, ενώ τα τροφοκύτταρα ξεκινούν να πολυπλοειδίζονται και να αποκτούν μεγάλο μέγεθος (**Dej and Spradling, 1999**).

1.12.1.1 Αναπτυξιακή πορεία των ωοθυλακίων

Όπως προαναφέρθηκε, η κυτταροπλασματική ασυμμετρία στο συγκύτιο των 16 κυττάρων απαιτείται για τον καθορισμό του ωοκυττάρου και φαίνεται να εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τους μικροσωληνίσκους. Οι τελευταίοι ξεκινούν από το ΚΟΜ και εκτείνονται στα τροφοκύτταρα μέσω των δακτυλιοειδών διαύλων συγκροτώντας ένα δίκτυο που διαφοροποιεί το προ-ωοκύτταρο από τα υπόλοιπα κύτταρα του συγκυτίου (**Theurkauf et al., 1992**). Τα τροφοκύτταρα συνθέτουν RNA, πρωτεΐνες και οργανίδια που προορίζονται για το ωοκύτταρο, τα οποία μεταφέρονται σε αυτό μέσω των δακτυλιοειδών καναλιών (**Mahajan-Miklos and Cooley, 1994; Robinson and Cooley, 1997**). Η ανάπτυξη των ωοθυλακίων έχει χωριστεί σε 14 διακριτά στάδια (**King, 1970**) ή σε 20 σύμφωνα με διαφορετική κατάταξη (**Μαργαρίτης, 1985; 1986**) (εικ. 1.8).

Α) Προβιτελλογενετικά στάδια

Κατά τη διάρκεια των προβιτελλογενετικών σταδίων (εικ. 1.8, 1.11), δηλαδή από τη στιγμή που το ωοθυλάκιο εξέρχεται από το γερμάριο και εισέρχεται στο βιτελλάριο και μέχρι το στάδιο 6, το ωοκύτταρο μεγαλώνει με τους ίδιους ρυθμούς σε σχέση με τα τροφοκύτταρα, ως αποτέλεσμα της μεταφοράς θρεπτικών συστατικών από αυτά (**Mahajan-Miklos and Cooley, 1994; Cooley and Theurkauf 1994**). Τα τροφοκύτταρα γίνονται αμέσως πολυπλοειδικά με τη βοήθεια της ενδομίτωσης, ενώ τα θυλακοκύτταρα αφού αυξηθούν κατ'αρχήν σε αριθμό, στη συνέχεια γίνονται πολυπλοειδή, μετά την ενδομίτωση (στάδια 7-9). Είναι χαρακτηριστικό το γεγονός ότι στο στάδιο 2 υπάρχουν 80 θυλακοκύτταρα γύρω από το ωοκύτταρο και τα τροφοκύτταρα, ενώ καθώς προχωρά η ανάπτυξη και τα θυλακοκύτταρα υπόκεινται σε συνεχείς μιτωτικές διαιρέσεις, στο στάδιο 6, καταλήγουν στον αριθμό των 650 περίπου κυττάρων. Χαρακτηριστική είναι η αύξηση που παρατηρείται στον αριθμό των μιτοχονδρίων των θυλακοκυττάρων, γεγονός που αντανακλά την έντονη απαίτησή τους σε ενέργεια (**Tourmente et al., 1990**).

Β) Βιτελλογενετικά στάδια

Τα πιο εξελιγμένα έντομα και μερικά σπονδυλωτά χαρακτηρίζονται από την ετεροσυνθετική βιτελλογένεση κατά την οποία τα υλικά μεταφέρονται στο ωοκύτταρο μέσω του αίματος (**Τρουγκάκος, 1997**). Όπως θα αναλυθεί και σε επόμενα κεφάλαια, στο δεύτερο σημείο ελέγχου της ωογένεσης (στάδια 7-9) κατά το οποίο “αποφασίζεται” η περαιτέρω ανάπτυξη του ωοθυλακίου και η είσοδός του στα βιτελλογενετικά στάδια, κύριοι ρυθμιστικοί μηχανισμοί της ωοθήκης, ανάμεσα στους οποίους και τα επίπεδα των ορμονών της εκδυσόνης και της νεοτενίνης, ασκούν καθοριστικό ρόλο (**Soller et al., 1999**).

Η βιτελλογένεση διακρίνεται σε 7 στάδια, τα οποία είναι τα ακόλουθα κατά

Μεσσήνη-Νικολάκη (1982):

Στάδιο 8: Αποτελεί το στάδιο του ωοθυλακίου στο οποίο εντοπίζεται για πρώτη φορά λέκιθος με χαρακτηριστικούς σχηματισμούς τα α και β-λεκιθοσφαιρίδια. Τα πρώτα τα οποία είναι σφαιρικοί σχηματισμοί που περιβάλλονται από διπλή μεμβράνη, αποτελούνται από φωσφολιπίδια, πολυσακχαρίτες και πρωτεϊνες της λεκίθου. Τα β-λεκιθοσφαιρίδια χαρακτηρίζονται από συσσωματώματα πολυσακχαριτών και φωσφολιπιδίων, ενώ δεν αποτελούνται από μεμβράνη.

Στάδιο 9A: Στο στάδιο αυτό ο όγκος του ωοκυττάρου αυξάνεται με συσσώρευση α-λεκιθοσφαιριδίων, ενώ ο συνολικός όγκος του ωοθυλακίου δεν αλλάζει σημαντικά. Τα θυλακοκύτταρα μετακινούνται προς το ωοκύτταρο από την επιφάνεια των τροφοκυττάρων. Εμφανίζονται εκκριτικά κυστίδια που εκκρίνονται στα όρια θυλακοκυττάρων –ωοκυττάρου και σχηματίζουν τα βιτελλινικά σωμάτια, τον πρόδρομο σχηματισμό της βιτελλινικής μεμβράνης.

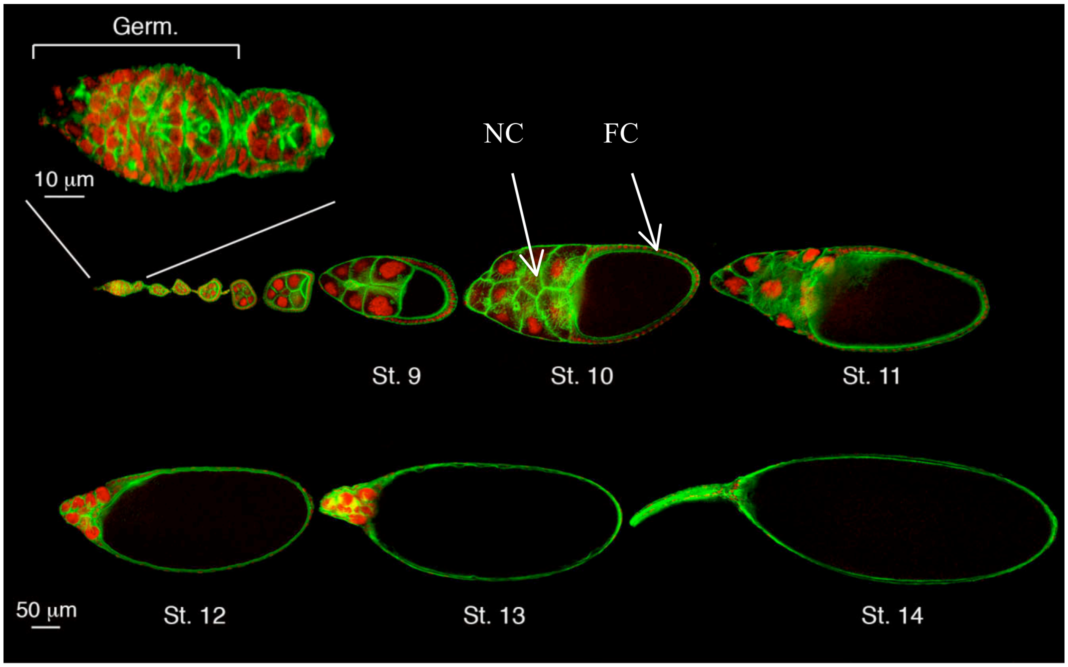
Στάδιο 9B: Αύξηση του όγκου του ωοκυττάρου με συσσώρευση α-λεκιθοσφαιριδίων.

Στάδιο 9C: Ο όγκος του ωοκυττάρου αυξάνει αισθητά σε σύγκριση με τον όγκο του ωοθυλακίου. Στο στάδιο αυτό διευρύνονται οι μεσοκυττάριοι χώροι στα θυλακοκύτταρα και συσσωρεύονται βιτελλινικά σωμάτια.

Στάδιο 10A: Παρατηρείται σημαντική αύξηση του όγκου του ωοθυλακίου. Τα βιτελλινικά σωμάτια αυξάνονται σε πάχος και συντήκονται σε μεγαλύτερα αθροίσματα. Εμφανίζεται έντονη εκκριτική δραστηριότητα και το ωοκύτταρο εξακολουθεί να προσλαμβάνει λεκιθοπρωτεϊνες από την αιμολέμφο κυτταροποσικά.

Στάδιο 10B: Ο συνολικός όγκος του ωοθυλακίου αυξάνεται περαιτέρω. Τα βιτελλινικά σωμάτια έχουν συντηχθεί σε μία συνεχή στοιβάδα που καλύπτει το ωοκύτταρο πάχους 1.6μm, ενώ τα θυλακοκύτταρα συνεχίζουν να εκκρίνουν υλικά. Δεν εντοπίζονται κυτταροποσικά κυστίδια.

Στάδιο 10C: Στο στάδιο αυτό ο συνολικός όγκος του ωοκυττάρου δεν μεταβάλλεται ενώ αυξάνει ο όγκος του ωοκυττάρου σε σχέση με τα τροκύτταρα. Η έκκριση της βιτελλινικής μεμβράνης έχει ολοκληρωθεί. Για πρώτη φορά εμφανίζεται η ραχιαίο-κοιλιακή διαφοροποίηση ενώ στην εμπρόσθιο-ραχιαία περιοχή παρατηρείται συσσώρευση θυλακοκυττάρων, τα οποία θα εκκρίνουν τις διαφοροποιημένες δομές του χορίου στον εμπρόσθιο πόλο. Η βιτελλινική μεμβράνη στην τελική της δομή εμφανίζεται ως μία ελαστική, άμορφη και σπογγώδης δομή (εικ. 1.9).



Εικόνα 1.8. Τα διαδοχικά στάδια ανάπτυξης των ωοθυλακίων, από το στάδιο του γερμαρίου μέχρι και το τελευταίο στάδιο 14. Η χρώση με FITC-φαλλοϊδίνης απεικονίζει τον κυτταροσκελετό της F-ακτίνης (πράσινο χρώμα), και το ιωδιούχο προπίδιο τους πυρήνες (κόκκινο χρώμα). Κατά τη διάρκεια των σταδίων 9-11 διακρίνονται οι ανακατατάξεις των πληθυσμών των θυλακοκυττάρων (FC) και η αύξηση μεγέθους του ωοκυττάρου (OC) Στα τελευταία στάδια 12-14, το ωοκύτταρο εξακολουθεί να αυξάνεται, ενώ τα τροφοκύτταρα (NC) έχοντας εκπληρώσει το ρόλο τους με την προώθηση του κυτταροπλασματικού τους υλικού στο ωοκύτταρο, εκφυλίζονται μέσω κυτταρικού θανάτου. Στο τέλος του σταδίου 14 εκφυλίζεται και ο πληθυσμός των θυλακοκυττάρων. Germ: γερμάριο, St: στάδιο (Ανατύπωση από Cavaliere et al., 2008).

Η βιτελλινική μεμβράνη αποτελεί το πρώτο στρώμα του κελύφους και είναι πρωτεϊνικής φύσεως σε ποσοστό 74%, ενώ περιέχει και υδατάνθρακες. Το πάχος της ξεκινώντας από 1.3μm στο στάδιο 10C σταδιακά μειώνεται λόγω της πίεσης από το αναπτυσσόμενο χόριο στα 0.3μm στο τέλος της χοριογένεσης (**Margaritis, 1985**).

Στη διάρκεια των βιτελλογενετικών σταδίων επέρχεται η συσσώρευση των λεκιθοπρωτεϊνών ή βιτελλογενινών στο ωοκύτταρο. Οι βιτελλογενίνες συντίθενται στην ωοθήκη από τα θυλακοκύτταρα, διαδικασία που επάγεται από την ορμόνη νεοτενίνη (JH), καθώς και στο λιπαρό σωμάτιο του θώρακα και σε αυτό της κοιλιάς, μία διαδικασία που εξαρτάται από την 20-υδροξυεκδυσόνη (20 E) (**Brennan et al., 1982; Isaac and Bownes, 1982**). Μετά τη σύνθεσή τους οι βιτελλογενίνες εκκρίνονται στην αιμολέμφο και επιλεκτικά μεταφέρονται στο ωοκύτταρο, στο οποίο εισέρχονται με ενδοκύττωση (**Giorgi, 1979; Bownes and Blair, 1986**). Οι λεκιθοπρωτεϊνες αναγνωρίζονται και προσλαμβάνονται από έναν υποδοχέα της πλασματικής μεμβράνης του ωοκυττάρου και μέσω καλυμμένων εσοχών και κυτταροποσικών κυστιδίων, μεταφέρονται σε πρώιμα ενδοσώματα και κατόπιν σε μία τροποποιημένη μορφή ωρίμων ενδοσωμάτων (α-λεκιθοσφαιρίδια) που οδηγούνται σε αποθήκευση (**Μεσσήνη-Νικολάκη, 1982**).

Η έκφραση των γονιδίων των λεκιθοπρωτεϊνών ξεκινά και στους δύο ιστούς αμέσως μετά την έκδυση των τελείων εντόμων (**Coschigano and Wensink, 1993**). Φαίνεται, ότι οι δύο ορμόνες JH and 20E συμμετέχουν στη ρύθμιση έκφρασης των γονιδίων αυτών (**Bownes and Blair, 1986; Bownes et al., 1994; Riddiford, 1993**), με τη διεγερτική επίδραση και των δύο ορμονών στο λιπαρό σώμα, σε αντίθεση με την ωοθήκη, η οποία φάνηκε να επηρεάζεται μόνο από την JH (**Bownes and Blair, 1986**). Σημειώνεται ότι και το μόριο sex-peptide μπορεί να διεγείρει τη σύνθεση της JH στα αλλαντοειδή σωμάτια των παρθένων θηλυκών εντόμων *in vitro* (**Moshitzky et al., 1996**).

Γ) Χοριογενετικά στάδια

Στο τέλος του σταδίου 10, το ωοκύτταρο καταλαμβάνει ολόκληρο το οπίσθιο μισό του ωοθυλακίου (εικ. 1.14). Στα στάδια 10Β έως 12, το κυτταρόπλασμα των τροφοκυττάρων μεταφέρεται στο ωοκύτταρο μέσω των δακτυλιοειδών καναλιών, ενώ αμέσως μετά οι πυρήνες των τροφοκυττάρων παρουσιάζουν συμπυκνωμένη χρωματίνη, αποδομημένο DNA και εκφυλίζονται (εικ. 1.14) (**Cavaliere et al., 1998; Foley and Cooley, 1998; McCall and Steller, 1998**), ενώ τα υπολείμματά τους εγκολπώνονται και απομακρύνονται από τα θυλακοκύτταρα (**Nezis et al., 2000**). Τα θυλακοκύτταρα, κατά τη διάρκεια των σταδίων 11-14, συνθέτουν και εκκρίνουν πρωτεΐνες για τη δημιουργία του χορίου, καθώς και τις εξειδικευμένες δομές του κελύφους, που περιβάλλουν το πλήρες ανεπτυγμένο ωοκύτταρο (**Margaritis 1985; 1986; Margaritis and Mazzini, 1998; Trougakos and Margaritis, 2002**). Παράλληλα, μία σειρά σηματοδοτικών μονοπατιών αλληλεπιδρούν με το ωοκύτταρο ελέγχοντας την πολικότητά του και κατ'επέκταση αυτή του εμβρύου όπως θα αναλυθεί στη συνέχεια **(Berg, 2005)**. Στο τέλος του σταδίου 14, τα θυλακοκύτταρα εμφανίζουν χαρακτηριστικά κυτταρικού θανάτου (εικ. 1.14) και φαγοκυτταρώνονται από τα επιθηλιακά κύτταρα του ωαγωγού (**Nezis et al., 2002**).

Το πρότυπο έκκρισης των θυλακοκυττάρων κατά τη διάρκεια των σταδίων αυτών είναι το ακόλουθο: 1) Έκκριση πρωτεϊνών και πολυσακχαριτών, 2) σύνθεση και έκκριση κεριού, 3) σύνθεση και έκκριση πρόδρομων μορφών κρυσταλλικών πρωτεϊνών, 4) σύνθεση και έκκριση δομικών πρωτεϊνών και πολυσακχαριτών και τέλος, 5) εκφυλισμός των κυττάρων αυτών. Αποτέλεσμα των παραπάνω διαδικασιών είναι ο σχηματισμός ενός λειτουργικού χορίου (εικ. 1.9).

Το σύστημα σταδιογράφησης των 9 σταδίων της χοριογένεσης βάσει της εμφάνισης των ωοθυλακίων σε σχέση με τη λεπτή δομή των διαφόρων ζωνών του κελύφους (**Μαργαρίτης, 1980, Margaritis, 1986**) έχει ως εξής:

Στάδιο 11Α: Στο στάδιο αυτό το το ωοκύτταρο καταλαμβάνει τα 2/3 του όγκου του ωοθυλακίου. Η βιτελλινική μεμβράνη στην εμπρόσθια περιοχή έχει άνισο πάχος αν και εμφανίζεται ισοπαχής και συμπαγής πέριξ του ωοκυττάρου, ενώ στην περιοχή του κολλάρου εμφανίζει οπές.

Στάδιο 11Β: Το μέγεθος του ωοκυττάρου αυξάνεται αισθητά σε σύγκριση με το προηγούμενο στάδιο. Στον εμπρόσθιο πόλο εμφανίζονται πολυάριθμα κυστίδια στα θυλακοκύτταρα των αναπνευστικών νηματίων, τα οποία συνδυάζονται με την έκκριση ηλεκτρονιόπυκνου υλικού, γεγονός που υποδηλώνει την έναρξη σύνθεσης των αναπνευστικών νηματίων. Παρατηρείται έκκριση-συγκρότηση του συμπλέγματος ICL-εσώτερου ενδοχορίου στο εμπρόσθιο άκρο.

Στάδιο 12A: Είναι το στάδιο στο οποίο γίνονται εμφανή για πρώτη φορά τα αναπνευστικά νημάτια. Στο εμπρόσθιο ραχιαίο τμήμα του ωοθυλακίου έχει σχηματιστεί το ενδοχόριο, το οποίο ελαττώνεται προς την πλευρά του κυρίου τμήματος μέχρις ότου εξαφανίζεται.

Στάδιο 12B: Στο στάδιο αυτό επιμηκύνονται τα αναπνευστικά νημάτια. Σε όλο το κυρίως τμήμα παρατηρείται σύμπλεγμα ICL/εσώτερου ενδοχορίου, που σε ορισμένες θέσεις συνυπάρχει με χαλαρό υλικό.

Στάδιο 12C: Αυξάνεται ακόμη παραπάνω το μήκος των αναπνευστικών νηματίων. Στο κυρίως τμήμα διακρίνεται το στρώμα του κεριού, ενώ το ενδοχόριο έχει αυξηθεί με τοπικές αποθέσεις υλικού, που συνιστούν την έναρξη σχηματισμού των στυλίσκων. Προσθήκη ενδοχορίου και κρυστάλλωση ICL (διαχωρισμός από το ενδοχόριο στην περιοχή του πώματος).

Στάδιο 13A: Συμπλήρωση των στυλίσκων και έκκριση-συγκρότηση της οροφής του ενδοχορίου στο κύριο τμήμα του ωοθυλακίου. Επιμήκυνση των αναπνευστικών νηματίων και προσθήκη ενδοχορίου στο εμπρόσθιο άκρο.

Στάδιο 13B: Η οροφή ολοκληρώνεται στο κύριο τμήμα του ωοθυλακίου και του ενδοχορίου στο εμπρόσθιο άκρο. Επιμήκυνση των αναπνευστικών νηματίων

Στάδιο 14A: Έκκριση και συγκρότηση του δικτύου οροφής σε ολόκληρο το ωοθυλάκιο. Κρυστάλλωση ICL με παράλληλη διαμόρφωση του δαπέδου του ενδοχορίου στο κύριο τμήμα του ωοθυλακίου. Έκκριση και συγκρότηση των πλακών της ραχιαίας πλευράς καθώς και του δικτύου της κοιλιακής πλευράς στα αναπνευστικά νημάτια.

Στάδιο 14B: Αποτελεί το τελικό στάδιο της χοριογένεσης στο οποίο εκκρίνεται το εξωχόριο από τα θυλακοκύτταρα, ενώ τα αναπνευστικά νημάτια φτάνουν το τελικό τους μήκος. Τέλος τα θυλακοκύταρα εκφυλίζονται και αποχωρίζονται από το ώριμο ωάριο.

Υπό τις κατάλληλες συνθήκες τα ωάρια ενός θηλυκού εντόμου που έχει διασταυρωθεί με αρσενικό άτομο, περνούν από τον ωαγωγό στη μήτρα, όπου και ενεργοποιούνται, ολοκληρώνουν τη μείωση και γονιμοποιούνται (**King, 1970; Bloch Qazi et al., 2003**).

1.12.1.2 Μορφολογία του κελύφους

Το κέλυφος του αυγού, που περιβάλλει το ωοκύτταρο και αποτελείται από τη βιτελλινική μεμβράνη και το χόριο, είναι μία εξωκυτταρική λειτουργική δομή που εξυπηρετεί πλήθος ρόλων από την γονιμοποίηση του αυγού μέχρι την εκκόλαψη της λάρβας στο τέλος της εμβρυογένεσης (**Margaritis,1985; Margaritis and Mazzini,1998; Waring, 2000**). Η δομή αυτή εναποτίθεται ανάμεσα στο ωοκύτταρο και τα υπερκείμενα θυλακοκύτταρα. Οι πρωτεϊνες του κελύφους εκκρινόμενες από τα θυλακοκύτταρα, διαμορφώνουν μία αυστηρά συγκροτημένη δομή που φέρει χαρακτηριστική οριζόντια και ακτινωτή πολυπλοκότητα (**Μαργαρίτης, 1980; Margaritis et al., 1980**). Η ακτινωτή πολυπλοκότητα αντιστοιχεί στις διαδοχικές ζώνες του κελύφους εκφράζοντας τη χρονική διαφοροποίηση των κυττάρων που εκκρίνουν και παράγουν τις ζώνες αυτές. Η οριζόντια πολυπλοκότητα αντιστοιχεί σε διαφορές στη δομή της κάθε ζώνης του κελύφους, τόσο μέσα στο αποτύπωμα ενός θυλακοκυττάρου (κυτταρική πολυπλοκότητα) όσο και στις εξειδικευμένες περιοχές που εμφανίζουν δομική διαφοροποίηση (περιφερειακή πολυπλοκότητα). Τα εξειδικευμένα αυτά χαρακτηριστικά εξαρτώνται από σειριακές και σε κάποιες περιπτώσεις συνδυασμένες ενεργότητες πολλών γνωστών σηματοδοτικών μονοπατιών κατά τη μέση και όψιμη ωογένεση. Πέντε μορφολογικά διακριτά στρώματα-ζώνες του κελύφους έχουν ταυτοποιηθεί και είναι τα εξής (**Μαργαρίτης, 1980; Margaritis et al., 1980**) (εικ. 1.9A): 1) **Βιτελλινική μεμβράνη** με πάχος 2500-3000 A, ελαστική και πορώδης με σωματίδια διαμέτρου 70-90 A 2) **Στρώμα κεριού**, πάχους 50 A, που αποτελείται από υδρόφοβες πλάκες, οι οποίες συμπιέζονται μεταξύ της βιτελλινικής μεμβράνης και της εσώτερης χοριονικής ζώνης. 3) **Εσώτερη χοριονική ζώνη (ICL),** πάχους 400 A, που αποτελείται από 8-10 στοιβάδες πάχους 50 A η κάθε μά από αυτές. Η ζώνη φαίνεται να φέρει σε μία περιοδική κατανομή σφαιρικών μορίων διαμέτρου 30 A σε τρισδιάστατο κυβικό πλέγμα έναν αριθμό κρυσταλλιτών διαμέτρου 1-3 μm. 4) **Ενδοχόριο**, με ένα λεπτό διάτρητο δάπεδο 400 A, που αποτελείται από σύμπλεγμα ινιδίων διαμέτρου 400 A και συμπαγή οροφή 2000 A, καλυπτόμενη από πολυγωνικό δίκτυο. Μεταξύ δαπέδου και οροφής υπάρχουν στυλίσκοι διαμέτρου 2500-4000 A και ύψους 1μm. 5) **Εξωχόριο,** πάχους 3000-5000 A, που αποτελείται από διατεταγμένες ίνες διαμέτρου 40-80 A, χαλαρά συνδεδεμένες μεταξύ τους. Η σύνθεση του χορίου στα τελευταία στάδια της ωογένεσης προϋποθέτει τη συντονισμένη επέκταση των γονιδίων του χορίου που ξεκινά στο στάδιο 10B (Claycomb and Orr-Weaver, 2005).

Η επιφάνεια του χορίου περιλαμβάνει: α) Πρόσθιο πόλο, όπου και βρίσκονται, ένας σχηματισμός, για είσοδο του σπέρματος, που ονομάζεται **μικροπύλη,** ένα ζεύγος **αναπνευστικά νημάτια,** για την αναπνοή του εμβρύου και **πώμα** που χωρίζεται από το υπόλοιπο κέλυφος με το **κολλάρο**, με αποκόλληση των οποίων, κατά το τέλος της εμβρυογένεσης, γίνεται η έξοδος της προνύμφης από το αυγό. β) **Οπίσθιο πόλο**, όπου κατά την εμβρυογένεση θα ξεκινήσει η δημιουργία των γεννητικών οργάνων του εντόμου, (εικ. 1.9B).

Ο μεταγραφικός έλεγχος των γονιδίων της βιτελλινικής μεμβράνης, όπως των VM26A.2, VM32E (**Savant and Waring 1989; Jin and Petri 1993; Cavaliere et al., 1997; Andrenacci et al., 2000**) και του χορίου s15, s36 (**Mariani et al., 1988; Tolias and Kafatos, 1990**) έχει μελετηθεί εκτενώς αποκαλύπτοντας συγκεκριμένα ρυθμιστικά στοιχεία (cis-acting) της τοπικής και χρονικής τους έκφρασης. Παράλληλα, πλήθος μεταγραφικών παραγόντων (trans-acting) ελέγχει την έκφραση των γονιδίων της ζώνης του χορίου με ορισμένους από αυτούς να έχουν ταυτοποιηθεί, όπως οι μεταγραφικοί παράγοντες CF1 και CF2 που προσδένονται στον υποκινητή του γονιδίου του χορίου s15. Είναι χαρακτηριστικό ότι, ο παράγοντας CF1 ή αλλιώς USP (ultraspiracle) σχηματίζει ετεροδιμερή με τον υποδοχέα της εκδυσόνης EcR επάγοντας την έκφραση γονιδίων του χορίου (**Hackney et al., 2007**). Επίσης, όπως έχει διαπιστωθεί, το πολύπλοκο σύστημα έκφρασης των προαναφερθέντων γονιδίων επηρεάζεται θετικά ή αρνητικά από την αλληλεπίδραση μεταγραφικών παραγόντων, η δράση των οποίων φαίνεται να ελέγχεται από τα μονοπάτια σηματοδότησης του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα-EGFR (epidermal growth factor receptor) και του πρωτεϊνικού μορίου Dpp (Decapentaplegic/TGF-β-like protein). Παράδειγμα αποτελεί η τοπική και χρονική ρύθμιση των γονιδίων s36 του χορίου και VM32E της βιτελλινικής μεμβράνης από τις οδούς σηματοδότησης Dpp/EGFR (**Tolias et al., 1993; Bernardi et al., 2006; 2007**).

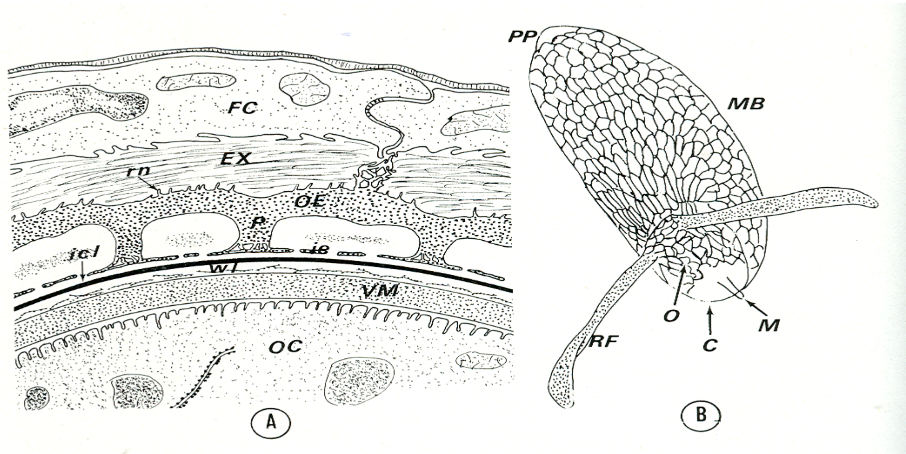
Εξειδικευμένες περιοχές στην περιοχή του κελύφους-Οριζόντια πολυπλοκότητα

Όπως έχει αποδειχθεί (**Margaritis et al., 1980**), όλες σχεδόν οι ζώνες του κελύφους χαρακτηρίζονται από δομική διαφοροποίηση στις ειδικευμένες περιοχές (περιφερειακή πολυπλοκότητα), ενώ μερικές εμφανίζουν διαφορικότητα δομής σε κάθε κύτταρο χωριστά (κυτταρική πολυπλοκότητα). Συνέπεια της περιφερειακής πολυπλοκότητας είναι η ύπαρξη ειδικευμένων περιοχών του κελύφους: 1) **Το πώμα**, που βρίσκεται στην εμπρόσθιο-ραχιαία μοίρα του ωοθυλακίου και περιλαμβάνει τρεις διακριτούς τύπους αποτυπωμάτων και διαθέτει κατά τόπους διάτρητο σύμπλεγμα δαπέδου-στυλίσκων-οροφής, πάχους 0.3μm. 2) **Το κολλάρο**, που είναι ημικυκλική περιοχή και με το οποίο διαχωρίζεται το πώμα από την κοιλιακή πλευρά του κυρίου τμήματος, ενώ περιέχει διάτρητη βιτελλινική μεμβράνη και το ενδοχόριο εμφανίζει συμπαγές δάπεδο και μεταποιημένους στυλίσκους-οροφή, οι οποίοι σχηματίζουν ασυνεχή διάταξη. 3) **Η μικροπύλη,** που αποτελείται από βιτελλινική προεξοχή με ελικοειδείς σχηματισμούς και από ενδοχοριονικό τμήμα σε μορφή κώνου, το οποίο εσωτερικά περιλαμβάνει άνοιγμα διαμέτρου 10μm για την υποδοχή του βιτελλινικού τμήματος και δίαυλο διαμέτρου 0.8 μm για την είσοδο του σπερματοζωαρίου. 4) **Τα δύο αναπνευστικά νημάτια**, που είναι επιμήκεις σχηματισμοί, κυλινδροειδείς, πάχους 20μm και μήκους 300μm. Περιέχουν διακλαδισμένους στυλίσκους και δύο διακριτές επιφάνειες: μία ραχιαία, με πλάκες διαμέτρου 1-3μm και μικρά βαθουλώματα, και μία κοιλιακή, η οποία περιέχει λεπτό δίκτυο από ίνες διαμέτρου 500 A^0, με ανοίγματα 1600 A^0. Και οι δύο επιφάνειες επιτρέπουν την άμεση επικοινωνία μεταξύ περιβάλλοντος και του εσωτερικού χώρου των κοιλοτήτων του ενδοχορίου. 5) **Ο οπίσθιος πόλος**, περιέχει διαφοροποιημένη μορφή ενδοχορίου με ελλιπές δάπεδο, διακλαδισμένους πολύ επιμήκεις και κυκλικά διατεταγμένους στυλίσκους καθώς και οροφή πολύ λεπτή και πολλές φορές διάτρητη (εικ. 1.9Β) (**Margaritis et al., 1980**).

1.12.1.3 Ο ρόλος του κυτταροσκελετού των μικροσωληνίσκων στα διάφορα στάδια της ωογένεσης και ο καθορισμός της αξονικής συμμετρίας του ωοκυττάρου

Όπως έχει διαπιστωθεί σε διαφορετικές φάσεις της ωογένεσης τα στοιχεία του κυτταροσκελετού εμπλέκονται στις διαδικασίες μεταφοράς μορίων (**Cooley and Theurkauf, 1994).** Οι μικροσωληνίσκοι είναι πολωμένα μόρια με θετικά και αρνητικά άκρα. Στο στάδιο του γερμαρίου το αρνητικό άκρο εντοπίζεται στο ωοκύτταρο, γεγονός που σημαίνει ότι αυτό το πολωμένο ικρίωμα καθοδηγεί τη μεταφορά των διαφόρων μορίων προς το ωοκύτταρο με τη συμμετοχή ειδικών κινητηρίων πρωτεϊνών (**Theurkauf et al., 1992**). Πρωτεϊνες και mRNAs που προορίζονται για τον οπίσθιο πόλο κινούνται μέσω (+) κατευθυνομένων κινητηρίων πρωτεϊνών των μικροσωληνίσκων, ενώ διάφοροι μορφογενετικοί καθοριστές με προορισμό τον εμπρόσθιο πόλο (anterior pole-AP) κινούνται μέσω (-) κατευθυνομένων κινητηρίων πρωτεϊνών (π.χ. δυνεϊνη) πάνω στο πολωμένο ικρίωμα των μικροσωληνίσκων (**Theurkauf et al., 1992; Theurkauf , 1994**).

Πιο συγκεκριμένα, στα προβιτελλογενετικά στάδια (1-6) οι μικροσωληνίσκοι εκτείνονται από το ΚΟΜ του ωοκυττάρου προς τα τροφοκύτταρα και ευθύνονται για τη μεταφορά και εντόπιση διαφόρων οργανιδίων και μακρομορίων στο ωοκύτταρο (**Theurkauf et al., 1992; Pokrywkaand Stephenson, 1995**).



Εικόνα 1.9. Διαγραμματική παράσταση των ζωνών του κελύφους ωοθυλακίου σταδίου 14, (σχήμα Α), καθώς και της εξωτερικής μορφολογίας γεννημένου ωαρίου, (σχήμα Β). Διακρίνονται: βιτελλινική μεμβράνη (VM), στρώμα κεριού (wl), εσώτερη χοριονική ζώνη (icl), δάπεδο ενδοχορίου (ie), στυλίσκοι (P), οροφή ενδοχορίου (OE), δίκτυο οροφής (rn), και εξωχόριο (EX), κύριο τμήμα του ωοθυλακίου (MB), ο οπίσθιος πόλος (PP), η μικροπύλη (M), η περιοχή του πώματος (O), το κολλάρο (C), και τα δύο αναπνευστικά νημάτια (RF). Επίσης φαίνεται το ωοκύτταρο (OC), και τα εκφυλιζόμενα θυλακοκύτταρα (FC), (Margaritis et al., 1980).

Στα αμέσως επόμενα στάδια 7-8, το ΚΟΜ εκφυλίζεται (**Theurkauf et al., 1992**) και οι μικροσωληνίσκοι συγκεντρώνονται στην εμπρόσθια πλευρά του ωοκυττάρου, όπου εντοπίζονται και μόρια mRNAs, που παίζουν ρόλο στον καθορισμό της αξονικής συμμετρίας που εγκαθίσταται στο ωοκύτταρο κατά τη διάρκεια των σταδίων 7-10. Στα στάδια 9-10Β διαμορφώνεται μία κλίση μικροσωληνίσκων από τον εμπρόσθιο στον οπίσθιο πόλο του ωοκυττάρου (**Theurkauf, 1994**).

Η αξονική συμμετρία που επιτυγχάνεται μέσω της ασύμμετρης κατανομής μορφογενετικών καθοριστών στο ωοκύτταρο, θα δώσει γένεση στους μελλοντικούς άξονες του αναπτυσσόμενου εμβρύου. Πιο συγκεκριμένα, ο πρόσθιο-οπίσθιο άξονας του εμβρύου διαμορφώνεται από την εντόπιση των mRNA bicoid (bcd) στον εμπρόσθιο όπως και των oskar (osk) και nanos (nos) στον οπίσθιο πόλο του ωοκυττάρου. Το mRNA nos είναι μεταφραστικά ενεργό στους διαιρούμενους κυστοβλάστες και στα τροφοκύτταρα σταδίου 10, ενώ στα ωοκύτταρα των τελευταίων σταδίων, η μετάφραση των bcd και nos καταστέλλεται. Η καταστολή αυτή αναιρείται μετά τη γονιμοποίηση και οι αντίστοιχες πρωτεϊνες παράγονται διαμορφώνοντας συγκεκριμένες διαβαθμίσεις που κατευθύνουν το αναπτυξιακό πρότυπο του εμβρύου. Αντιθέτως, το mRNA oskar μεταφράζεται κατά τη διάρκεια της μέσης ωογένεσης διαμορφώνοντας συγκεκριμένα σύμπλοκα με RNP μόρια, τα λεγόμενα πολικά κυστίδια, με μόρια καθοριστών που απαιτούνται για το κοιλιακό πρότυπο, αλλά και τη διαμόρφωση των γεννητικών κυττάρων (**Mahowald, 2001**).

Πλήθος πρωτεϊνικών παραγόντων εμπλέκεται στην εντόπιση και μεταφραστική ρύθμιση των μεταγράφων bicoid, oskar, gurken και nos (**Johnstone and Lasko, 2001; St. Johnston, 2005).** Το δίκτυο των μικροσωληνίσκων διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη μετακίνηση (**Steinhauer and Kalderon 2006; St. Johnston 2005; Zimyanin et al., 2008**), ενώ ο κυτταροσκελετός της F-ακτίνης στην αγκίστρωσή τους στον οπίσθιο πόλο (**Babu et al., 2004; Suyama et al., 2009**).

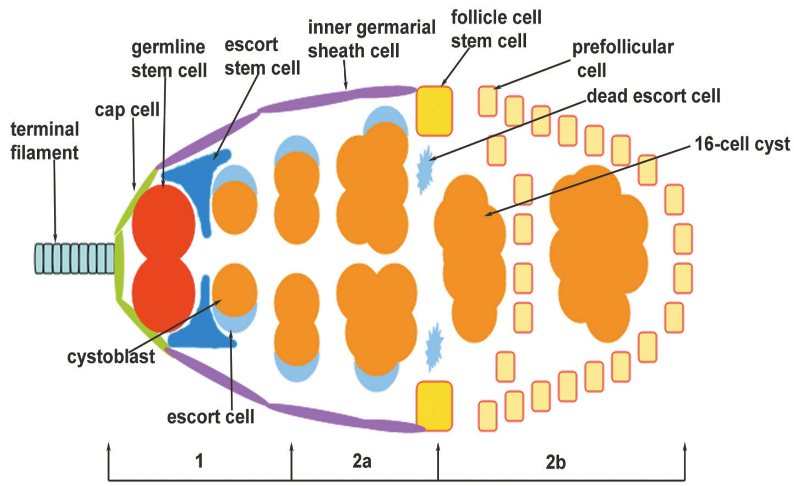
Στα στάδια 10Β-12 τα τροφοκύτταρα αδειάζουν το κυτταρόπλασμά τους στο ωοκύτταρο, με αποτέλεσμα την ανάμειξη των δύο κυτταροπλασμάτων (**Gutzeit, 1986**). Η αναδιοργάνωση των μικροσωληνίσκων κατά το στάδιο 10 συμβαδίζει και πιθανόν ρυθμίζεται από μεταβολές του σκελετού της ακτίνης. Είναι χαρακτηριστική η παρουσία ενός παχέος δικτύου περιφερειακών ινιδίων ακτίνης στο ωοκύτταρο στην αρχή του σταδίου 10, το οποίο περιορίζεται σε πάχος καθώς προχωρά η ανάπτυξη εκτός από το σημείο στην πρόσθια πλευρά (**Riparbelli and Callaini, 1995**). Η μείωση διαμέτρου της διάταξης των ινιδίων ακτίνης συμβαίνει παράλληλα με τη συγκρότηση των μικροσωληνίκων σε παράλληλες σειρές, προτείνοντας ότι οι μικροσωληνίσκοι δεν μπορούν να αναδιοργανώσουν και να προωθήσουν τη ροή του κυτταροπλάσματος (**Robinson and Cooley, 1997**). Σημειώνεται ότι ο ρόλος της ακτίνης στη διαδικασία αυτή δεν περιορίζεται στο ωοκύτταρο, αλλά επεκτείνεται και στα τροφοκύτταρα με τη διαμόρφωση των δεσμών ακτίνης με αποτέλεσμα τη συγκράτηση των τροφοκυτταρικών πυρήνων όπως θα αναλυθεί σε επόμενο κεφάλαιο (**Robinson and Cooley, 1997; Νέζης, 2002).**

1.13 Προγονικά κύτταρα στο ώριμο γερμάριο

Η παραγωγή τόσο των κυττάρων της γενετικής/βλαστικής σειράς (germline cells) όσο και των σωματικών θυλακοκυττάρων (somatic follicle cells) ρυθμίζεται συντονισμένα από τα κύτταρα της κόγχης (niche) του γερμαρίου.

1.13.1 Προγονικά κύτταρα της βλαστικής (γενετικής) σειράς

Τα κύτταρα κόγχης, τα προγονικά κύτταρα της γενετικής σειράς (germ-line stem cells, GSCs) και οι μιτωτικά διαιρούμενοι κυστοβλάστες εντοπίζονται στην περιοχή 1 του γερμαρίου (εικ. 1.10). Στα ενήλικα έντομα, το τελικό νημάτιο (terminal filament) και τα καλυπτήρια κύτταρα (cap cells) διαμορφώνουν την κόγχη που διατηρεί αδιαφοροποίητα τα προγονικά κύτταρα της γενετικής σειράς (**Lin et al., 2002; Xie et al., 2005; 2007**). Στη βάση του τελικού νηματίου, ένα σύνολο καλυπτηρίων κυττάρων έρχεται σε επαφή με τα προγονικά GSCs. Καθώς τα θυγατρικά κύτταρα των GSCs απομακρύνονται από τα καλυπτήρια, περιβάλλονται από τα σωματικά συνοδευτικά κύτταρα (escort cells) τα οποία υποστηρίζουν τη διαφοροποίηση του κυστοβλάστη (**Decotto and Spradling, 2005**). Το τελικό νημάτιο και τα καλυπτήρια κύτταρα προάγουν την αυτοανανέωση των GSCs αποτρέποντας τη διαφοροποίησή τους (**Wu et al., 2008).** Στις επαφές μεταξύ των καλυπτηρίων κυττάρων και των προγονικών GSCs (**Lin and Spradling, 1997**), που είναι απαραίτητες για τη διατήρηση των τελευταίων σε αδιαφοροποίητη κατάσταση, βασικό ρόλο παίζουν οι συνδέσεις κυτταρικής πρόσφυσης με πρωταγωνιστές τα μόρια της DE-καδερίνης (γονίδιο shotgun) και β-κατενίνης (γονίδιο Armadillo) (**Song et al., 2002**). Επίσης, οι χασμοδεσμοί (gap junctions) μεταξύ των γενετικών και σωματικών κυττάρων είναι πιθανό να ευθύνονται για τη διατήρηση των GSCs και των θυγατρικών τους (**Tazuke et al., 2002**). Παράλληλα όμως τα καλυπτήρια κύτταρα ελέγχουν την αδιαφοροποίητη κατάσταση των GSCs μέσω της έκκρισης διαφόρων μορίων, όπως του πρωτεϊνικού μορίου Dpp της οικογένειας των μορφογενετικών πρωτεϊνών BMP (Bone Morphogenetic Proteins) (**Xie and Spradling, 1998; 2000; Song et al., 2004).** Η κόγχη ελέγχει επίσης τον αριθμό τόσο των GSCs όσο



Εικόνα 1.10. Διαγραμματική απεικόνιση του γερμαρίου της *Drosophila* με τη θέση των προγονικών κυττάρων της γενετικής/βλαστικής σειράς (germline stem cells-GSCs) και των προγονικών σωματικών κυττάρων (follicle stem cells-FSCs) καθώς και των κυττάρων της κόγχης (niche cells). Δύο προγονικά κύτταρα GSCs (germline stem cells) εντοπίζονται πλησίον της κόγχης που απαρτίζεται από τα καλυπτήρια κύτταρα (cap cells) και το τελικό νημάτιο (terminal filament). Τα προγονικά GSCs και τα καλυπτήρια κύτταρα έρχονται σε επαφή και με τα συνοδευτικά κύτταρα (escort cells). Οι διαφοροποιούμενοι κυστοβλάστες (cystoblast) απομακρύνονται από την κόγχη και είναι σε στενή επαφή με τα συνοδευτικά κύτταρα μέχρι το θάνατο των τελευταίων (dead escort cells) είτε μέχρι την αντικατάσταση αυτών από τα προ-θυλακοκύτταρα (prefollicular cells), τα οποία προέρχονται από τα προγονικά σωματικά κύτταρα (follicle cells stem cells). Τα τελευταία εντοπίζονται στις περιοχές 2a και 2b και είναι σε επαφή με τα εσώτερα κύτταρα της θήκης του γερμαρίου (inner germarial sheath cells) (Wu et al., 2008).

και των προγονικών συνοδευτικών κυττάρων μέσω της οδού Jak/Stat (Janus kinase/signal transducer and activators of transcription). Το μονοπάτι αυτό ενεργοποιείται από τους συνδέτες Unpaired (Upd), που δρουν μέσω των διαμεμβρανικών υποδοχέων Domeless (**Hombria and Brown, 2002; Arbouzova et al., 2006**). Αντιστοίχως, τα GSCs, ελέγχουν τον αριθμό και τη λειτουργία των καλυπτηρίων κυττάρων μέσω της σηματοδότησης του συνδέτη Delta και του υποδοχέα Notch (**Ward et al., 2006; Song et al., 2007**). Από τα παραπάνω γίνεται φανερό ότι η σηματοδότηση από τα ίδια τα GSCs επιτρέπει στη σωματική κόγχη να παρέχει τα απαραίτητα μόρια για τη συντήρηση της προγονικής τους κατάστασης (**Ward et al., 2006**).

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα GSCs χαρακτηρίζονται από μία σχετικά μεγάλης διάρκειας G2 φάση συγκριτικά με τις υπόλοιπες, φαινόμενο που ενδεχομένως συνδέεται με τις χρονικές απαιτήσεις των κυττάρων αυτών ως προς τη συγκρότηση του συναπτώματος, είτε την αναγκαιότητα ύπαρξης ενός σημείου ελέγχου της γενετικής πληροφορίας (**Hsu et al., 2008**).

1.13.2 Προγονικά κύτταρα των θυλακοκυττάρων

Τα θυλακοκύτταρα προέρχονται από 2-3 σωματικά προγονικά κύτταρα (follicle stem cells-FSCs) που εντοπίζονται στο όριο των περιοχών 2a/2b του γερμαρίου (εικ. 1.10)

(**Margolis and Spradling, 1995**). Στην περιοχή 2b που η κύστη αναδιοργανώνεται με το ωοκύτταρο να είναι τοποθετημένο στο κέντρο της, όπως προαναφέρθηκε, οι πρόγονοι των θυλακοκυττάρων, τα προ-θυλακοκύτταρα (pre-follicular cells) περιβάλλουν την κύστη αντικαθιστώντας τα συνοδευτικά κύτταρα (**Koch and King, 1966; King et al., 1968; Spradling, 1993**). Και στην περίπτωση αυτή, το τελικό νημάτιο και τα καλυπτήρια κύτταρα είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση της αδιαφοροποίητης κατάστασης των FSCs με την παραγωγή των μορίων Hedgehog (Hh), Wingless (Wg), και Dpp (**Forbes et al., 1996; Song and Xie 2003; Zhang and Kalderon, 2001**). Όπως συμβαίνει και με τα GSCs, το ίδιο και τα προγονικά FSCs, έχουν σύντομη διάρκεια ζωής εάν δεν μπορούν να ανταποκριθούν στα σήματα των BMP πρωτεϊνών (**Kirilly et al., 2005**). Το μόριο Hh ελέγχει τον αριθμό των κυττάρων (**Forbes et al., 1996; Zhang and Kalderon, 2001**), ενώ το μόριο Wg τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίησή τους (**Song and Xie, 2003**). Ένας μικρός αριθμός εσωτερικών κυττάρων θήκης (sheath cells) μεσολαβεί μεταξύ των κυττάρων καλυπτηρίων και των κυττάρων FSCs (εικ. 1.10). Τα μόρια πρόσφυσης, DE-καδερίνη και Armadillo είναι αυστηρά εντοπισμένα στην επιφάνεια μεταξύ των προγονικών FSCs και των κυττάρων θήκης και απαιτούνται για τη διατήρηση και τη μεγαλύτερη διάρκεια ζωής των προγονικών κυττάρων (**Song and Xie, 2002**). Ωστόσο, ο ακριβής ρόλος των συνδέσεων πρόσφυσης τόσο για τα GSCs όσο και για τα FSCs είναι υπό διερεύνηση, υποθέτοντας ότι εξασφαλίζουν την παραμονή των προγονικών κυττάρων κοντά στην πηγή σηματοδότησης (**Wu et al., 2008**). Σε σχετικά πρόσφατη μελέτη διαπιστώθηκε ο ρόλος των ιντεγκρινών και των συνδετών τους στη διατήρηση της προγονικής αδιαφοροποίητης ταυτότητας των FSCs. Τα τελευταία φαίνεται να εξαρτώνται από τις αλληλεπιδράσεις πρόσφυσης των ιντεγκρινών τους και της εξωκυττάριας ουσίας για τη διατήρηση, την αγκίστρωση και τον έλεγχο του κυτταρικού τους πολλαπλασιασμού (**O'reilly et al., 2008**).

1.13.3 Μεταβολές στις διαδικασίες πολλαπλασιασμού των προγονικών κυττάρων

Στις περιπτώσεις που η συντονισμένη διαδικασία πολλαπλασιασμού των GSCs και FSCs διαταρράσεται, το αποτέλεσμα είναι η ανάπτυξη ενός ωοθυλακίου που εκφυλίζεται (**Forbes et al., 1996; Drummond-Barbosa and Spradling, 2001; McCall, 2004**). Πλην όμως των ενδογενών αναπτυξιακών παραγόντων ρύθμισης, σημαντικό ρόλο στο ρυθμό πολλαπλασιασμού τόσο των GSCs όσο και των FSCs κατέχουν και εξωγενείς παράγοντες, με τη διαθεσιμότητα της τροφής να αποτελεί έναν από τους πιο μελετημένους παράγοντες (**Drummond-Barbosa and Spradling, 2001**). Η δράση της έλλειψης θρεπτικών στοιχείων μπορεί να ασκηθεί μέσω των αναλόγων της ινσουλίνης νευροεκκριτικών πεπτιδίων (**LaFever and Drummond-Barbosa, 2005**). Τα πεπτίδια αυτά που παράγονται από δύο σύνολα νευροεκκριτικών κυττάρων του εγκεφάλου ρυθμίζουν άμεσα τις διαιρέσεις των GSC, την ανάπτυξη της κύστεως και τη βιτελλογένεση, ενώ τα θυλακοκύτταρα λαμβάνουν δευτερογενώς το ερέθισμα από τα γενετικά κύτταρα (**LaFever and Drummond-Barbosa, 2005**). Το μοντέλο που προτείνεται από τους Hsu και συν. (2008) έχει ως εξής: Σε μία εμπλουτισμένη δίαιτα, τα πεπτίδια DILPs ενεργοποιούν απευθείας τον υποδοχέα της ινσουλίνης στα GSCs, που με τη σειρά του διεγείρει την κινάση της τριφωσφορικής ινοσιτόλης (PI3K) και την περαιτέρω καταστολή του μεταγραφικού παράγοντα FOXO, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την προώθηση της G2 φάσης και την είσοδο των κυττάρων στη φάση της μίτωσης. Καταστολή του κύκλου στη φάση G2 και άρα αναστολή του πολλαπλασιασμού, προκύπτει στην περίπτωση στέρησης θρεπτικών συστατικών μέσω ενεργοποίησης του παράγοντα FOXO (**Hsu et al., 2008**).

1.14 Η αναπτυξιακή πορεία και διαφοροποίηση των θυλακοκυττάρων

Τα προγονικά κύτταρα FSCs δίνουν γένεση στους προγόνους των θυλακοκυττάρων, τα προ-θυλακοκύτταρα, όπως προαναφέρθηκε, τα οποία διακρίνονται σε τρεις τύπους, τα πολικά (polar cells), τα κύτταρα στελέχους (stalk cells) και αυτά του κυρίου σώματος (main-body follicle cells) (εικ. 1.11). Η αναπτυξιακή πορεία των τριών αυτών κυτταρικών τύπων, που διεξάγεται στην περιοχή του γερμαρίου, είναι καθοριστικής σημασίας για τη διαμόρφωση του ωοθυλακίου και την εμφάνιση πολικότητας κατά μήκος του πρόσθιο-οπισθίου άξονα. Περίπου 16 από τα προ-θυλακοκύτταρα διεισδύουν μεταξύ των γειτονικών κύστεων, σταματούν να διαιρούνται και καθίστανται προ-πολικά κύτταρα, που τελικά θα δώσουν τα πολικά και τα κύτταρα στελέχους (**Baksa et al., 2002; McGregor et al., 2002; Torres et al., 2003).** Η μετανάστευση αυτή απαιτεί τη σηματοδότηση Hedgehog (Hh) (**Besse et al., 2002**). Η διαφοροποίηση των προ-πολικών κυττάρων σε πολικά και κύτταρα στελέχους καθιστά εφικτό το διαχωρισμό των ωοθυλακίων. Τα υπόλοιπα προ-θυλακοκύτταρα συνιστούν τα θυλακοκύτταρα του κυρίου σώματος που καλύπτουν το σύνολο του ωοθυλακίου καθώς αυτό εξέρχεται από το γερμάριο (εικ. 1.11).

Τα πολικά κύτταρα λειτουργούν ως ρυθμιστικά κέντρα σηματοδότησης τοποθετούμενα στα πρόσθια και οπίσθια άκρα του ωοθυλακίου (εικ. 1.11) (**Spradling, 1993; Ruohola-Baker et al., 1991**), ενώ στα στάδια 7-9 προωθούν τη διαφοροποίηση των προσθίων θυλακοκυττάρων μέσω του μονοπατιού JAK/STAT στους διαφόρους τύπους: συνοριακά κύτταρα (border cells), τα κύτταρα που εκτείνονται (stretched cells) και τα μεταναστεύοντα κεντρικά (centripetal cells) (εικ. 1.11) (**Silver and Montell, 2001; Beccari et al., 2002; Ghiglione et al., 2002; Grammont and Irvine, 2002; Xi et al., 2003**). Τα κύτταρα στελέχους σχηματίζουν τις γέφυρες διασύνδεσης μεταξύ των διαδοχικών ωοθυλακίων, ενώ τα κύτταρα του κυρίου σώματος διαμορφώνουν το επιθήλιο που καλύπτει την κύστη των γενετικών κυττάρων (εικ. 1.11). Σημειώνεται ότι ο προσδιορισμός της ταυτότητας του κάθε τύπου θυλακοκυττάρων καθορίζεται από τα επίπεδα ενεργοποίησης του μονοπατιού Notch, που επάγονται από τον συνδέτη Delta των κυττάρων της γενετικής σειράς σε συνάρτηση με το μονοπάτι Jak/Stat (**Assa-Kunik et al., 2007**).

1.14.1 Διαμόρφωση του επιθηλίου των θυλακοκυττάρων

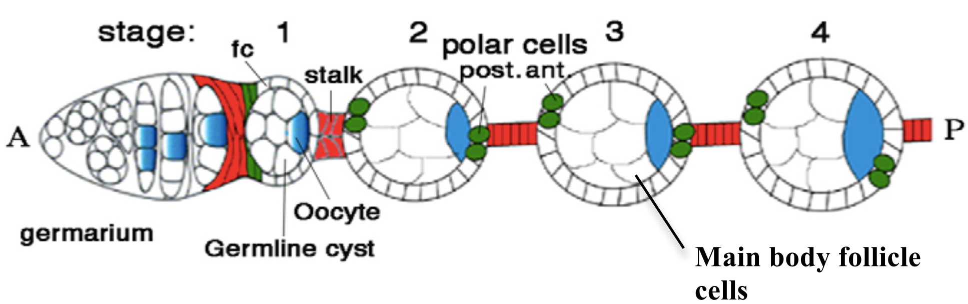
Η αρχική ενθυλάκωση της γενετικής κύστεως περιλαμβάνει τη μετάβαση από τη μεσεγχυματική στην επιθηλιακή κατάσταση. Τα μεσεγχυματικά προ-θυλακοκύτταρα μετά από έναν αριθμό διαιρέσεων, εγκλείουν το ωοθυλάκιο στο επιθήλιο των θυλακοκυττάρων (**Margolis and Spradling, 1995; Tworoger et al., 1999**). Κατά τη διάρκεια της ωογένεσης τα θυλακοκύτταρα αναδιοργανώνονται μεταβάλλοντας τις συνδέσεις πρόσφυσης με τα γειτονικά τους κύτταρα (**Steinberg, 2007**). Ομοφιλικές συνδέσεις της DE-καδερίνης μεσολαβούν στην πρόσφυση των προ-θυλακοκυττάρων στα κύτταρα γενετικής σειράς κατά την πορεία μορφοποίησης του επιθηλίου, ενώ τα προ-πολικά κύτταρα διατηρούν το ωοκύτταρο στο οπίσθιο άκρο του ωοθυλακίου μέσω της υψηλής συγκέντρωσης των μορίων DE-καδερίνης (**Gonzalez-Reyes and Johnston, 1998a; Godt and Tepass, 1998; Oda et al., 1996**).

Τα γλυκοσφιγγολιπίδια είναι απαραίτητα στα θυλακοκύτταρα για την ενθυλάκωση της κύστεως. Οι παράγοντες egghead και brainiac, κωδικοποιούν πρωτεΐνες που προσθέτουν κατάλοιπα γλυκόζης στα σφιγγολιπίδια (**Wandall et al., 2003**). Και τα δύο μόρια απαιτούνται στα κύτταρα γενετικής σειράς για το διαχωρισμό των κύστεων σε ανεξάρτητα ωοθυλάκια (**Goode et al., 1996a; 1996b**).

Στα στάδια 1-6, τα επιθηλιακά θυλακοκύτταρα, υφίστανται μιτωτικές διαιρέσεις προκειμένου να ακολουθήσουν την αύξηση μεγέθους των βλαστικών κυττάρων. Τα επιθηλιακά θυλακοκύτταρα παύουν να διαιρούνται στο τέλος του σταδίου 6, ενώ εισέρχονται στο στάδιο της λεγόμενης ενδομίτωσης (**Lopez-Schier and Johnston, 2001; Deng et al., 2001b**). Η επακόλουθη πολυπλοειδία είναι απαραίτητη για το τελικό μέγεθος των θυλακοκυττάρων (**Lopez-Schier and Johnston, 2001; Deng et al., 2001b**). Στη συνέχεια τα κύτταρα αυτά αρχίζουν να εμφανίζουν μορφολογικά και μοριακά σημάδια διαφοροποίησης σε πέντε κύριες αναπτυξιακές διαδρομές: τα συνοριακά κύτταρα (border cells), τα εκτεινόμενα κύτταρα (stretched cells), τα μεταναστεύοντα κεντρικά (centripetal cells), τα οπίσθια (posterior cells) και τα θυλακοκύτταρα του κυρίου σώματος (main body follicle cells) (εικ. 1.12). Ο κάθε τύπος θυλακοκυττάρων φέρει μία εξειδικευμένη λειτουργία σε σχέση με την παραγωγή του ωρίμου ωοθυλακίου. Ο ακριβής αριθμός αλλά και η τοποθέτηση του κάθε κυτταρικού τύπου αποτελούν κρίσιμα στοιχεία για τη μορφογένεση του αυγού, καθώς οι λειτουργίες τους επηρεάζουν τη σύνθεση δομών που απαιτούνται για το ώριμο αυγό, όπως τα ραχιαία αναπνευστικά νημάτια και τη μικροπύλη, ενώ παράλληλα καθορίζουν τον προσθιο-οπίσθια άξονα του ωοκυττάρου και κατ'επέκταση του εμβρύου (**Xi et al., 2003**).

1.14.2 Αναδιοργάνωση του επιθηλίου

Στα αρχικά στάδια της ωογένεσης, μέχρι το στάδιο 8, τα επιθηλιακά θυλακοκύτταρα διαμορφώνουν ένα κυβοειδές επιθήλιο, ενώ κατά το στάδιο 9, αναδιοργανώνονται με μία σειρά μεταβολών στο σχήμα τους συνοδευόμενες από συγκεκριμένες μεταναστεύσεις.



Εικόνα 1.11. Στάδια πρώιμης ωογένεσης στη *Drosophila*. Απεικονίζεται η περιοχή του γερμαρίου και τέσερα ωοθυλάκια σταδίων 1-4 (stages 1-4). Η διαφοροποίηση των πολικών (polar cells-πράσινο χρώμα), και των κυττάρων στελέχους (stalk cells-κόκκινο χρώμα) έχει ξεκινήσει από την περιοχή του γερμαρίου και συνεχίζεται στα επόμενα στάδια. Oocyte: Ωοκύτταρο (μπλε χρώμα), fc: θυλακοκύτταρα. Germline cyst: γενετική κύστη, germarium: γερμάριο, P/post: οπίσθιος πόλος, ant: εμπρόσθιος πόλος, main-body follicle cells: θυλακοκύτταρα του κυρίου σώματος (Assa-Kunik et al., 2007).

1) Μετανάστευση των συνοριακών κυττάρων (border cell migration). Κατά την έναρξη του σταδίου 9, τα πολικά κύτταρα της πρόσθιας πλευράς στρατολογούν 4-6 γειτονικά θυλακοκύτταρα να καταστούν κύτταρα συνόρων, τα οποία αποκολλώνται από το επιθήλιο, περιβάλλουν τα πολικά και μεταναστεύουν προς τον οπίσθιο πόλο ανάμεσα στα τροφοκύτταρα. Μελέτες κάνουν λόγο για συγκεκριμένα σηματοδοτικά μονοπάτια που κατευθύνουν την πορεία αυτή συμπεριλαμβανομένων των οδών Jak-Stat (**Ghiglione et al., 2002; Beccari et al., 2002, Silver et al., 2001; 2005**) Notch (**Wang et al., 2007; Prasad and Montell, 2007**) PDGF/VEGF υποδοχέα (PVR) (**Duchek et al., 2001**), και EGFR (**Duchek and Rorth, 2001**). Ο υποδοχέας Notch πρέπει να ενεργοποιηθεί στα κύτταρα συνόρων για την αποκόλλησή τους (**Wang et al., 2007; Prasad and Montell, 2007**), ενώ στη συνέχεια τα κύτταρα εκτείνονται σε μήκος, γεγονός που επιτρέπει την έναρξη της διείσδυσης (**Fulga and Rorth, 2002**). Για τη μετακίνηση ανάμεσα στα τροφοκύτταρα απαιτείται η δράση του μορίου πρόσφυσης DE-καδερίνη (**Oda et al., 1996; Niewiadomska et al., 1999; Pacquelet and Rorth, 2005**).

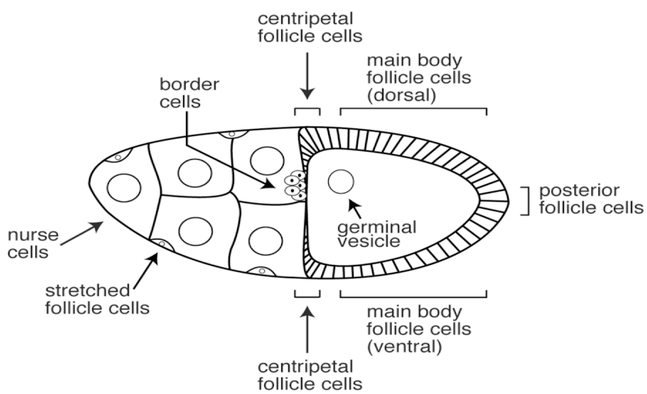
2) Διαμόρφωση κιονοειδούς και πλακώδους επιθηλίου. Ταυτόχρονα με τη μετανάστευση των συνοριακών κυττάρων, τα θυλακοκύτταρα του κυρίου σώματος μεταναστεύουν προς τον οπίσθιο πόλο για να καλύψουν το ωοκύτταρο. Αυτή η αναδιοργάνωση περιλαμβάνει το σχηματισμό ενός πλακώδους επιθηλίου από τα τελικά θυλακοκύτταρα του προσθίου πόλου και ενός κιονοειδούς επιθηλίου από τα κύτταρα του κυρίου σώματος και τα τελικά του οπισθίου πόλου. Κατά την έναρξη του σταδίου 10, το διαχωριστικό όριο των δύο τύπων επιθηλίου ευθυγραμμίζεται με την επιφάνεια που διαχωρίζει το ωοκύτταρο από τα τροφοκύτταρα. Από το κιονοειδές επιθήλιο εκκρίνονται οι συνιστώσες των δομών του κελύφους. Ένας πληθυσμός 50 περίπου κυττάρων στο εμπρόσθιο άκρο εκτείνεται, με αποτέλεσμα να γίνονται πλακώδη και να καλύπτουν τα τροφοκύτταρα. Αυτά τα κύτταρα καλούνται stretched, πλακώδη θυλακοκύτταρα, είτε θυλακοκύτταρα των τροφοκυττάρων. Η "έκταση" των κυττάρων αυτών ελέγχεται από το μονοπάτι Notch στα πρόσθια θυλακοκύτταρα, προκειμένου να καθίσταται δυνατή η χαλάρωση των δυνάμεων πρόσφυσης μέσω ελεγχόμενης άσκησης δυνάμεων τόσο τοπικών από τα ίδια τα κύτταρα με τη βοήθεια της μυοσίνης όσο και δυνάμεων που προέρχονται από τη μετατόπιση των κυττάρων του κυρίου σώματος (**Grammont et al., 2007**). Είναι πιθανό τα πρόσθια κύτταρα να πρέπει να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους και με τα υποκείμενα τροφοκύτταρα για να αποκτήσουν αυτό το σχήμα. Τα τελικά θυλακοκύτταρα προορίζονται να γίνουν πλακώδη εάν δεν προωθηθούν τα χαρακτηριστικά της οπίσθιας πλευράς από την ενεργότητα του EGFR (**Roth et al., 1995; Gonzalez-Reyes et al., 1995**). Είναι χαρακτηριστικό ότι όλα τα τελικά κύτταρα είναι προκαθορισμένο να αναπτύξουν δομές της πρόσθιας πλευράς μέχρι το στάδιο 6, στο οποίο ο συνδέτης Gurken (Grk), προερχόμενος από το ωοκύτταρο, ενεργοποιεί ικανοποιητικά επίπεδα του υποδοχέα EGFR στα κύτταρα του οπισθίου πόλου (**Roth et al., 1995; Gonzalez-Reyes et al., 1995; Gonzalez-Reyes and St Johnston, 1998a**) δημιουργώντας με τον τρόπο αυτό τον πρόσθιο-οπίσθιο άξονα-a/p. Αξίζει να σημειωθεί ότι τόσο το μονοπάτι Jak/Stat όσο και το EGFR/Ras πρέπει να ενεργοποιηθούν για την έκφραση του δεικτών του οπισθίου πόλου στα κύτταρα του κυρίου σώματος (**Xi et al., 2003**). Εν συνεχεία τα ίδια κύτταρα ευθύνονται για τον καθορισμό της πολικότητας του ωοκυττάρου σηματοδοτώντας την κατάρρευση του κέντρου των μικροσωληνίσκων (ΚΟΜ) και τη δημιουργία ενός νέου στον πρόσθιο πόλο με αποτέλεσμα την αναστροφή της πολικότητάς τους. Συνέπεια αυτής αποτελεί η μετακίνηση του ωοκυτταρικού πυρήνα στον πρόσθιο πόλο. Κατά την έναρξη του σταδίου 9, ο επανατοποθετημένος πυρήνας με την ενεργοποίηση του υποδοχέα EGFR στα θυλακοκύτταρα της ραχιαίας πλευράς και πάλι μέσω του μορίου Grk, διεγείρει τον καταρράκτη Ras-Raf-MAPK (**Ray and**

Schupbach, 1996) και συμβάλλει στην εγκαθίδρυση του άξονα της ραχιαίο-κοιλιακής πολικότητας-d/v τόσο του ωοκυττάρου όσο και του εμβρύου (**Lopez-Schier, 2003**). Αυτή η εντοπισμένη ενεργοποίηση του υποδοχέα απαιτείται για τον προσδιορισμό των δύο διακριτών δομών που δίνουν γένεση στα αναπνευστικά νημάτια καθώς και για την ορθή τοποθέτηση αυτών κατά μήκος του ραχιαίο-κοιλιακού άξονα (**Neuman-Silberberg and Schupbach, 1993; Neuman-Silberberg and Schupbach, 1996; Schupbach, 1987**). Το κάθε αναπνευστικό νημάτιο αρχίζει να διαμορφώνεται στο στάδιο 11 από τον πληθυσμό των 65-70 ραχιαίων-προσθίων θυλακοκυττάρων του κιονοειδούς επιθηλίου που μεταναστεύουν πάνω από τα streched κύτταρα στην κάθε πλευρά της μέσης γραμμής (**Rittenhouse and Berg, 1995**). Στον προσδιορισμό των δομών του κελύφους όμως κατά μήκος του προσθιο-οπισθίου άξονα συμβάλλει και η σηματοδότηση Dpp (**Twombly et al., 1996**), η οποία απαιτείται για τη διαμόρφωση των εξειδικευμένων δομών της πρόσθιας περιοχής. Κατά το στάδιο 10 της ωογένεσης, το μόριο αυτό εκφράζεται τόσο στα stretched, όσο και στα centripetal κύτταρα. Στην πραγματικότητα, η συνδυασμένη δράση EGFR και Dpp, επηρεάζει το μέγεθος και την τοποθέτηση του πώματος και των αναπνευστικών νηματίων, που παρουσιάζουν ιδιαίτερη ευαισθησία στα μεταβαλλόμενα επίπεδα της σηματοδότησης Dpp (**Twombly et al., 1996; Chen and Schupbach, 2006; Deng and Bownes, 1998; Peri and Roth, 2000; Shravage et al., 2007; Dobens and Raftery, 2000**).

Σύμφωνα με τα παραπάνω καθίσταται σαφές ότι η χρονικά και τοπικά ελεγχόμενη ενεργότητα του υποδοχέα EGFR καθορίζει τις διακριτές αναπτυξιακές διαδρομές των θυλακοκυττάρων στις κατάλληλες θέσεις, όμως οι συνιστώσες του μηχανισμού αυτού παραμένουν σε κάποιο βαθμό αδιευκρίνιστες. Σύμφωνα με σχετικά πρόσφατη μελέτη οι διακριτές αναπτυξιακές πορείες προκύπτουν από την τοπική σηματοδότηση προερχόμενη απευθείας από το συνδέτη Grk της γενετικής σειράς χωρίς τη μεσολάβηση ρυθμιστικών μορίων της EGFR ενεργότητας στα επιθηλιακά θυλακοκύτταρα (**Boisclair Lachance et al., 2009**). Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με το μοντέλο αυτό η αναπτυξιακή διαδρομή της μέσης γραμμής προκύπτει από τα κύτταρα που εκτίθενται σε υψηλά επίπεδα της σηματοδότησης Grk/EGFR, ενώ τα αναπνευστικά νημάτια προέρχονται από ενδιάμεσα επίπεδα της παραπάνω σηματοδότησης. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί και η συμμετοχή του μονοπατιού JNK στην επιμήκυνση των αναπνευστικών νηματίων όσο και στη διαμόρφωση της μικροπύλης κατά τα τελευταία στάδια της ωογένεσης (**Suzanne et al., 2001**). Όσον αφορά στα εκτελεστικά ή ρυθμιστικά μόρια της προαναφερθείσας διαδικασίας, τόσο οι μεταγραφικοί παράγοντες Mirror (mirr) και Pointed (Pnt), που δρουν καταρροϊκά της σηματοδότησης EGFR, όσο και ο αναστολέας Sty του υποδοχέα της κινάσης της τυροσίνης (RTK) συμβάλλουν καταλυτικά στη διαμόρφωση του αναπτυξιακού επιθηλιακού προτύπου. (**Boisclair Lachance et al., 2009**).

3) Μετανάστευση προς το κέντρο (centripetal migration). Κατά το στάδιο 10Β, τα θυλακοκύτταρα του κιονοειδούς επιθηλίου μεταναστεύουν εσωτερικά στη διαχωριστική επιφάνεια του ωοκυττάρου με τα τροφοκύτταρα. Τα κύτταρα αυτά ονομάζονται centripetal μεταναστεύοντα θυλακοκύτταρα και συγκροτούν το πώμα και το κοιλιακό κολλάρο του κελύφους, ενώ μαζί με τα συνοριακά κύτταρα δίνουν γένεση στη μικροπύλη (**Edwards et al., 1997**). Η μετανάστευση αυτή ελέγχεται από ένα σύνολο μονοπατιών όπως Dpp, Notch, Jak/Stat, EGFR (**Wu et al., 2008**). Όσον αφορά στην αναδιοργάνωση των μεμβρανικών περιοχών του κυτταροσκελετού, τα επίπεδα της πλευρικής α-σπεκτρίνης αυξάνονται (**Dobens et al., 2005**), ενώ η β-σπεκτρίνη δεν φαίνεται να έχει ενεργό ρόλο (**Zarnescu and Thomas, 1999**). Τα μόρια της DE-καδερίνης προωθούν τη μετακίνηση (**Oda et al., 1996**), ενώ ο υποδοχέας της εκδυσόνης EcR (ecdysone receptor), που επίσης είναι απαραίτητος για τη διαδικασία αυτή αυξάνει τα επίπεδα της καδερίνης (**Hackney et al., 2007**). Σημειώνεται ότι η ενεργότητα του υποδοχέα ρυθμίζεται αρνητικά από το μονοπάτι EGFR/Ras (**Hackney et al., 2007**), ενώ η έκφραση του γονιδίου bun ενισχύεται από το πιο πάνω μονοπάτι (**Dobens et al., 2000**). Η πορεία των ακραίων μεταναστευτικών centripetal κυττάρων ανακόπτεται από τα συνοριακά κύτταρα. Επίσης, τα κύτταρα αυτά εκφράζουν το μόριο Dpp κατά τη μετακίνησή τους και κατά τη διαμόρφωση της μικροπύλης (**Twombly et al., 1996; Dobens and Raftery, 2000**). Η διαμόρφωση του πώματος καθοδηγείται από τη σηματοδότηση EGFR και Dpp. Υψηλά επίπεδα Dpp οδηγούν στη διαμόρφωση άλλου ένα κανονικού πώματος (**Twombly et al., 1996**), ενώ υπερέκφραση του ενεργού EGFR επεκτείνει το πώμα σε βάρος του κολλάρου (**Queenan et al., 1997**). Τελικά, τα ακραία centripetal κύτταρα αποθέτουν τη βιτελλινική μεμβράνη και το ενδοχόριο, τα συνοριακά κύτταρα ευθύνονται για τη διαμόρφωση του καναλιού, ενώ και οι δύο τύποι κυττάρων δίνουν γένεση στη μικροπύλη (**Edwards et al., 1997**).

Σημειώνεται ότι, η χρονική στιγμή της centripetal μετακίνησης είναι κεφαλαιώδους σημασίας για τη διαδικασία του αδειάσματος του τροφοκυτταρικού υλικού στο ωοκύτταρο (dumping) αλλά και της διαμόρφωσης του ωοθυλακίου. Ανεπιτυχής ή καθυστερημένη centripetal μετακίνηση είναι πιθανό να οδηγήσει σε φαινότυπο dumpless (**Dobens and Raftery, 2000**).



Εικόνα 1.12. Σχηματική απεικόνιση των διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών σε ένα ωοθυλάκιο σταδίου 10B. Διακρίνονται τα τροφοκύτταρα (nurse cells), και οι διαφορετικοί πληθυσμοί των θυλακοκυττάρων: τα ραχιαία του κυρίου σώματος (main body follicle cells-dorsal) και τα αντίστοιχα κοιλιακά (main body follicle cells-ventral), τα κύτταρα του οπισθίου πόλου (posterior follicle cells), τα θυλακοκύτταρα του εμπροσθίου πόλου που εκτείνονται (stretched cells), τα συνοριακά κύτταρα (border cells), καθώς και τα θυλακοκύτταρα που μεταναστεύουν στο διαχωριστικό όριο του ωοκυττάρου με τα τροφοκύτταρα στο μέσον του ωοθυλακίου (centripetal cells) (Cavaliere et al., 2008).

Πλην των αλληλεπιδράσεων που αναφέρθηκαν στις παραπάνω διαδικασίες, όπως αυτές ανάμεσα στους μεμβρανικούς υποδοχείς και τους συνδέτες τους, καθώς και τα μόρια κυτταρικής πρόσφυσης, σημαντικό ρόλο στην επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων γενετικής και σωματικής σειράς και την τελική διαμόρφωση του ωοθυλακίου διαδραματίζουν και οι χασμοδεσμοί (Gap junctions) μέσω των οποίων διεξάγεται η μεταφορά μικρών μορίων. Ήδη από τις πρώτες μελέτες της ωογένεσης του εντόμου έχει αποκαλυφθεί ο ρόλος των χασμοδεσμών μεταξύ γειτονικών τροφοκυττάρων, μεταξύ τροφοκυττάρων και ωοκυττάρου και τέλος ανάμεσα στα θυλακοκύτταρα και το ωοκύτταρο ή τα τροφοκύτταρα. Οι χασμοδεσμοί αυτοί έχει βρεθεί να μεταβάλλονται δομικά και σε μέγεθος στα διάφορα στάδια της ωογένεσης (**Mahowald, 1972; Giorgi and Postlethwait, 1985**), ενώ σταδιοειδική επικοινωνία μεταξύ ωοκυττάρου και θυλακοκυττάρων έχει προκύψει από δεδομένα κατανομής ενδοκυτταρικών ουσιών, κατανομή που έχει βρεθεί να εξαρτάται από πλήθος παραγόντων όπως το pH, τις υψηλές συγκεντρώσεις ιόντων Ca, την JH ή την 20-υδροξυεκδυσόνη (**Bohrmann and Assenbaum, 1993**). Οι χασμοδεσμοί στη *Drosophila* συγκροτούνται από διαφόρους συνδυασμούς μονομερών ινεξίνης (Inx) (**Bohrmann and Zimmermann, 2008**).

1.14.3 Μιτωτικές διαιρέσεις θυλακοκυττάρων και μετάβαση στην ενδομίτωση

Στα πρώτα στάδια της ωογένεσης (1-6) τα θυλακοκύτταρα διεξάγουν πλήρεις κυτταρικούς κύκλους, που περιλαμβάνουν όλες τις φάσεις αυτού, G1, S, G2, και M. Κατά τη διάρκεια των σταδίων 7-9, υφίστανται 3 κύκλους ενδομίτωσης διπλασιάζοντας το γενωμικό τους DNA χωρίς όμως τα κύτταρα να διαιρούνται (**Mahowald et al., 1979**). Κατά το στάδιο 10B, η αντιγραφή του DNA σταματά και τα θυλακοκύτταρα του κυρίου σώματος, που καλύπτουν το ωοκύτταρο, μεταβαίνουν από την ενδοαντιγραφή στη συγχρονισμένη γονιδιακή επέκταση των χρωμοσωμικών περιοχών που σχετίζονται με τη σύνθεση των δομών του κελύφους (**Calvi et al., 1998**).

Η μετάβαση από τον μιτωτικό κύκλο στην ενδομίτωση επάγεται από τη σηματοδότηση του συνδέτη Delta, που προέρχεται από τα κύτταρα της γενετικής σειράς, που ενεργοποιεί τον υποδοχέα Notch στα θυλακοκύτταρα (**Deng et al., 2001; Lopez-Schier and St Johnston, 2001**). Το μονοπάτι Notch προωθεί τη μετάβαση στους κύκλους των ενδομιτώσεων αυξάνοντας την έκφραση της πρωτεϊνης Hnt (hindsight, zinc-finger protein), η οποία πέρα από τη δράση της στα γονίδια που συνδέονται με τη μετάβαση από τις μιτώσεις στις ενδομιτώσεις, καταστέλλει και την πρωτεϊνη Hedgehog, που προωθεί τον πολλαπλασιασμό των θυλακοκυττάρων στα πρώτα στάδια της ωογένεσης (**Sun and Deng, 2007**). Στο στάδιο 10B η οδός Notch στα θυλακοκύτταρα του κυρίου σώματος καταστέλλεται, ενώ ενεργοποιείται ο υποδοχέας της εκδυσόνης EcR (**Sun et al., 2008**). Οι δύο ισομορφές του υποδοχέα EcR (EcR-A και EcR-B1) εκφράζονται τόσο στα κύτταρα της γενετικής σειράς όσο και στα θυλακοκύτταρα. Πέρα από τη δράση αυτού στα στάδια της βιτελλογένεσης (**Carney and Bender, 2000**), κρίσιμος είναι ο ρόλος του και στην επέκταση και έκφραση των γονιδίων του χορίου, ενώ νεότερες μελέτες δείχνουν ότι, η ενεργότητά του παρουσιάζει ευαισθησία στη σηματοδότηση EGFR/Ras, και συνδέεται με τις μεταναστεύσεις των θυλακοκυττάρων και τη μορφοποίηση του σωλήνα των αναπνευστικών νηματίων (**Hackney et al., 2007**). Απενεργοποίηση της ισομορφής του υποδοχέα EcR-B1 στην πρώιμη και μέση ωογένεση έχει ως αποτέλεσμα την αποκόλληση των θυλακοκυττάρων και την απώλεια ακεραιότητας του μονόστρωμου επιθηλίου, γεγονός που συνδέεται με μεταβολές στις συνδέσεις πρόσφυσης και στον κυτταροσκελετό της F-ακτίνης. Το μονοπάτι της εκδυσόνης (EcR/USP σύμπλοκο) όπως είναι γνωστό εμπλέκεται στον έλεγχο της ανακύκλωσης των συνδέσεων πρόσφυσης της καδερίνης στα συνοριακά κύτταρα επιτρέποντας τη μετακίνησή τους (**Bai et al., 2000**), ενώ αντίστοιχη δράση πιστεύεται ότι ασκεί και στα θυλακοκύτταρα κυρίου σώματος που περιβάλλουν το ωοθυλάκιο (**Romani et al., 2009**).

Στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου των θυλακοκυττάρων συμμετέχει και η κινάση JNK (**Johnson and Lapadat, 2002**), ενώ στην περίπτωση μετάβασης των θυλακοκυττάρων από τις μιτωτικές διαιρέσεις στην ενδομίτωση, το μονοπάτι JNK συνιστά κρίσιμο θετικό ρυθμιστή των μιτωτικών κύκλων (**Jordan et al., 2006**). Κρίσιμο ρόλο στην έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο αποκαλύφθηκε ότι παίζουν και τα μιτοχόνδρια. Οι ενεργειακές απαιτήσεις των κυττάρων φαίνεται ότι αλλάζουν με αποτέλεσμα μείωση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης της μιτοχονδριακής σχάσης, Drp-1, να καταλήγει στην εκτεταμένη σύντηξη των μιτοχονδρίων, τον αδιάκοπο πολλαπλασιασμό των κυττάρων, καθώς και τη μη ενεργοποίηση του μονοπατιού Notch (**Mitra et al., 2012**).

1.15 Είδη κυτταρικού θανάτου

1.15.1 Απόπτωση

Η απόπτωση είναι ένας γενετικά προκαθορισμένος μηχανισμός που μπορεί να προκύψει ως απόκριση σε διάφορα ερεθίσματα. Τα επικρατέστερα αποπτωτικά μονοπάτια είναι αυτά της **εξωγενούς** και της **ενδογενούς** οδού. Στην πρώτη περίπτωση, που είναι γνωστή και ως "μονοπάτι υποδοχέα θανάτου", η απόπτωση ξεκινά από την ενεργοποίηση των υποδοχέων θανάτου (death receptors) μετά από τη δέσμευση σε αυτούς ενός μορίου συνδέτη (ligand). Σε αυτούς τους υποδοχείς περιλαμβάνονται ο υποδοχέας του παράγοντα TNF-tumor necrosis factor, ο υποδοχέας CD95/Fas, καθώς και οι υποδοχείς TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand). Στην περίπτωση του **ενδογενούς** μονοπατιού, γνωστό και ως **μιτοχονδριακό**, η απόπτωση είναι το αποτέλεσμα ενός ενδοκυτταρικού καταρράκτη αντιδράσεων στα οποία η διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο (**Scaffidi et al., 1998; Kroemer et al., 2007**). Τόσο το ενδογενές όσο και το εξωγενές αποπτωτικό μονοπάτι καταλήγουν στην **συρρίκνωση του κυττάρου**, τη **συμπύκνωση της χρωματίνης**, την **πυρηνική θραύση**, που συνήθως συνοδεύεται από την ενδονουκλεοσωμική θραύση του DNA, τη **χαρακτηριστική εμφάνιση προεξοχών στην κυτταρική μεμβράνη (blebbing)**, καθώς και την έκθεση της **φωσφατίδυλο-σερίνης** στην επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης (**Zamzami et al., 1996**).

Για την ταχεία και ολοκληρωμένη εκτέλεση των παραπάνω χαρακτηριστικών φαίνεται να είναι απαραίτητη η ενεργοποίηση μίας τάξης πρωτεασών, των λεγομένων **κασπασών**, (πρωτεάσες κυστεΐνης που διασπούν μετά από κατάλοιπο ασπαρτικού οξέος-Asp). Ωστόσο, δεν απαιτείται η δράση όλων των κασπασών παρά ένα μόνο μέρος αυτών και συγκεκριμένα των κασπασών 3, 6 και 7 (Fuentes-Prior and Salvesen, 2004). Αυτές, ανήκουν στις κασπάσες τελεστές, που ασκούν τη δράση τους σε εξειδικευμένα υποστρώματα εντός του κυττάρου διασπώντας τα. Η ενεργοποίησή τους πραγματοποιείται από τις κασπάσες 8, 9, 10 που ανήκουν στα εναρκτήρια μόρια (εικ. 1.13) (**Kroemer et al., 2007**).

Η δράση των κασπασών σχετίζεται με την αδρανοποίηση των πρωτεϊνών που προστατεύουν τα κύτταρα από την ενεργοποίηση του αποπτωτικού μονοπατιού. Ένα παράδειγμα αποτελεί η πρωτεΐνη CAD (caspase-activated deoxyribonuclease) που στα μη αποπτωτικά κύτταρα μαζί με την I^{CAD} συγκροτεί ένα ανενεργό σύμπλοκο. Στα αποπτωτικά κύτταρα η I^{CAD} απενεργοποιείται από τις κασπάσες με αποτέλεσμα να ελευθερώνεται η CAD δρώντας ως νουκλεάση κόβοντας το DNA κατ' αρχήν σε μεγάλα τμήματα (150-300 Kb) και ακολούθως σε μικρότερα (180-200 bp) (**Liu et al., 1997, Wyllie et al., 1980**). Επίσης, οι πρωτεΐνες **Bcl-2** (B-cell leukemia) πρωτεολύονται από τις κασπάσες, με αποτέλεσμα την αδρανοποίησή τους, αλλά και την παραγωγή προϊόντων που επάγουν την απόπτωση. Τέλος, οι κασπάσες δρουν άμεσα σε **υποστρώματα-στόχους** όπως είναι η **λαμίνη του πυρήνα** και η **πηκτωληματίνη** που σχετίζεται με την οργάνωση του **κυτταροσκελετού** (**Takahashi and Earnshaw 1996, Kothakota et al., 1997**).

Οι κασπάσες τελεστές ενεργοποιούνται μέσω πρωτεόλυσης από τις αρχικές κασπάσες, οι οποίες ενεργοποιούνται αρχικά από κάποιο ερέθισμα που επάγει την απόπτωση, δηλαδή από κάποιο προαποπτωτικό μήνυμα. Η ενεργοποίηση των αρχικών κασπασών επιτυγχάνεται με διαφόρους τρόπους, π.χ. από τους υποδοχείς θανάτου, με τους οποίους ενεργοποιείται η κσπάση-8, είτε από κυτταροτοξικούς παράγοντες στην περίπτωση της κασπάσης-9 (**Nagata, 1997**).

Ο τρόπος με τον οποίο ενεργοποιούνται οι αρχικές κασπάσες σχετίζεται με πρόσδεση σε ειδικούς συμπαράγοντες, ένας μηχανισμός που παρατηρείται συχνά σε πρωτεάσες. Έτσι, η ενεργοποίηση της **κασπάσης-8** απαιτεί την πρόσδεση με τον συμπαράγοντα **fADD** (Fas-associated protein with death domain) μέσω της περιοχής **DED** (death effector domain) (Boldin et al., 1996). Αντίθετα η ενεργοποίηση της **προκασπάσης-9** γίνεται μέσω της δημιουργίας συμπλόκου με τον συμπαράγοντα **Apaf-1** μέσω της **CARD** περιοχής (caspase recruitment domain). Επίσης, απαραίτητη είναι και η παρουσία του **κυτοχρώματος c** καθώς και του **ATP**, υποδεικνύοντας ότι η απόπτωση είναι μία διαδικασία που απαιτεί ενέργεια (εικ. 1.19) (**Hu et al., 1999**). Τελικά, η ενεργοποίηση των κασπασών γίνεται σύμφωνα με το ακόλουθο μοντέλο: Οι κασπάσες (προένζυμα) φέρουν μία περιορισμένη ενδογενή ενεργότητα. Ωστόσο, η συγκέντρωση πολλών τέτοιων μορίων σε μία περιοχή του κυττάρου π.χ. μέσω του κυτταροπλασματικού μέρους του **Fas-υποδοχέα**, είναι ικανή να οδηγήσει σε αυτοκατάλυση (**Thornberry and Lazebnik, 1998**).

Στην περίπτωση του εξωγενούς μονοπατιού, η δέσμευση του συνδέτη στον κατάλληλο υποδοχέα, προκαλεί τον ολιγομερισμό του μορίου προσαρμογέα **FADD** (Fas-associating death domain-containing protein) εντός του συμπλέγματος DISC (death-inducing signaling complex). O FADD που έχει ολιγομεριστεί δεσμεύει τις εναρκτήριες **κασπάσες-8 και 10** προκαλώντας τον διμερισμό και την ενεργοποίησή τους (**Debatin and Krammer, 2004)**. Στις περισσότερες περιπτώσεις όμως η απόπτωση διεξάγεται μέσω της ενδογενούς ή μιτοχονδριακής οδού (**Green and Kroemer, 2004**). Σε αυτό το μονοπάτι, οι κασπάσες τελεστές διασπώνται και ενεργοποιούνται από την εναρκτήρια **κασπάση 9**, η οποία καθίσταται ενεργός από τον πολυμερισμό της κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης **Apaf-1** (apoptosis protease activating factor-1) εντός του πολυπρωτεϊνικού συμπλέγματος που καλείται αποπτώσωμα (apoptosome) (εικ. 1.13). O Apaf-1 προϋπάρχει στο κυτοσόλιο σαν μονομερές και η ενεργοποίησή του εξαρτάται από την παρουσία του κυτοχρώματος c και του ATP (**Cain et al., 2002**). Η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, που φυσιολογικά εντοπίζεται στο μιτοχονδριακό μεσομεμβρανικό χώρο-IMS (intermembrane mitochondrial space), όπου και συμμετέχει στη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας (**Bernardi and Azzone, 1981**), σχετίζεται με τη συγκρότηση του αποπτωσώματος. Συνεπώς, **η διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης MMP** (mitochondrial membrane permeabilization), αποτελεί ένα κρίσιμο γεγονός υπεύθυνο για τη **διέγερση των κασπασών** του ενδογενούς μονοπατιού. Η διαπερατότητα MMP όμως μπορεί επίσης να προκαλέσει τον καταρράκτη των αποπτωτικών γεγονότων ακόμη και ανεξαρτήτως της ενεργοποίησης των κασπασών. Αυτός ο τύπος αποπτωτικού θανάτου είναι δυνατόν να διεξαχθεί (**Chipuk and Green, 2005**) λόγω της μη αναστρέψιμης απώλειας της μιτοχονδριακής λειτουργίας, όπως επίσης λόγω της απελευθέρωσης από τα μιτοχόνδρια μορίων τελεστών όπως του παράγοντα **AIF** (apoptosis-inducing factor), της **ενδονουκλεάσης G** (EndoG) και άλλων (εικ. 1.13) (**Kroemer and Martin, 2005**).

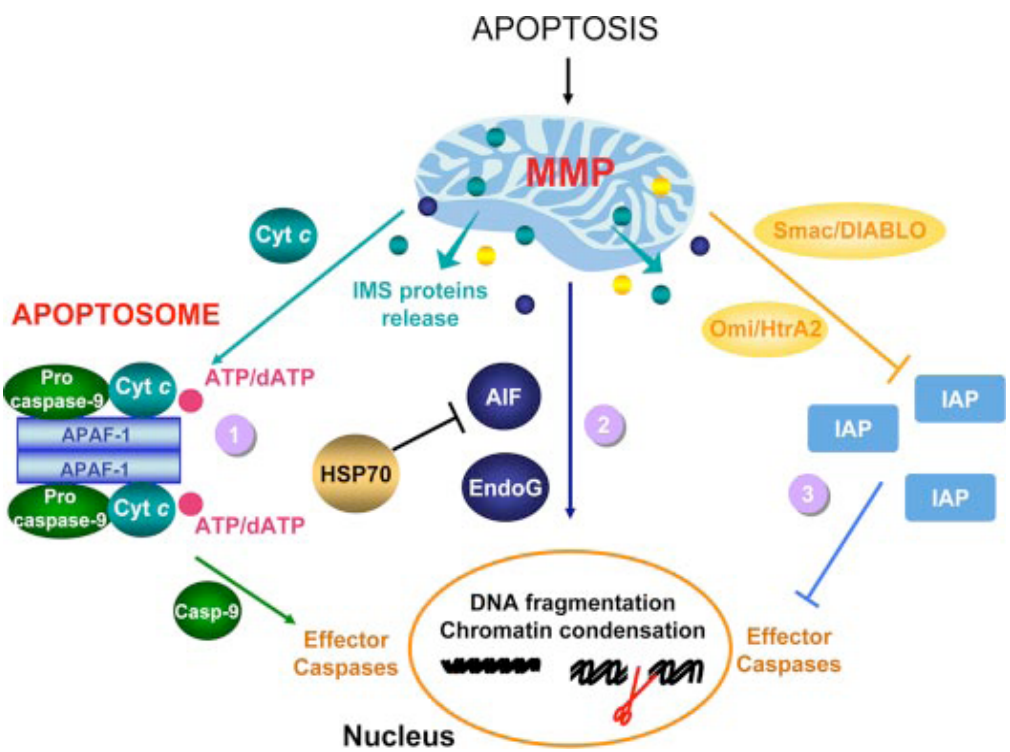
Η "**συνομιλία**" (crosstalk) ανάμεσα στο **εξωγενές** και **ενδογενές** μονοπάτι έχει εκτενώς διερευνηθεί στην περίπτωση των υποδοχέων θανάτου. Έτσι, σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους η σύνδεση του συνδέτη στους υποδοχείς προκαλεί τη διέγερση στις κασπάσες τελεστές χωρίς τη μεσολάβηση της διαπερατότητας MMP. Αντιθέτως, σε άλλους κυτταρικούς τύπους, παρατηρείται η πολύπλοκη διαδοχή γεγονότων με αρχή την ενεργοποίηση της κασπάσης 8, που οδηγεί στη διάσπαση και ενεργοποίηση της πρωτεΐνης **Bid**, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί την **Bax**. Οι δύο τελευταίες πρωτεΐνες ανήκουν στην υπεροικογένεια των πρωτεϊνών Bcl-2. Αποτέλεσμα της ενεργοποίησης της Bax είναι η αύξηση της MMP, που καταλήγει στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και την επακόλουθη ενεργοποίηση της κασπάσης 3 (**Scaffidi et al., 1998; Kroemer et al., 2007).**

Η διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών εξαρτάται απόλυτα από τη διαδικασία της απόπτωσης και για το λόγο αυτό η διεξαγωγή της ελέγχεται αυστηρά σε πολλά και κρίσιμα στάδια (**Green and Kroemer, 2004**). Σημαντικό ρόλο σε αυτά τα σημεία ελέγχου διαδραματίζουν τα μιτοχόνδρια με ένα πλήθος σημάτων, συμπεριλαμβανομένων διαφόρων ενδογενών (π.χ. συγκέντρωση πρωτονίων, ιόντων Ca, Mg, K, Na, επίπεδα ATP, ADP, NAD, γλουταθειόνη, κινάσες, φωσφατάσες) όπως και εξωγενών παραγόντων (π.χ. πρωτεΐνες ιών). Είναι χαρακτηριστικό το γεγονός ότι στο επίπεδο μεμβρανών αυτών των οργανιδίων συγκλίνουν τα σήματα κυτταρικού θανάτου και επιβίωσης. Όταν τα σήματα θανάτου επικρατούν επάγεται η αύξηση διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης, η οποία έχει ως επακόλουθο: 1) την απελευθέρωση του **κυτοχρώματος c**, δευτερογενών μορίων (Smac/DIABLO) που είναι ενεργοποιητές των κασπασών είτε πρωτεϊνικά μόρια που συνδέονται και απενεργοποιούν τους αναστολείς της απόπτωσης IAPs (inhibitor of apoptosis), την επαγόμενη από το στρες ενδοπρωτεάση Omi, και τις κασπάσες τελεστές, 2) την απελευθέρωση εκτελεστικών μορίων ανεξάρτητα από τις κασπάσες όπως του παράγοντα **AIF** και της **ενδονουκλεάσης G**, 3) τη μεταβολή του διαμεμβρανικού δυναμικού **ΔΨ** και 4) την **βιοενεργητική υποβάθμιση** του κυττάρου με την αναστολή της διαδικασίας οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, και τέλος τη συσσώρευση των ενεργών ενώσεων οξυγόνου ROS (**Kroemer et al., 2007**). Οι αλληλεπιδράσεις των παραπάνω μορίων κατά τη διεξαγωγή του αποπτωτικού προγράμματος παρουσιάζονται στην εικόνα 1.13.

Ο αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος μπορεί να αποφευχθεί με την ενεργοποίηση των αναστολέων των κασπασών. Στα κύτταρα συναντάμε τους φυσικούς **αναστολείς** όπως είναι οι **IAPS** (inhibitors of apoptosis) και οι οποίοι έχουν βρεθεί στους νηματώδεις, στα έντομα, στα πτηνά και στα θηλαστικά. Οι αναστολείς IAPS χαρακτηρίζονται από την περιοχή BIR (baculovirus IAP repeat) που αλληλεπιδρά με τις κασπάσες καθώς και με την πρωτεΐνη reaper (**Kaiser et al., 1998**). Σημειώνεται ότι οι IAPS δεν είναι ειδικοί αναστολείς των κασπασών αλλά γενικοί αναστολείς της απόπτωσης.

1.15.2 Νέκρωση

Η απόφαση σχετικά με το είδος του θανάτου, απόπτωση ή νέκρωση, στις περισσότερες περιπτώσεις υπαγορεύεται από τα ενεργειακά αποθέματα του κυττάρου. Σε αντίθεση με τη νέκρωση, η απόπτωση απαιτεί ένα τουλάχιστον μικρό ποσό ATP για τη διεξαγωγή της (**Nicotera et al., 1998**). Η νέκρωση δεν θεωρείται γενετικά προκαθορισμένη διαδικασία και συνήθως συμβαίνει πολύ σύντομα μετά την έκθεση στο ερέθισμα, ενώ ο τελικός φαινότυπος των νεκρωτικών κυττάρων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη σοβαρότητα του τραύματος. Στα κύρια χαρακτηριστικά της νέκρωσης ανήκουν η **αύξηση του ενδοκυτταρικού όγκου** που τελικά οδηγεί στη **ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης και την ανεξέλεγκτη αποδόμηση των οργανιδίων**. Η διαπίστωση του νεκρωτικού θανάτου ελλείψει βιοχημικών μαρτύρων είναι δυνατή μόνο με τη χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Η νέκρωση θεωρείται επιβλαβής για τους οργανισμούς, καθώς οδηγεί στην απώλεια κυττάρων που μπορεί να αποβεί παθολογική,



Εικόνα 1.13. Τα προ-αποπτωτικά ερεθίσματα που έχουν ως αποτέλεσμα την αυξημένη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης (MMP) παρέχουν στις πρωτεΐνες του μεσομεμβρανικού μιτοχονδριακού χώρου (IMS) τη δυνατότητα να απελευθερωθούν στο κυτοσόλιο, όπου μπορούν να ακολουθήσουν διάφορα μονοπάτια. 1) Το κυτόχρωμα c (cyt c), προωθεί τη συγκρότηση του «αποπτωσώματος» (apoptosome) μαζί με τον παράγοντα Apaf-1 και το ATP, που καταλήγει στην ενεργοποίηση της κασπάσης-9 από την ανενεργό προ-κασπάση-9 (pro-caspase 9). Η ενεργός κασπάση με τη σειρά της ευθύνεται για την πρωτεολυτική ενεργοποίηση των κασπασών τελεστών (effector caspases), η δράση των οποίων επιφέρει τα ιδιαίτερα αποπτωτικά χαρακτηριστικά. 2) Τα μόρια AIF και EndoG δρουν ανεξαρτήτως των κασπασών, ενώ μετατοπιζόμενα προκαλούν την αποδόμηση του DNA (DNA fragmentation) και τη συμπύκνωση της χρωματίνης (chromatin condensation). Η πρωτεΐνη θερμικού σοκ Hsp70 δρα ανασταλτικά της εισόδου του AIF στον πυρήνα (nucleus). 3) Τέλος, τα μόρια Smac/DIABLO και Omi/HtrA2 μέσω δέσμευσης ανταγωνίζονται τους αναστολείς της απόπτωσης IAPs, οι οποίοι

υπό φυσιολογικές συνθήκες ασκούν την αντι-αποπτωτική τους δραστηριότητα προλαμβάνοντας την ενεργοποίηση των κασπασών (Kroemer et al., 2007).

αλλά και στην εμφάνιση εντοπισμένης **φλεγμονώδους αντίδρασης** που μπορεί να ενισχύσει την ανάπτυξη όγκων (**Vakkila and Lotze, 2004**). Ο αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος μπορεί να μεταπέσει σε νεκρωτικό σε περίπτωση αναστολής των κασπασών είτε ελλείψει των παραγόντων που τις ενεργοποιεί όπως του Apaf-1 (**Kroemer and Martin, 2005**).

Από τη διεξαγωγή της διαδικασίας της νέκρωσης δεν μπορεί να αποκλειστεί και η συμμετοχή των κασπασών αλλά και της πρωτεϊνοσύνθεσης, όπως μαρτυρούν μελέτες του επαγομένου από τον TNF κυτταρικού θανάτου (**Kroemer and Martin, 2005**). Αυτές οι παρατηρήσεις, παράλληλα με άλλες σε knock-out μελετών (**Nakagawa et al., 2005**), προτείνουν ότι η επιλογή του είδους κυτταρικού θανάτου δεν καθορίζεται μόνο από το ερέθισμα, αλλά και από το ίδιο το κύτταρο, με τη νέκρωση να περιλαμβάνει την ενεργό συμμετοχή πολλών ενζύμων που μαρτυρούν την **ύπαρξη ελέγχου της διαδικασίας**. Ένα παράδειγμα αποτελεί η κινάση RIP (receptor interacting protein), που είναι απαραίτητη για την επαγόμενη από τον TNF νέκρωση και αναστέλλει την ανταλλαγή ATP/ADP στις μιτοχονδριακές μεμβράνες με την άμεση δράση στην τρανσλοκάση του νουκλεοτιδίου της αδενίνης (ANT-adenine nucleotide translocase), προκαλώντας τη δυσλειτουργία των οργανιδίων και τελικά τον κυτταρικό θάνατο (**Temkin et al., 2006**). Κατά συνέπεια, οι **μιτοχονδριακές μεταβολές** ενδεχομένως συνιστούν ένα κρίσιμο, τουλάχιστον σε ορισμένες περιπτώσεις, σημείο ελέγχου του νεκρωτικού θανάτου. Στο συμπέρασμα αυτό συγκλίνουν και άλλες μελέτες με την υπερέκφραση των Bcl-2 αντι-αποπτωτικών μελών, που σταθεροποιούν τη μιτοχονδριακή μεμβράνη, να αποτρέπουν ή να καθυστερούν τη νέκρωση, με παράδειγμα την επαγόμενη από τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα με την παράλληλη αναστολή των κασπασών νέκρωση (**Kroemer et al., 1998**). Παρομοίως, σε knock-out μελέτες της κυκλοφιλίνης D (CypD) που συμβάλλει στην MMP (**Basso et al., 2005**) ο νεκρωτικός θάνατος αποτρέπεται (**Nakagawa et al., 2005**). Τα παραπάνω μαρτυρούν τη συμμετοχή της **MMP** στην επαγωγή της νέκρωσης (**Kroemer et al., 2007**).

1.15.3 Ρύθμιση απόπτωσης και νέκρωσης

Αξίζει να σημειωθεί ότι, οι δύο κύριοι τύποι θανάτου, απόπτωση και νέκρωση, **δεν είναι απαραίτητα δύο ανεξάρτητες διαδικασίες**, αλλά αντιθέτως μοιράζονται πολλά **κοινά** σηματοδοτικά μονοπάτια (**Yakovlev and Faden, 2004**). Είναι χαρακτηριστικό το γεγονός ότι, μπορούν να ενεργοποιηθούν από κοινό ερέθισμα, αλλά η **ένταση** αυτού και τα ενεργειακά επίπεδα **ATP**, συγχρόνως με το βαθμό της αυξημένης ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης **ιόντων Ca** και την επερχόμενη ενεργοποίηση της πρωτεϊνης **καλπαϊνης,** καθορίζουν τη διεξαγωγή του ενός ή του άλλου τύπου προγράμματος κυτταρικού θανάτου (**Yamashima and Oikawa 2009**). **Περιορισμένη αύξηση των ιόντων Ca** προωθεί την **απόπτωση** (**Neumar et al., 2003**), ενώ περισσότερο **έντονη** οδηγεί σε **νέκρωση** μέσω της καταστροφικής διάσπασης ρυθμιστικών και δομικών πρωτεϊνών (**Syntichaki et al., 2002**).

Υποστρώματα της καλπαίνης αποτελούν ο παράγοντας Apaf-1 καθώς και οι κασπάσες (κασπάσες 3, 7, 8, 9, 12) που μπορούν να αποτελέσουν στόχους σε περιπτώσεις μικρού βαθμού ενεργοποίηση της καλπαίνης, και άρα να προωθηθεί ο αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος (**Yamashima and Oikawa 2009; Doyle et al., 2008**). Αντιθέτως, υψηλότερες συγκεντρώσεις ιόντων Ca και άρα μεγαλύτερος βαθμός ενεργών καλπαϊνών ενισχύουν το νεκρωτικό θάνατο μέσω της απώλειας ακεραιότητας της λυσοσωμικής μεμβράνης (**Reimertz et al., 2001; Chua et al., 2000**). Η διαδοχή των γεγονότων κατά τη νέκρωση περιλαμβάνει ενδείξεις **μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας** με περιορισμένα επίπεδα ATP, ενισχυμένη **παραγωγή ενώσεων ROS**, ενεργοποίηση των **καλπαϊνών** και των **καθεψινών**, και τέλος καταστροφή της **λυσοσωμικής** και **πλασματικής μεμβράνης** (**Golstein and Kroemer 2007**). Καθοριστικό ρόλο όμως στην παραπάνω απόφαση για την τύχη του κυττάρου διαδραματίζουν, όπως έχει ήδη αναφερθεί τα **λυσοσώματα** (**Yamashima, 2000; Nylandsted et al., 2004**), μέσω του βαθμού απώλειας της ακεραιότητας της μεμβράνης τους και κατά συνέπεια της συγκέντρωσης των υδρολυτικών ενζύμων που απελευθερώνονται στο κυτοσόλιο (**Yamashima and Oikawa 2009; Boya and Kroemer 2008**).

1.15.4 Αυτοφαγία και Αυτοφαγικός κυτταρικός θάνατος

Σε αντίθεση με την απόπτωση που περιλαμβάνει την εκτεταμένη συμμετοχή καταβολικών ενζύμων, που πραγματοποιούν την καταστροφή του συνόλου των κυτταρικών δομών και οργανιδίων, η αυτοφαγία αποτελεί μία αργή διαδικασία, κατά την οποία μέρος του κυτταροπλάσματος περικλείεται σε κυστίδια και τελικά αποικοδομείται από τις **λυσοσωμικές υδρολάσες** (**Kroemer and Jaattela, 2005**). Η σχέση ανάμεσα στις δύο διαδικασίες είναι ιδιαίτερα περίπλοκη, **με την αυτοφαγία να λειτουργεί άλλοτε ως επαγωγέας του κυτταρικού θανάτου (Shimizu et al., 2004)** και **άλλοτε να αποτελεί την απόκριση του κυττάρου απέναντι στο στρες υποστηρίζοντας την κυτταρική επιβίωση** π.χ. σε περιπτώσεις έλλειψης θρεπτικών στοιχείων (**Boya et al., 2005**). Με την αυτοφαγία το κύτταρο κατορθώνει να εξασφαλίσει τα απαιτούμενα επίπεδα ATP και τους απαραίτητους μεταβολίτες προκειμένου να ικανοποιήσει τις ενεργειακές του ανάγκες. Επιπροσθέτως, συμβάλλει καθοριστικά στην απομάκρυνση των πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων και των κατεστραμμένων οργανιδίων, πράγμα που σημαίνει ότι αποτρέπει τη συγκέντρωση των μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών παρέχοντας σημαντική προστασία στο κύτταρο (**Kroemer et al., 2007**). Παράδειγμα αποτελεί ο ρόλος της αυτοφαγίας σε περιπτώσεις νευροεκφυλιστικών νόσων όπως της Huntington, με τα πειραματόζωα που φέρουν μεταλλαγμένη μορφή της πρωτείνης huntingtin να μην εμφανίζουν τη νόσο όταν διεξάγεται φυσιολογικά η αυτοφαγική διαδιακασία (**Ravikumar et al., 2004**).

Όταν παρατηρείται εκτεταμένη κυστιοδιοποίηση τότε κάνουμε λόγο για την περίπτωση του **αυτοφαγικού κυτταρικού θανάτου**. Αντικείμενο διερεύνησης αποτελεί το ερώτημα κατά πόσο ο αυτοφαγικός θάνατος επιτελείται διαμέσου της αυτοφαγίας με την έννοια ότι η αναστολή αυτής θα απέτρεπε το θάνατο, καθώς και πότε συμβαίνει με την αυτοφαγία, που σημαίνει ότι η αναστολή της αυτοφαγίας θα επηρέαζε μόνο τη μορφολογία της διαδικασίας και όχι την τύχη του κυττάρου. Πλήθος μελετών σε αυτοφαγικά γονίδια (atg genes) διερευνά το συγκεκριμένο ζήτημα προκειμένου να διευκρινιστεί η συμβολή της αυτοφαγίας στον φυσιολογικό-αναπτυξιακό σε αντιδιαστολή με τον παθολογικό κυτταρικό θάνατο. Σύμφωνα με τα μέχρι τώρα δεδομένα, φαίνεται ότι το αυτοφαγικό γονίδιο Beclin-1 ή αλλιώς atg6 παίζει σημαντικό ρόλο στην ογκοκαταστολή (**Levine and Yuan, 2005**), φαινόμενο που ενδεχομένως συνδέεται με τον εξαρτώμενο από την Beclin-1 αυτοφαγικό έλεγχο που αποτρέπει την επιβάρυνση των κυττάρων από τα κατεστραμμένα οργανίδια συμπεριλαμβανομένων και των μιτοχονδρίων. Η πρωτεϊνη Beclin-1 αρχικά είχε ταυτοποιηθεί ως πρωτεϊνη που αλληλεπιδρά με τις πρωτεϊνες Bcl-2 (**Liang et al., 1998**) και δρα στη λυσοσωμική αποικοδόμηση κατά την αυτοφαγία (**Liang et al., 1999**). Επίσης, όπως έχει διαπιστωθεί η δέσμευση της Beclin-1 από την Bcl-2 στο ΕΔ έχει ως επακόλουθο την αναστολή της εξαρτώμενης από την πρωτεϊνη Beclin-1 αυτοφαγίας, ενώ όπως φαίνεται τα συσχετιζόμενα επίπεδα των δύο πρωτεϊνών διασφαλίζουν τη διεξαγωγή της αυτοφαγικής διαδικασίας στα φυσιολογικά επίπεδα διατήρησης της κυτταρικής ομοιόστασης με τα κύτταρα ικανά να ανταπεξέρχονται στις καταστάσεις στρες χωρίς να επάγεται ο κυτταρικός θάνατος (**Pattingre et al., 2005**). Το προαναφερθέν μοντέλο που υπογραμμίζει **τον εξαρτώμενο από την πρωτεϊνη Beclin-1 αυτοφαγικό θάνατο** ως έναν επιπλέον μηχανισμό απέναντι στην ογκογένεση αυξάνει την πιθανότητα τα αντι-αποπτωτικά μέλη της υπεροικογένειας Bcl-2 να λειτουργήσουν ως ογκογονίδια όχι μόνο με την παρεμπόδιση της απόπτωσης, αλλά και με την αναστολή της αυτοφαγίας (**Pattingre and Levine, 2006**).

Αξίζει να σημειωθεί ότι, η αυτοφαγία είναι επίσης υπεύθυνη για την απομάκρυνση και των κατεστραμμένων μιτοχονδρίων. Συνεπώς, όταν επάγεται αύξηση διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης MMP σε ένα μόνο μικρό αριθμό οργανιδίων, σε απόκριση ενός υπο-αποπτωτικού ερεθίσματος, η αυτοφαγία εξασφαλίζει την απομάκρυνση των οργανιδίων που εμφανίζουν αλλοιώσεις. Στην περίπτωση αυτή, **καταστολή της αυτοφαγίας** θα ευνοήσει την **επαγωγή της απόπτωσης** μέσω της ενδογενούς οδού (**Kroemer and Jaatela, 2005**). Είναι πιθανό, τα μιτοχόνδρια που υφίστανται διάνοιξη των πόρων τους PTP (permeability transition pores) με την απώλεια του δυναμικού ΔΨ να αποτελούν στόχο της λεγόμενης "μιτοφαγίας" (**Elmore et al., 2001**).

Συνεπώς, **βασικά επίπεδα αυτοφαγίας και ελαφρά ενισχυμένης από κάποιο παράγοντα στρες** αποτελεί έναν **εξαιρετικά αποδοτικό και απαραίτητο για την κυτταρική επιβίωση μηχανισμό**, εξασφαλίζοντας τα απαιτούμενα επίπεδα ενέργειας και απομακρύνοντας κατεστραμμένα μόρια και οργανίδια, διαδικασία ιδιαίτερα καθοριστική π.χ. για την περίπτωση των νευρώνων, που δεν τους δίνεται η δυνατότητα να απαλλαγούν από μέρος αυτών μέσω της κυτταρικής διαίρεσης. Ωστόσο, όταν **επεκτείνεται σε μεγάλο βαθμό**, μπορεί να οδηγήσει σε **κυτταρικό θάνατο** μέσω της απομάκρυνσης ή αποικοδόμησης σημαντικού μέρους **κυτταρικών οργανιδίων είτε κρίσιμων παραγόντων επιβίωσης** (**Kourtis and Tavernarakis, 2009**). Από τα παραπάνω διαφαίνεται ο διττός ρόλος της αυτοφαγίας στη ρύθμιση τόσο της κυτταρικής επιβίωσης όσο και του θανάτου (**Baehrecke, 2005).**

1.16 Ρόλος των μιτοχονδρίων

Διαπερατότητα της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και οι πρωτεϊνες της υπεροικογένειας Bcl-2

Η υπεροικογένεια των πρωτεϊνών Bcl-2 απαρτίζεται από μέλη που φέρουν μία τουλάχιστον ομόλογη περιοχή (BH region). Οι Bcl-2 πρωτεϊνες διακρίνονται στα αντι-αποπτωτικά μέλη Bcl-2 και Bcl-XL που φέρουν 4 περιοχές BH (BH1234), στα προ-αποπτωτικά μέλη Bax και Bak που περιέχουν τρεις περιοχές BH (BH123) και τέλος στις επίσης προ-αποπτωτικές πρωτεϊνες Bid και Bad με την περιοχή BH3 (**Letai et al., 2002**). Ορισμένες πρωτεϊνες φέρουν και μία διαμεμβρανική περιοχή με COOH άκρο με το οποίο μπορούν να εισέρχονται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη-OM (mitochondrial outer membrane), αλλά και σε άλλες μεμβράνες. Η κύρια θέση δράσης των **Bcl-2** είναι η **μιτοχονδριακή** μεμβράνη (**Kroemer and Reed, 2000**). Κατά κανόνα, οι πρωτεϊνες με τις ΒΗ1234 περιοχές εντοπίζονται κυρίως στην εξωτερική μεμβράνη, την οποία προστατεύουν από τη διαπερατότητα MMP, μέσω της δέσμευσης και εξουδετέρωσης της δράσης άλλων προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών της Bcl-2 οικογένειας, οι οποίες προωθούν τη διαπερατότητα. Ωστόσο, ορισμένες ΒΗ1234 αλλά και ΒΗ123 πρωτεϊνες δρουν και στη μεμβράνη του ΕΔ.

Παράδειγμα αποτελεί η πρωτεϊνη Bax, η οποία υπό φυσιολογικές συνθήκες είναι μια πρωτεϊνη που εντοπίζεται στο κυτοσόλιο. Ωστόσο κατά την απόπτωση η Bax εισέρχεται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (**Wolter et al., 1997**), όπου πιστεύεται ότι διαμορφώνει πόρους διάνοιξης είτε μόνη της, είτε με τη συνέργεια και άλλων προ-αποπτωτικών μελών, όπως της πρωτεϊνης Bak και του ενεργού καρβοξυτελικού θραύσματος tBid (truncated Bid) (**Kuwana et al., 2002**). Ωστόσο, η πρωτεϊνη Bax μπορεί να οδηγήσει και στην αποσταθεροποίηση της λιπιδικής μεμβράνης καταλήγοντας στην ύπαρξη ασυνεχών περιοχών κατά μήκος της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Για την δράση της Bax απαιτείται η μετατόπισή της, καθώς όταν παραμένει στο κυτοσόλιο οι μιτοχονδριακές βλάβες και κατ'επέκταση η απόπτωση αποφεύγεται (**Sawada et al., 2003**). Η διαπερατότητα MMP προκύπτει από τη μεταβολή στη διαμόρφωση των Bax ή Bak (με την έκθεση της αμινοτελική περιοχής τους), με την ολοκληρωτική εισαγωγή τους στις μιτοχονδριακές μεμβράνες σαν ολιγομερή και με τη συγκρότηση διαπερατών διαύλων-πόρων (**Kuwana et al., 2002**).

Όσον αφορά στον τρόπο με τον οποίο οι αντι-αποπτωτικές Bcl-2 πρωτεϊνες αναστέλλουν τη διαπερατότητα MMP, φαίνεται ότι, τα μέλη αυτά δρουν ως αναστολείς της δράσης των προ-αποπτωτικών μελών. Πιο συγκεκριμένα, τα αντι-αποπτωτικά μόρια μπορούν να αλληλεπιδράσουν άμεσα με τις πρωτεϊνες που διαμορφώνουν τους πόρους είτε έμμεσα να εξουδετερώσουν τη δράση τους (**Letai et al., 2002**). Ωστόσο, δεδομένα προτείνουν ότι, τα μόρια Bcl-2 και Bcl-XL μπορούν να αλληλεπιδράσουν με διάφορες μιτοχονδριακές πρωτεϊνες συμπεριλαμβανομένων των μορίων ANT και VDAC (**Marzo et al., 1998, Shimizu et al., 2000).** Τελικά, φαίνεται ότι οι πρωτεϊνες Bcl-2 φέρουν διττή λειτουργία στα μιτοχόνδρια, αναστέλλοντας τη διαμόρφωση των πόρων από τις Bax και Bak, αλλά και παρεμποδίζοντας τη λειτουργία αυτών που προέρχονται από τις πρωτεϊνες του PTP συμπλέγματος (VDAC και ANT) (**Kroemer et al., 2007**).

Διαπερατότητα μεσολαβούμενη από το κανάλι VDAC

Το ηλεκτροευαίσθητο ανιονικό κανάλι VDAC (voltage dependent anion channel) είναι η πρωτεϊνη που κυριαρχεί στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη μέσω της οποίας διέρχονται μόρια έως 5 KDa. Το άνοιγμα του καναλιού ωστόσο φαίνεται να είναι μία ρυθμιζόμενη διαδικασία και το VDAC να παρουσιάζει σε κάποιο βαθμό εξειδίκευση στη διέλευση διαφόρων μορίων όπως ATP, ιόντων Ca, κ.ά.. Η εμπλοκή του καναλιού στην αποπτωτική διαδικασία έχει προταθεί από την ομάδα του Tsujimoto και τους συνεργάτες του το 1999 (**Shimizu et al., 1999, Tsujimoto and Shimizu 2000**), ενώ διάφορα πειραματικά δεδομένα, προτείνουν ότι οι πρωτεϊνες Bcl-2 δεσμεύονται στο κανάλι ρυθμίζοντας το ΔΨ δυναμικό και την έξοδο του κυτοχρώματος c κατά την απόπτωση (**Kroemer et al., 2007**).

Υπερέκφραση της VDAC φαίνεται ικανή να επάγει την απόπτωση σε πλήθος κυττάρων (**Zaid et al., 2005**), και μάλιστα με τις διαφορετικές ισομορφές του καναλιού να αλληλεπιδρούν με διαφορετικό τρόπο με τις προ-αποπτωτικές πρωτεϊνες Bcl-2.

Ανίχνευση της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης

Η διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης-MMP (mitochondrial membrane permeabilization) αποτελεί ένα καθολικό χαρακτηριστικό του κυτταρικού θανάτου και θεωρείται το σημείο στο οποίο η πορεία του κυττάρου είναι πλέον μη αναστρέψιμη (**Green and Kroemer 1998; 2004**). Οι μηχανισμοί που σχετίζονται με την MMP είναι ιδιαίτερα πολύπλοκοι.

Ένα ερώτημα που απασχόλησε ιδιαίτερα την έρευνα αφορούσε στην ενδεχόμενη συμμετοχή της εσωτερικής μεμβράνης-IM (mitochondrial inner membrane) στην αύξηση της διαπερατότητας MMP. Σύμφωνα με διάφορα πειραματικά δεδομένα μπορούν να διακριθούν δύο μονοπάτια που οδηγούν στη διαπερατότητα MMP: 1) σε αυτό κατά το οποίο η απώλεια του δυναμικού ΔΨ συμβαίνει πολύ νωρίς κατά τη διαδικασία και ανεξάρτητα από τις κασπάσες και 2) σε αυτό στο οποίο η εσωτερική μεμβράνη δεν επηρεάζεται μέχρις ότου ξεκινήσει η δεύτερη φάση της αποπτωτικής διαδικασίας. (**Kroemer et al., 2007).**

Μεμβρανικοί πόροι παροδικής διαπερατότητας

Η παροδική διαπερατότητα PT (permeability transition) συνίσταται στην ξαφνική αύξηση της διαπερατότητας της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης σε μόρια με μοριακή μάζα μέχρι 1.5 KDa. Αυτό επιτυγχάνεται με το άνοιγμα ηλεκτροευαίσθητων, υψηλής αγωγιμότητας καναλιών που εντοπίζονται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και είναι γνωστά ως μεμβρανικοί πόροι παροδικής διαπερατότητας PTPs (permeability transition pores). Τα κανάλια αυτά είναι πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα (PTPC), με ένα σύνολο πρωτεϊνών να ευθύνεται για τη διάνοιξή τους. Συγκροτούνται στα σημεία επαφής των μιτοχονδριακών μεμβρανών και στη διαμόρφωσή τους συμβάλλουν οι δυναμικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις πρωτεϊνες VDAC, ANT και CypD (cyclophilin D) (**Zoratti and Szabo, 1995**). Αξίζει να σημειωθεί ότι, μόνο σε περιπτώσεις μεγάλης και παρατεταμένης διάνοιξης των πόρων και με την παρουσία υψηλού ποσού ATP, το κύτταρο είναι δυνατόν να οδηγηθεί σε κυτταρικό θάνατο επαγόμενο από τα ιόντα Ca. Η διάνοιξη των πόρων παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία στα ιόντα Ca, όπως και σε οξειδωτικούς παράγοντες και προ-αποπτωτικές πρωτεϊνες Bcl-2 (Bax, Bak, Bid). Αντιθέτως, το κλείσιμο των πόρων προκύπτει από συνδέτες της CypD και της ANT, καθώς και από τα αντι-αποπτωτικά μέλη Bcl-2, Bcl-XL (**Marzo et al., 1998; Ravagnan et al., 1999**).

Μόρια που απελευθερώνονται από τα μιτοχόνδρια

Κυτόχρωμα c: Η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c αποτελεί κρίσιμο γεγονός στον εξαρτώμενο από τα μιτοχόνδρια κυτταρικό θάνατο (**Li et al., 1997**). Η έκκριση αυτού ολοκληρώνεται μέσα σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα, ενώ προηγείται της έκθεσης της φωσφατίδυλο-σερίνης και της απώλειας ακεραιότητας της μεμβράνης (**Goldstein et al., 2000**). Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι υπάρχουν δύο σημαντικές πηγές του κυτοχρώματος c. Η μία εξ αυτών συνδέεται με τα μιτοχονδριακά λιπίδια και κυρίως την καρδιολιπίνη, ενώ σε μικρότερο ποσοστό το κυτόχρωμα c διαχέεται ελεύθερα στον μεσομεμβρανικό μιτοχονδριακό χώρο-IMS (**Ott et al., 2002**). Η σύνδεση καρδιολιπίνης και κυτοχρώματος επηρεάζεται από τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις καθώς και από την οξείδωση της καρδιολιπίνης από τις ενώσεις ROS (**Ott et al., 2002**). Κατά την ενεργοποίηση της απόπτωσης από τη διαπερατότητα MMP, το κυτόχρωμα c δρα ως οξυγενάση της καρδιολιπίνης συμβάλλοντας στην οξείδωσή της για την απελευθέρωση του ιδίου, αλλά και άλλων προ-αποπτωτικών παραγόντων (**Kagan et al., 2005**). Με την έξοδό του στο κυτοσόλιο ένα ποσοστό του κυτοχρώματος αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς IP3R τύπου I της 1,4,5 τριφωσφορικής ινοσιτόλης (inositol 1,4,5-trisphosphate receptor), με αποτέλεσμα την ενίσχυση της αποπτωτικής διαδικασίας μέσω της επιπλέον απελευθέρωσης ιόντων Ca από το ΕΔ, ενώ η αύξηση στη συγκέντρωση των ιόντων στο κυτοσόλιο εντός φυσιολογικών ορίων διευκολύνει τη διαμεσολαβούμενη από τους IP3R έκκριση Ca, υψηλότερες συγκεντρώσεις παρεμποδίζουν τη λειτουργία των υποδοχέων. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι υποδοχείς τύπου I και III που χαρακτηρίζονται από διαφορετικό απαιτούμενο κατώφλι της διαμεσολαβούμενης από το Ca αναστολής τους (**Bezprozvanny et al., 1991; Boehning and Joseph, 2000**).

Η παρουσία του κυτοχρώματος στο κυτοσόλιο προάγει τη συγκρότηση του λεγόμενου αποπτωσώματος που ενεργοποιεί την προ-κασπάση 9, και απαρτίζεται από το κυτόχρωμα c, τον παράγοντα Apaf-1 και το ATP (εικ. 1.19). Κατά τη διαμόρφωσή του η κασπάση 9 καθίσταται ικανή να διεγείρει την ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών που καταλήγει στον αποπτωτικό θάνατο (**Zou et al., 1999**). Στόχο των κασπασών αποτελούν οι διάφορες κυτταρικές δομές συμπεριλαμβανομένων και των μιτοχονδρίων. Οι ενεργές κασπάσες αποκτούν πρόσβαση στον εσωτερικό μεσομεμβρανικό χώρο των οργανιδίων μέσω της διαπερατής εξωτερικής μεμβράνης με αποτέλεσμα την αποικοδόμηση πλήθους απαραίτητων συνιστωσών της αναπνευστικής αλυσίδας ανακόπτοντας τη διαδικασία ανταλλαγής ηλεκτρονίων στην εσωτερική μεμβράνη (**Ricci et al., 2004**).

AIF (apoptosis inducing factor): Κατά την ενεργοποίηση της αποπτωτικής διαδικασίας, ο AIF ελευθερώνεται στο κυτοσόλιο και μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου και συμμετέχει στη συμπύκνωση της χρωματίνης και τη θραύση του DNA μέσω μιας διαδικασίας που ενδεχομένως διεξάγεται με τη δέσμευση του AIF στο DNA (**Susin et al., 1999**).

<u>Η δυναμική φύση των μιτοχονδρίων-μιτοχονδριακή σύντηξη και σχάση</u>

Ο αριθμός και η μορφολογία των μιτοχονδρίων ελέγχεται από την υφιστάμενη ισορροπία ανάμεσα στη διαδικασία σύντηξης και σχάσης των οργανιδίων (mitochondrial fusion and fission) (**Chan, 2006**), οι οποίες με τη σειρά τους ρυθμίζονται από μηχανισμούς που περιλαμβάνουν τις πρωτεΐνες GTPάσες που συνδέονται με τη δυναμίνη (dynamin-related GTPases) (**Wang et al., 2009a**).

Η μιτοχονδριακή σχάση στα θηλαστικά περιλαμβάνει τουλάχιστον δύο πρωτεΐνες, την DLP1 (dynamin-like protein 1) και ένα μικρότερο πρωτεϊνικό μόριο την Fis1. Η DLP1 εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στο κυτταρόπλασμα. Κατά τη σχάση, η DLP1 μετατοπίζεται στα μιτοχόνδρια όπου και προσλαμβάνεται στα σημεία της επιφάνειας, μέρος των οποίων θα διαμορφώσει το σημείο σχάσης, ενώ πιστεύεται ότι η DLP1 με τη βοήθεια της GTP υδρόλυσης συμβάλλει στη συστολή των μικροσωληνίσκων κατά τη διεξαγωγή της διαδικασίας (**Smirnova et al., 2001**). Η πρωτεΐνη Fis1 βρίσκεται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και στρατολογεί την πρόσδεση της DLP1 στα μιτοχόνδρια μέσω του αμινοτελικού της άκρου (**Wells et al., 2007**).

Από την άλλη μεριά, η μιτοχονδριακή σύντηξη ρυθμίζεται από τρεις GTPάσες: τις

Mfn1, Mfn2 (mitofusin 1,2) και την Opa1 (optic atrophy 1) (**Knott et al., 2008**). Οι Mfn1, Mfn 2 είναι μιτοχονδριακές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες εντοπισμένες στην εξωτερική μεμβράνη. Κατά τη σχάση, αλληλεπιδράσεις σε συγκεκριμένες περιοχές (coiled-coil domains) των Mfn1 και Mfn2 μπορούν να οδηγήσουν στη συγκρότηση ομο-ολιγομερικών και ετερο-ολιγομερικών συμπλόκων προκειμένου να προσδεθούν τα γειτονικά μιτοχόνδρια μεταξύ τους (**Ishihara et al., 2004**). Η Opa1 βρίσκεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη όπου και σχετίζεται με τη σύντηξη αυτής (**Chen et al., 2005**).

Τόσο η σύντηξη όσο και η σχάση παίζουν καθοριστικό ρόλο στη διατήρηση ενός υγιούς πληθυσμού μιτοχονδρίων. Η σύντηξη επιτρέπει την ανταλλαγή των λιπιδικών μεμβρανών και του ενδομιτοχονδριακού περιεχομένου συμπεριλαμβανομένου και του mtDNA μεταξύ διαφορετικών μιτοχονδρίων, με αποτέλεσμα να μειώνεται αρκετά το ποσοστό των κατεστραμμένων οργανιδίων. Αντιθέτως η σχάση που είναι συζευγμένη με τη σύντηξη και ακολουθείται από την αυτοφαγία, επιτρέπει την απομόνωση και μείωση του αριθμού των μιτοχονδρίων με μη αναστρέψιμη βλάβη, διατηρώντας με τον τρόπο αυτό την ακεραιότητα και ομοιογένεια του μιτοχονδριακού πληθυσμού (**Wang et al., 2009a**). Οι μέχρι τώρα ενδείξεις κάνουν λόγο για το σημαντικό ρόλο διατήρησης της ισορρροπίας ανάμεσα στη μιτοχονδριακή σύντηξη και σχάση για τη διεξαγωγή κρίσιμων διαδικασιών όπως το μεταβολισμό και την κατανομή των μιτοχονδρίων σε σημεία αναλόγως τις ενεργειακές απαιτήσεις, την παραγωγή ενέργειας, τη σηματοδότηση του Ca, την παραγωγή των ROS και την απόπτωση (**Wang et al., 2009a**).

Η αποδόμηση των εκτεταμένων μιτοχονδριακών δικτύων αποτελεί ένα πρωταρχικό γεγονός κατά τη διεξαγωγή του αποπτωτικού προγράμματος στα κύτταρα των θηλαστικών (**Suen et al., 2008**). Στη διαδικασία αυτή φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό, ρυθμιστικό ρόλο οι πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 που αλληλεπιδρούν με τους μηχανισμούς της μιτοχονδριακής σύντηξης και σχάσης ελέγχοντας τη μορφολογία του μιτοχονδριακού δικτύου τόσο σε υγιή όσο και σε αποπτωτικά κύτταρα (**Autret and Martin, 2010**).

1.17 Ερεθίσματα που επάγουν τον κυτταρικό θάνατο

1.17.1 Βλάβη στο πυρηνικό DNA

Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα κύτταρα που φέρουν βλάβες στο DNA σε βαθμό που δεν μπορεί να επιδιορθωθεί, οδηγούνται είτε στην απόπτωση (εικ. 1.14) είτε εισέρχονται σε κατάσταση αναστολής του κυτταρικού κύκλου. Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην κυτταρική απόκριση απέναντι στη βλάβη του γενετικού υλικού, είτε ενεργοποιώντας τη διαδικασία επιδιόρθωσης είτε προκαλώντας την απόπτωση όταν η βλάβη είναι μη αναστρέψιμη. Η πρωτεΐνη p53 μεταξύ άλλων είναι μεταγραφικός παράγοντας των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bax, Bid, Puma, Noxa της οικογένειας Bcl-2, που επάγουν την MMP (εικ. 1.14) (**Vousden and Lu, 2002**), ενώ παράλληλα ενισχύει τη γονιδιακή έκφραση της πρωτεΐνης ASC (apoptosis-associated specklike adaptor protein), που ενεργοποιεί την πρωτεΐνη Bax και την επαγόμενη αλλήλεπίδρασή της με τα μιτοχόνδρια (**Ohtsuka et al., 2004**), όπως επίσης πλήθος άλλων πρωτεϊνών που εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια και προωθούν τη διαπερατότητα MMP μέσω οξειδωτικών αντιδράσεων (**Donald et al., 2001**). Ανάμεσα στις ιδιότητές της συγκαταλέγεται η αναστολή έκφρασης της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 (**Wu et al., 2001**), αλλά και η αλληλεπίδρασή της με πρωτεΐνες που σχετίζονται με το ΕΔ ή την πλασματική μεμβράνη (**Liu et al., 2004; Zamzami and Kroemer, 2005**) και ενισχύουν την αποπτωτική διαδικασία.

1.17.2 Σήματα από το Κυτοσόλιο

Ορισμένοι μεταβολίτες από το πλήθος των μονοπατιών που διεξάγονται στο κυτοσόλιο επηρεάζουν την διαπερατότητα MMP και κατ'επέκταση την ενδογενή αποπτωτική οδό (εικ. 1.20) (**Kroemer et al., 2007**). Οι ενώσεις ROS αλλά και άλλοι μεταβολίτες και λιπιδικές αλδεϋδες προάγουν τη διαπερατότητα MMP κυρίως μέσω επιδράσεων στα μιτοχονδριακά λιπίδια και τις μιτοχονδριακές πρωτεϊνες. Τέλος, τα ιόντα Ca θεωρούνται απαραίτητοι επαγωγείς της MMP μέσω της διάνοιξης των πόρων PTP (**Kroemer et al., 2007**).

Εκτός όμως από τους μεταβολίτες, την απόπτωση ελέγχουν και μονοπάτια σηματοδότησης, όπως της ουμπικιτίνης (υπεύθυνο για την αποικοδόμηση πλήθους πρωτεϊνών) καθώς και μονοπάτια εξαρτώμενα από κινάσες (PI3K, Akt) (**Cantley 2002; Franke et al., 2003**; **Cardone et al., 1998; Pastorino et al., 1999**).

Το μονοπάτι των MAPK (mitogen-activated protein kinase) κινασών απαρτίζουν πρωτεϊνικές κινάσες που εμπλέκονται στη σηματοδότηση επαγωγής της απόπτωσης και παίζουν ρόλο στην αύξηση της MMP. Για παράδειγμα, οι κινάσες JNK (c-Jun NH2-terminal kinases) σε περίπτωση στρες αλληλεπιδρούν με τα μιτοχόνδρια (**Kharbanda et al., 2000; Kurinna et al., 2004**). Οι JNK κινάσες απενεργοποιούν τις αντι-αποπτωτικές και ενεργοποιούν τις αποπτωτικές πρωτεϊνες της οικογένειας Bcl-2 (**Schroeter et al., 2003, Yin et al., 2005**) προωθώντας τη διαπερατότητα MMP.

1.17.3 Στοιχεία του Κυτταροσκελετού

Πολλές συνιστώσες του κυτταροσκελετικού συστήματος όπως οι μικροσωληνίσκοι, τα μικροϊνίδια και ενδιάμεσα ινίδια κατέχουν σημαντικό ρόλο τόσο στην κυτταρική επιβίωση όσο και στον κυτταρικό θάνατο. Η κινητικότητα, η πολικότητα, η διαμόρφωση σχήματος, καθώς και η μετακίνηση μορίων, οργανιδίων και κυστιδίων ελέγχονται από τα στοιχεία του κυτταροσκελετού και συμβάλλουν στην τύχη του κυττάρου. Για παράδειγμα, γειτονικά κύτταρα υφίστανται απόπτωση αμέσως μετά τον αποχωρισμό από την εξωκυτταρική μήτρα, φαινόμενο που ονομάζεται "anoikis" και βασίζεται στα προαποπτωτικά σήματα τα προερχόμενα από τις ιντεγκρίνες, ενώ απορρύθμιση αυτού οδηγεί στον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό που συναντάται σε πολλές νεοπλασίες (**Reddig and Juliano, 2005**). Ένα άλλο παράδειγμα αποτελεί η πρωτεϊνη γκελσολίνη που εξαρτάται από το Ca και έχει αντι-αποπτωτική επίδραση μέσω της δράσης της στο κλείσιμο του VDAC (**Kusano et al., 2000**). Ομοίως και η ακτίνη του κυτταροσκελετού ρυθμίζει το VDAC (**Gourlay and Ayscough, 2005**), με τη μονομερή μορφή της να ενισχύει το κλείσιμο και την πολυμερή να υποστηρίζει την ευαισθησία του καναλιού απέναντι σε αποπτωτικά ερεθίσματα (**Gourlay and Ayscough, 2005**).

1.17.4 Η αλληλεπίδραση του ενδοπλασματικού δικτύου και των ιόντων Ca με τα μιτοχόνδρια

Η συγκέντρωση ιόντων Ca στο κυτοσόλιο παραμένει πολύ χαμηλή (περίπου 100nM) μέσω της ενεργούς έκκρισης ιόντων από αντλίες στην πλασματική μεμβράνη είτε σε ενδοκυτταρικά οργανίδια, όπως η αντλία SERCA του σάρκο/ενδοπλασματικού δικτύου. Εξ αιτίας της δράσης της σαρκο και ενδοπλασματικής ΑΤΡάσης (SERCA), και πρωτεϊνών που δεσμεύουν τα ιόντα, το ΕΔ συσσωρεύει ιόντα Ca σε χιλιάδες φορές μεγαλύτερες συγκεντρώσεις συγκρινόμενες με αυτές στο κυτοσόλιο (**Berridge et al., 2000, Görlach et al., 2006**). Το ΕΔ, που συνιστά την κύρια ενδοκυτταρική αποθήκη των ιόντων Ca, συμβάλλει σε ένα ευρύ φάσμα διαφορετικών διαδικασιών όπως κυτταρικό πολλαπλασιασμό, γονιμοποίηση, κυτταρικό θάνατο (**Breckenridge et al., 2003; Rizzuto and Pozzan, 2006**). Τα ιόντα Ca δρουν ως σημαντικοί συμπαράγοντες των πρωτεϊνών-συνοδών (chaperones) του ΕΔ, συμμετέχοντας στην ορθή αναδίπλωση των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών (**Corbett and Michalak, 2000**). Δύο κανάλια στο ΕΔ ευθύνονται για την απελευθέρωση του Ca στο κυτοσόλιο, με αποτέλεσμα να προωθούν την Ca-σηματοδότηση: 1) ο υποδοχέας της 1,4,5 τριφωσφορικής ινοσιτόλης IP3R (inositol 1,4,5-trisphosphate receptor), και 2) ο υποδοχέας της ρυανοδίνης RyR (ryanodine receptor). Οι υποδοχείς έχουν παρόμοια λειτουργία αλλά διαφέρουν στη ρύθμιση, την αγωγιμότητα και το προφίλ έκφρασης (**Foskett et al., 2007; Sutko and Airey, 1996**).

Η αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης Ca, ακολουθώντας την έκκρισή του από το ΕΔ καταλήγει σε μια πληθώρα ενδοκυτταρικών γεγονότων (**Berridge, 2006**). Με δεδομένη τη στενή επαφή ανάμεσα στο ΕΔ και τα μιτοχόνδρια και την έκθεση των μιτοχονδρίων στις λεγόμενες μικροπεριοχές Ca (Ca-microdomains), που εντοπισμένα φέρουν υψηλές συγκεντρώσεις των ιόντων (**Pinton and Rizzuto, 2006; Rizzuto and Pozzan, 2006**), αλλά και μέσω άμεσων συνδέσεων με τους υποδοχείς IP3R, είναι φανερό ότι τα σήματα ιόντων Ca, τα προερχόμενα από το ΕΔ, επηρεάζουν καταλυτικά τη μιτοχονδριακή λειτουργία (εικ. 1.14). Η ηλεκτροχημική διαβάθμιση ανάμεσα στον εσωτερικό και εξωτερικό χώρο των μιτοχονδρίων ($\Delta\psi m = -180$mV) κατευθύνει την πρόσληψη των ιόντων εντός της μιτοχονδριακής μήτρας, δηλαδή τη μεταφορά των ιόντων κατά μήκος της εξωτερικής και εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Η πρόσληψη αυτή ενεργοποιεί τη μιτοχονδριακή παραγωγή ATP μέσω ρύθμισης της ενεργότητας των ενζύμων του κύκλου του Krebs (**McCormack and Denton, 1990; Carafoli 2010).** Ομοίως, και άλλες διαδικασίες όπως η οξείδωση των λιπαρών οξέων, ο καταβολισμός των αμινοξέων, αλλά και διάφορες πρωτεΐνες όπως η πρωτεΐνη ANT (adenine nucleotide translocator), η υπεροξειδική δυσμουτάση, η ενεργότητα της F1-ΑΤΡάσης ρυθμίζονται από το μιτοχονδριακό Ca (**McCormack and Denton 1990; Hayashi et al., 2009; Shoshan-Barmatz et al., 2010**). Είναι χαρακτηριστική η ύπαρξη μηχανισμών θετικής ανάδρασης ανάμεσα στο ATP και τα ιόντα Ca, καθώς το ATP μεταφερόμενο στο κυτταρόπλασμα ρυθμίζει πρωτεΐνες όπως τη SERCA, αλλά και τους υποδοχείς IP3Rs (**Walsh et al., 2009**).

Οι αντλίες SERCA και οι υποδοχείς IP3R ρυθμίζονται από τα ιόντα Ca, και άρα η τοπική συγκέντρωση ιόντων γύρω από τα μιτοχόνδρια ορίζει την επαναφόρτωση του ΕΔ και επομένως τα χαρακτηριστικά των σημάτων Ca, τα οποία επηρεάζονται επίσης από την τοπολογία των μιτοχονδρίων, την παραγωγή ROS, την τοπική συγκέντρωση Ca, καθώς και την ισομορφή του IP3R που εκφράζεται (**Walsh et al., 2009; Duchen et al., 2000; Rizzuto et al., 2004).**

Η ροή των ιόντων κατά μήκος της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης καθορίζεται κυρίως από τα ηλεκτροευαίσθητα κανάλια VDAC. (**Gincel et al., 2001**). Το κανάλι κατέχει κεντρικό ρόλο στη "συνομιλία" ανάμεσα στο κυτταρόπλασμα και τα μιτοχόνδρια. Κατά αυτόν τον τρόπο το κανάλι εμπλέκεται και στην επαγωγή της απόπτωσης από διάφορα ερεθίσματα (**Shoshan-Barmatz et al., 2010**).

1.17.5 Ο ρόλος του Ενδοπλασματικού δικτύου και των ιόντων Ca στην απόπτωση, τη νέκρωση και την αυτοφαγία

Υπάρχει πλέον η γενική θεώρηση ότι τους τρεις τύπους κυτταρικού θανάτου όχι μόνο δεν τους διακρίνουν σαφή όρια αλλά ακριβώς το αντίθετο, μοιράζονται κοινά μόρια εκτελεστές αλλά και μονοπάτια σηματοδότησης. Ανάμεσα στα τελευταία έχει αποσαφηνιστεί πλέον ο ρόλος των ιόντων Ca, που χαρακτηρίζεται από τη συμμετοχή του ως δευτερογενές μήνυμα σε πλήθος φυσιολογικών και μη διαδικασιών. Η ρύθμιση των επιπέδων της ενδοκυτταρικής ομοιόστασης από αντι και προ-αποπτωτικές πρωτεϊνες διαμορφώνει το τελικό ερέθισμα στο οποίο εκτίθενται τόσο τα μιτοχόνδρια όσο και άλλα εκτελεστικά μόρια μεταξύ των οποίων και πολλοί επαγωγείς κυτταρικού θανάτου (**Pinton et al., 2008**).

Χαρακτηριστική είναι η εξάρτηση των ηλεκτροευαίσθητων μιτοχονδριακών πόρων PTP από τα ιόντα Ca (**Rasola and Bernardi, 2007**). Η διάνοιξή τους είναι καθοριστική της περαιτέρω "μοίρας" του κυττάρου είτε μέσω επαγωγής της απόπτωσης (εικ. 1.14), όταν τα επίπεδα ATP είναι ικανά να ενεργοποιήσουν τις κασπάσες, είτε μέσω προώθησης της νέκρωσης ως αποτέλεσμα της διαταραγμένης ομοιόστασης των ιόντων Ca αλλά και της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας (**Giorgi et al., 2008; Rasola et. al, 2010**). Νέκρωση επέρχεται όταν η διαπερατότητα επεκτείνεται σε μεγαλύτερο αριθμό μιτοχονδρίων με αποτέλεσμα την ενεργειακή απώλεια, ενώ εντοπισμένη σε μικρότερο αριθμό μιτοχονδρίων προκαλεί την απελευθέρωση των προ-αποπτωτικών παραγόντων με τα υπόλοιπα ανεπηρέαστα μιτοχόνδρια ικανά να παράσχουν τα απαραίτητα επίπεδα ATP για την εκτέλεση του αποπτωτικού προγράμματος (**Rasola and Bernardi, 2007; Rasola et al., 2010**). Επιπλέον, Ca2+/Na+ και Ca2+/H+ ανταλλάκτες είναι παρόντες στην IMM, η κύρια λειτουργία των οποίων είναι η εξαγωγή ιόντων Ca από τη μήτρα αλλά και η εισαγωγή αυτών υπό ορισμένες συνθήκες (**Malli and Graier, 2010**). Όμως, και η διαδικασία της αυτοφαγίας επηρεάζεται από τα ιόντα Ca (**Harr and Distelhorst, 2010**).

Η κύρια ώθηση για την υπόθεση εμπλοκής της ομοιόστασης του Ca στην απόπτωση προήλθε από την παρατήρηση ότι οι βασικοί ρυθμιστές της απόπτωσης, δηλαδή οι πρωτεϊνες Bcl-2 εδράζονται στα δύο κύρια κυτταρικά διαμερίσματα που σχετίζονται στενά με τη ρύθμιση της συγκέντρωσης ιόντων Ca, και συγκεκριμένα τα μιτοχόνδρια και το ΕΔ (εικ. 1.20). Είναι χαρακτηριστική η εντόπιση της Bcl-2 στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, καθώς και στο ΕΔ αλλά και στον πυρήνα, ενώ είναι επίσης γνωστή και η κυτταροπλασματική της μορφή (**Pinton and Rizzuto, 2006**).

Μελέτες υποστηρίζουν ένα μοντέλο σύμφωνα με το οποίο η Bcl-XL αλληλεπιδρά με όλες τις ισομορφές του υποδοχέα IP3R δρώντας ως ρυθμιστής της λειτουργίας αυτών επιτρέποντας την έκκριση των ιόντων Ca από το ΕΔ ιδιαίτερα σε περίπτωση εξωγενούς ερεθίσματος (**White et al., 2005**).

Όσον αφορά στην περίπτωση της αυτοφαγίας, ερεθίσματα που αυξάνουν τα επίπεδα του κυτοσολικών ιόντων Ca ενεργοποιούν την εξαρτώμενη από το Ca ή την καλμοντουλίνη πρωτεϊνική κινάση-κινάση-CaMKK (Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase-kinase) με αποτέλεσμα την αναστολή του στόχου της ραπαμυκίνης (mTOR) και άρα την ενεργοποίηση της αυτοφαγίας (**Pinton et al., 2008**). Επίσης, η αυτοφαγία όπως έχει προκύψει από ορισμένες μελέτες επάγεται λόγω του στρες στο ΕΔ, καταστάσεις κατά τις οποίες τα κύτταρα καλούνται να επιλέξουν ανάμεσα στην επιβίωση μέσω της αυτοφαγίας και του θανάτου μέσω της απόπτωσης, μεταξύ των οποίων υφίστανται σημαντικές "συνομιλίες" (**Maiuri et al., 2007; Eisenberg-Lerner et al., 2009**). Πλήθος μονοπατιών εμπλέκεται στην απόκριση των ιόντων Ca του ΕΔ απέναντι στην ελαττωματική αναδίπλωση των πρωτεϊνών και την αναπόφευκτη αύξηση της MMP (**Kroemer et al., 2007**). Επίσης, η διαμόρφωση του αυτοφαγοσώματος φάνηκε ότι ήταν εξαρτώμενη από το Ca, ενώ υπήρξαν επιπλέον ενδείξεις σχετικά με την εξάρτηση της αυτοφαγίας από την AMP κινάση η ενεργοποίηση της οποίας εξαρτάται από το Ca, ενώ απαιτεί την ενεργοποίηση αναρροϊκά της εξαρτώμενης από το Ca ή την καλμοντουλίνη κινάσης κινάσης β. Ρύθμιση της αυτοφαγίας όμως γίνεται και μέσω των καλπαϊνών. Πιο συγκεκριμένα φαίνεται ότι η πρωτεϊνη αυτή συνιστά ρυθμιστή της διαμόρφωσης του αυτοφαγοσώματος μέσω της ενδεχόμενης εμπλοκής της στη μεταφορά των μεμβρανών στο φαγοφόρο, στην αλληλεπίδραση με διάφορες φωσφατάσες επηρεάζοντας τα μονοπάτια Akt και JNK, αλλά και της αλληλεπίδρασης με διάφορες συνιστώσες του κυτταροσκελετού (**Demarchi et al., 2007**). Επίσης, τα βασικά επίπεδα της αυτοφαγίας ρυθμίζονται από τη διάσπαση της πρωτεϊνης ATG5 που εξαρτάται από την καλπαϊνη και τον βαθμό ενεργοποίησης αυτής από τα ιόντα Ca (**Xia et al., 2010**).

Τα μέχρι τώρα στοιχεία μιλούν για επαγωγή της αυτοφαγίας από τα ιόντα Ca στο κυτοσόλιο (**Høyer-Hansen et al., 2007; Wang et al., 2008; Grotemeier et al., 2010**), ή στο ΕΔ (**Gordon et al., 1993; Brady et al., 2007**), με την πιθανή εμπλοκή μονοπατιών εξαρτώμενων ή μη από τις AMPK και τις ERK κινάσες (**Høyer-Hansen et al., 2007; Wang et al., 2008; Grotemeier et al., 2010**). Θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι μια χαμηλής έντασης μεταφορά ιόντων από το ΕΔ στα μιτοχόνδρια είναι απαραίτητη για την αναστολή της αυτοφαγίας ενώ μία αύξηση στην κυτοσολική συγκέντρωση αυτών μπορεί να ενεργοποιήσει την αυτοφαγική διαδικασία (**Decuypere et al., 2011**).

Τέλος, τα ιόντα Ca ρυθμίζουν την ενεργότητα πολλών πρωτεϊνών με κρίσιμο ρόλο και στους τρεις τύπους κυτταρικού θανάτου, όπως είναι η **Πρωτεϊνική κινάση C (PKC) (Parker and Murray-Rust, 2004**), οι **Φωσφατάσες** που συμμετέχουν στα μονοπάτια της απόπτωσης (**Shibasaki and McKeon, 1995**), οι **καλπαϊνες** (**Neumar et al., 2003**), και οι **κασπάσες (Nakagawa et al., 2000).**

1.17.6 Ο ρόλος των λυσοσωμάτων και των ενώσεων ROS στον κυτταρικό θάνατο

Η ύπαρξη των ισχυρών λυτικών ενζύμων εντός των λυσοσωμάτων τα καθιστά ιδιαίτερα κρίσιμα για την κυτταρική επιβίωση (**Guicciardi et al., 2004**). Στην περίπτωση της μερικούς και επιλεκτικής διαπερατότητας της μεμβράνης τους επάγεται ο ελεγχόμενος αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος με την ενεργοποίηση συγκεκριμένων προ-αποπτωτικών παραγόντων (εικ. 1.14), ενώ η μαζική απελευθέρωση του λυσοσωμικού περιεχομένου στο κυτοσόλιο προκαλεί την ανεξέλεγκτη καταστροφή μορίων και άρα τη νέκρωση του κυττάρου (**Tardy et al., 2006; Boya and Kroemer, 2008; Yamashima and Oikawa 2009; Doyle et al., 2008; Golstein and Kroemer 2007; McCall, 2011**).

Αυξημένη διαπερατότητα της λυσοσωμικής μεμβράνης (lysosome membrane permeabilization-LMP) προκύπτει από μία πληθώρα ερεθισμάτων συμπεριλαμβανομένων των ενώσεων ROS (**Halliwell, 2000**), των πρωτεϊνών Bax (**Feldstein et al., 2006**), ενώ ρυθμίζεται και από άλλα μόρια όπως τις κασπάσες, τις καθεψίνες, αλλά και τις καλπαϊνες (**Boya and Kroemer, 2008**). Η διαφορά ανάμεσα στη μεταβολή της διαπερατότητας και τη ρήξη της μεμβράνης συνίσταται στο γεγονός ότι η πρώτη συμβαίνει χωρίς δομικές μεταβολές σε αντίθεση με τη δεύτερη (**Yamashima et al., 1996**).

Η επίδραση της ενεργοποιημένης από το Ca καλπαίνης στο επίπεδο της μεμβράνης καθίσταται δυνατή με τη συνεργατική δράση των ενώσεων ROS, και την επερχόμενη οξείδωση της πρωτείνης Hsp70, η οποία αποτελεί σημαντικό παράγοντα σταθεροποίησης της λυσοσωμικής μεμβράνης (**Nylandsted et al., 2004; Boya and Kroemer, 2008; Yamashima et al., 2009**). Το γεγονός που καθιστά τα οργανίδια αυτά ευάλωτα στη δράση των ROS αποτελεί η παρουσία και συσσώρευση μεγάλων ποσοτήτων Fe προερχομένου από την αποικοδόμηση συγκεκριμένων πρωτεϊνων, όπως της φερριτίνης. Παρουσία Fe ενεργοποιούνται οι αντιδράσεις Fenton που καταλήγουν στη σύνθεση δραστικών οξειδωτικών μορίων όπως της υδροξυλικής ρίζας, η οποία με τη σειρά της μπορεί να προκαλέσει βλάβη στη δομή της λυσοσωμικής μεμβράνης (**Boya and Kroemer, 2008**), γεγονός που σημαίνει ότι η συσσώρευση Fe στα λυσοσώματα αποτελεί καθοριστικό παράγοντα διατήρησης ή μη της σταθερότητας της μεμβράνης του οργανιδίου, κατά την έκθεση στο οξειδωτικό στρες (**Terman et al., 2006**).

Η απελευθέρωση των λυσοσωμικών πρωτεασών στο κυτοσόλιο μπορεί να επιφέρει τον κυτταρικό θάνατο καθώς ενδέχεται να καταλήξει στην αποικοδόμηση κρίσιμων για την κυτταρική επιβίωση πρωτεϊνών αλλά και στην ενεργοποίηση παραγόντων κυτταρικού θανάτου όπως των κασπασών. Η ενεργοποίηση των τελευταίων είναι δυνατή μέσω της πρωτεολυτικής ενεργοποίησης της πρωτεϊνης Bid, που επάγει την MMP, από τις καθεψίνες B και D (**Boya and Kroemer, 2008**). Επίσης, είναι πιθανό η σύνδεση ανάμεσα στη λυσοσωμική και μιτοχονδριακή μεμβρανική διαπερατότητα να σχετίζεται με την διέγερση της κασπάσης-2 από την καθεψίνη B (**Guicciardi et al., 2005; Yeung et al., 2006**). Η εκτεταμένη διαπερατότητα της λυσοσωμικής μεμβράνης μπορεί να καταλήξει και σε κυτταρικό θάνατο ανεξάρτητο των κασπασών όπως στην περίπτωση απελευθέρωσης του παράγοντα επαγωγής της απόπτωσης (AIF-apoptosis inducing factor) (**Modjtahedi et al., 2006**). Τέλος, πλην της φυσιολογικής εμπλοκής των λυσοσωμάτων στην αυτοφαγία, κατά την επαγωγή της νέκρωσης μέσω διαφόρων ερεθισμάτων, τα οποία αυξάνουν την ενδοκυτταρική συγκέντρωση των ιόντων Ca, ενισχύεται η αυτοφαγία μέσω της ενεργοποιημένης καλπαϊνης και συνεργάζεται με τις καθεψίνες εκτός των λυσοσωμάτων για τη διεξαγωγή του κυτταρικού θανάτου (**Kourtis and Tavernarakis, 2009**).

1.17.7 Ενώσεις ROS, οξειδωτικό στρες και κυτταρικός θάνατος.

Οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν μία ομάδα πολύ δραστικών μορίων που περιέχουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στιβάδα. Οι ελεύθερες ρίζες που προέρχονται από το μεταβολισμό του οξυγόνου καλούνται ενεργές ενώσεις οξυγόνου ROS (reactive oxygen species). Οι ενώσεις ROS περιλαμβάνουν το υπεροξειδικό ανιόν ($\cdot O_2-$), τις υδροξυλικές ρίζες ($\cdot OH$), το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) (**Desai et al., 2008**). Το H_2O_2 δεν ανήκει στις ελεύθερες ρίζες και είναι πιο ασθενής οξειδωτικός παράγοντας από το ανιόν $\cdot O_2$- ωστόσο, παρουσία μετάλλων όπως ο σίδηρος μπορεί να οξειδωθεί στην πολύ ενεργό και τοξική υδροξυλική ρίζα (**Droge, 2002**) μέσω της αντίδρασης Fenton. Στα κυτταρικά συστήματα οι ενώσεις ROS αδρανοποιούνται από τις αντιοξειδωτικές πρωτεϊνες όπως την υπεροξειδική δισμουτάση, την καταλάση, την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, τη θειορεδοξίνη κ.ά. Η σύνθεση των ενώσεων ROS πραγματοποιείται από ένα σύνολο αντιδράσεων, όπως κατά την αερόβια αναπνοή στα μιτοχόνδρια, και σε φυσιολογικές συνθήκες η συγκέντρωσή τους ελέγχεται από τη δράση των προναφερθέντων αντιοξειδωτικών ενζύμων. Είναι γνωστό ότι παραγωγή των ενώσεων αυτών επάγεται σε ορισμένες περιπτώσεις από τη δράση εξωγενών παραγόντων όπως η ιονίζουσα ακτινοβολία, οι αντιδράσεις φλεγμονής, αλλά και από ένα πλήθος χημειοθεραπευτικών φαρμάκων. Οξειδωτικό στρες εμφανίζεται στα κύτταρα όταν η ισορροπία ανάμεσα στην παραγωγή των ενώσεων ROS και την αντιοξειδωτική δραστηριότητα εξουδετέρωσης αυτών διαταράσσεται (**Desai et al., 2008**). Οι ενώσεις ROS παίζουν καθοριστικό ρόλο στην κυτταρική επιβίωση. Φυσιολογικά επίπεδα ενώσεων ROS λειτουργούν ως σήματα για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση, ενώ αντιθέτως υψηλά επίπεδα αυτών μπορούν να οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο (εικ. 1.20). Η διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης εξασφαλίζει τη φυσιολογική κυτταρική απόκριση απέναντι σε διάφορα ενδογενή και εξωγενή ερεθίσματα, ενώ σε περίπτωση απώλειας αυτής το οξειδωτικό στρες μέσα από ένα σύνολο μηχανισμών μπορεί να γίνει η αιτία του κυτταρικού θανάτου καθώς και της εμφάνισης καρκίνου, νευροεκφυλιστικών ασθενειών αλλά και γήρανσης (**Trachootham et al., 2008; Valko et al., 2007).** Οι ROS εμφανίζουν υψηλή ενεργότητα οξειδώνοντας με αντιστρεπτό τρόπο τα διάφορα μόρια, ωστόσο υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες προσβάλλουν λιπίδια, πρωτεΐνες αλλά και το DNA καταλήγοντας πολλές φορές σε μία σοβαρή και μη αντιστρεπτή οξειδωτική βλάβη (**Trachootham et al., 2008**).

Τα λιπίδια φαίνεται να είναι τα περισσότερο ευαίσθητα απέναντι στη δράση των ελευθέρων ριζών και των ενώσεων ROS. Το υπεροξειδικό ανιόν καθώς και η υδροξυλική ρίζα συνήθως προκαλούν την έναρξη της αυτοκαταλυόμενης λιπιδικής υπεροξείδωσης (**Halliwell and Gutteridge, 1999**), το αποτέλεσμα της οποίας είναι η μετατροπή των ακόρεστων λιπαρών οξέων σε πολωμένα λιπιδικά υπεροξείδια που μπορούν να αυξήσουν τη ρευστότητα της μεμβράνης, την εκροή μορίων αλλά και να οδηγήσουν στην απώλεια ενεργότητας των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών. Η εκτεταμένη υπεροξείδωση έχει συσχετιστεί όμως και με την απώλεια της ακεραιότητας της μεμβράνης, καθώς και με τον κυτταρικό θάνατο, χωρίς όμως να έχει διευκρινιστεί κατά πόσο αποτελεί την αιτία ή το αποτέλεσμα αυτού (**Avery, 2011**).

Το DNA φαίνεται να είναι λιγότερο ευαίσθητο απέναντι στη δράση των ενώσεων αυτών λόγω της δομής της διπλής του έλικας αλλά και της προστατευτικής δράσης των ιστονών. Ωστόσο, όταν εμφανίζεται οξειδωτική βλάβη του DNA είναι πολύ πιθανό να οδηγήσει σε καρκινογένεση, με όλες του τις βάσεις αλλά και τους γλυκοζιτικούς δεσμούς να αποτελούν στόχο της υδροξυλικής ρίζας (**Trachootham et al., 2008; Tsuzuki et al., 2007**). Το DNA είναι επίσης ευάλωτο στην οξείδωση που καταλύεται από σίδηρο, καθώς αυτός δεσμεύεται απευθείας στους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς όπου δημιουργούνται οι υδροξυλικές ελεύθερες ρίζες (**Macomber et al., 2007**). Η οξειδωτική βλάβη του γενετικού υλικού δεν θεωρείται στις περισσότερες περιπτώσεις η κύρια αιτία του επαγόμενου από τις ενώσεις ROS κυτταρικού θανάτου, πράγμα που σημαίνει ότι το DNA δεν αποτελεί έναν από τους πρωταρχικούς στόχους των ενώσεων, καθώς καθοριστικό ρόλο σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να παίξει η προσβολή πρωτεϊνών που απαιτούνται για την ακεραιότητα αυτού (**Thorpe et al., 2004**). Συγκριτικά, το μιτοχονδριακό DNA ελλείψει μηχανισμών επιδιόρθωσης αλλά και λόγω τοπολογίας παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία (**Inoue et al., 2003**).

Ορισμένες πρωτεΐνες είναι περισσότερο ευάλωτες στη δράση των ενώσεων ROS, φαινόμενο που εξαρτάται από την περιεκτικότητα αυτών σε αμινοξικά κατάλοιπα που είναι οξειδωτικά ευαίσθητα, την παρουσία θέσεων δέσμευσης μετάλλων, την τοπολογία των πρωτεϊνών, τη μοριακή διαμόρφωση αλλά και το ρυθμό αποικοδόμησης. Τα νεοσυντιθέμενα πρωτεϊνικά μόρια είναι πιο ευαίσθητα καθώς η ολοκληρωμένη αναδίπλωση αλλά και η συμμετοχή σε συμπλέγματα προσφέρει προστασία από την οξειδωτική βλάβη (**Medicherla and Goldberg, 2008; Trachootham et al., 2008**). Η οξείδωση των πρωτεϊνών μπορεί να είναι αντιστρεπτή ή μόνιμη. Η πολύ δραστική υδροξυλική ρίζα που παράγεται μέσω της αντίδρασης Fenton στοχεύει κυρίως τις πρωτεΐνες, με ορισμένα αμινοξικά κατάλοιπα όπως μεθειονίνη, λυσίνη, αργινίνη, ιστιδίνη, προλίνη, θρεονίνη, κυστεΐνη, δίνοντας τελικά προϊόντα καρβονυλίωσης, τα οποία αποτελούν και δείκτη της έκτασης του οξειδωτικού στρες (**Valko et al., 2006**). Πλην όμως της άμεσης επίδρασης των ριζών στους πρωτεϊνικούς στόχους, η οξειδοαναγωγική ισορροπία παίζει καταλυτικό ρόλο στην πρωτεϊνική λειτουργία μέσω ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, της μεταμεταφραστικής τροποποίησης αλλά και της σταθερότητας των μορίων.

Οι ROS είναι δυνατόν να συμμετάσχουν στο μονοπάτι μεταφοράς ιόντων μέσω της αλληλεπίδρασής τους με 1) ιοντικά κανάλια, π.χ. κανάλια Ca^{+2}, K^+, Na^+, Cl^-, 2) την Na^{+-} K^+ ATPάση και H^+ ATPάση, 3) ιοντοανταλλάκτες όπως Na^+/Ca^{2+} και Na^+/H^+, 4) συμμεταφορείς K^+-Cl^-, Na^+-K^+-Cl^-, και P_i-Na^+. Όσον αφορά στο μηχανισμό που ευθύνεται για την εμπλοκή των ROS στο μονοπάτι της ιοντικής μεταφοράς περιλαμβάνει 1) την οξείδωση των σουλφιδριλικών ομάδων των εμπλεκομένων πρωτεϊνών, 2) την υπεροξείδωση των μεμβρανικών φωσφολιπιδίων, 3) την αναστολή των πρωτεϊνών που δεσμεύονται σε ρυθμιστικά ένζυμα, τη διαμόρφωση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και τα επίπεδα ATP. Οι μεταβολές στους μηχανισμούς μεταφοράς ιόντων οδηγούν σε αλλαγές της ομοιόστασης του Ca^{+2}, με τελικό αποτέλεσμα την κυτταρική δυσλειτουργία (**Kourie, 1998; Giordano et al., 2005; Feissner et al., 2009**).

Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά στην εμπλοκή του οξειδωτικού στρες στην επαγωγή της απόπτωσης, οι ενώσεις ROS μαζί με τα υψηλά επίπεδα ενδομιτοχονδριακού Ca αποτελούν τους κυριότερους ενεργοποιητές διάνοιξης των μιτοχονδριακών πόρων PTP και άρα προώθησης της μιτοχονδριακής διαπερατότητας MMP (εικ. 1.20) (**Kroemer et. al., 2007; Lemasters et al., 2009; Halestrap, 2010).** Οι παράγοντες αυτοί δρουν συνεργατικά καθώς σε περιπτώσεις οξειδωτικού στρες όπου απαιτούνται χαμηλότερα επίπεδα Ca για το άνοιγμα των πόρων, ενώ μελέτες αναφέρουν ότι η οξείδωση των σουλφιδριλικών ομάδων στην κυκλοφιλίνη D ή στην πρωτεΐνη ANT (**Vieira et al., 2001**) ενισχύει την επαγόμενη από τα ιόντα Ca αύξηση διαπερατότητας MPT. Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση σχετικά με τον προσδιορισμό των καταλοίπων που υφίστανται οξείδωση με αποτέλεσμα να αυξάνουν ή να μειώνουν την ευαισθησία διάνοιξης των πόρων (**Toman and Fiskun, 2011**). Επιπλέον όμως και όπως έχει ήδη αναφερθεί βασικό ρόλο στην ενισχυμένη διαπερατότητα και παραπέρα απελευθέρωση προ-αποπτωτικών παραγόντων παίζει και η οξείδωση λιπιδίων της μιτοχονδριακής μεμβράνης (**Vieira and Kroemer, 2003; Kroemer et al., 2007**). Η οξείδωση συγκεκριμένων πρωτεϊνικών μορίων μπορεί να συμβάλλει πολλές φορές στην ενίσχυση των γεγονότων του αποπτωτικού καταρράκτη (**Marnett et al., 2003**). Παραδείγματα των τελευταίων αποτελούν οι κασπάσες, οι πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2, καθώς και το κυτόχρωμα c, μόρια που παρουσιάζουν οξειδωτική ευαισθησία (**Trachootham et al., 2008**), αλλά και πρωτεΐνες που σχετίζονται με τις διαδικασίες σύντηξης και σχάσης όπως οι Drp1 και Mfn2 (**Wu et al., 2011**). Χαρακτηριστική όμως είναι η δράση των ενώσεων και στην πρωτεΐνη p53, η οποία ελέγχει την τύχη του κυττάρου μέσα από ένα σύνολο μηχανισμών που εξαρτάται από το βαθμό του στρες. (**Trachootham et al., 2008**).

Πολλές μελέτες σημειώνουν το ρόλο των ενώσεων ROS αναρροϊκά της αυτοφαγίας (**Dewaele et al., 2010**), καθώς παρουσία των ενώσεων ROS σημειώνεται αυξημένη συγκέντρωση αυτοφαγοσωμάτων σε διαφόρους κυτταρικούς τύπους (**Chen et al., 2008; Zhang et al., 2009).**

Χαρακτηριστική είναι και η αλληλεπίδραση των ROS με τα διάφορα μονοπάτια επιβίωσης και κυτταρικού θανάτου που συμμετέχουν οι MAPK κινάσες (Mitogen Activated Protein Kinase) μέσω τριών μονοπατιών: (1) ERKs (Extracellular signal-regulated kinases), (2) JNKs (c-Jun N-Terminal Kinases) και (3) p38-MAPKs. Το μονοπάτι των ERKs έχει συσχετισθεί κατά κύριο λόγο με την επιβίωση σε συνθήκες ηπίου στρες, ενώ τα μονοπάτια JNK και p38-MAPK που ανήκουν στις SAPK κινάσες με τον κυτταρικό θάνατο σε συνθήκες σοβαρού οξειδωτικού στρες (**Clerk, 2003; Takano et al., 2003; Matsuzawa and Ichijo, 2005).**

1.18 Μεταβολή της ομοιόστασης του Ca, παραγωγή ενώσεων ROS και η μεταξύ τους "συνομιλία"

Αρκετές μελέτες υποστηρίζουν την άποψη ότι η αύξηση της συγκέντρωσης ιόντων Ca ενεργοποιεί την παραγωγή ενώσεων ROS στα μιτοχόνδρια (**Hansson et al., 2008; Kowaltowski et al., 1995; 2009; Castilho et al., 1995; Irigoin et al., 2009; Adam-Vizi and Starkov 2010**). Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι η άποψη αυτή καταρρίπτεται από άλλες έρευνες που καταδεικνύουν το αντίθετο (**Gyulkhandanyan et al., 2004; Starkov et al., 2002),** αλλά και από αυτές που δεν έχουν βρει κάποια συσχέτιση μεταξύ των δύο (**Panov et al., 2007; Schonfeld et al., 2007**). Σημειώνεται ότι, η διαφορική επίδραση του ασβεστίου στην εξεταζόμενη διαδικασία εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη διαθεσιμότητα των υποστρωμάτων της αναπνευστικής αλυσίδας στα απομονωμένα μιτοχόνδρια των διαφόρων πειραματικών μελετών. Ανάμεσα στους βασικούς παράγοντες που παίζουν ρόλο στην ενδεχόμενη επίδραση των ιόντων Ca στο οξειδωτικό στρες μέσω της παραγωγής ενώσεων ROS, θα πρέπει να συμπεριληφθούν, α) η μεταβολική κατάσταση των μιτοχονδρίων, πριν και κατά τη διάρκεια πρόσληψης του Ca, καθώς η κατάσταση αυτή καθορίζει την εξάρτηση της παραγωγής των ROS από το δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης ΔΨm, το οποίο επηρεάζεται από την συγκέντρωση των ιόντων Ca και β) η ενδεχόμενη μεταβολή διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης των πόρων PTP από τα ιόντα Ca, καθώς η γενικά αποδεκτή διαπίστωση, χωρίς όμως να έχει διευκρινιστεί ο ακριβής μηχανισμός, είναι το εξαρτώμενο και επαγόμενο από το Ca άνοιγμα των πόρων PTP της μιτοχονδριακής μεμβράνης (**Adam-Vizi and Starkov, 2010**).

Παράλληλα όμως με τη διάνοιξη των πόρων PTP, έχουν καταγραφεί και άλλες μεταβολές της μιτοχονδριακής μηχανής λόγω της μεταβολής ομοιόστασης των ιόντων Ca υπεύθυνες για τη μεταβολική ανεπάρκεια των μιτοχονδρίων ενισχύοντας την παραγωγή των ενώσεων ROS. Τέτοια παραδείγματα αποτελούν η αναστολή των μιτοχονδριακών ενζύμων (π.χ. δεϋδρογενάσες του κύκλου του Krebs), της διαδικασίας της αναπνοής και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης λόγω των υψηλών ιοντικών συγκεντρώσεων Ca (**Lai et al., 1988; Roman et al., 1981**). Όλα τα προαναφερθέντα γεγονότα μπορούν να αναστείλλουν την ικανότητα των μιτοχονδρίων να απομακρύνουν τις ενώσεις ROS, είτε να προωθήσουν την παραγωγή τους (**Andreyev et al., 2005; Starkov, 2008**).

Όμως οι ενώσεις ROS με τη σειρά τους αλληλεπιδρούν και με ιοντικά κανάλια, όπως προαναφέρθηκε, και άρα είναι ικανές να αυξήσουν υπό ορισμένες συνθήκες την ενδοκυτταρική συγκέντρωση των συγκεκριμένων ιόντων.

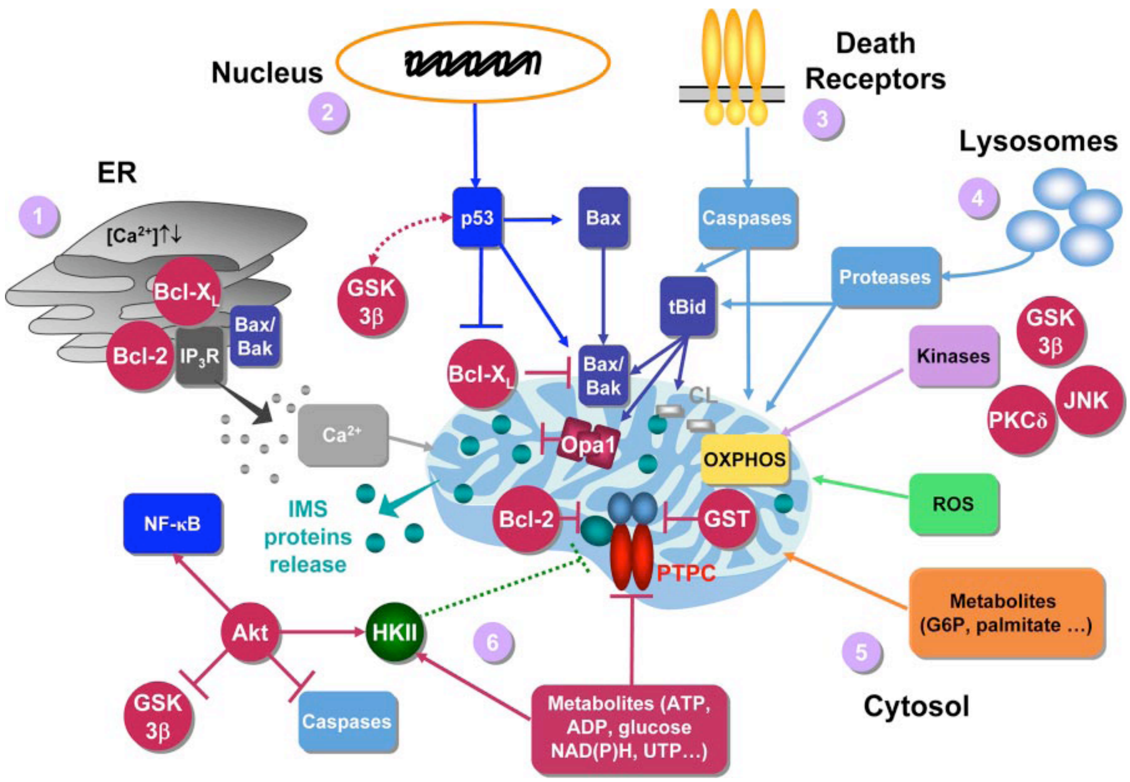
1.19 "Συνομιλία" αυτοφαγίας και απόπτωσης

Η ρύθμιση των δύο διαδικασιών, αυτοφαγίας και απόπτωσης, είναι αναμενόμενο να θεωρείται μία συντονισμένη δράση, καθώς η αυτοφαγία μπορεί να αναστείλλει την απόπτωση, αλλά παράλληλα και οι δύο μπορούν να οδηγήσουν τα κύτταρα σε θάνατο. Έκπληξη ωστόσο αποτέλεσαν ενδείξεις όσον αφορά τη ρύθμιση και των δύο διαδικασιών από κοινά πρωτεϊνικά μόρια, όπως φαίνεται να συμβαίνει στις περισσότερες περιπτώσεις. Ρύθμιση μπορεί να γίνει αναρροϊκά τόσο της αυτοφαγικής όσο και της αποπτωτικής μηχανής με σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν και τις δύο διαδικασίες. Για παράδειγμα η p53 που είναι επαγωγέας της απόπτωσης μπορεί να ενισχύσει και την αυτοφαγία μέσω της αυξημένης έκφρασης του γονιδίου στόχου της p53 του DRAM (**Crighton et al., 2006**). Παρομοίως η ενεργοποίηση του PI3 kinase/Akt μονοπατιού που είναι γνωστό ως μονοπάτι επιβίωσης και άρα αναστολής της απόπτωσης μπορεί να αναστείλλει και την αυτοφαγία (**Arico et al., 2001**).

Χαρακτηριστική είναι και η δράση των πρωτεϊνών Beclin-1/Atg6 που αποτελούν μέρος του συμπλόκου PI3 κινάσης τύπου III που απαιτείται για τη διαμόρφωση των αυτοφαγικών κυστιδίων με την πρωτεϊνη Beclin-1 να αλληλεπιδρά και με την Bcl-2 (**Liang et al., 1999**), γεγονός που αποκαλύπτει τη συσχέτιση ενός κρίσιμου ρυθμιστή της απόπτωσης με έναν εξίσου σημαντικό ρυθμιστή της αυτοφαγίας (**Pattingre et al., 2005)**.

Επιπλέον, οι αυτοφαγικές πρωτείνες Atg συμμετέχουν στη διαδικασία της απόπτωσης, σε συνεργασία με τις καλπαϊνες ή τις κασπάσες. Σε συνθήκες επαγωγής της απόπτωσης, η Atg5 διασπάται από τις καλπαίνες, παρέχοντας ένα προϊόν, η υπερέκφραση του οποίου επάγει την απόπτωση και όχι την αυτοφαγία (**Yousefi et al., 2006).** Επίσης, η κασπάση-3 διασπά την Atg4, δίνοντας ένα προϊόν που προωθεί την αυτοφαγία ανεξαρτήτως της απόπτωσης (**Betin and Lane, 2009**). Επιπλέον, οι κασπάσες διασπούν την Beclin-1 κατά την απόπτωση οδηγώντας στην αναστολή της αυτοφαγίας (**Wirawan et al., 2010**), ενώ χαρακτηριστική είναι και η έκφραση της κασπάσης-9 που διαμεσολαβείται από την έκφραση της Beclin-1 στα κύτταρα των θηλαστικών (**Wang et al., 2007b**).

Τέλος, ένας άλλος μηχανισμός με τον οποίο η Bcl-2 στο ΕΔ μπορεί να επηρεάσει την αυτοφαγία σχετίζεται με τη παρεμπόδιση απελευθέρωσης των ιόντων Ca από το ΕΔ (**Hoyer-Hansen et al., 2007**).



Εικόνα 1.14. Τα μιτοχόνδρια αντιπροσωπεύουν το κρίσιμο σημείο ελέγχου της απόπτωσης, όπου σήματα θανάτου και επιβίωσης από διάφορα σημεία του κυττάρου αλλά και από το εξωκυτταρικό περιβάλλον συγκλίνουν και συμμετέχουν στην απόφαση για την τύχη του κυττάρου. 1) Προ-αποπτωτικά μέλη των Bcl-2 πρωτεϊνών ασκούν τη δράση τους όχι μόνο στα μιτοχόνδρια αλλά και στο ΕΔ (ER), όπου έχει βρεθεί ότι ρυθμίζουν τα επίπεδα των ιόντων Ca. Το ποσό του Ca που είναι διαθέσιμο για απελευθέρωση κατά την ενεργοποίηση του υποδοχέα IP3 καθορίζει την απόκριση των μιτοχονδρίων στα ιόντα, που μπορεί να κυμαίνεται από τη μεταβολική δραστηριότητα μέχρι την διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης, την έκκριση πρωτεϊνών του μεσομεμβρανικού χώρου IMS (IMS proteins release) αλλά και την απόπτωση. 2) Η πρωτεϊνη p53 ελέγχει μέρος της απόκρισης των κυττάρων των θηλαστικών σε περιπτώσεις βλάβης του DNA του πυρήνα (nucleus), μέσω μεταγραφικών ή μη μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένης και της αλληλεπίδρασης της πρωτεϊνης με τα μέλη Bax, Bak, Bcl-2, Bcl-XL της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Σημειώνεται ότι η ενεργότητα της p53 ενδεχομένως προωθείται από την πρόσδεση της κινάσης της συνθετάσης του γλυκογόνου 3β (GSK-3β). 3) Υποδοχείς θανάτου (death receptors) μεταδίδουν τα προ-αποπτωτικά ερεθίσματα από το εξωκυτταρικό περιβάλλον μέσω της εξωγενούς οδού, στην ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών. Το εξωγενές μονοπάτι συνδέεται με τα μιτοχόνδρια μέσω της κασπάσης 8, η οποία παρεμβάλλεται στην πρωτεολυτική ωρίμανση της Bid. Το μόριο που προκύπτει (tBid) συμβάλλει στην MMP προωθώντας τη διαμόρφωση πόρων από τις Bax και Bak, την αποδόμηση των ολιγομερών της Opa1 αλλά και μέσω της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας από τις αλληλεπιδράσεις με την καρδιολιπίνη της IM. 4) Όταν οι μεμβράνες των λυσοσωμάτων (lysosomes) διαρρηγνύονται, οι καθεψίνες και άλλες υδρολάσες απελευθερώνονται στο κυτοσόλιο όπου προάγουν την απόπτωση ή τη νέκρωση. Ορισμένες καθεψίνες-πρωτεάσες (proteases) είναι ικανές να ενεργοποιήσουν την Bid, αλλά και να παρεμποδίσουν τη μιτοχονδριακή λειτουργία με τη διάσπαση υπομονάδων των συμπλεγμάτων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS), προωθώντας την παραγωγή των ενώσεων ROS. Το ίδιο έχει προταθεί για την κασπάση-3, η οποία μπορεί να εισέλθει στον χώρο IMS κατά την περιορισμένη διαπερατότητα της OM και να συμμετάσχει στα πολλαπλασιαστικά φαινόμενα για την MMP. 5) Ερεθίσματα φθάνουν και από το κυτοσόλιο με στόχο την αύξηση της MMP. Μερικά από αυτά είναι οι ενώσεις ROS, διάφοροι μεταβολίτες (metabolites) όπως γλυκόζη (glucose), αλλά και

ενεργές κινάσες (kinases) π.χ. GSK-3β, PKC, JNK κλπ. 6) Από την άλλη πλευρά, πολλοί ενδογενείς παράγοντες παρεμποδίζουν τη διαπερατότητα του συμπλόκου των πόρων PTP προστατεύοντας τα μιτοχόνδρια από την MMP. Παράδειγμα αποτελούν οι μεταβολίτες όπως το NAD(P)H και το UTP, οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2, αντιοξειδωτικά ένζυμα όπως τρανσφεράση της γλουταθειόνης, κινάσες που προωθούν την κυτταρική επιβίωση όπως η Akt. Η τελευταία μπορεί να αναστείλλει την απόπτωση μέσω πολλαπλών μονοπατιών όπως μέσω της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NFκB, την αναστολή των κασπασών και της κινάσης GSK-3β και της κινάσης HKII (hexokinase II) (Kroemer et al., 2007).

1.20 Ο κυτταρικός θάνατος κατά τη διαδικασία ωογένεσης του εντόμου

1.20.1 Οι κασπάσες στη διαδικασία ωογένεσης

Όπως θα αναλυθεί στη συνέχεια, ο κυτταρικός θάνατος κατά την ωογένεση του εντόμου εμφανίζει διαφορετική ρύθμιση σε σύγκριση με τους υπολοίπους ιστούς του εντόμου, χωρίς δηλαδή τη συμμετοχή των γονιδίων reaper (rpr), head (hid), grim και sickle (skl), που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που δεσμεύονται και παρεμποδίζουν τη δράση των αναστολέων της απόπτωσης DIAPs (*Drosophila* inhibitors of apoptosis), σημαντικών ρυθμιστών της ενεργότητας των κασπασών (**Hay and Guo, 2006; Steller, 2008; Pritchett et al., 2009**).

Οι κασπάσες της *Drosophila* περιλαμβάνουν τρεις εναρκτήριες: την Dronc (*Drosophila* Nedd-2-like caspase), Dredd (Death-related ced-3/Nedd2-like) και Strica, και τέσσερις τελεστές: την Dcp-1 (death caspase-1), Drice (*Drosophila* ice), Damm και Decay (**Hay and Guo, 2006**). Μεταλλαγές έχουν αναφερθεί στην Dronc, Dredd, Decay, Dcp-1 και Drice (**Baum et. al., 2007**). Η κασπάση Dcp-1 είναι απαραίτητη για τον κυτταρικό θάνατο των τροφοκυττάρων που παρατηρείται κατά τη μέση ωογένεση (**Laundrie et al., 2003**). Οι κασπάσες, σε αρκετές περιπτώσεις, αντικαθιστούν η μία τη λειτουργία της άλλης. Είναι χαρακτηριστικό ότι σε συνθήκες έλλειψης τροφής μεταλλαγμένα στελέχη dcp-1 φέρουν ωοθυλάκια σταδίου 7-8 με μη συμπυκνωμένους τροφοκυτταρικούς πυρήνες και με τα θυλακοκύτταρα να έχουν υποστεί κυτταρικό θάνατο ανεξάρτητα από τα τροφοκύτταρα (**Laundrie et al., 2003; Mazzalupo et al., 2006**). Επίσης, υπερέκφραση του αναστολέα diap1 έχει ως αποτέλεσμα ανωμαλίες στη μέση ωογένεση αντίστοιχες των μεταλλαγμένων στελεχών dcp-1 (**Peterson et al., 2003; Mazzalupo and Cooley, 2006**) υποστηρίζοντας την απαίτηση σε κασπάσες κατά τον κυτταρικό θάνατο στη μέση ωογένεση (**Baum et al., 2007**). Όπως έχει βρεθεί, τα μεταλλαγμένα στελέχη dronc και dredd δεν επηρεάζουν τον ΠΚΘ ούτε στη μέση ούτε στην όψιμη ωογένεση. Περαιτέρω διερεύνηση της τρίτης εναρκτήριας κασπάσης, Strica, έδειξε ότι μικρές ελλείψεις οδήγησαν σε περιορισμένο αριθμό ανωμαλιών κατά την ωογένεση, ενώ έλλειψη ολόκληρου του γονιδίου είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ενός μικρού μόνο αριθμού ανωμάλων ωοθυλακίων. Διπλά μεταλλαγμένα στελέχη σε strica και dronc επέδειξαν μία υψηλή συχνότητα ανωμάλων ωοθυλακίων τόσο στη μέση όσο και στην όψιμη ωογένεση. Οι κασπάσες Dcp-1 και Drice δρουν συνεργατικά κατά την όψιμη ωογένεση, που σημαίνει ότι ελλείψει της μίας κασπάσης η δράση της αντικαθίσταται από την άλλη. Συνεπώς, κατά τον αναπτυξιακό ΠΚΘ των τροφοκυττάρων στην ωογένεση οι κασπάσες Strica, Dronc, Dcp-1 και Drice χαρακτηρίζονται από πλεονασμό με το πλεονέκτημα να υποκαθιστούν η μία τη λειτουργία της άλλης σε περίπτωση απώλειας (**Baum et al., 2007**). Μερική έλλειψη στα μεταλλαγμένα στελέχη strica έχει ως αποτέλεσμα ανώμαλα ωοθυλάκια κατά τη μέση ωογένεση, που χαρακτηρίζονται από απόντα ή εκφυλισμένα θυλακοκύτταρα και άθικτα τροφοκύτταρα αντίστοιχα με αυτά που προκύπτουν από τα μεταλλαγμένα στελέχη dcp-1 (**Laundrie et al., 2003**). Εναλλακτικά, η όψιμη ωογένεση (**Baum et al., 2007**).

Οι κασπάσες απαιτούνται για τον σποραδικό/επαγόμενο κυτταρικό θάνατο της μέσης ωογένεσης, ενώ έχουν μία μερική συμμετοχή στον ΠΚΘ της όψιμης ωογένεσης, η οποία ελέγχεται τόσο από αποπτωτικούς όσο και από μη αποπτωτικούς μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου. Κατά τη μέση ωογένεση, η Dronc και Strica και ενδεχομένως και κάποιος άλλος παράγοντας δρουν πλεοναστικά ενεργοποιώντας την κασπάση τελεστή Dcp-1 (**Baum et al., 2007**).

1.20.2 Προγραμματισμένος Κυτταρικός Θάνατος των τροφοκυττάρων κατά την όψιμη ωογένεση

Στα τελευταία στάδια της ωογένεσης τα τροφοκύτταρα μεταφέρουν το κυτταροπλασματικό τους περιεχόμενο στο ωοκύτταρο μέσω κυτταροπλασματικών γεφυρών, που ονομάζονται δακτυλιοειδή κανάλια, σε μια διαδικασία που καλείται άδειασμα του κυτταροπλάσματος (dumping) (**Spradling, 1993**). Αποτέλεσμα αυτής της μεταφοράς είναι ο διπλασιασμός στον όγκο του ωοκυττάρου. Κατά το dumping συμβαίνουν δραστικές κυτταροπλασματικές αλλαγές, συμπεριλαμβανομένης της διαμόρφωσης δεσμών ακτίνης (actin bundles) που εκτείνονται από την πλασματική μεμβράνη μέχρι τον πυρηνικό φάκελο των τροφοκυττάρων όπως θα αναλυθεί στη συνέχεια (**Okada et al., 1959; Gutzeit et al., 1986; Nezis et al., 2001; 2002**). Μετά το άδειασμα του κυτ/τος οι τροφοκυτταρικοί πυρήνες και τα άλλα υπολείμματα απομακρύνονται με τη βοήθεια κυτταρικού θανάτου (**Νέζης, 2002**). Η αποδόμηση των τροφοκυτταρικών πυρήνων ξεκινά σχεδόν ταυτόχρονα με τη διαδικασία dumping (Cooley et al., 1992), χωρίς να είναι γνωστό εάν οι μεταβολές στον κυτταροσκελετό που συνοδεύουν αυτή τη λειτουργία ελέγχονται από τον ίδιο μηχανισμό.

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (ΠΚΘ) των τροφοκυττάρων, που παρατηρείται μετά τη διαδικασία του dumping κατά τα τελευταία στάδια της ωογένεσης, χαρακτηρίζεται από την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Πιο συγκεκριμένα, η διαδικασία ξεκινά στο αναπτυξιακό στάδιο 11, κατά το οποίο ο πυρηνικός τους φάκελος καθίσταται διαπερατός με τις δέσμες ακτίνης να κάνουν την εμφάνισή τους (εικ. 1.15G). Η κυτταροπλασματική μεταφορά καθοδηγείται από τις συσπάσεις των συμπλόκων ακτίνης-μυοσίνης των κυττάρων (**Robinson and Cooley 1997**), ενώ οι δύο πληθυσμοί ακτίνης που ευθύνονται για τη διαδικασία του dumping είναι: 1) η υποφλοιώδης ακτίνη, που εντοπίζεται και στους τρεις κυτταρικούς τύπους των ωοθυλακίων καθ'όλη τη διάρκεια της ωογένεσης, και 2) το δίκτυο των ινιδίων ακτίνης με τη διαμόρφωση των κυτταροπλασματικών δεσμών πέριξ των τροφοκυτταρικών πυρήνων. Στο στάδιο 12, οι δέσμες ακτίνης γίνονται μεγαλύτερες σε πάχος ενώ κάποιοι πυρήνες εμφανίζουν θετικό σήμα μετά από χρώση με πορτοκαλί της ακριδίνης, που ανιχνεύει αποδόμηση του DNA, και παρουσιάζουν κάποιες μορφολογικές μεταβολές, όπως λοβούς και εγκολπώσεις. Στο στάδιο 12C οι μισοί τροφοκυτταρικοί πυρήνες παρουσιάζουν συμπυκνωμένη χρωματίνη ενώ οι υπόλοιποι φαίνονται φυσιολογικοί. Στο ίδιο αναπτυξιακό στάδιο ένας μικρός αριθμός πυρήνων εμφανίζει αποδομημένο DNA με την τεχνική TUNEL. Κατά το στάδιο 13, όλοι οι πυρήνες παρουσιάζουν έντονα συμπυκνωμένη χρωματίνη μετά από χρώση με ιωδιούχο προπίδιο, και όλοι περιέχουν αποδομημένο DNA (εικ. 1.15C). Οι δέσμες των ινιδίων ακτίνης έχουν γίνει παχύτερες και εκτείνονται από τη μία άκρη των τροφοκυττάρων στην άλλη. Κατά τη διάρκεια του σταδίου 13 έχει αρχίσει και ο σχηματισμός των αποπτωτικών σωματίων των τροφοκυττάρων (**Νέζης, 2002**). Τα σωμάτια αυτά περιέχουν πυρηνικά κυρίως κατάλοιπα των τροφοκυττάρων με απλή ή πολλαπλή μεμβράνη. Στο τέλος του σταδίου 13, τα σωμάτια φαγοκυτταρώνονται από τα γειτονικά τους θυλακοκύτταρα, με τα τελευταία να εκτείνουν προεκβολές που εγκολπώνουν τα σωμάτια, ενώ τα κατάλοιπα των αποπτωτικών σωματίων λύονται μέσα στα φαγοσώματα των θυλακοκυττάρων μέχρι το τέλος του σταδίου 14 (**McCall and Steller, 1998; Foley and Cooley, 1998; Νέζης, 2002; Nezis et al., 2001; 2002**).

Μεταλλαγμένα στελέχη στα γονίδια chickadee, quail, και singed, έχουν ως αποτέλεσμα τη στειρότητα των εντόμων, καθώς δεν είναι ικανά να συγκροτήσουν τις κυτταροπλασματικές δέσμες της ακτίνης. Το γονίδιο chickadee, κωδικοποιεί την προφιλίνη (profilin) που συνδέεται με τα μονομερή της ακτίνης και παίζει ρόλο στον πολυμερισμό τους (**Theriot and Mitchison, 1993**). Το γονίδιο quail κωδικοποιεί μία πρωτεϊνη που παρουσιάζει ομοιότητες με τη βιλλίνη (villin) (**Mahajan-Miklos and Cooley, 1994**), η οποία συνδέεται με την ακτίνη, διαδικασία εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση των ιόντων Ca (**Friederich et al, 1990**), ενώ το γονίδιο singed κωδικοποιεί την φασίνη (fascin), πρωτεΪνη που συνδέεται στα μονομερή της ακτίνης (**Paterson and O'Hare 1991, Bryan et al., 1993**).

Ο μηχανισμός κυτταρικού θανάτου απομάκρυνσης των τροφοκυττάρων, πρέπει να σημειωθεί ότι διαφέρει από τους μηχανισμούς τυπικού κυτταρικού θανάτου στους υπόλοιπους ιστούς του εντόμου, καθώς όπως θα δούμε και στην περίπτωση της μέσης ωογένεσης, οι πρωτεϊνες που συνδέονται στους αναστολείς IAP (reaper, hid, grim) δεν απαιτούνται για τη διεξαγωγή αυτού του θανάτου (**Peterson et al., 2007, Foley and Cooley, 1998**). Ο ΠΚΘ φαίνεται επίσης να έχει μία ελάχιστη απαίτηση ενεργοποίησης κασπασών όπως προαναφέρθηκε, ενώ είναι δυνατόν και άλλοι μηχανισμοί κυτταρικού θανάτουν να δρουν σε συνδυασμό με την απόπτωση είτε την αντικαθιστούν όταν αυτή καταστέλλεται (**Baum et al., 2007**). Πρόσφατα σχετικά δεδομένα κάνουν λόγο για την ύπαρξη πρωταρχικών χαρακτηριστικών αυτοφαγίας και απόπτωσης και εν συνεχεία νέκρωσης. Στενή σύνδεση φαίνεται επίσης να υπάρχει ανάμεσα στις διαδικασίες αυτοφαγίας και απόπτωσης κατά τα στάδια αυτά, καθώς η αποικοδόμηση ενός αναστολέα της απόπτωσης dBruce λόγω της αυτοφαγίας ελέγχει την αποδόμηση του DNA και ενεργοποιεί τον κυτταρικό θάνατο χωρίς όμως να επηρεάζει τη συμπύκνωση της πυρηνικής χρωματίνης (**Nezis et al., 2010**). Επιπροσθέτως, σημαντικά υπήρξαν τα συμπεράσματα μελέτης σχετικά με τη δράση της DNAάσης II ως προς την ολοκλήρωση της αποδόμησης του DNA κατά τον κυτταρικό θάνατο των τροφοκυττάρων, παράλληλα με τη διαπίστωση των ιδιαιτέρων χαρακτηριστικών που έχουν τα κύτταρα αυτά (**Bass et. al., 2009**). Μεταλλαγές στο γονίδιο Atg1 περιόρισαν μερικώς το φαινότυπο του κυτταρικού θανάτου, ενώ αντιθέτως διαπιστώθηκε η ύπαρξη χαρακτηριστικών προγραμματισμένης νέκρωσης, όπως έκκριση ιόντων Ca, απώλεια ATP, καθώς και συσσωματώματα λυσοσωμάτων πέριξ των πυρήνων (**Bass et al., 2009**).

Ωστόσο, παραμένουν ακόμη άγνωστοι αρκετοί παράγοντες που συμμετέχουν στον κυτταρικό θάνατο δεδομένης της περιορισμένης συμμετοχής των κασπασών. Η έλλειψη του γονιδίου lola, που κωδικοποιεί μία BTB πρωτεϊνη που συμμετέχει στην αξονική καθοδήγηση έχει διαπιστωθεί ότι παίζει ρόλο στην συμπύκνωση της πυρηνικής χρωματίνης και την αποδόμηση του DNA, όπως και στο dumping (**Bass et al., 2007**). Έχει επίσης βρεθεί η αλληλεπίδραση της πρωτεϊνης αυτής με μία χρωμοσωμική κινάση

(JIL-1), που επηρεάζει την πυρηνική λαμίνη (**Zhang et al., 2003, Bao et al., 2005**). Μεταλλαγές στα γονίδια lola και jil-1 έχουν ως αποτέλεσμα τη μη φυσιολογική μορφολογία της πυρηνικής λαμίνης, προτείνοντας το ρόλο των δύο γονιδίων και των πυρηνικών λαμινών στη συμπύκνωση της πυρηνικής χρωματίνης κατά τον αναπτυξιακό κυτταρικό θάνατο (**Bass et al., 2007**).

1.20.3 Κυτταρικός θάνατος κατά την πρώιμη και μέση ωογένεση

Από τα παραπάνω γίνεται φανερό ότι ο ΠΚΘ πραγματοποιείται φυσιολογικά κατά τα τελευταία στάδια της ωογένεσης και ο ρόλος του είναι η δημιουργία ενός λειτουργικού και φυσιολογικού ωοκυττάρου. Ωστόσο, κυτταρικός θάνατος συναντάται στο συγκεκριμένο βιολογικό σύστημα ως απόκριση σε συγκεκριμένες στρεσογόνες καταστάσεις δρώντας ως ελεγκτής για να εξασφαλίσει ότι μόνο τα φυσιολογικά και υγιή ωοθυλάκια επιλέγονται να συνεχίσουν την ανάπτυξή τους (**McCall, 2004**). Η διαδικασία της ωογένεσης ελέγχεται σε δύο κυρίως αναπτυξιακά στάδια, τα οποία είναι τα πλέον ευαίσθητα και ονομάζονται σημεία ελέγχου της ωογένεσης. Σε αυτά τα στάδια έχει διαπιστωθεί σχετικά αυξημένο ποσοστό κυτταρικού θανάτου σε ωοθυλάκια που εμφανίζουν ανωμαλίες και δεν είναι δυνατόν να αναπτυχθούν περαιτέρω σε φυσιολογικά. Τα στάδια αυτά είναι το στάδιο 8 της μέσης ωογένεσης και το στάδιο του γερμαρίου (**Drummond-Barbosa and Spradling, 2001; McCall, 2004**). Αξίζει να σημειωθεί ότι, με τη βοήθεια αυτού του μηχανισμού τα έντομα είναι σε θέση να εξασφαλίζουν το απαραίτητο ποσό ενέργειας που χρειάζονται για την διαδικασία της ωογένεσης, καθώς δεν σπαταλούν ενέργεια αναπτύσσοντας ελαττωματικά ωοθυλάκια και κατ'επέκταση απογόνους με ανωμαλίες (**Buszczak and Cooley, 2000; Drummond-Barbosa and Spradling, 2001**).

<u>1.20.3.1 Κυτταρικός θάνατος και πρώτο σημείο ελέγχου της ωογένεσης</u>

Στην περιοχή 2 του γερμαρίου στην οποία πραγματοποιείται το πρώτο σημείο ελέγχου η βλαστική/γενετική κυτταρική σειρά περιβάλλεται από τα θυλακοκύτταρα. Όπως πιστεύεται, ο κυτταρικός θάνατος, που εμφανίζεται στην περίπτωση αυτή, εξασφαλίζει την ισορροπία μεταξύ των βλαστικών κυττάρων και των θυλακοκυττάρων, καθώς σε ένα ελλιπές διατροφικό περιβάλλον τα θυλακοκύτταρα επιβραδύνουν το ρυθμό ανάπτυξής τους σε σχέση με τα κύτταρα της βλαστικής σειράς, τα οποία εν συνεχεία σαν αντιστάθμισμα της παραπάνω επιβράδυνσης εμφανίζουν αντίστοιχα ποσοστά κυτταρικού θανάτου. Ο κυτταρικός θάνατος στην περιοχή του γερμαρίου λειτουργεί σαν ένας μηχανισμός που διατηρεί τον κατάλληλο αριθμό των θυλακοκυττάρων που απαιτούνται για να περιβάλλουν τα τροφοκύτταρα (**Drummond-Barbosa and Spradling, 2001**). Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι κύστεις καθώς μετακινούνται διαμέσου της περιοχής 2a του γερμαρίου εισέρχονται στο στάδιο της μείωσης και επομένως σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών τα κύτταρα της γενετικής σειράς είναι δυνατόν να ανασταλούν στη φάση της μειωτικής πρόφασης για μεγάλο διάστημα και στη συνέχεια να οδηγηθούν σε απόπτωση, συνοδευόμενη από το θάνατο και των θυλακοκυττάρων (**Drummond-Barbosa and Spradling, 2001**). Η ανάπτυξη των εντόμων σε ένα περιβάλλον με ανεπαρκή τροφή χαρακτηρίζεται από ένα υψηλό ποσοστό κυτταρικού θανάτου (εικ. 1.15D,E) (**Drummond-Barbosa and Spradling, 2001; Smith et al., 2002**). Στις συνθήκες αυτές βασικό ρόλο φαίνεται να παίζει το μονοπάτι PI3K το μεσολαβούμενο από την ινσουλίνη. Στο έντομο υπάρχουν επτά πεπτίδια που αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα της ινσουλίνης (**Wu and Brown, 2006**), ενώ μεταλλαγές στους θετικούς ρυθμιστές του μονοπατιού έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση του σωματικού μεγέθους και τη στειρότητα (**Montagne et al., 1999**). Το μονοπάτι αυτό ενδεχομένως να μεσολαβεί στις αποκρίσεις απέναντι στη στέρηση τροφής στο γερμάριο και έτσι να ρυθμίζει αρνητικά τον κυτταρικό θάνατο. Τόσο ο υποδοχέας της ινσουλίνης (InR) όσο και το υπόστρωμα αυτού chico έχει βρεθεί ότι απαιτούνται για τον πολλαπλασιασμό των θυλακοκυττάρων με άγνωστη μέχρι στιγμής επίδραση στον κυτταρικό θάνατο (**Drummond-Barbosa and Spradling, 2001; LaFever and Drummond-Barbosa, 2005**). Ο στόχος της ραπαμυκίνης (Tor) είναι ένας στόχος καταρροϊκά στο μονοπάτι της PI3K και μεταλλαγές αυτού φαίνεται να αυξάνουν τον κυτταρικό θάνατο. Προτείνεται λοιπόν, ότι μεταλλαγές στο μονοπάτι PI3K της ινσουλίνης επηρεάζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επάγουν τον κυτταρικό θάνατο στο γερμάριο, όπως προκύπτει από τα δεδομένα των μεταλλαγών στα γονίδια InR, chico και Tor (**Zhang et al., 2000; Zhang et al., 2009a**).

Από τους πρώτους παράγοντες που θεωρήθηκε ρυθμιστικός αυτού του σημείου ελέγχου ήταν ο μεταγραφικός παράγοντας με πρότυπο έλικας-θηλιάς-έλικας Daughterless (Da) (**Smith et al., 2002**). Έντομα με μεταλλαγές στον παράγοντα Da παράγουν ωοθυλάκια με πλεόνασμα τροφοκυττάρων και έλλειψη θυλακοκυττάρων στελέχους. Ο φαινότυπος αυτός μπορεί να ερμηνευθεί με μεταβολές στην αναλογία των θυλακοκυττάρων προς τα τροφοκύτταρα, ενδεχομένως λόγω των μειωμένων ποσοστών κυτταρικού θανάτου των κυττάρων γενετικής σειράς εντός του γερμαρίου. Σε συνθήκες έλλειψης τροφής τα στελέχη αγρίου τύπου εμφάνισαν 50-70% ποσοστά κυτταρικού θανάτου στο γερμάριο, ενώ τα μεταλλαγμένα στελέχη Da μόλις 5-12% (**Smith et al., 2002**). Σημειώνεται ότι ο παράγοντας Da δεν ανιχνεύεται στα κύτταρα γενετικής σειράς (**Cummings and Cronmiller, 1994**), πράγμα που σημαίνει ότι επάγει τον παραπάνω φαινότυπο ενεργοποιώντας σήματα θανάτου από τα θυλακοκύτταρα (**McCall, 2004**).

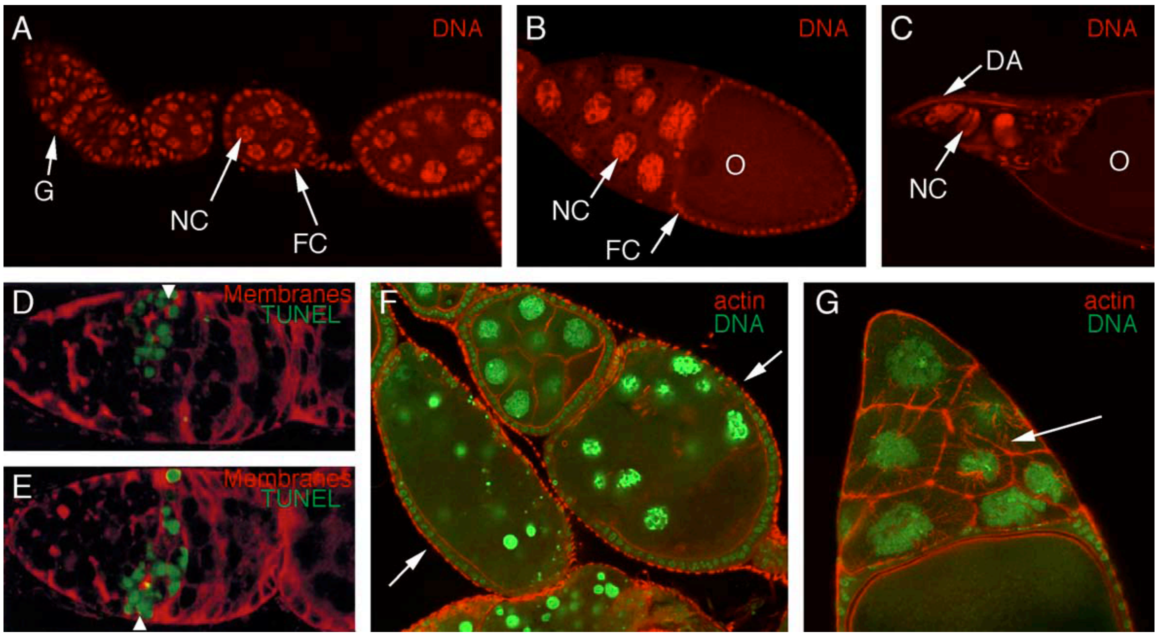
1.20.3.2 Κυτταρικός θάνατος και δεύτερο σημείο ελέγχου της ωογένεσης

Κατά τα στάδια της μέσης ωογένεσης 7-8 λαμβάνει χώρα το δεύτερο σημείο ελέγχου της ανάπτυξης των ωοθυλακίων. Η ανώμαλη ανάπτυξη των ωοθυλακίων ή η έκθεση των εντόμων σε διαφόρους εξωγενείς παράγοντες όπως π.χ. τοξικές ουσίες, τροφή ελλιπή σε πρωτεΐνες, ακατάλληλη θερμοκρασία κ.λ.π. έχει ως αποτέλεσμα το αυξημένο ποσοστό θανάτου σε αυτό το στάδιο (**Drummond-Barbosa and Spradling, 2001; Chao and Nagoshi, 1999; De Lorenzo et al., 1999; Nezis et al., 2000**). Τα πρώτα κύτταρα που εμφανίζουν χαρακτηριστικά κυτταρικού θανάτου είναι τα τροφοκύτταρα με τους πυρήνες τους να είναι λοβωτοί και να δίνουν θετικό σήμα TUNEL, ενώ παράλληλα η νηματιακή ακτίνη εμφανίζεται σαν μία συμπαγής μάζα ενώ στη συνέχεια εξαφανίζεται (εικ. 1.15F) (**Chao and Nagoshi, 1999; De Lorenzo et al., 1999; Nezis et al., 2000; Peterson et al., 2003**). Έχει επίσης βρεθεί ότι τα υπολείμματα των τροφοκυττάρων φαγοκυτταρώνονται από τα γειτονικά επιθηλιακά κύτταρα (**Giorgi and Deri, 1976; McCall, 2004; Nezis et al., 2006**). Το σημείο ελέγχου της μέσης ωογένεσης φαίνεται να παρέχει μια τελευταία ευκαιρία στην ωοθήκη, πριν το στάδιο 8, να εξαλείψει ελαττωματικά ωοθυλάκια έτσι ώστε να μη δαπανηθεί ενέργεια στη βιτελλογένεση (**Νέζης, 2002**). Αξίζει να σημειωθεί ότι, ο κυτταρικός θάνατος στη μέση ωογένεση παρουσιάζει κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά σε σύγκριση με το θάνατο των υπολοίπων ιστών του εντόμου. Όπως και στην περίπτωση του ΠΚΘ της όψιμης ωογένεσης, ο θάνατος αυτός είναι ανεξάρτητος από τους παράγοντες rpr, hid, grim, skl (**Peterson et al., 2007**). Το μονοπάτι της κινάσης PI3K με τη μεσολάβηση της ινσουλίνης, φαίνεται να ρυθμίζει την κυτταρική επιβίωση κατά τη μέση ωογένεση. Μεταλλαγές στον υποδοχέα της ινσουλίνης InR, είτε στο γονίδιο chico, είτε στη ριβοσωμική πρωτεϊνη ομόλογη της S6 κινάσης (S6k), αναστέλλουν την ανάπτυξη των προβιτελλογνετικών ωοθυλακίων καταλήγοντας στον εκφυλισμό τους (**Chen et al., 1996; LaFever and Drummond-Barbosa, 2005; Drummond-Barbosa and Spradling, 2001**). Μεταλλαγές στο γονίδιο chico αυξάνουν τον εκφυλισμό και αναστέλλουν τη βιτελλογένεση προτείνοντας ότι η στερεοειδογένεση της ωοθήκης εξαρτάται από το μονοπάτι της ινσουλίνης όπως συμβαίνει και στα θηλαστικά (**Poretsky et al., 1999**). Είναι πιθανό η περαιτέρω ανάπτυξη των ωοθυλακίων πέρα από το σημείο ελέγχου της μέσης ωογένεσης να σχετίζεται με τα επίπεδα της 20-υδροξυεκδυσόνης (20 E) και της ορμόνης νεοτενίνης (JH) (**Soller et al., 1999**). Έχει παρατηρηθεί ότι μετά από στέρηση θρεπτικών συστατικών τα επίπεδα της εκδυσόνης αυξάνονται και επάγουν τον κυτταρικό θάνατο (**Terashima et al., 2005**). Η επιβίωση ή ο θάνατος εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ των επιπέδων των δύο ορμονών 20 E και JH. Επίσης, χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι η έκφραση των γονιδίων στόχου E74 και E75 της 20 E, παρουσιάζει μία δυναμική αύξησης ή μείωσης των επιπέδων τους σε απόκριση της στέρησης θρεπτικών στοιχείων. Τα γονίδια αυτά αλληλορυθμίζονται και είναι άλλοτε προ-αποπτωτικά και άλλες φορές αντι-αποπτωτικά (**Terashima et al., 2006**). Επιπλέον μεταβολές στην έκφραση παρατηρήθηκαν και σε άλλα γονίδια που σχετίζονται με τον κυτταρικό θάνατο και με τις ορμόνες, όπως επίσης σε συνιστώσες του μονοπατιού PI3K σηματοδότησης όπως και του μονοπατιού JNK (c-Jun N terminal kinase). Τέλος, στη ρύθμιση των επιπέδων των 20 E και JH καθοριστικό ρόλο παίζει ο υποδοχέας της ινσουλίνης (InR) δηλώνοντας την αλληλεπίδραση αυτών των μονοπατιών (**Tu et al., 2002**). Το σημείο σύνθεσης των εκδυστεροειδών δεν είναι πλήρως γνωστό. Το στερεοειδογενές ένζυμο Dare που κωδικοποιεί την αναγωγάση αδρενοδοξίνη χαρακτηρίζεται από περιορισμένη έκφραση στα τροφοκύτταρα (**Buszczak et al., 1999; Freeman et al., 1999**). Κύτταρα της γενετικής σειράς που δεν διαθέτουν το ένζυμο δεν φθάνουν στα βιτελογενετικά στάδια (**Buszczak et al., 1999**). Άλλα στερεοειδογενή ένζυμα που εκφράζονται τόσο στα τροφοκύτταρα όσο και στα θυλακοκύτταρα είναι τα δύο P450, εκ των οποίων το ένα εκφράζεται μόνο στα θυλακοκύτταρα (**Chavez et al., 2000; Petryk et al., 2003; Warren et al., 2004**). Τα δεδομένα αυτά είναι ασύμβατα με το μοντέλο που έχει καθιερωθεί κατά το οποίο το ένζυμο Dare είναι το μόνο που παρέχει ηλεκτρόνια στα P450 των μιτοχονδρίων (**Freemen et al., 1999**), συνεπώς, πρόδρομα μόρια της 20E είναι δυνατόν να εγκαθίστανται μεταξύ τροφοκυττάρων και θυλακοκυττάρων. Στην προνύμφη του εντόμου η εκδυσόνη συντίθεται στο δακτυλιοειδή αδένα και η τελική μετατροπή της στην 20E από το ένζυμο P450 20-υδροξυλάση διεξάγεται στους περιφερειακούς ιστούς (**Petryk et al., 2003; Warren et al., 2004**).

Μεσοδερμική έκφραση του γονιδίου shade, που κωδικοποιεί την 20-υδροξυλάση αρκεί για την επιβίωση των μεταλλαγμένων θηλυκών εντόμων ως προς το shade όχι όμως και για τη γονιμότητά τους. Τα έντομα αυτά χαρακτηρίζονται από εκφυλισμένα ωοθυλάκια στη μέση ωογένεση, γεγονός που σημαίνει ότι η μετατροπή σε 20E είναι απαραίτητη για την ωοθήκη (**Petryk et al., 2003; Warren et al., 2004**).

Το μονοπάτι απόκρισης στην εκδυσόνη απαιτείται αναμφίβολα στα κύτταρα της γενετικής σειράς για να επιβιώσουν μέχρι το τέλος της ωογένεσης, συνεπώς φαίνεται να υπάρχει ένας αυτοκρινής μηχανισμός δράσης της εκδυσόνης (**Buszczak et al., 1999**). Μεταλλαγμένα στελέχη του υποδοχέα της εκδυσόνης είτε του γονιδίου στόχου E75 δίνουν ωοθυλάκια που εκφυλίζονται στη μέση ωογένεση (**Buszczak et al., 1999; Carney**

and Bender, 2000). Έκφραση του EcR παρατηρείται στα τροφοκύτταρα και τα θυλακοκύτταρα καθ'όλη τη διάρκεια της ωογένεσης, ενώ η έκφραση των γονιδίων στόχων E74, E75 και BR-C ενισχύεται κατά τη μέση ωογένεση (**Buszczak et al., 1999**). Τα δεδομένα αυτά προτείνουν ότι η ικανότητα απόκρισης στην εκδυσόνη ή η διαθεσιμότητα της πρωτεϊνης παρουσιάζει σταδιοειδική ρύθμιση με αποτέλεσμα την ενισχυμένη μεταγραφική ενεργότητα του EcR κατά τη μέση ωογένεση (**McCall, 2004**).



Εικόνα 1.15 Φωτογραφίες ωοθυλακίων διαφόρων αναπτυξιακών σταδίων και ανίχνευση κυτταρικού θανάτου, τόσο ΠΚΘ, όσο και επαγομένου σε συνθήκες έλλειψης τροφής, μετά από χρώσεις ιωδιούχου προπιδίου (για την παρατήρηση των πυρήνων-θετικό σήμα ως ένδειξη συμπυκνωμένης πυρηνικής χρωματίνης-κόκκινο χρώμα), φαλλοϊδίνης για την απεικόνιση του κυτταροσκελετού της ακτίνης (κόκκινο χρώμα), TUNEL για την ανίχνευση αποδομημένου DNA (πράσινο χρώμα). A-C: Ωοθυλάκια μετά από χρώση ιωδιούχου προπιδίου, όπου διακρίνονται οι πυρήνες των τροφοκυττάρων (NC) και των θυλακοκυττάρων (FC). A: Ωοθυλάκια από το στάδιο του γερμαρίου (G) μέχρι και το στάδιο 6 με φυσιολογικούς πυρήνες και στα δύο είδη κυττάρων, B: Φυσιολογικό ωοθυλάκιο σταδίου 10, με τη χαρακτηριστική μετατόπιση των θυλακοκυττάρων γύρω από το ωοκύτταρο (O), C: Ωοθυλάκιο σταδίου 13 μετά τη διαδικασία dumping, όπου παρατηρείται η απουσία κυτταροπλάσματος των τροφοκυττάρων. Σήμα συμπυκνωμένης χρωματίνης παρατηρείται σε κάποιους υπολειπόμενους τροφοκυτταρικούς πυρήνες, ενώ διακρίνεται η δομή του χοριονικού αναπνευστικού νηματίου (DA), D: Σήμα αποδομημένου DNA στην περιοχή 2 του γερμαρίου σε συνθήκες έλλειψης τροφής. F: Σήμα αποδομημένου DNA και απουσία κυτταροσκελετού της ακτίνης σε ανώμαλα ωοθυλάκια σταδίου 8. G: Φυσιολογική συγκρότηση των κυτταροπλασματικών δεσμών ακτίνης (βέλος) σε ωοθυλάκιο σταδίου 11 κατά τη διαδικασία dumping (McCall, 2004).

Καταρροϊκά του μονοπατιού της εκδυσόνης κατά τη διεξαγωγή του κυτταρικού θανάτου στη μέση ωογένεση καθοριστικό ρόλο παίζουν οι κασπάσες, όπως η Dcp-1, με μία εξαιρετικά δυναμική συμμετοχή στην εκτέλεση του προγράμματος κυτταρικού θανάτου, (**Laundrie et al., 2003**). Ο ρόλος των αναστολέων θεωρείται επίσης καταλυτικός στη διατήρηση των καταλλήλων επιπέδων της Dcp-1 στη μέση ωογένεση

(**Rodriguez et al., 2002; Peterson et al., 2003; Mazzalupo and Cooley, 2006; Baum et al., 2007**), καθώς παρατηρούνται δυναμικές μεταβολές της έκφρασής του κατά τη διάρκεια των σταδίων αυτών, προδίδοντας την αυστηρή ρύθμισή του. Τα επίπεδα mRNA και πρωτεϊνών diap1 εμφανίζονται μειωμένα κατά τη μέση ωογένεση στα υγιή ωοθυλάκια (**Fooley and Cooley, 1998; Baum et al., 2007**), γεγονός που ενδεχομένως **ευθύνεται για την αυξημένη ευαισθησία των ωοθυλακίων των σταδίων αυτών απέναντι στα ερεθίσματα του κυτταρικού θανάτου (Chao and Nagoshi, 1999)**. Η κασπάση Drice ενεργοποιείται σε υψηλά επίπεδα κατά τη μέση ωογένεση στα ανώμαλα ωοθυλάκια (**Laundrie et al., 2003; Peterson et al., 2003**). Σε έντομα μεταλλαγμένα στην Dcp-1 η ενεργότητα της Drice περιορίζεται στον τροφοκυτταρικό πυρήνα, γεγονός που υποδεικνύει ότι η Dcp-1 απαιτείται για την ενεργοποίηση της Drice στο κυτταρόπλασμα είτε για τη διάσπαση των πυρηνικών πρωτεϊνών ώστε να μπορεί η Drice να εξέλθει του πυρήνα (**Laundrie et al., 2003**). Και τα δύο μοντέλα είναι εξίσου πιθανά καθώς η Dcp-1 είναι ικανή να διασπάσει τη Drice καθώς και πυρηνικές λαμίνες (**Song et al., 2000**).

Τέλος, δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί κατά πόσο η ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου μέσω του Dark και του Diap-1 διεξάγεται στα κύτταρα της γενετικής σειράς είτε εάν δρα στα θυλακοκύτταρα και δευτερογενώς το σήμα επιβίωσης ή θανάτου μεταφέρεται στη γενετική σειρά (**McCall, 2004**). Άλλωστε, ο κυτταρικός θάνατος των τροφοκυττάρων, τουλάχιστον στα σημεία ελέγχου της ωογένεσης όπως φαίνεται να ισχύει σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να οφείλεται σε σήματα προερχόμενα από τα θυλακοκύτταρα, δηλαδή από τη διατάραξη της στιβάδας των θυλακοκυττάρων (**Chao and Nagoshi, 1999**). Για τη μετάδοση των σημάτων αυτών υπεύθυνη μπορεί να είναι η επικοινωνία των δύο κυτταρικών τύπων τόσο μέσω των χασμοδεσμών (**Giorgi and Postlethwait, 1985; Chao and Nagoshi, 1999**), όσο και μέσω των μονοπατιών σηματοδότησης, όπως έχει αναλυθεί, και ευθύνονται για τον προσδιορισμό των θυλακοκυττάρων του οπισθίου πόλου πριν το στάδιο 7 (**Gonzalez-Reyes and St Johnston, 1995, 1998a;1998b; Gonzalez-Reyes et al., 1997; Chao and Nagoshi, 1999**).

Υψηλά ποσοστά κυτταρικού θανάτου στη μέση ωογένεση έχουν διαπιστωθεί και από μεταλλαγές του γονιδίου της κινάσης Mos και συνεπώς φαίνεται ότι το γονίδιο ενισχύει την επιβίωση ενδεχομένως μέσω του μονοπατιού των MAPK κινασών (**Ivanovska et al., 2004**).

Θα πρέπει να τονιστεί ότι, η ιδιαίτερη **ευαισθησία των ωοθυλακίων** που παρατηρείται στο δεύτερο σημείο ελέγχου (**Drummond-Barbosa and Spradling, 2001; McCall, 2004, Nezis, 2000**) και που όπως προαναφέρθηκε, οφείλεται στην περιορισμένη έκφραση των αναστολέων της απόπτωσης Diap-1 στα τροφοκύτταρα (**Fooley and Cooley, 1998; Baum et al., 2007**), μπορεί να αποδοθεί και σε ορισμένα άλλα χαρακτηριστικά των κυττάρων τους στα στάδια αυτά: 1) Τα θυλακοκύτταρα στο στάδιο 7, σταματούν να διαιρούνται και εισέρχονται στον κύκλο της ενδομίτωσης, δηλαδή της συνεχούς αντιγραφής του DNA τους με σοβαρό το ενδεχόμενο να καθίστανται περισσότερο ευάλωτα απέναντι σε στρεσογόνους παράγοντες, τόσο μέσω αυξημένης πιθανότητας οξείδωσης/βλάβης του γενετικού τους υλικού, όσο και από το γεγονός ότι, ενώ μέχρι το στάδιο 6 (των συνεχών μιτωτικών διαιρέσεων) επαγόμενος θάνατος των θυλακοκυττάρων θα μπορούσε να ξεπεραστεί με την αντικατάσταση αυτών από τις διαιρέσεις των γειτονικών τους κυττάρων, από το στάδιο 7 και έπειτα αυτό δεν είναι πλέον εφικτό (**Chao and Nagoshi, 1999**). 2) Τα στάδια 7-9 χαρακτηρίζονται από μεταβολές στην κατάσταση πόλωσης των μεμβρανών των τροφοκυττάρων και του ωοκυττάρου και μάλιστα εξαρτώμενες από τα επίπεδα της νεανικής ορμόνης (**Bohrmann et al., 1986a; 1986b).**

1.20.3.3 Πρόσφατα δεδομένα σχετικά με τον κυτταρικό θάνατο κατά την πρώιμη και μέση ωογένεση

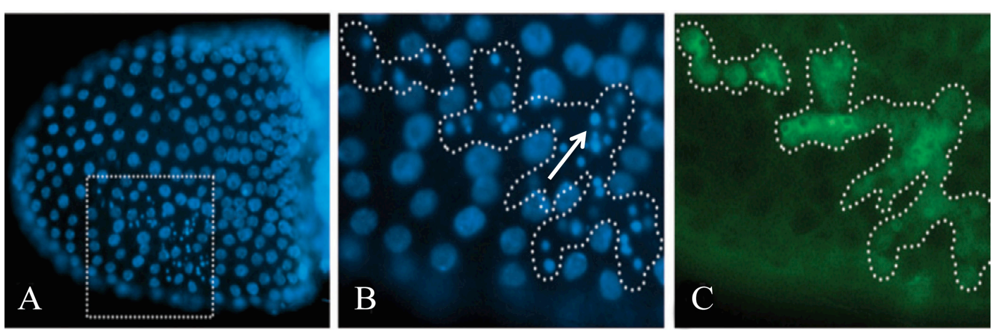
Σύγχρονες μελέτες κάνουν λόγο για τη συμμετοχή της αυτοφαγίας υπό ορισμένες συνθήκες στον επαγόμενο κυτταρικό θάνατο που παρατηρείται στα δύο σημεία ελέγχου της ωογένεσης. Συγκεκριμένα, η αυτοφαγία διαπιστώθηκε ότι δρα αναρροϊκά της ενεργοποίησης των κασπασών και της αποδόμησης του DNA, ενώ δεν βρέθηκε να επηρεάζει τη συμπύκνωση της πυρηνικής χρωματίνης (**Nezis et al., 2009; Pritchett et al., 2009**). Η συμμετοχή ενεργοποιημένων κασπασών έχει διαπιστωθεί στην περιοχή 2 του γερμαρίου και μάλιστα σε σχέση με την αυτοφαγική διαδικασία, καθώς μεταλλαγές στο γονίδιο της dcp-1 οδηγούν σε μειωμένα επίπεδα αποδομημένου DNA και αυτοφαγίας (**Hou et al., 2008**), ενώ παράλληλα, μεταλλαγές στα γονίδια αυτοφαγίας atg1 και atg7 έχουν επίσης ως αποτέλεσμα μειωμένα επίπεδα αποδομημένου DNA στα ωοθυλάκια αυτών των σταδίων (**Hou et al., 2008; Nezis et al., 2009**). Επομένως, τόσο η αυτοφαγία όσο και η κασπάση Dcp-1 απαιτούνται για τον επαγόμενο κυτταρικό θάνατο κατά την πρώιμη ωογένεση (**Pritchett et al., 2009**). Μία πιθανή ερμηνεία σχετικά με τη συμβολή της αυτοφαγίας στη διεξαγωγή των γεγονότων κυτταρικού θανάτου αποτελεί η ενδεχόμενη, από την εκτεταμένη αυτοφαγία, αποικοδόμηση κρίσιμων για την κυτταρική επιβίωση πρωτεϊνών (**Nezis et al., 2009**).

Πολύ πρόσφατα δεδομένα από τη μελέτη του κυτταρικού θανάτου της μέσης ωογένεσης του εντόμου αποκαλύπτουν την εκτεταμένη αναδιαμόρφωση, που υφίστανται τα μιτοχονδριακά δίκτυα, συνοδευόμενη από τη δημιουργία συσσωματωμάτων και την εγκόλπωση, καθώς και την αποικοδόμηση αυτών από τα θυλακοκύτταρα. Οι μεταβολές που υφίστανται τα μιτοχόνδρια βρέθηκε ότι εξαρτώνται από τις κασπάσες, τις πρωτείνες Bcl-2, τις συνιστώσες της μιτοχονδριακής σύντηξης και σχάσης, καθώς και την αυτοφαγία. Κύριο συμπέρασμα της συγκεκριμένης έρευνας υπήρξε η διαπίστωση ότι, το μιτοχονδριακό μονοπάτι είναι ο κύριος μηχανισμός ενεργοποίησης του κυτταρικού θανάτου στη μέση ωογένεση, ενώ οι πρωτεϊνες Buffy και Debcl ρυθμίζουν τόσο την αναδιαμόρφωση των οργανιδίων, όσο και τον κυτταρικό θάνατο με την επαγωγή της μιτοχονδριακής διαπερατότητας MMP και την ακόλουθη απελευθέρωση προ-αποπτωτικών παραγόντων από τα μιτοχόνδρια (**Tanner et al., 2011**). Σημειώνεται ότι, μέχρι στιγμής δεν έχει διαπιστωθεί η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια του εντόμου, όπως συμβαίνει στα κύτταρα των θηλαστικών κατά την αποπτωτική διαδικασία (**Peterson et al., 2007**).

1.20.4 Θάνατος των θυλακοκυττάρων

Τα επιθηλιακά θυλακοκύτταρα πεθαίνουν φυσιολογικά κατόπιν της αποθέσεως του χορίου στην όψιμη ωογένεση. Στα τελευταία στάδια της ωογένεσης, μόνο ένα μικρό υποσύνολο προσθίων θυλακοκυττάρων δίνει σημάδια έναρξης κυτταρικού θανάτου (**Nezis et. al., 2002**), με χαρακτηριστική την παρουσία αυτοφαγοσωμάτων και αυτολυσοσωμάτων (**Nezis et al., 2006**). Ένα αρχικό γνώρισμα της διαδικασίας κυτταρικού θανάτου των θυλακοκυττάρων είναι η απώλεια των μικρολαχνών από την κορυφαία μεμβράνη στο στάδιο 14Α. Η απώλεια των μικρολαχνών συνιστά χαρακτηριστικό αποπτωτικής διαδικασίας σε άλλους οργανισμούς (**Kerr et al., 1972; Wyllie et al., 1980**). Στη συνέχεια η πυρηνική χρωματίνη συμπυκνώνεται ενώ στο κυτταρόπλασμα εμφανίζεται πλήθος κενοτοπίων. Αυτές οι αλλοιώσεις είναι χαρακτηριστικές των κυττάρων που αποπίπτουν όταν εκτεθούν στον οξειδωτικό παράγοντα του υπεροξειδίου του υδρογόνου (**Dini et al., 1996; Kazzaz et al., 1996**). Έχει διατυπωθεί η απόψη ότι ο θάνατος των θυλακοκυττάρων μπορεί να οφείλεται στο υπεροξείδιο του υδρογόνου (**Νέζης, 2002**), καθώς αυτό παράγεται από τα κύτταρα στα τελευταία στάδια της ωογένεσης ενεργοποιώντας μόρια υπεροξειδασών για να επιτευχθεί η σκλήρυνση του χορίου (**Margaritis 1985, Trougakos and Margaritis 1998a; 1998b**). Πιο συγκεκριμένα, η NADH οξειδάση που εντοπίζεται στη μεμβράνη των θυλακοκυττάρων από τα πρώτα στάδια ανάπτυξης των ωοθυλακίων ευθύνεται για την ενεργοποίηση της υπεροξειδικής αντίδρασης σκλήρυνσης του χορίου των ωοθυλακίων στα τελευταία στάδια της ωογένεσης (**Κεραμάρης, 1999**). Στο στάδιο 14Β, τα θυλακοκύτταρα εμφανίζουν πυρήνες με συμπυκνωμένη χρωματίνη, αποδομημένο DNA καθώς και πλήρη αποκόλληση από την εξωκυττάρια ουσία, φαινόμενα που παρατηρούνται κατά τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (**Wyllie et al., 1980**). Επίσης, σημειώνεται ότι, η αποκόλληση από την εξωκυττάρια ουσία αποτελεί παράγοντα κυτταρικού θανάτου, ενώ στην περίπτωση των θυλακοκυττάρων αυτά αποκολλώνται από το χόριο καθώς τα ώριμα ωοθυλάκια εξέρχονται του ωοθηκαρίου και περνούν στον πλευρικό ωαγωγό για να οδηγηθούν στον κεντρικό ωαγωγό και να γονιμοποιηθούν (**King, 1970**). Η απομάκρυνση των θυλακοκυττάρων και η επερχόμενη απώλεια επαφής με την εξωκυττάρια ουσία ξεκινά στο στάδιο 14Α στον εμπρόσθιο πόλο, όπου και ανιχνεύονται τα πρώτα σημάδια θανάτου. Το γεγονός αυτό ενδεχομένως συνδέεται με τη διαδικασία σύνθεσης του χορίου που ολοκληρώνεται πρώτα στην περιοχή αυτή (**Margaritis, 1985; Trougakos and Margaritis, 1998a; 1998b; Deng and Bownes, 1998**). Όταν το ωοθυλάκιο φτάνει στο τελικό στάδιο 14Β, οι δυνάμεις πρόσφυσης στην εξωκυττάρια ουσία μπορεί να χαλαρώνουν με αποτέλεσμα την αποκόλληση. Δεδομένα από άλλα συστήματα μιλούν για την μετάδοση σημάτων επιβίωσης από την εξωκυττάρια ουσία, γεγονός που δικαιολογεί την ανθεκτικότητα των θυλακοκυττάρων απέναντι σε διαφόρους επαγωγείς της απόπτωσης (**Boudreau et al., 1995; Frisch and Ruoslahti, 1997**).

Τέλος, τα υπολείμματα των θυλακοκυττάρων απομακρύνονται μέσω φαγοκύτωσης από τα επιθηλιακά κύτταρα στην είσοδο του πλευρικού ωογαγωγού, με αποτέλεσμα να αποτρέπεται η απόφραξη των ωοθηκαρίων και να διευκολύνεται η προώθηση των



Εικόνα 1.16. Φωτονιογραφίες από μικροσκόπιο φθορισμού ωοθυλακίου σταδίου 10Β μετά από χρώση DAPI, για την απεικόνιση των πυρήνων (μπλε χρώμα) και TUNEL, για την αποδόμηση DNA (πράσινο χρώμα). Αναστολή έκφρασης του γονιδίου του υποδοχέα της εκδυσόνης (EcR) προκαλεί απόπτωση στα θυλακοκύτταρα, όπως αυτή ανιχνεύεται από τους πυρήνες με τη συμπυκνωμένη πυρηνική χρωματίνη (A, B) και το αποδομημένο DNA (C). (Ανατύπωση από Romani et al., 2009).

ωρίμων ωοθυλακίων προς τον κεντρικό ωαγωγό (**Νέζης, 2002**).

Πέρα από τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, τα επιθηλιακά θυλακοκύτταρα πεθαίνουν ακολουθώντας τον επαγόμενο ή σποραδικό θάνατο των τροφοκυττάρων κατά τη μέση ωογένεση, γεγονός που καταλήγει στον εκφυλισμό των ωοθυλακίων. .Ωστόσο, είναι πιθανό να συμβεί και το αντίθετο, δηλαδή σήματα προερχόμενα από τα θυλακοκύτταρα, να προκαλέσουν το θάνατο των τροφοκυττάρων και άρα τον εκφυλισμό του ωοθυλακίου (**Chao and Nagoshi, 1999; Pritchett et al., 2009**). Οι ακριβείς μηχανισμοί που ελέγχουν το θάνατο των θυλακοκυττάρων σε μικρότερα στάδια, είναι σε μεγάλο βαθμό αδιευκρίνιστοι (**Pritchett et al., 2009**).

Οι δύο κυτταρικοί τύποι (τροφοκύτταρα και θυλακοκύτταρα) παρουσιάζουν τόσο διαφοροποιήσεις ως προς τα σήματα και τους παράγοντες που προκαλούν τον κυτταρικό θάνατο σε κάθε έναν από αυτούς, όσο και ομοιότητες. Παραδείγματα της πρώτης περίπτωσης αποτελούν οι μελέτες υπερέκφρασης των πρωτεϊνικών μορίων p53, Chk2, GADD45 (**Chao and Nagoshi, 1999; Bakhrat et al., 2010; Peretz et al., 2007)**, ή μεταλλαγμένων στελεχών π.χ. στην κασπάση Dcp-1 (**Laundrie et al., 2003; Mazzalupo et al., 2006),** που οδηγούν σε διαφορετικούς φαινοτύπους, που σχετίζονται με τον κυτταρικό θάνατο στα δύο είδη κυττάρων. Παράδειγμα της δεύτερης περίπτωσης αποτελεί ο ρόλος του μονοπατιού της εκδυσόνης και στα δύο είδη κυττάρων (**Romani et al., 2009**). Σύμφωνα με τη μελέτη αυτή**,** μία ισομορφή του υποδοχέα της εκδυσόνης EcR-B1 απαιτείται για την ακεραιότητα και ορθή πολικότητα του επιθηλίου των θυλακοκυττάρων, τόσο στα αρχικά στάδια της ωογένεσης, κατά τη διάρκεια των μιτωτικών διαιρέσεων, όσο και κατά τη μέση ωογένεση όταν τα κύτταρα εισέρχονται στη φάση της ενδομίτωσης (**Romani et al., 2009**). Επιπροσθέτως, ο υποδοχέας EcR είναι απαραίτητος για την επιβίωση των θυλακοκυττάρων στη μέση ωογένεση, καθώς αναστολή έκφρασης του γονιδίου EcR προκαλεί τον αποπτωτικό θάνατο, όπως αυτός ανιχνεύεται μέσω της συμπύκνωσης της πυρηνικής χρωματίνης και της αποδόμησης του DNA στους πυρήνες των θυλακοκυττάρων (εικ. 1.16). Ταυτόχρονα, διαπιστώνεται η ενεργοποίηση της κασπάσης-3 και η μειωμένη έκφραση του αναστολέα της απόπτωσης Diap1, γεγονός που οδήγησε στο συμπέρασμα ότι, ο υποδοχέας της εκδυσόνης εμπλέκεται στο θάνατο των θυλακοκυττάρων μέσω ενός ρυθμιστικού μοριακού μηχανισμού που είναι κοινός με αυτόν που ελέγχει το θάνατο των τροφοκυττάρων (**Romani et al., 2009**). Ο ρόλος της εκδυσόνης στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων πέρα από το δεύτερο σημείο ελέγχου, καθώς και στον επαγόμενο θάνατο στο στάδιο αυτό έχει αναλυθεί εκτενώς παραπάνω (§ 1.20.3.2).

1.20.5 Ο ρόλος της ηλικίας των εντόμων και του οξειδωτικού στρες στον κυτταρικό θάνατο

Η ευαισθησία του βιολογικού μας συστήματος απέναντι στο οξειδωτικό στρες είναι ήδη γνωστή με βάση μελέτες σχετικά με την παρατηρούμενη μείωση της ωοτοκίας με την αύξηση της ηλικίας του εντόμου, στην οποία φαίνεται να συμβάλλουν η περιορισμένη ενεργότητα των προγονικών ωογονίων της γενετικής σειράς GSC (germline stem cells), καθώς και τα αυξημένα ποσοστά κυτταρικού θανάτου στα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια. Πιο συγκεκριμένα, η μείωση του ρυθμού διαίρεσης των GSC φαίνεται να ευθύνεται για τη μειωμένη παραγωγή ωοθυλακίων ήδη από την 3η ημέρα, ενώ μετά την 25η η μείωση είναι δραματική και οφειλόμενη κυρίως στον εκτεταμένο κυτταρικό θάνατο (**Zhao et al., 2008**). Πιθανολογείται ότι, για τον κυτταρικό θάνατο στα έντομα αυξημένης ηλικίας ευθύνονται οι ελεύθερες ρίζες και το επαγόμενο οξειδωτικό στρες (**Zhao et al., 2008**) όπως έχει καταγραφεί τόσο στη *Drosophila,* όσο και σε άλλα πρότυπα βιολογικά συστήματα κατά τη γήρανση (**Tower, 2000; Grotewiel et al., 2005; Waskar, 2005**). Χαρακτηριστικά είναι τα αποτελέσματα υπερέκφρασης της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD), ενός ενζύμου με αντιοξειδωτική δράση που επεκτείνει την επιβίωση του εντόμου, ενώ παράλληλα αποτρέπει τη γήρανση των GSC της ωοθήκης (**Pan et al., 2007**).

Επιπροσθέτως, ο θάνατος των θυλακοκυττάρων, στο τελευταίο στάδιο της ωογένεσης, είναι πιθανό να οφείλεται στην αυξημένη παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου από την NADH οξειδάση, η οποία παράγεται για τη σκλήρυνση του χορίου (**Νέζης, 2002**).

Από τα παραπάνω συνάγεται το συμπέρασμα ότι, το βιολογικό σύστημα της ωογένεσης εμφανίζει μία ευαισθησία απέναντι στο οξειδωτικό στρες συνδεόμενη κατ'αρχήν με την ηλικία του οργανισμού.

Όμως, και οι πρωτεΐνες Buffy και Debcl, που πολύ πρόσφατα διαπιστώθηκε ότι ελέγχουν τον κυτταρικό θάνατο στη μέση ωογένεση, φέρουν προ-αποπτωτική δράση με έναν τρόπο εξαρτώμενο από την ηλικία των εντόμων (**Tanner et al., 2011**). Αξίζει να σημειωθεί ότι, έντομα ηλικίας 10-20 ημερών, ενώ εξακολουθούν να είναι αναπαραγωγικώς ενεργά, χαρακτηρίζονται από μία σειρά γονιδίων που επιδεικνύουν δραματικές αλλαγές στην έκφρασή τους σε συνάρτηση με την ηλικία (**Zhan et al., 2007**). Είναι πιθανό, ο κυτταρικός θάνατος στις ωοθήκες των νεαρότερων εντόμων να ελέγχεται από διαφορετικό μονοπάτι από αυτό των εντόμων μεγαλύτερης ηλικίας (**Tanner et al., 2011**). Τα υψηλά ποσοστά κυτταρικού θανάτου όμως στα έντομα αυξημένης ηλικίας, όπως αναλύθηκε παραπάνω, είναι δυνατόν να αποδοθούν και στη συσσώρευση ελευθέρων ριζών (**Zhao et al., 2008**).

1.20.6 "Συνομιλία" ανάμεσα στην αυτοφαγία και την απόπτωση

Πρόσφατες σχετικά μελέτες προδίδουν τον ρόλο των κασπασών και στην προώθηση της αυτοφαγίας με πιο χαρακτηριστικό το παράδειγμα της Dcp-1 κασπάσης και τη συμβολή της τόσο σε αποπτωτικά όσο και σε μη αποπτωτικά μονοπάτια κυτταρικού θανάτου (**Hou et al., 2008; Kim et al., 2010**). Πλην των γονιδίων που σχετίζονται με την αυτοφαγία, η αλληλεπίδραση της κασπάσης επεκτείνεται και σε γονίδια που εμπλέκονται στη σηματοδότηση ινσουλίνης/IGF-TOR και MAPK/JNK, καθώς και με γονίδια της εκδυσόνης (**Kim et al., 2010**). Η μελέτη καταλήγει στο συμπέρασμα ότι η κασπάση Dcp-1 στους ιστούς του εντόμου ρυθμίζει και/ή ρυθμίζεται από την αυτοφαγία, τα σήματα εκδυσόνης, τις κινάσες JNK και MAPK, καθώς και από πλήθος μεταγραφικών παραγόντων και σημάτων κυτταρικού θανάτου (**Kim et al., 2010**). Τόσο το JNK όσο και το TOR μονοπάτι επηρεάζουν και την απόπτωση, αλλά και την αυτοφαγία (**Lee et al., 2006; Wu et al., 2009; Wang et al., 2009**). Θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι, τα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης των δύο σηματοδοτήσεων μπορούν να οδηγήσουν άλλοτε στην επιβίωση και άλλοτε στον κυτταρικό θάνατο επιδρώντας με διαφορετικό τρόπο στην αυτοφαγική ή αποπτωτική οδό. Σχετικά με τα γονίδια της αυτοφαγίας, μεταλλαγμένα στελέχη του εντόμου στα γονίδια atg1 και atg7, επέδειξαν χαμηλότερα ποσοστά αποδομημένου DNA στα δύο σημεία ελέγχου της ωογένεσης (**Scott et al., 2007; Nezis et al., 2009**). Στη δε όψιμη ωογένεση, η αυτοφαγική αποικοδόμηση του αναστολέα της απόπτωσης dBruce ελέγχει τον αποπτωτικό θάνατο των τροφοκυττάρων (**Nezis et al., 2010**). Ενδεχομένως κάτι αντίστοιχο να ισχύει και στην περίπτωση της μέσης ωογένεσης, καθώς είναι γνωστή η συμμετοχή του συγκεκριμένου αναστολέα και σε αυτό το στάδιο (**Hou et al., 2008**). Συνεπώς, ο μηχανισμός της αυτοφαγίας μπορεί να είναι προστατευτικός στις περιπτώσεις ενός ηπίου στρες, ενώ όταν επεκτείνεται σε μεγάλο βαθμό καταλήγοντας στην αυτοφαγική αποικοδόμηση κρίσιμων για την επιβίωση πρωτεϊνών, όπως των αρνητικών ρυθμιστών της απόπτωσης, είναι δυνατόν να ενισχύει τον καταρράκτη των αποπτωτικών αντιδράσεων. Για παράδειγμα, μία ασθενής επαγωγή της αυτοφαγίας μπορεί να είναι υπεύθυνη για την κυτταρική επιβίωση καταστέλλοντας την απόπτωση που προκαλείται από την υπερέκφραση της Dcp-1, ενώ αντιθέτως μία ισχυρή προώθηση της αυτοφαγικής οδού μπορεί να ενισχύσει τον φαινότυπο του θανάτου μέσω της συνδυαστικής δράσης τόσο του αποπτωτικού όσο και του αυτοφαγικού κυτταρικού θανάτου (**Blommaart et al., 1997; Thummel, 2001; Baehrecke, 2003**).

1.21 Ο ρόλος του κυτταροσκελετού της ακτίνης στην ωογένεση

1.21.1 Ταχεία μεταφορά

.

Η διαδικασία ταχείας μεταφοράς dumping εξαρτάται από την ακτίνη, όπως έχει βρεθεί ύστερα από αναστολή αυτής με τη χρήση κυτοχαλασίνης (**Gutzeit, 1986**). Πιο αναλυτικά, στα τελευταία στάδια της ωογένεσης παρατηρείται μία αξιοσημείωτη μεταβολή στην κατανομή της ακτίνης προετοιμάζοντας τη συστολή των τροφοκυττάρων. Κατά τη διάρκεια των σταδίων 9-10, η κατανομή της νηματιακής ακτίνης διακρίνεται 1) στην υποφλοιώδη (subcortical) ακτίνη που επενδύει και διαγράφει το σχήμα των τροφοκυττάρων, των θυλακοκυττάρων αλλά και του ωοκυττάρου, 2) στην ακτίνη των δακτυλιοειδών καναλιών και 3) στην ακτίνη των συνοριακών θυλακοκυττάρων. Στο στάδιο 11, ανιχνεύονται σημαντικές μεταβολές, καθώς συγκροτούνται οι κυτταροπλασματικές δέσμες ακτίνης (actin cables) που εκτείνονται από τις τροφοκυτταρικές μεμβράνες μέχρι τους πυρήνες. Οι δέσμες δημιουργούν ένα καλά οργανωμένο δίκτυο περιβάλλοντας τους πυρήνες τους οποίους συγκρατούν στο κέντρο των κυττάρων προκειμένου να μη φράξουν τα δακτυλιοειδή κανάλια κατά τη διαδικασία του dumping (εικ. 1.15G). Οι δέσμες είναι περισσότερο έντονες στα τροφοκύτταρα πλησίον του ωοκυττάρου και λιγότερο πυκνές στα πιο απομακρυσμένα κύτταρα. Οι δέσμες αυτές εμφανίζουν ραβδώσεις ενώ αποτελούνται από επιμέρους αλληλοεπικαλυπτόμενες δεσμίδες μικροϊνιδίων ακτίνης. Τέλος, εμφανίζουν μεγαλύτερη συγκέντρωση γύρω από τα δακτυλιοειδή κανάλια (**Robinson and Cooley, 1997; Νέζης, 2002**). Στο στάδιο 12 τα τροφοκύτταρα από πολυγωνικά γίνονται σφαιρικά ενώ οι δέσμες χάνουν τον συμμετρικό προσανατολισμό τους και αποκτούν τυχαία διεθεύτηση. Ομοίως τα δακτυλιοειδή κανάλια παρουσιάζονται σαν να έχουν χάσει τον προσανατολισμό τους και να έχουν αλλάξει θέση. Η εμφάνιση των δακτυλιοειδών καναλιών δίνει έναν περισσότερο ηλεκτρονιόπυκνο εξωτερικό δακτύλιο και έναν λίγότερο πυκνό εσωτερικό που αποτελείται και από μικροϊνίδια ακτίνης (**Νέζης, 2002**).

Πλην της ταχείας μεταφοράς όμως, κατά τη διάρκεια των σταδίων 7-10, διεξάγεται και η κατευθυνόμενη επιλεκτική μεταφορά μορίων μέσω των δακτυλιοειδών καναλιών προς το ωοκύτταρο. Και στην περίπτωση αυτή συμμετέχει η ακτίνη καθώς η μεταφορά παρουσιάζει ευαισθησία απέναντι σε αναστολείς του πολυμερισμού της ακτίνης, προτείνοντας τη σημασία ύπαρξης των ινιδίων στο μικροπεριβάλλον των καναλιών και τη συμμετοχή τους στη διαδικασία αυτή (**Robinson and Cooley, 1997**).

Ένα σύνολο πρωτεϊνικών μορίων είναι ικανό να αναστείλλει τη διαδικασία αδειάσματος του κυτταροπλάσματος και να δώσει φαινότυπο **dumpless**. Ταυτόχρονα, ο ρόλος των μορίων αυτών, όπως και των στοιχείων του κυτταροσκελετού, επεκτείνεται σε μία πληθώρα διαδικασιών/λειτουργιών κρίσιμων για την πορεία της ωογένεσης. Ακολουθεί ενδεικτικά μία σύντομη αναφορά σε ορισμένα από τα μόρια αυτά.

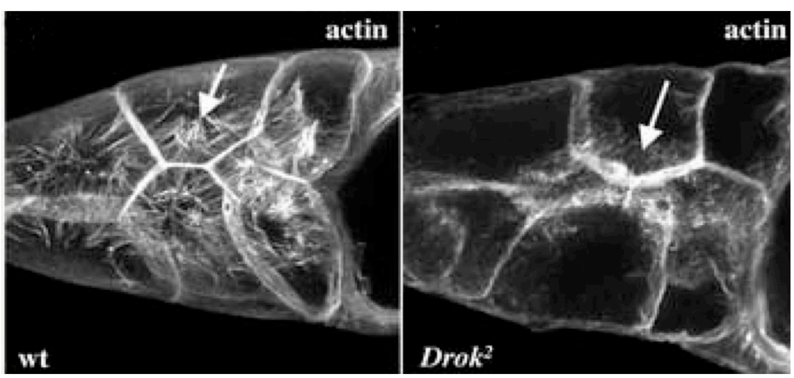
1) **Οικογένεια των Rho GTPασών**. Στη *Drosophila*, η οικογένεια των rho GTPασών περιλαμβάνει τις πρωτεϊνες Drac1, RhoL, Dcdc42. Ενδεικτικά, μπορούμε να αναφερθούμε στους φαινοτύπους που προκύπτουν από τα μεταλλαγμένα στελέχη της πρωτεϊνης rac και καταλήγουν σε μεταβολές της μετανάστευσης των συνοριακών κυττάρων, γεγονός που οδηγεί σε ανωμαλίες κατά τη διαμόρφωση της μικροπύλης (**Murphy and Montell, 1996**). Μεταλλαγές επίσης στις πρωτεϊνες RhoL και Dcdc42 στα κύτταρα της γενετικής σειράς επιφέρουν ένα πλήθος αλλοιώσεων στον κυτταροσκελετό της ακτίνης (**Murphy and Montell, 1996**). Τα στελέχη Dcdc42 παρουσιάζουν ασυνέχειες της υποφλοιώδους ακτίνης και με τα δακτυλιοειδή κανάλια να απομακρύνονται από τις μεμβράνες, γεγονός που οδηγεί στην κυτταρική σύντηξη και τη διαμόρφωση πολυπύρηνων κυττάρων. Αντίστοιχοι φαινότυποι προκύπτουν και στα μεταλλαγμένα στελέχη RhoL παράλληλα με την κατάρρευση των συνδέσεων ανάμεσα στα κύτταρα της γενετικής σειράς με τα σωματικά, με αποτέλεσμα την εμφάνιση αλλοιώσεων του επιθηλίου των θυλακοκυττάρων. Επιπλέον, οι παραπάνω πρωτεϊνες σχετίζονται και με την εμφάνιση φαινοτύπου dumpless, καθώς μεταλλαγή αυτών αποτρέπει το σχηματισμό των κυτταροπλασματικών δεσμών ακτίνης στο στάδιο 10B (**Robinson and Cooley, 1997**).

2) **Rok κινάσες.** αποτελούν καταρροϊκούς στόχους των ενεργοποιημένων Rho GTPασών και στην περίπτωση της *Drosophila*, η ομόλογη πρωτεϊνική κινάση DRok είναι απαραίτητη σε πολλαπλές διαδικασίες της ωογένεσης, συμπεριλαμβανομένης 1) της ακεραιότητας της μεμβράνης του ωοκυττάρου, η οποία μπορεί να είναι υπεύθυνη για την αποτυχημένη έκκριση του συνδέτη του υποδοχέα EGFR των θυλακοκυττάρων, της πρωτεϊνης Gurken, 2) της εξαρτώμενης από την ακτίνη συγκράτησης των τροφοκυτταρικών πυρήνων, 3) του dumping, μέσω της ενδεχόμενης δράσης της κινάσης στην πρωτεϊνη αδουσίνη που συνδέεται με την ακτίνη, αλλά και στην ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης (sqh) που ευθύνεται για τη συστολή του συμπλόκου ακτίνης-μυοσίνης (εικ. 1.17), 4) της εγκαθίδρυσης της πολικότητας του ωοκυττάρου, καθώς η αποδιοργανωμένη ακτίνη δεν φαίνεται να είναι ικανή να αγκιστρώσει την πρωτεϊνη oskar στην οπίσθια πλευρά της μεμβράνης του ωοκυττάρου, 5) αλλά και της μεταφοράς των κυστιδίων της λεκίθου (**Verdier et. al., 2006**).

3) **Πρωτεϊνες HSP.** Μεταλλαγμένα στελέχη στην πρωτεϊνη Hsp60, εμφανίζουν μία σειρά σημαντικών αλλοιώσεων σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια καταλήγοντας ακόμα και σε στειρότητα στα ομόζυγα μεταλλαγμένα στελέχη. Οι διάφορες βλάβες γίνονται ορατές μετά τα στάδια 6-7, ανάμεσα στις οποίες περιλαμβάνονται: 1) η περιορισμένη πρόσφυση των θυλακοκυττάρων μετά τα στάδια 6-7, 2) η ευθραυστότητα της μεμβράνης των τροφοκυττάρων, 3) οι μεταβολές στα δακτυλιοειδή κανάλια, 4) η περιορισμένη ανάπτυξη της F-ακτίνης που περιβάλλει τους τροφοκυτταρικούς πυρήνες κατά το dumping, 5) η περιορισμένη ανίχνευση ακτίνης στα όρια των τροφοκυττάρων και η μη φυσιολογική συσσώρευση αυτής στο ωοκύτταρο, και τέλος, 6) η αποτυχημένη εγκαθίδρυση πολικότητας του ωοκυττάρου. Όλα τα παραπάνω είναι δυνατόν να

συνιστούν το αποτέλεσμα μεταβολών στην οργάνωση στοιχείων του κυτταροσκελετού και να σχετίζονται με αλλοιώσεις στην F-ακτίνη καθώς και στα μόρια της τουμπουλίνης τόσο στα θυλακοκύτταρα όσο και στα κύτταρα της γενετικής σειράς και μάλιστα σε σημεία πλησίον των πλασματικών μεμβρανών και των κέντρων οργάνωσης των μικροσωληνίσκων. Ο ρόλος της Hsp60, ενδέχεται να έχει σχέση με την ορθή αναδίπλωση και σταθεροποίηση στοιχείων του κυτταροσκελετού όπως της ακτίνης αλλά και των μορίων τουμπουλίνης, όπως έχει βρεθεί σε άλλους οργανισμούς (**Sarkar and Lakhotia, 2008**).

4) Πρωτεολιπιδικές πρωτεϊνες PLP. Ένα άλλο παράδειγμα μορίου που εκφράζεται σε ορισμένους πληθυσμούς των κυττάρων του επιθηλίου και εντοπίζεται στις πλασματικές μεμβράνες αποτελεί η πρωτεϊνη M6, που ανήκει στην οικογένεια των πρωτεολιπιδικών πρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα, τα πειραματικά δεδομένα μαρτυρούν μία χρονική απαίτηση για την έκφραση της πρωτεϊνης που συμπίπτει με τα στάδια αναδιαμόρφωσης του επιθηλίου, μετά το στάδιο 7. Τα πρώτα αποτελέσματα μεταβολών δράσης της πρωτεϊνης M6 γίνονται ορατά μετά το στάδιο 9. Η πρωτεϊνη M6 συμβάλλει στις διαδικασίες αναδιαμόρφωσης των μεμβρανών, στη διακυτταρική πρόσφυση, τις μεταβολές στο κυτταρικό σχήμα κ.ά. με αποτέλεσμα να καθίσταται απαραίτητη για τη διατήρηση ακεραιότητας του επιθηλίου. Στη διατήρηση αυτής της ακεραιότητας έχει βρεθεί ότι συμμετέχουν μόρια όπως τα σύμπλοκα καδερίνης-κατενίνης (**Tanentzapf et al., 2000**), η κινάση Ser/Thr dPak (**Conder et al., 2007**), αλλά και οι ιντεγκρίνες (**Fernandez-Minan et al., 2007**), ενώ τέλος έχει βρεθεί να σχετίζεται και με φαινότυπο dumpless (**Zappia et al., 2011**).



Εικόνα 1.17. Απεικόνιση του κυτταροσκελετού της ακτίνης (actin), μετά από χρώση φαλλοϊδίνης, σε ωοθυλάκια σταδίου 11 από στέλεχος αγρίου τύπου (wt) και μεταλλαγμένο στην κινάση *Drok* (*Drok^2*). Τα μικροϊνίδια της F-ακτίνης στο μεταλλαγμένο στέλεχος έχουν μικρότερο πάχος και μήκος (μεγάλο βέλος), ενώ αποτυγχάνουν να εκταθούν από τις μεμβράνες μέχρι το κέντρο των τροφοκυττάρων, δίνοντας φαινότυπο “dumpless”, σε σύγκριση με το στέλεχος wt (μικρό βέλος) (Ανατύπωση από Verdier et al., 2006).

5) Κινάσες Ser/Thr, όπως η Akt κινάση, η οποία αποτελεί συνιστώσα του σηματοδοτικού μονοπατιού InR/PI3K που ελέγχει την κυτταρική ανάπτυξη. Στη *Drosophila* ευθύνεται για την αναπτυξιακή πορεία των ωοθυλακίων, καθώς έλλειψη αυτής έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του κυτταρικού μεγέθους των θυλακοκυττάρων. Το τελικό μέγεθος των θυλακοκυττάρων μετά το στάδιο 7, αποκτάται μέσω των τριών κύκλων ενδομίτωσης (**Lilly and Spradling, 1996; Calvi et al., 1998**). Είναι πιθανό ότι η κινάση δρα άμεσα στη DNA σύνθεση ελέγχοντας με τον τρόπο αυτό το τελικό μέγεθος των θυλακοκυττάρων. Μη φυσιολογικό κυτταρικό μέγεθος που έχει ως αποτέλεσμα την ασυνέχεια του επιθηλίου εμπλέκεται στην ανάπτυξη και λειτουργικότητά του αποκαλύπτοντας τη σημασία της κυτταρικής αύξησης και του μεγέθους στην ορθή μορφογένεση του επιθηλίου (**Cavaliere et al., 2005**). Επίσης, η ενεργοποιημένη μορφή της κινάσης στον οπίσθιο πόλο του επιθηλίου καταλήγει σε καθυστέρηση της centripetal μετανάστευσης και τελικά σε φαινότυπο dumpless (**Cavaliere et al., 2005**).

6) **Μόρια κυτταρικής πρόσφυσης**. Η συντονισμένη δράση ανάμεσα στο επιθήλιο των θυλακοκυττάρων και τα υποκείμενα κύτταρα γενετικής σειράς απαιτεί μία ισχυρή διακυτταρική πρόσφυση. Ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών που εμπλέκεται στις διαδικασίες πρόσφυσης είναι το σύμπλοκο κατενίνης-καδερίνης που περιλαμβάνει τις Ν και Ε καδερίνες, τις α και β κατενίνες (**Peifer, 1995**). Η β-κατενίνη συνδέει την α-κατενίνη στην Ε-καδερίνη και η α-κατενίνη συνδέει το σύμπλοκο της καδερίνης στον κυτταροσκελετό της ακτίνης απευθείας είτε μέσω της α-ακτινίνης (**Peifer, 1995**). Το υπεύθυνο γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεϊνη β-κατενίνη είναι το armadillo, και μεταλλαγές αυτού συνδέονται με πλήθος φαινοτύπων τόσο στα ωοθυλάκια όσο και στο έμβρυο. Παραδείγματα αποτελούν οι φαινότυποι dumpless ως αποτέλεσμα της αδυναμίας συγκρότησης των δεσμών ακτίνης, η λάθος διευθέτηση του ωοκυττάρου, μεταβολές του κυτταρικού σχήματος, καθώς και αποσύνδεση των δακτυλιοειδών καναλιών από τις μεμβράνες. Το γονίδιο shotgun κωδικοποιεί την DE-καδερίνη και μεταλλαγές αυτού στα ωοθυλάκια έχουν ως αποτέλεσμα μεταβολές στην κυτταρική πρόσφυση, αλλά με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης να παραμένει ανέπαφος (**Robinson and Cooley, 1997**).

1.21.2 Συγκρότηση των δακτυλιοειδών καναλιών και λειτουργία

Τα δακτυλιοειδή κανάλια (ΔΚ) αυτά συνιστούν δομές ακτίνης με μεγάλο μέγεθος που διαμορφώνουν τις συνδέσεις ανάμεσα στα κύτταρα της γενετικής σειράς μέσω των οποίων καθίσταται εφικτή η μεταφορά του κυτταροπλασματικού υλικού (**Robinson and Cooley, 1996**). Το δακτυλιοειδές σχήμα των καναλιών οφείλεται σε αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στον κυτταροσκελετό της ακτίνης και των σχετιζομένων με αυτόν πρωτεϊνών. (**Robinson et al., 1994**). Τα ώριμα κανάλια αποτελούνται από έναν εξωτερικό δακτύλιο στενά συνδεδεμένο με την πλασματική μεμβράνη και έναν εσωτερικό λιγότερο ηλεκτρονιόπυκνο, ενώ θεωρούνται προϊόντα της αύλακας του κυτταρικού διαχωρισμού. Ο εξωτερικός δακτύλιος δημιουργείται μετά την τέταρτη μιτωτική διαίρεση στην περιοχή 1 του γερμαρίου ενώ η διαμόρφωση του εσωτερικού ολοκληρώνεται στην περιοχή 3 του γερμαρίου (**Robinson et al., 1994; Robinson and Cooley, 1997**). Τα ΔΚ συνιστούν δυναμικές δομές που αυξάνουν το μέγεθός τους κατά τη διάρκεια της ωογένεσης (**Robinson et. al., 1994**).

1.22 Τα βιοηλεκτρικά φαινόμενα στο βιολογικό σύστημα της ωογένεσης και ο ρόλος των ενδοκυτταρικών συγκεντρώσεων ιόντων Ca

Στο παρόν κεφάλαιο συνοψίζονται οι κυριότερες μελέτες σχετικά με την παρουσία συγκεκριμένων ενδογενών ιοντικών ρευμάτων, διαφορών δυναμικού και καταστάσεων πόλωσης των πλασματικών μεμβρανών στα κύτταρα του παρόντος βιολογικού συστήματος. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα παραπάνω βιοηλεκτρικά φαινόμενα χαρακτηρίζονται από σταδιοειδική και κυτταροειδική δράση, ενώ πιστεύεται ότι τα ιοντικά ρεύματα παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της φυσιολογικής ιοντικής ισορροπίας (**Bohrmann et al., 1986a; 1986b**), όπως και σε κρίσιμες διαδικασίες της αναπτυξιακής πορείας των ωοθυλακίων (**Woodruff and Telfer, 1980; De Loof, 1983; Overall and Jaffe, 1985**).

Κατά την κύρια περίοδο ανάπτυξης (στάδια 9-11), ένα συνεχές ρεύμα ιόντων φαίνεται να εισέρχεται στην περιοχή των τροφοκυττάρων και να εξέρχεται από το ωοκύτταρο (**Overall and Jaffe, 1985; Bohrmann et al., 1986a; 1986b**) δημιουργώντας βρόχους ρευμάτων που ξεκινούν από τα δακτυλιοειδή κανάλια και καταλήγουν στα τροφοκύτταρα και το ωοκύτταρο. Κύρια συνιστώσα του ρεύματος αυτού είναι η συγκέντρωση των ιόντων Na, και δευτερευόντως τα ιόντα Ca που φαίνεται να εμπλέκονται κατά τη διάρκεια του σταδίου 10 (**Overall and Jaffe, 1985**). Κατά τη χοριογενετική περίοδο (στάδια 12-14A), to εισερχόμενο ρεύμα του προσθίου πόλου παραμένει, αλλά στην πλειοψηφία των περιπτώσεων εισερχόμενα ρεύματα κάνουν την εμφάνισή τους στον οπίσθιο πόλο και την οπίσθιο-ραχιαία περιοχή, ενώ κύριος ρυθμιστής αυτών είναι τα ιόντα Cl. Στα προηγούμενα στάδια υπεύθυνο για το ρεύμα ήταν το πλασμαλήμμα του συγκυτίου των τροφοκυττάρων και του ωοκυττάρου, ενώ στην περίπτωση αυτή είναι το επιθήλιο των θυλακοκυττάρων. Ιοντικά ρεύματα παραμένουν και στο ωολήμμα αλλά επικαλύπτονται από αυτά του επιθηλίου (**Overall and Jaffe, 1985; Bohrmann et al., 1986a; 1986b**).

Τα εισερχόμενα ιοντικά ρεύματα των χοριογενετικών σταδίων σχετίζονται με περιοχές έντονης έκκρισης δομών. Τα πρόσθια και πρόσθιο-ραχιαία ιοντικά ρεύματα συνδέονται με το σχηματισμό των αναπνευστικών νηματίων και το κολλάρο αντιστοίχως (**King, 1970; Mahowald and Kambysellis, 1980; Margaritis et al., 1980**), ενώ η μη πάχυνση του χορίου στην οπίσθια ραχιαία πλευρά επίσης συμπίπτει με την παρουσία του αντιστοίχου ρεύματος. Με βάση τα παραπάνω θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι οι ενδογενείς ιοντικές συγκεντρώσεις εξυπηρετούν σε κάποιο βαθμό τη χοριογένεση.

Πιο συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις των ανιόντων του επιθηλίου είναι δυνατόν να διασφαλίζουν την απορρόφηση ύδατος από τις νεοσυντιθέμενες χοριονικές δομές (**Overall and Jaffe, 1985**). Τέλος, ενδέχεται οι ιοντικές συγκεντρώσεις να κατευθύνουν τις μεταναστεύσεις των πληθυσμών των θυλακοκυττάρων όπως αυτές έχουν περιγραφεί σε προηγούμενο κεφάλαιο (**Overall and Jaffe, 1985**).

Όσον αφορά στην κατάσταση πόλωσης των μεμβρανών και τις τιμές των ηλεκτρικών δυναμικών, οι Bohrmann και συν. (1986) αναφέρουν ότι η τιμή του δυναμικού στα κύτταρα των ωοθυλακίων υπόκειται σε ορμονικό έλεγχο, καθώς εξαρτάται από τη νεανική ορμόνη (juvenile-JH), τα επίπεδα της οποίας επηρεάζουν το δυναμικό του ωοκυττάρου και των τροφοκυττάρων αυτόνομα στα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια. Το ωοκύτταρο παρουσιάζεται υπερπολωμένο κυρίως στα στάδια 10B, 12 και 13, ενώ οι μεμβράνες των τροφοκυττάρων μόνο στο στάδιο 7. Είναι πιθανό, ότι το ωοκύτταρο στο στάδιο 14 δεν επηρεάζεται από την ορμόνη καθώς το χόριο αποτελεί ένα είδος φραγμού (**Bohrmann et al., 1986a;b**).

Αποπόλωση της μεμβράνης των τροφοκυττάρων, δηλαδή απώλεια του αρνητικού τους δυναμικού, παρατηρείται στα τελευταία στάδια της βιτελλογένεσης με την παρουσία της JH από το στάδιο 10B και στα επόμενα στάδια, φαινόμενο που δεν φαίνεται να συνδέεται με τη διαδικασία αδειάσματος του κυτταροπλάσματος (**Bohrmann, 1981; Bohrmann et al., 1986b**).

Μελέτες όμως αναφέρονται και στην τιμή δυναμικού των δακτυλιοειδών καναλιών του εντόμου, τα δεδομένα των οποίων είναι αντικρουόμενα. Οι διαφορές τους μπορούν να αποδοθούν στη διαφορετική σύσταση των μέσων που χρησιμοποιήθηκαν για την καταγραφή των μετρήσεων, με το δυναμικό των τροφοκυτταρικών μεμβρανών να επηρεάζεται σε μεγαλύτερο βαθμό σε σύγκριση με αυτό του ωοκυττάρου (**Singleton and Woodruff, 1994, Cole and Woodruff, 2000**).

Όπως έχει βρεθεί και στο έντομο *Hyalophora cecropia*, που εμφανίζει πολλές ομοιότητες με τη *Drosophila,* η πολικότητα ανάμεσα στο ωοκύτταρο και τα τροφοκύτταρα καθίσταται εφικτή μέσω της διαφοράς στην συγκέντρωση ιόντων Ca (**Woodruff et al., 1991; Woodruff and Telfer, 1994**), που εγκαθιδρύει ένα ηλεκτρικό δυναμικό εστιασμένο κατά μήκος των καναλιών που θεωρείται υπεύθυνο για την κατανομή των φορτισμένων πρωτεϊνών (**Cole and Woodruff, 1997**). Αυτό το ιοντικό ρεύμα μέσα από τη δράση του στις πρωτεϊνες του κυτοσολίου ενισχύει μεταβολές στην μεταγραφική δραστηριότητα του πυρήνα του ωοκυττάρου (**Woodruff et al., 1998**). Στην περίπτωση της *Drosophila*, όπου έχει καταμετρηθεί μία σταθερή διαφορά δυναμικού 2.5mV ανάμεσα στα τροφοκύτταρα και το ωοκύτταρο, με το τελευταίο να είναι θετικά φορτισμένο σε σύγκριση με τα τροφοκύτταρα (**Woodruff et al., 1988**).

Ενδεικτικά τέλος, μπορούμε να αναφερθούμε στη συμβολή συγκεκριμένων αντλιών στην ανάπτυξη των βιοηλεκτρικών φαινομένων που διέπουν το παρόν βιολογικό σύστημα, όπως είναι η περίπτωση της Na-K ATPάσης, και της αντλίας πρωτονίων, V-ATPάσης, η εξειδικευμένη κατανομή και ενεργότητα των οποίων διαφέρει ανάλογα την φάση ανάπτυξης και τον κυτταρικό τύπο των ωοθυλακίων, ενώ εμφανίζει εξάρτηση από τα επίπεδα της JH καθώς και της 20-υδρόξυεκδυσόνης (**Bohrmann, 1991; Bohrmann and Braun, 1999**).

Όσον αφορά στις ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις των ιόντων Ca, αυτές φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο σε πλήθος λειτουργιών του συστήματος της ωογένεσης, όπως: 1) τη μετανάστευση των θυλακοκυττάρων προς το κέντρο του ωοθυλακίου (centripetal migration) (**Heinrich and Gutzeit, 1985**), 2) για τη συστολή ακτίνης-μυοσίνης κατά το τροφοκυτταρικό άδειασμα (**Wheatley et al., 1995, Νέζης, 2002**), 3) την διακυτταρική επικοινωνία μέσω χασμοδεσμών (**Bohrmann and Assenbaum, 1993**), αλλά και μέσω μορίων κυτταρικής πρόσφυσης, όπως καδερίνες (**Zartman et al., 2009**), επικοινωνία κρίσιμη σε ορισμένες περιπτώσεις για τη μετάδοση σημάτων επιβίωσης ή διατήρησης της αδιαφοροποίητης κατάστασης των προγονικών κυττάρων (**Wu et al., 2008**), αλλά και για τη μορφογένεση του επιθηλίου (**Zartman et al., 2009**), 4) στην ενεργότητα διαφόρων πρωτεϊνικών μορίων και κυρίως αυτών που συνδέονται με την ακτίνη (**Matova et al., 1999**), 5) όσο και στη σύνθεση της νεοτενίνης, την εξαρτώμενη από τους υποδοχείς NMDA στα αλλαντοειδή σωμάτια. Αν υποθέσουμε ότι τα κύτταρα των αλλαντοειδών σωματίων απελευθερώνουν ιόντα Ca, η μείωση της κυτταροπλασματικής συγκέντρωσης των ιόντων θα έχει ως αποτέλεσμα την περιορισμένη σύνθεση της νεανικής ορμόνης JH (**Rachinsky et. al., 1994**), ορμόνη η οποία δρα ανασταλτικά του επαγομένου θανάτου όπως έχει καταγραφεί σε συνθήκες ανεπαρκούς τροφής (**Terashima et. al., 2005**), και στη σύνθεση της οποίας έχει βρεθεί ότι συμμετέχουν οι υποδοχείς NMDAR με υψηλό βαθμό ευαισθησίας στα ιόντα Ca (**Chiang et. al., 2002**). Ήδη από πολύ παλαιότερες μελέτες είναι γνωστό ότι η μετάβαση από τα προβιτελλογενετικά στα βιτελλογενετικά στάδια εξαρτάται από την ισορροπία ανάμεσα στην εκδυσόνη και την JH (**Soller et. al., 1999**). Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί η κρίσιμη συμμετοχή της συγκεκριμένης ορμόνης τόσο στην ενεργότητα ορισμένων καναλιών-αντλιών (**Bohrmann, 1991**), όπως και στην σταδιοειδική κατάσταση πόλωσης των πλασματικών μεμβρανών (**Bohrmann, 1981**).

1.23 Σκοπός της παρούσας διατριβής

Σύμφωνα με τα ευρήματα προηγουμένων μελετών του εργαστηρίου μας (**Panagopoulos et al., 2004**), η **συνεχής** ημερήσια έκθεση διάρκειας **6 λεπτών** του εντόμου στη διαμορφωμένη, από την ανθρώπινη ομιλία, ακτινοβολία του συστήματος GSM-900MHz κινητής τηλεφωνίας, κατά τη διάρκεια των πρώτων 5 ημερών της ενήλικης ζωής του, προκαλεί σημαντική μη-θερμική **μείωση της αναπαραγωγικής του ικανότητας/μέσης ωοτοκίας**, όπως αυτή προσδιορίζεται από τον αριθμό χρυσαλίδων της πρώτης θυγατρικής γενιάς.

Για το λόγο αυτό, η παρούσα διατριβή επικεντρώθηκε στη διερεύνηση, σε **κυτταρικό επίπεδο**, της αιτίας, που ευθύνεται για την παρατηρούμενη μείωση της αναπαραγωγικής ικανότητας των εντόμων.

Όπως προαναφέρθηκε, το αναπτυξιακό σύστημα της ωογένεσης ανταποκρίνεται σε διαφόρους παράγοντες στρες, όπως στέρηση τροφής ή έκθεση σε χημικούς τοξικούς παράγοντες, με την επαγωγή κυτταρικού θανάτου στα δύο σημεία ελέγχου της διαδικασίας, καταλήγοντας στον εκφυλισμό και την απομάκρυνση των αλλοιωμένων ωοθυλακίων (**Drummond-Barbosa and Spradling, 2001; Nezis et al., 2000; McCall, 2004**).

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε κατά πόσο **η έκθεση στην ακτινοβολία των κινητών τηλεφώνων** αποτελεί έναν ακόμη **παράγοντα στρες ικανό να προκαλέσει τον επαγόμενο θάνατο** στα κύτταρα των ωοθυλακίων**.** Για τον σκοπό αυτό, εξετάστηκαν ωοθυλάκια των **αναπτυξιακών σταδίων της πρώιμης και μέσης ωογένεσης (στ. 1-10),** προερχόμενα από ωοθήκες εκτεθειμένων εντόμων (***in vivo*** έκθεση) στα GSM πεδία κοινών κινητών τηλεφώνων. Η μελέτη εστιάστηκε στα δύο κύρια χαρακτηριστικά αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου, αποδόμηση του **DNA** και αποδιοργάνωση του **κυτταροσκελετού της ακτίνης.** Παράλληλα, εξετάστηκε το ενδεχόμενο εμφάνισης και άλλου τύπου **αλλοιώσεων**, πλην των χαρακτηριστικών του επαγομένου κυτταρικού θανάτου, στα κύτταρα των ωοθυλακίων της **όψιμης ωογένεσης** (στ. 11-14), ενώ τέλος, σε μία απόπειρα διαπίστωσης αντίστοιχου βαθμού ευαισθησίας του συστήματος απέναντι στον παράγοντα έκθεσης στην ακτινοβολία και σε συνθήκες ***in vitro***, μελετήσαμε τις αλλοιώσεις του δικτύου της ακτίνης σε απομονωμένα ωοθυλάκια που εκτέθηκαν στο πεδίο κατά την *in vitro* ανάπτυξή τους στα τελευταία στάδια της ωογένεσης (στ. 11-13).

Ταυτόχρονα, εφαρμόζοντας διαφορετικά συστήματα έκθεσης, κατέστη δυνατή η μελέτη ορισμένων παραμέτρων της ακτινοβολίας (αριθμός δόσεων, διάρκεια και ένταση έκθεσης) ως προς τον τρόπο που αυτές καθορίζουν το τελικό βιολογικό αποτέλεσμα. Ελλείψει δεδομένων συγκριτικών βιολογικών επιδράσεων ανάμεσα στη **συνεχή και τη διακοπτόμενη έκθεση** στα πεδία συχνοτήτων κινητής τηλεφωνίας, και με περιορισμένα στοιχεία μόνο από πεδία πολύ χαμηλών συχνοτήτων (ELF) (**Ivancsits et al., 2002**), ένα μεγάλο μέρος της εργασίας αφιερώθηκε στη σύγκριση αυτή, με την εφαρμογή πρωτοκόλλων έκθεσης ίδιας συνολικής χρονικής διάρκειας, αλλά σε διαφορετικούς συνδυασμούς αριθμού δόσεων ακτινοβολίας και ενδιαμέσων διαστημάτων διακοπής. Στόχος της διερεύνησης ήταν η **αποκάλυψη ή μη της αθροιστικής επίδρασης** της συγκεκριμένης ακτινοβολίας, καθώς και η ενδεχόμενη **απόκριση** του συστήματος, υπό ορισμένες συνθήκες, απέναντι σε αυτόν τον παράγοντα στρες.

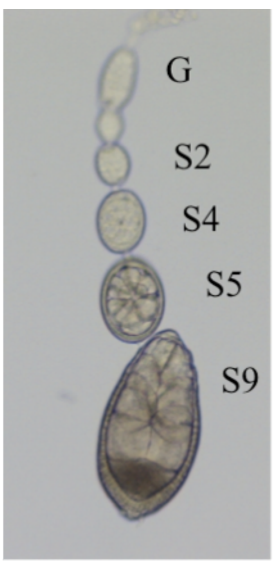
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Βιολογικό υλικό

Σαν βιολογικό υλικό στην παρούσα διατριβή επιλέχθηκε το έντομο *Drosophila melanogaster*, Oregon R, wild type, για λόγους επέκτασης προηγουμένων ερευνητικών εργασιών του εργαστηρίου μας, αλλά και για τα πλεονεκτήματα που διαθέτει αυτός ο οργανισμός όπως έχει ήδη αναφερθεί στην Εισαγωγή της παρούσας εργασίας.

Ο κύκλος ζωής του εντόμου, όπως έχει ήδη αναλυθεί στην Εισαγωγή της παρούσας διατριβής, αποτελείται από διακριτά στάδια, τα οποία είναι δυνατόν σε σχετικά σταθερές συνθήκες περιβάλλοντος να είναι σε κάποιο βαθμό συγχρονισμένα. Σε αυτή την ιδιότητα, και συγκεκριμένα στο συγχρονισμό ως προς τη σεξουαλική ωρίμανση των νεοεκδυθέντων εντόμων και εν συνεχεία στην αναπτυξιακή περίοδο από το στάδιο απόθεσης του αυγού μέχρι και το στάδιο της χρυσαλίδας, βασίστηκαν τα πρωτόκολλα της αναπαραγωγικής ικανότητας του εντόμου, μέτρο της οποίας αποτέλεσε ο αριθμός χρυσαλίδων της πρώτης θυγατρικής γενιάς που εκφράζεται και ως μέση ωοτοκία ανά μητρικό έντομο (**Παναγόπουλος, 2001; Panagopoulos et al., 2004**)

Η διεξαγωγή της μελέτης στο επίπεδο ωογένεσης του εντόμου, πραγματοποιήθηκε κατά κύριο λόγο στα ωοθυλάκια της πρώιμης και μέσης ωογένεσης (εικ. 2.1), και σε πιο περιορισμένο βαθμό στα ωοθυλάκια της όψιμης ωογένεσης (εικ. 2.2), μετά τη χρήση διαφόρων αντιδραστηρίων και παρατήρηση στο μικροσκόπιο. Τα ωοθυλάκια προήλθαν από την ανατομία σε ωοθήκες θηλυκών εντόμων.



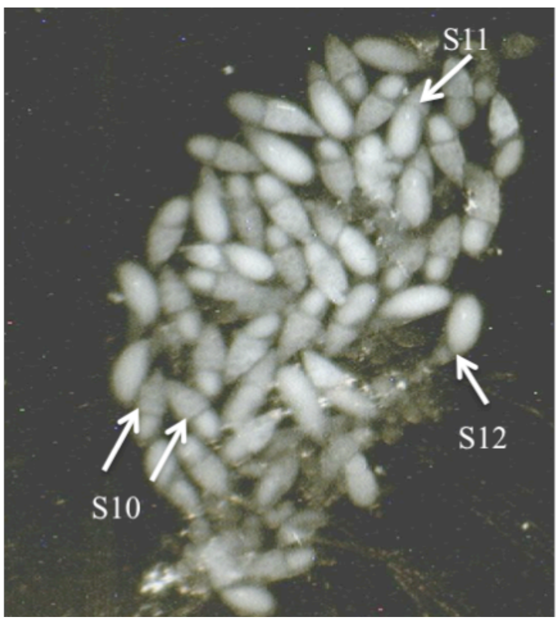
Εικόνα 2.1. Φωτογραφία φωτονικού μικροσκοπίου ωοθηκαρίου με ωοθυλάκια διαφόρων αναπτυξιακών σταδίων της πρώιμης και μέσης ωογένεσης, από το στάδιο του γερμαρίου (G) μέχρι και το στάδιο 9 (S9), μετά από ανατομία στην ωοθήκη ενός εντόμου *Drosophila melanogaster.*

2.1.1 Διατήρηση της καλλιέργειας

Ο πληθυσμός του εντόμου αναπτύχθηκε σε αποστειρωμένες γυάλες είτε σε αποστειρωμένους πλαστικούς σωλήνες καλλιέργειας που περιείχαν τροφή. Οι πλαστικοί σωλήνες χρησιμοποιούνται ως έχουν, ενώ οι γυάλες πριν την παρασκευή της τροφής αποστειρώνονται σε κλίβανο θερμοκρασίας 150 ^oC για 2h. Ο πληθυσμός διατηρήθηκε σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 23-25^0C, υγρασίας 60-80% και με δωδεκάωρη εναλλαγή φωτός-σκότους. Σημειώνεται ότι, δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή, με συχνές μετρήσεις ανά τακτά χρονικά διαστήματα, ώστε να αποφευχθεί κάθε ενδεχόμενο έκθεσης της καλλιέργειας του εντόμου σε οποιαδήποτε πηγή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας.

2.1.2 Θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη των εντόμων

Μία δόση τροφής αποτελείται από 4g άγαρ, 13 g μαγιά, 32 g ριζάλευρου, 16 g ζάχαρης, 25 g τοματοπολτού, 2 ml αιθανόλης και 2 ml προπιονικού οξέος, διαλυμένα σε 450 ml νερού. Μετά την παρασκευή και τη στερεοποίηση της τροφής σε θερμοκρασία δωματίου, σε κάθε σωλήνα προστίθενται μία σταγόνα αιθανόλης και μία σταγόνα προπιονικού οξέος στους γυάλινους σωλήνες και περίπου 4 στις γυάλες. Όταν η τροφή χρησιμοποιείται σε πειράματα για την αύξηση της ωοτοκίας των εντόμων, στην τροφή προστίθεται 1 σταγόνα πυκνής μαγιάς διαλυμένης σε νερό σε κάθε σωλήνα 12-16 ώρες πριν την ανατομία. Οι σωλήνες με την τροφή φυλάσσονται στους 4^0C.



Εικόνα 2.2. Φωτογραφία στερεοσκοπίου μετά από ανατομία και απομόνωση ωοθυλακίων διαφόρων σταδίων μέσης (S10) και όψιμης ωογένεσης (S11, S12).

2.2 Απομόνωση ωοθυλακίων

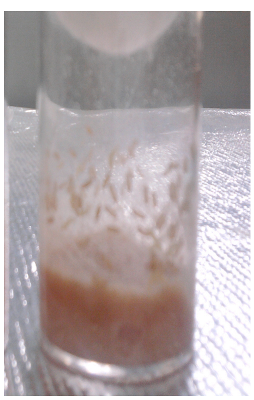
Η ανατομία των θηλυκών εντόμων πραγματοποιείται με τη βοήθεια κατάλληλου στερεοσκοπίου (Zeiss stereo IV με ειδική διάταξη προσπίπτοντος ψυχρού φωτισμού) σε διάλυμα Ringer's (**Ephrussi and Beadle, 1936**), το οποίο είναι ισότονο με την αιμολέμφο του εντόμου και έχει την ακόλουθη σύσταση: 0,75% NaCl 0,02% $CaCl_2$, 0,01% KCl, 0,02% $NaHCO_3$ διαλυμένα σε απεσταγμένο νερό. Με το διάλυμα αυτό δεν έχουμε ωσμωτικά φαινόμενα και άρα κίνδυνο διάρρηξης των ωοθυλακίων. Σε πρώτη φάση συλλέγονται οι ωοθήκες των εντόμων και στη συνέχεια διαχωρίζονται τα ωοθυλάκια. Η διαδικασία της ανατομής και συλλογής των ωοθυλακίων πραγματοποιείται με τη χρήση ειδικών λαβίδων και βελόνων ανατομίας, ενώ η μεταφορά τους πραγαματοποιείται με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur σε γυάλινα αντικειμενοφόρα σκεύη για την επώση των ωοθυλακίων με τα διάφορα αντιδραστήρια.

Παράλληλα κατά την ανατομία εξετάζεται η μορφολογία, το μέγεθος και η δομή των διαχωρισμένων ωοθυλακίων.

2.3 Πειραματικά πρωτόκολλα μελέτης επίδρασης της ακτινοβολίας κινητού τηλεφώνου στην αναπαραγωγική ικανότητα και ωογένεση του εντόμου *D. melanogaster*

2.3.1 Πρωτόκολλο μελέτης επίδρασης της ακτινοβολίας στην αναπαραγωγική ικανότητα του εντόμου D. melanogaster

1. Συλλογή νεοεκδυθέντων 4-6 h εντόμων *Drosophila melanogaster*, Oregon R, wild type
2. Διαχωρισμός κατάλληλου αριθμού εντόμων, με τη βοήθεια αναισθητοποίησης με αιθέρα, σε αρσενικά και θηλυκά άτομα και τοποθέτηση αυτών σε χωριστούς σωλήνες με τροφή κατά τη διάρκεια των 2 πρώτων 24ώρων της ενήλικης ζωής τους. Η έκθεση στο πεδίο πραγματοποιείται 1h μετά την αναισθητοποίηση. Ακολουθεί η ημερήσια έκθεση την επόμενη μέρα ($2^{ο}$ 24ωρο).
3. Διασταύρωση των εντόμων (10 αρσενικών και 10 θηλυκών της ίδιας ομάδας) σε κοινούς σωλήνες με καινούρια τροφή και παραμονή σε αυτούς για τα επόμενα 3 24ωρα της ζωής τους (απόθεση αυγών μετά το πρώτο 24ωρο της διασταύρωσης). Κατά τη διάρκεια των 3 24ώρων πραγματοποιείται η ημερήσια έκθεση στο πεδίο των κινητών τηλεφώνων.
4. Απομάκρυνση των πατρικών εντόμων και διατήρηση των σωλήνων στο θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας για τα επόμενα 6-8 24ωρα (ανάπτυξη θυγατρικών χρυσαλίδων). Η έκθεση των ομάδων στο πεδίο σταματά μετά την απομάκρυνση των πατρικών εντόμων.
5. Καθημερινή καταμέτρηση των θυγατρικών χρυσαλίδων όλων των ομάδων με ταυτόχρονη απομάκρυνση των ενηλίκων εντόμων, που προκύπτουν, μέχρι την ολοκλήρωση των 4 ημερών της καταμέτρησης.



Εικόνα 2.3. Οι θυγατρικές χρυσαλίδες απομακρυσμένες από την τροφή μετά την ολοκλήρωση της εμβρυογένεσης και κατά τη διάρκεια της μεταμόρφωσης, ακινητοποιημένες και ακινητοποιημένες στα τοιχώματα ενός σωλήνα καλλιέργειας του εντόμου.

<u>2.3.1.1 Ειδικοί χειρισμοί</u>

Η επιτυχία του πειραματικού πρωτοκόλλου μελέτης της Αναπαραγωγικής Ικανότητας του εντόμου βασίζεται σε κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά όπως:

1. Στην επίτευξη συγχρονισμού των εντόμων. Νωρίς το πρωί την ημέρα έναρξης του πειράματος πραγματοποιείται σχολαστική απομάκρυνση όλων των ενηλίκων

εντόμων από τις γυάλες του πληθυσμού, προκειμένου να καταστεί δυνατή η συλλογή νεοεκδυθέντων εντόμων εντός ολίγων ωρών.

2. Διατηρούμε χωριστά τα αρσενικά από τα θηλυκά έντομα κατά τα πρώτα 2 24ωρα της ζωής τους μέχρις ότου ωριμάσουν σεξουαλικά και είναι έτοιμα για άμεση διασταύρωση.
3. Τα έντομα (αρσενικά και θηλυκά της ίδιας ομάδας) τοποθετούνται σε κοινούς νέους σωλήνες και είναι έτοιμα για άμεση διασταύρωση και απόθεση αυγών μετά από ένα 24ωρο (δεύτερο σημείο επίτευξης συγχρονισμού των εντόμων ως προς την απόθεση των αυγών τους).
4. Αφήνουμε τα έντομα να γεννήσουν μόνο για 3 24ωρα καθώς στο διάστημα αυτό σημειώνεται το μέγιστο της αναπαραγωγικής τους ικανότητας και άρα ελαχιστοποιούνται οι πιθανότητες να αποτεθούν αυγά στην τροφή τα οποία δεν πρόκειται να εξελιχθούν περαιτέρω σε χρυσαλίδες. Οι σωλήνες διατηρούνται στο θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας για 6-8 ημέρες προκειμένου μέσα σε αυτό το διάστημα να αναπτυχθούν και να καταμετρηθούν οι θυγατρικές χρυσαλίδες όλων των ομάδων.
5. Η καταμέτρηση των θυγατρικών χρυσαλίδων πραγματοποιείται μετά την παρέλευση των 6-8 24ώρων από τη στιγμή της απομάκρυνσης των πατρικών εντόμων, όταν έχουν αρχίσει να εκδύονται ενήλικα έντομα και να καθίσταται δυνατή η καταμέτρηση όλων των χρυσαλίδων (σε αυτή τη φάση όλα τα αυγά έχουν φτάσει στο στάδιο της χρυσαλίδας). Η επιλογή των νεοεκδυθέντων εντόμων για την πραγματοποίηση των πειραμάτων παράλληλα με την μικρής διάρκειας παραμονή αυτών, μόνο 3 24ωρα στους σωλήνες με στόχο την αναπαραγωγή τους κατά τη διάρκεια των οποίων εμφανίζεται το μέγιστο της αναπαραγωγικής τους ικανότητας, μας επιτρέπει να θεωρήσουμε ότι η καταμέτρηση των θυγατρικών χρυσαλίδων αντιστοιχεί στον αριθμό των γεννημένων αυγών, δηλαδή στην τιμή της μέσης ωοτοκίας ανά μητρικό έντομο.

2.3.2 Πρωτόκολλα μελέτης επίδρασης της ακτινοβολίας στη διαδικασία ωογένεσης του εντόμου D. melanogaster

- Τα πατρικά έντομα των πειραματικών πρωτοκόλλων της αναπαραγωγικής ικανότητας, μετά την απομάκρυνσή τους από τους σωλήνες με την ολοκλήρωση του 5ου 24ώρου της πειραματικής διαδικασίας τοποθετούνται σε νέο σωλήνα με φρέσκια τροφή και μία σταγόνα μαγιάς (επαγωγή της ωογένεσης). Ακολουθεί μία ακόμη ημερήσια έκθεση, καθώς και μία τελευταία έκθεση την επόμενη ημέρα λίγες ώρες πριν την ανατομία και τη λήψη των ωοθυλακίων.
- Σημειώνεται ότι, σύμφωνα με τις πειραματικές μας ενδείξεις, η επίδραση της ακτινοβολίας είναι σχετικά άμεση, που σημαίνει ότι τα αποτελέσματά της ανιχνεύονται εντός ολίγων ωρών μετά την έκθεση (3-5h), ενώ μετά το πέρας των 9h από την τελευταία έκθεση στο πεδίο δεν είναι πλέον ανιχνεύσιμα, καθώς μέχρι τότε τα υπολείμματα των κατεστραμμένων ωοθυλακίων έχουν φαγοκυτταρωθεί από γειτονικά κύτταρα.
- Οι τεχνικές που ακολουθούνται προκειμένου να διαπιστωθεί η ενδεχόμενη δράση της ακτινοβολίας στην επαγωγή κυτταρικού θανάτου αναφέρονται στις

παραγράφους 2.4.1-2.4.7, ενώ για άλλου τύπου αλλοιώσεις στις παραγράφους 2.4.8 και 2.5.

2.3.3 Πρωτόκολλο In vitro ανάπτυξης ωοθυλακίων του εντόμου

Η ανατομία των θηλυκών εντόμων λαμβάνει χώρα σε κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας (25^0 C) σε θρεπτικό υλικό Schneider's (GIBCO/BRL, Cergy-Pontoise, France) που περιέχει απαραίτητα συστατικά για την *in vitro* ανάπτυξη των ωοθυλακίων από το αρχικό στάδιο 11 στο στάδιο 14 (**Petri et al., 1979; Νέζης 2002**). Για το σκοπό αυτό συλλέγουμε σε σύντομο χρονικό διάστημα ωοθυλάκια, από έντομα ηλικίας 3-4 ημερών, αρχικών σταδίων 11, λίγα σε αριθμό για κάθε δείγμα, και τα επωάζουμε στο θρεπτικό μέσο για 3 h. Σε αυτό το χρονικό διάστημα αναμένεται η ανάπτυξη του 75% περίπου των ωοθυλακίων σταδίου 11 στα στάδια 12-13, ενώ μεγαλύτερο διάστημα επώασης απαιτείται για την ολοκλήρωση της ανάπτυξης μέχρι και το στάδιο 14. Η επώαση πραγματοποιείται εντός καλυμμένου δοχείου με εμποτισμένα με dH_2O διηθητικά χαρτιά, προκειμένου να διατηρηθούν κατάλληλες συνθήκες υγρασίας. Σε ένα ποσοστό περίπου 25% η ανάπτυξη δεν ολοκληρώνεται ακόμα και όταν τα τροφοκύτταρα παρουσιάζουν χαρακτηριστικά κυτταρικού θανάτου. Το ποσοστό αυτό αποδίδεται σε τυχαίους τραυματισμούς των ωοθυλακίων κατά την ανατομία, είτε στην τοπική έλλειψη θρεπτικών στοιχείων του μέσου (**Νέζης, 2002; Nezis et al., 2006**). Τα ωοθυλάκια μετά από κατάλληλη χρώση παρατηρούνται στο μικροσκόπιο φθορισμού.

2.4 Φωτονική μικροσκοπία

Για την παρατήρηση των παρασκευασμάτων χρησιμοποιήθηκαν:

- Φωτονικό μικροσκόπιο φθορισμού Nikon Eclipse TE-2000 (ανάστροφο)
- Συνεστιακό σαρωτικό μικροσκόπιο laser (Confocal laser Scanning Microscope/CLSM) Nikon PCM 2000 (lasers: **πράσινο**-488-515nm, **κόκκινο**-543-565nm)

2.4.1 Χρώση με πορτοκαλί της ακριδίνης (A.O.)

Για τη διαπίστωση της ενδεχόμενης επίδρασης της ακτινοβολίας στο DNA των κυττάρων των ωοθυλακίων εφαρμόστηκε η χρώση πορτοκαλί της ακριδίνης. Η χρωστική αυτή συνδέεται με το DNA, με αποτέλεσμα όταν χρησιμοποιείται σε ζωντανό ιστό (χωρίς μονιμοποίηση), να είναι δείκτης του αποδομημένου DNA, δηλαδή δείκτης κυτταρικού θανάτου. Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται σε μονιμοποιημένο ιστό λειτουργεί ως πυρηνική χρωστική, όπως συμβαίνει με τη χρήση άλλων χρωστικών π.χ. propidium iodide, DAPI, Hoescht.

Τα στάδια της τεχνικής είναι τα εξής:

1. Ανατομία σε διάλυμα Ringer's 2-4 ωοθήκες
2. Μεταφορά των ωοθηκών σε διάλυμα Ringer's που περιέχει $1.6x10^{-6}$ M πορτοκαλί της ακριδίνης (Invitrogen, USA, A3568). Τα ωοθυλάκια ξεχωρίζονται πολύ προσεκτικά και συγχρόνως πολύ γρήγορα στο διάλυμα της χρωστικής, ενώ στη συνέχεια επωάζονται για ακόμα 3-4 min στο σκοτάδι υπό συνεχή ανακίνηση.
3. Αλλαγή του διαλύματος χρωστικής με φρέσκο διάλυμα Ringer's και ξέπλυμα για 4 min στο σκοτάδι υπό συνεχή ανακίνηση
4. Μεταφορά των ωοθυλακίων σε vidal αντικειμενοφόρο πλάκα σε νέο διάλυμα Ringer's
5. **5.** Άμεση παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού ή CLSM

2.4.2 Χρώση με τη διαδικασία TUNEL

Ομοίως, όπως και στην περίπτωση της χρώσης με πορτοκαλί της ακριδίνης, η τεχνική TUNEL χρησιμοποιήθηκε για τη διερεύνηση της επίδρασης της ακτινοβολίας στο DNA. Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται σε μονιμοποιημένο ιστό και όχι σε ζωντανό όπως στην περίπτωση της ακριδίνης. Η συγκεκριμένη μέθοδος στηρίζεται στο γεγονός ότι, κατά την αποδόμηση του DNA από τις πυρηνικές νουκλεάσες (DNάσες) δημιουργούνται 3'-OH ελεύθερα άκρα. Το ένζυμο τελική τρανσφεράση (TdT) προσθέτει dUTP στα ελεύθερα 3' άκρα. Η dUTP είναι συνήθως συζευγμένη με φλουορεσκίνη (FITC), επομένως με τον τρόπο αυτό, όπου υπάρχει αποδομημένο DNA (π.χ. κατά την απόπτωση των τροφοκυττάρων των ωοθυλακίων) αυτό ανιχνεύεται ως θετικό σήμα στο μικροσκόπιο φθορισμού. Η χρώση TUNEL αποτελείται από τα ακόλουθα στάδια:

- Ανατομία σε διάλυμα Ringer's
- Μονιμοποίηση σε διάλυμα 4% φορμαλδεϋδης (Polysciences, Inc., Warrington, PA, 18814) σε PBS που περιέχει 0.1% Triton X-100 (Sigma Chemical Co., Germany).για 30 min υπό συνεχή ανακίνηση (όπως συμβαίνει και σε όλα τα υπόλοιπα στάδια)
- Αλλαγή του διαλύματος με PBS (Invitrogen, USA, 70013-016) για 3 φορές και στη συνέχεια ξέπλυμα με PBS 2X5 min
- Επώαση σε διάλυμα PBS που περιέχει 20μg/ml proteinase K για 10 min
- Ξέπλυμα με PBS 3X5 min
- Επώαση στο TUNEL reaction mix Roche, Mannheim, Germany, 11684795910) για 3 ώρες στους 37^o C στο σκοτάδι
- Ξέπλυμα με PBS 2X10 min, 2X15 min, 2X20 min στο σκοτάδι
- Κάλυψη με antifading mounting medium (Sigma Chemical Co., Germany) και καλυπτρίδα
- Παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού ή CLSM

2.4.3 Χρώση Φαλλοϊδίνης συνδεδεμένης με ροδαμίνη

Προκειμένου να διερευνηθεί κατά πόσο η ακτινοβολία προκαλεί αλλοιώσεις στον κυτταροσκελετό της ακτίνης χρησιμοποιήθηκε η χρώση φαλλοϊδίνης συνδεδεμένης με ροδαμίνη. Η φαλλοϊδίνη είναι ένα αλκαλοειδές που σταθεροποιεί τη νηματιακή ακτίνη. Έτσι, όταν είναι συνδεδεμένη με φθορίζον μόριο (όπως ροδαμίνη) απεικονίζει την κατανομή της νηματιακής ακτίνης στο κύτταρο. Η χρώση αυτή εφαρμόστηκε στα ωοθυλάκια ως εξής:

- Ανατομία σε διάλυμα Ringer's
- Μονιμοποίηση σε διάλυμα 4% φορμαλδεϋδης σε PBS για 20 min υπό συνεχή ανακίνηση
- Μετα-μονιμοποίηση σε δ/μα 4% φορμαλδεϋδης σε PBS που περιέχει 0.1% Triton X-100 για 35 min υπό συνεχή ανακίνηση (όπως συμβαίνει και σε όλα τα υπόλοιπα στάδια)
- Χρώση σε διάλυμα που περιέχει 5λ φαλλοϊδίνης (Invitrogen, USA, R415) σε 995λ PBS
- Αλλαγή του διαλύματος με PBS για 3 φορές και στη συνέχεια ξέπλυμα με PBS 3X5 min

- Κάλυψη με antifading mounting medium και καλυπτρίδα
- Παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού ή CLSM

2.4.4 Διπλή Χρώση φαλλοϊδίνης συδεδεμένης με ροδαμίνη και TUNEL

Προκειμένου να διαπιστωθεί η συνύπαρξη των δύο χαρακτηριστικών κυτταρικού θανάτου στα ίδια ωοθυλάκια, που έχουν αλλοιωθεί από την έκθεση στην ακτινοβολία, χρησιμοποιήθηκε η διπλή χρώση φαλλοϊδίνης συνδεδεμένης με ροδαμίνη (αποδιοργάνωση του κυτ/τού της ακτίνης) και TUNEL (θρυμματισμός DNA). Τα στάδια είναι τα ακόλουθα:

- Ανατομία σε διάλυμα Ringer's
- Μονιμοποίηση σε διάλυμα 4% φορμαλδεϋδης σε PBS για 20 min υπό συνεχή ανακίνηση
- Μετα-μονιμοποίηση σε διάλυμα 4% φορμαλδεϋδης σε PBS που περιέχει 0.1% Triton X-100 για 35 min υπό συνεχή ανακίνηση (όπως συμβαίνει και σε όλα τα υπόλοιπα στάδια)
- Χρώση σε διάλυμα που περιέχει 5λ φαλλοϊδίνης σε 995λ PBS
- Αλλαγή του διαλύματος με PBS για 3 φορές και στη συνέχεια ξέπλυμα με PBS 3X5 min
- Επώαση σε διάλυμα PBS που περιέχει 20μg/ml proteinase K για 10 min
- Ξέπλυμα με PBS 3X5 min
- Επώαση στο TUNEL reaction mix για 3 ώρες στους 37^o C στο σκοτάδι
- Ξέπλυμα με PBS 2X10 min, 2X15 min, 2X20 min στο σκοτάδι
- Κάλυψη με antifading mounting medium και καλυπτρίδα
- Παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού ή CLSM. Η παρατήρηση και λήψη εικόνας με τα δύο χαρακτηριστικά ταυτόχρονα κατέστη δυνατή με την ταυτόχρονη χρήση και των δύο πηγών lasers (πράσινο: 488-515 nm, κόκκινο: 543-565nm) στο CLSM.

2.4.5 Χρώση με ιωδιούχο προπίδιο (PI)

Για τη διερεύνηση επίδρασης της ακτινοβολίας στην πυρηνική χρωματίνη εφαρμόστηκε η χρώση με ιωδιούχο προπίδιο. Η χρωστική ιωδιούχο προπίδιο είναι ουσία που δένεται στο DNA του πυρήνα και έτσι χρησιμοποιείται ευρύτατα για την απεικόνιση των πυρήνων των κυττάρων και την ανίχνευση συμπυκνωμένης πυρηνικής χρωματίνης. Η χρώση αυτή εφαρμόστηκε στα ωοθυλάκια ως εξής:

- Ανατομία σε διάλυμα Ringer's
- Μονιμοποίηση σε διάλυμα 4% φορμαλδεΰδης σε PBS για 30 min υπό συνεχή ανακίνηση
- Μετα-μονιμοποίηση σε διάλυμα 4% φορμαλδεΰδης σε PBS που περιέχει 0.1% Triton X-100 για 25 min υπό συνεχή ανακίνηση
- Αλλαγή του διαλύματος με PBS για 3 φορές και στη συνέχεια ξέπλυμα με PBS 3x5 min υπό συνεχή ανακίνηση
- Επώαση σε διάλυμα PBS που περιέχει 600 μg/ml RNAase A για 1 ώρα υπό συνεχή ανακίνηση
- Χρώση σε διάλυμα PBS που περιέχει 700 ng/ml ιωδιούχο προπίδιο για 15 min υπό συνεχή ανακίνηση
- Ξέπλυμα με PBS 3X5 min
- Κάλυψη με antifading mounting medium και καλυπτρίδα
- Παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού και σε CLSM

2.4.6 Διπλή χρώση με ιωδιούχο προπίδιο (PI) και TUNEL

Για τη διαπίστωση ταύτισης των δύο χαρακτηριστικών κυτταρικού θανάτου (συμπύκνωση της χρωματίνης του πυρήνα και θρυμματισμός του DNA) στα ίδια ωοθυλάκια, λόγω της έκθεσης στην ακτινοβολία, εφαρμόστηκε η διπλή χρώση ιωδιούχου προπιδίου και TUNEL.

- Ανατομία σε διάλυμα Ringer's
- Μονιμοποίηση σε διάλυμα 2% φορμαλδεϋδης σε PBS overnight στους 4^0 C
- Αλλαγή του διαλύματος με PBT (PBS+0.1% Triton X-100) για 2 φορές
- Ξέπλυμα με PBT 3×10 min υπό συνεχή ανακίνηση όπως και σε όλα τα υπόλοιπα στάδια
- Επώαση σε διάλυμα PBS που περιέχει 20 μg/ml proteinase K για 15 min
- Ξέπλυμα με PBS 3×5 min
- Επώαση στο TUNEL reaction mix, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Boehringer Mannheim kit) για 3 h στους 37^0C στο σκοτάδι
- Ξέπλυμα με PBS 3×5 min
- Επώαση σε διάλυμα PBS που περιέχει 800 μg/ml RNAase A για 1 h
- Χρώση σε διάλυμα PBS που περιέχει 700 ng/ml propidium iodide για 15 min
- Ξέπλυμα με PBS 3×5 min
- Κάλυψη με antifading mounting medium και καλυπτρίδα
- Παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού και CLSM

Σημειώνεται ότι, στην περίπτωση που διαπιστωθεί ότι ο φθορισμός στο σήμα της τεχνικής TUNEL έχει εξασθενήσει, η τεχνική πραγματοποιείται αντίστροφα, δηλαδή με τη χρώση του ιωδιούχου προπιδίου να προηγείται αυτής του Tunel.

2.4.7 Αναστολέας κασπασών FITC-VAD-FMK

Προκειμένου να διαπιστωθεί η συμμετοχή των κασπασών στον επαγόμενο, από την ακτινοβολία, κυτταρικό θάνατο, χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας FITC-VAD-FMK, που επιτρέπει την ανίχνευση των ενεργοποιημένων κασπασών στο κυτταρόπλασμα των τροφοκυττάρων.

- Ανατομία σε διάλυμα Ringer's
- Ξέπλυμα με Ringer's
- Επώαση σε 10 μΜ Fitc-VAD-fmk (fluoroisothiocyanate-conjugated inhibitor of active
  Caspases, Promega, USA) για 20 min στο σκοτάδι στους 25^0C
- Ξέπλυμα με PBS 3×5 min
- Μονιμοποίηση με 10% formalin (Formalin=37% Φορμαλδεϋδη) για 30 min στο σκοτάδι στους 25^0C
- Αλλαγή του διαλύματος με PBS για 3 φορές και στη συνέχεια ξέπλυμα με PBS 3×5 min
- Κάλυψη με antifading mounting medium και καλυπτρίδα
- Παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού και σε CLSM

2.4.8 Χρώση με υπόστρωμα ο-διανισιδίνη-H_2O_2

Για τη διερεύνηση της ενδεχόμενης επίδρασης της ακτινοβολίας στην ενεργότητα του ενζύμου υπεροξειδάση στα τελευταία στάδια της ωογένεσης εφαρμόστηκε η χρώση με υπόστρωμα ο-διανισιδίνης. Τα ωοθυλάκια τοποθετούνται σε διάλυμα που περιέχει:
0.004% (w/v) ο-διανισιδίνη, 0.03% H_2O_2, 30% σε διάλυμα Ringer's ή Tris-HCl, pH 7,5.
Διάλυμα Ι: 1 (w/v) ο-διανισιδίνη σε μεθανόλη
Διάλυμα ΙΙ: 0.03% H_2O_2 σε διάλυμα Ringer's ή Tris-HCl
Σε 500μl από το διάλυμα ΙΙ τοποθετούνται 20μl από το διάλυμα Ι και τα ωοθυλάκια.

Τα ωοθυλάκια εμφανίζουν σκούρο καφεκόκκινο χρωματισμό μέσα σε λίγα λεπτά μετά την επαφή τους με το υπόστρωμα.

2.5 Ηλεκτρονική μικροσκοπία

Η παρατήρηση των παρασκευασμάτων πραγματοποιήθηκε σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης Phillips EM 300 με τάση ανόδου 40 και 60 KV.

2.5.1 Έγκλειση σε εποξεικές ρητίνες

Προκειμένου να διαπιστωθούν αλλοιώσεις στη λεπτή δομή των ωοθυλακίων, λόγω της έκθεσης στην ακτινοβολία, εφαρμόστηκε η διαδικασία της έγκλεισης σε εποξεικές ρητίνες, ενώ ακολούθησε παρατήρηση τόσο σε φωτονικό όσο και σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

- Ανατομία σε διάλυμα Ringer's
- Μονιμοποίηση σε διάλυμα 2% γλουταρικής αλδεϋδης σε 0.08 M κακοδυλικό νάτριο pH=7.4 για 45 min
- Ξέπλυμα σε διάλυμα 4% σακχαρόζη σε 0.08 M κακοδυλικό νάτριο pH=7.4 2×20 min στους 4^0 C
- Μονιμοποίηση σε διάλυμα 2% τετροξειδίου του οσμίου σε απεσταγμένο νερό για 1h στους 4^0 C
- Ξέπλυμα σε διάλυμα 4% σακχαρόζη σε 0.08 M κακοδυλικό νάτριο pH=7.4 2×20 min στους 4^0 C
- Αφυδάτωση των δειγμάτων σε διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης αιθυλικής αλκοόλης (30%, 50%, 70%) για 10 min σε κάθε διάλυμα στους 4^0 C
- Χρώση en bloc με διάλυμα 2% οξεικού ουρανυλίου σε 70% αιθυλική αλκοόλη για 30 min στους 4^0 C
- Συνέχιση της αφυδάτωσης σε διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης αιθυλικής αλκοόλης (85%, 95%, 100%, 100% απόλυτα αφυδατωμένης) για 10 min σε κάθε διάλυμα στους 4^0 C
- Επώαση σε προπυλενοξείδιο 2×15 min υπό συνεχή ανακίνηση
- Διαπότιση σε διάλυμα Ρητίνης Α: προπυλενοξειδίου 1:3 για 1h υπό συνεχή ανακίνηση
- Διαπότιση σε διάλυμα Ρητίνης Α: προπυλενοξειδίου 1:1 για 1h υπό συνεχή ανακίνηση
- Διαπότιση σε διάλυμα Ρητίνης Α: προπυλενοξειδίου 3:1 για 1h υπό συνεχή ανακίνηση
- Ρητίνη Β 2×2 h υπό συνεχή ανακίνηση

- Πολυμερισμός της ρητίνης Β σε ειδικές πλαστικές θήκες για 2 ημέρες στους 60^0 C. Πριν την τοποθέτηση των θηκών στον κλίβανο πραγματοποιείται προσανατολισμός των δειγμάτων με τη βοήθεια του στερεοσκοπίου ανατομίας προκειμένου να καθίστανται εφικτές οι κατά μήκος ή εγκάρσιες τομές
  Ρητίνη Α: 25gr Epon 812, 20gr Araldite, 60gr DDSA (Fullam, Inc., New York, USA)
  Ρητίνη Β: 10gr ρητίνης Α και 8 σταγόνες DMP-30 (Fullam, Inc., USA).
  Απαιτείται η καλή ανάδευση των συστατικών κατά την παρασκευή των ρητινών καθώς και η περιοδική τοποθέτηση του μείγματος στον κλίβανο για 2-3 min κάθε φορά.

2.5.2 Τομές

Στα δείγματα των ωοθυλακίων που έχουν προκύψει από τη διαδικασία της έγκλεισης και βρίσκονται στα blocks της ρητίνης πραγματοποιούνται τομές πάχους 60-100nm σε υπερμικροτόμο Sorval MT-2 με τη βοήθεια γυάλινων μαχαιριών. Οι τομές συλλέγονται σε πλέγματα 300 και 400 mesh.

2.5.3 Χρώσεις

2.5.3.1 Χρώση με μπλε της τολουϊδίνης

Ωοθυλάκια που έχουν εγκλεισθεί σε ρητίνη κόβονται σε τομές πάχους 1-2μm και τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρους πλάκες σε μία σταγόνα φρέσκο απεσταγμένο νερό. Στη συνέχεια η πλάκα θερμαίνεται για λίγα λεπτά προκειμένου οι τομές να κολλήσουν σε αυτή. Ακολουθεί προσθήκη μίας σταγόνας διαλύματος 0.5% μπλε της τολουϊδίνης για 70 seconds με παράλληλη θέρμανση. Ακολουθεί ξέπλυμα με απεσταγμένο νερό, στέγνωμα και παρατήρηση της τομής στο φωτονικό μικροσκόπιο.

2.5.3.2 Χρώσεις με κιτρικό μόλυβδο και οξικό ουρανύλιο

Οι τομές που έχουν συλλεχθεί στα πλέγματα χρωματίζονται αρχικά με διάλυμα οξικού ουρανυλίου 7% σε απεσταγμένο νερό για 10 μέχρι 25 min (**Watson, 1958**) και εν συνεχεία με διάλυμα κιτρικού μολύβδου 0.4% σε απεσταγμένο νερό για 80 seconds παρουσία κρυστάλλων NaOH για την απορρόφηση του CO_2 της ατμόσφαιρας (**Venable and Coggeshall, 1965**). Ακολουθεί πολύ καλό ξέπλυμα με απεσταγμένο νερό.

2.6 Συστήματα έκθεσης

2.6.1 Μέτρηση της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας από τα κινητά τηλέφωνα

Η καταγραφή της έντασης της ακτινοβολίας που εκπέμπεται και από τα δύο συστήματα κινητής τηλεφωνίας, σύμφωνα με το πρότυπο της κάθε πειραματικής ενότητας, διεξήχθη με τη χρήση καταλλήλων πεδιομέτρων του RF φάσματος (900 και 1800 MHz): 1) RF Radiation Survey Meter, NARDA 8718 (Hauppauge, NY, USA), που καταγράφει την πυκνότητα ισχύος του ηλεκτρομαγνητικού κύματος σε mW/cm^2, 2)

Smart Fieldmeter, EMC Test Design, LLC, Newton, MA, USA, που μετρά την τιμή έντασης της ηλεκτρικής συνιστώσας του ηλεκτρομαγνητικού κύματος σε V/m.

Ωστόσο, γνωρίζοντας τη μία από τις δύο τιμές μπορούμε να υπολογίσουμε τη δεύτερη σύμφωνα με τη σχέση: E^2=Jx377, όπου E: η ένταση της ηλεκτρικής συνιστώσας σε V/m και J: η πυκνότητα ισχύος σε W/m^2.

Παράλληλα, μετρήθηκαν και οι τιμές έντασης του ηλεκτρικού (V/m) και μαγνητικού πεδίου (mG) της συχνότητας των 217Hz (ELF range) με το πεδιόμετρο Holaday HI-3604 ELF Survey Meter (Eden Prairie, MN, USA). Η καταγραφή αυτών των συνιστωσών είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς σύμφωνα με τον προταθέντα μηχανισμό του εργαστηρίου, το ηλεκτρικό και μαγνητικό πεδίο των ELF συχνοτήτων είναι πιθανό να ευθύνονται σε μεγάλο βαθμό για τις παρατηρούμενες βιολογικές επιδράσεις (**Panagopoulos et. al., 2002**).

Η μέτρηση της ακτινοβολίας πραγματοποιήθηκε κάθε φορά στο σημείο που διεξάγετο η έκθεση των πειραματικών ομάδων, πάντα στον ίδιο χώρο και με την ίδια διάταξη αντικειμένων. Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε στα μεταλλικά αντικείμενα, τα οποία απομακρύναμε από το σημείο ακτινοβόλησης προς αποφυγή ενδεχόμενης ανάκλασης της ακτινοβολίας πάνω σε αυτά και φαινομένων συμβολής, που θα μπορούσαν να μεταβάλλουν το πεδίο. Στο δωμάτιο ακτινοβόλησης εκτός από τις συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας που διαρκώς είχαμε υπό έλεγχο, φροντίζαμε ώστε να μην υπάρχουν συσκευές εν λειτουργία σε κοντινή απόσταση. Μία τέτοια παράλειψη θα σήμαινε έκθεση των ομάδων σε ηλεκτρικό και μαγνητικό πεδίο της συχνότητας των 60 Hz, κατ' επέκταση αλλοίωση των αποτελεσμάτων, καθώς σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου τόσο το μαγνητικό όσο και το ηλεκτρικό πεδίο της συχνότητας των 60 Hz επηρεάζουν την αναπαραγωγική ικανότητα του εντόμου μειώνοντας ή αυξάνοντάς την αντιστοίχως (**Παναγόπουλος, 2001**).

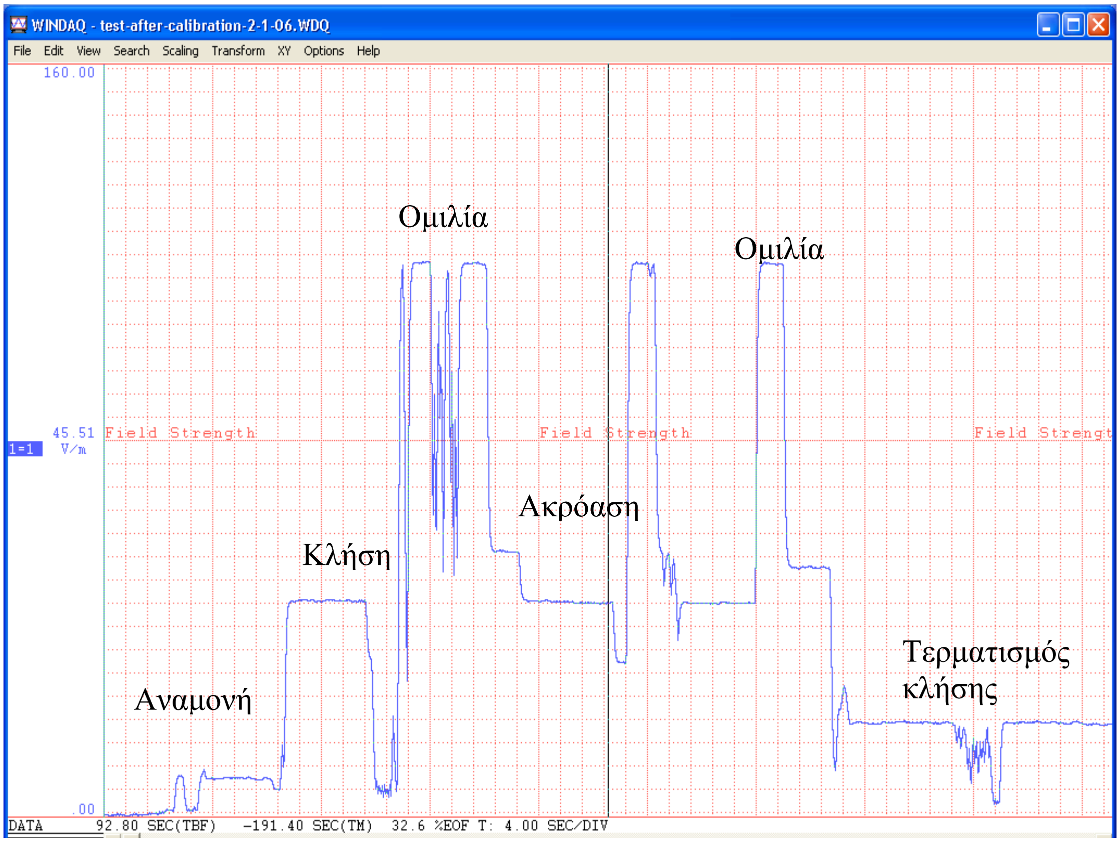
2.6.2 Έκθεση των ομάδων στο RF πεδίο των κινητών τηλεφώνων

Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του συστήματος έκθεσης στο πεδίο των κινητών τηλεφώνων της κάθε πειραματικής ενότητας αναφέρονται διεξοδικά στη συνέχεια. Στην παρούσα παράγραφο θα κάνουμε λόγο για ορισμένα γενικά χαρακτηριστικά του συστήματος έκθεσης στα μικροκυματικά πεδία των κινητών τηλεφώνων που είναι κοινά για όλα τα πειραματικά πρότυπα που έχουμε χρησιμοποιήσει.

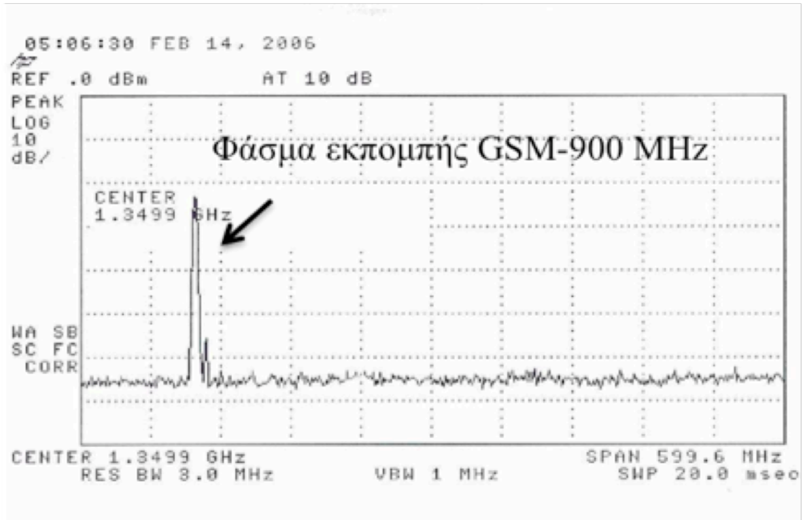
Στην εικόνα 2.4 παρουσιάζεται ενδεικτικά ένα διάγραμμα καταγραφής της εκπεμπόμενης έντασης από το κινητό τηλέφωνο σε όλες τις φάσεις λειτουργίας του (**Fragopoulou et al., 2010a**). Σύμφωνα με αυτό, η ένταση της ακτινοβολίας κατά την αναμονή είναι σχεδόν μηδενική. Ακολουθεί η αύξηση της τιμής αυτής κατά την κλήση με τη χαρακτηριστική διακύμανση να παρουσιάζεται ως έντονη αυξομείωση στις τιμές της έντασης. Αξίζει να σημειωθεί ότι, η εκπεμπόμενη ένταση είναι υψηλότερη όταν ο χρήστης ομιλεί, ενώ η τιμή αυτής μειώνεται όταν δεν ομιλεί αλλά ακούει τον συνομιλητή του. Αυτός ο τρόπος λειτουργίας δεν προέβλεπε την προστασία του χρήστη, αλλά επιλέχθηκε για την οικονομία της μπαταρίας από τους κατασκευαστές των τηλεφώνων. Τέλος, παρατηρούμε ότι η ένταση και πάλι μειώνεται αμέσως μετά το τέλος της κλήσης. Η καταγραφή πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του λογισμικού WinDaq Data acquisition software, DATAQ Instruments, Inc., Akron, OH, USA και το πεδιόμετρο Smart Fieldmeter για την καταμέτρηση των διακυμάνσεων στις τιμές έντασης της εκπεμπόμενης από ένα κινητό τηλέφωνο ακτινοβολίας κατά την ομιλούσα εκπομπή αλλά και σε διάφορες φάσεις της λειτουργίας του (**Fragopoulou et al., 2010a**).

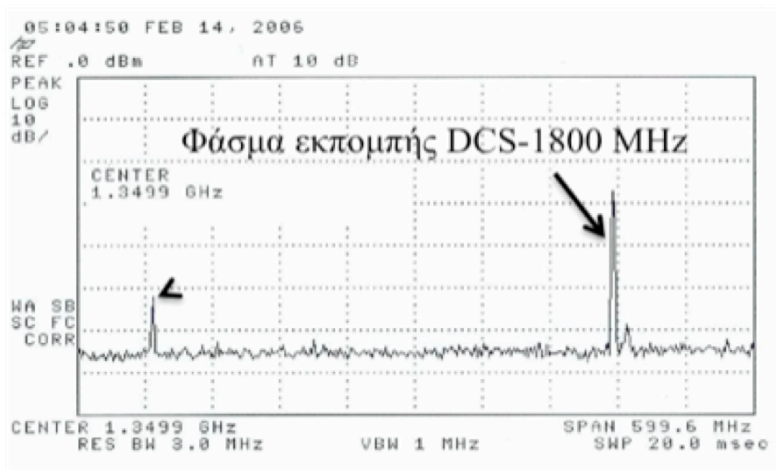
Όπως έχει αναφερθεί και στην Εισαγωγή της παρούσας, τα δύο συστήματα κινητής τηεφωνίας GSM-900MHz και DCS/GSM-1800MHz διαφέρουν στη φέρουσα συχνότητα. Στην εικόνα 2.5 παρουσιάζονται τα φάσματα εκπομπής ενός κινητού τηλεφώνου και από τα δύο συστήματα, όπως αυτά έχουν καταγραφεί από τον αναλυτή φάσματος Hewlett Packard 8595 E (9kHz-6.5 GHz) (Panagopoulos DJ, **Chavdoula ED**, Karabarbounis A., Maragritis LH, 2007b).

Στην παρούσα διατριβή, όπως και σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας, η βιολογική επίδραση της ακτινοβολίας των RF πεδίων μελετήθηκε με τη χρήση ενός κοινού κινητού τηλεφώνου, για λόγους που έχουν ήδη αναφερθεί στην Εισαγωγή, και με κατάλληλες συνθήκες ώστε να προσομοιάζουν τις αντίστοιχες συνθήκες έκθεσης ενός χρήστη κινητού τηλεφώνου. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η εκπεμπόμενη ακτινοβολία από το κινητό τηλέφωνο παρουσιάζει συνεχείς μεταβολές στις τιμές της έντασης αλλά και της συχνότητας. Αυτές οι διακυμάνσεις θεωρούνται περισσότερο στρεσογόνες για ένα κύτταρο ή έναν οργανισμό, με αποτέλεσμα τη δυσκολία προσαρμογής του σε αυτές (**Goodman, 1995**). Η έκθεση των ομάδων πραγματοποιήθηκε, όπως διαπιστώνεται από τις τιμές έντασης της ακτινοβολίας στην κάθε πειραματική ενότητα, εντός των ορίων επιτρεπόμενης έκθεσης και στις περισσότερες μελέτες μας για τη διάρκεια των 6 min ημερησίως (πειραματικές ενότητες 3.1-3.2), όπως προτείνεται από την ICNIRP (1998). Η έκθεση των πειραματικών ομάδων στην ακτινοβολία διεξήχθη σε κάθε περίπτωση στη διαμορφωμένη εκπομπή της ακτινοβολίας. Αυτό κατέστη εφικτό με τη χρήση ενός CD στο οποίο είχαμε καταγράψει ένα κείμενο συγκεκριμένο με διαστήματα παύσης και ομιλίας είτε με τη χρήση ραδιοφώνου, τοποθετημένου σε κατάλληλη απόσταση, προκειμένου να αποφευχθεί κάθε ενδεχόμενο έκθεσης των εντόμων και σε αυτό το Η/Μ πεδίο. Τέλος, σημειώνεται ότι, η έκθεση πραγματοποιήθηκε με την οπίσθια όψη του κινητού τηλεφώνου (εικ. 2.6), έχοντας εντοπίσει με τη βοήθεια πεδιομέτρου το σημείο που βρίσκεται η κεραία της συσκευής. Η οπίσθια όψη χρησιμοποιήθηκε για την έκθεση των ομάδων, καθώς η τιμή της σε αυτή την πλευρά τις περισσότερες φορές είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη της πρόσθιας όψης.



Εικόνα 2.4. Διαγραμματική απεικόνιση των τιμών έντασης της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας ενός κινητού τηλεφώνου στις διάφορες φάσεις λειτουργίας του (Ανατύπωση από Fragopoulou et al., 2010a).





Εικόνα 2.5. Λήψη φασμάτων εκπομπής των συστημάτων GSM-900 MHz και DCS-1800MHz από τον αναλυτή φάσματος Hewlett Packard 8595 E (9kHz-6.5 GHz). Το GSM-900 MHz παρουσιάζει μία μοναδική κορυφή στην τιμή περίπου των 900MHz (βέλος), σε αντίθεση με το DCS-1800 MHz (βέλος) και μία μικρότερη κοντά στα 900 MHz (κεφαλή βέλους) (Ανατύπωση από Panagopoulos DJ, **Chavdoula ED**, Karabarbounis A., Maragritis LH, 2007b).

Πειραματική διάταξη έκθεσης εντόμων στο πεδίο των κινητών τηλεφώνων.

Η έκθεση των πειραματικών ομάδων των εντόμων στο κοντινό πεδίο της κεραίας του κινητού τηλεφώνου πραγματοποιείται με τον σωλήνα της εκτεθειμένης ομάδας εντόμων (exposed) να βρίσκεται σε επαφή με την οπίσθια όψη της συσκευής (εικ. 2.6). Πριν την έναρξη της ακτινοβόλησης περιορίζοντας προσεκτικά, με τη βοήθεια του πώματος, τα έντομα σε έναν πολύ μικρό χώρο (και άρα περιορίζοντας τις μετακινήσεις τους και την απομάκρυνσή τους από το σημείο της μέγιστης εκπεμπόμενης έντασης), επιτυγχάνεται μία όσο το δυνατόν περισσότερο εντοπισμένη και κατά το δυνατόν ομοιόμορφη έκθεση όλων των οργανισμών στο πεδίο. Αντιστοίχως χειριζόμαστε και τις ομάδες μάρτυρες

(SE-sham exposed). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι, η προστασία και απομόνωση της ομάδας SE από την εκπεμπόμενη ακτινοβολία, πέρα από τη διατήρηση της απαιτούμενης απόστασης από την πηγή ακτινοβολίας, κατά την παραμονή της στον ίδιο χώρο που διεξαγόταν και η ακτινοβόληση των εκτεθειμένων (exposed) ομάδων, κατέστη δυνατή με τη βοήθεια ειδικού μεταλλικού πλέγματος που κάλυπτε τους σωλήνες λειτουργώντας ως κλωβός Faraday.

Εικόνα 2.6. Φωτογραφία τρόπου έκθεσης των εντόμων στο εγγύς πεδίο της κεραίας του κινητού τηλεφώνου. Η οπίσθια όψη της συσκευής έρχεται σε επαφή με το σωλήνα της εκτεθειμένης ομάδας, ενώ τα έντομα περιορίζονται με τη βοήθεια πώματος σε έναν μικρό χώρο για την περισσότερο εντοπισμένη και ομοιόμορφη έκθεση στο πεδίο.

2.6.3 Χαρακτηριστικά συστήματος έκθεσης κάθε πειραματικής ενότητας

2.6.3.1 Επίδραση της GSM ακτινοβολίας στο DNA και τον κυτταροσκελετό της ακτίνης - Σύγκριση βιολογικής επίδρασης συνεχούς και διακοπτόμενης έκθεσης στην GSM ακτινοβολία των κινητών τηλεφώνων

Χαρακτηριστικά συστήματος έκθεσης

Η έκθεση της κάθε ομάδας πραγματοποιήθηκε ανεξάρτητα και σε επαφή με το κινητό τηλέφωνο σύμφωνα με το ακόλουθο πρωτόκολλο συνεχούς και διακοπτόμενης έκθεσης-πίνακας 2.1. Ακολούθως, παρατίθενται οι τιμές της πυκνότητας ισχύος και οι αντίστοιχες τιμές έντασης της ηλεκτρικής συνιστώσας του κύματος, όπως επίσης και οι εντάσεις του ηλεκτρικού και μαγνητικού πεδίου των ELF συχνοτήτων-πίνακας 2.2. Οι τιμές αυτές έχουν προκύψει ως μέσοι όροι 10 ανεξαρτήτων μετρήσεων στον ίδιο χώρο κατά την διαμορφωμένη εκπομπή της ακτινοβολίας του συστήματος GSM-900 MHz για τη χρονική διάρκεια των **t=6 min.** Η τιμή SAR του κινητού τηλεφώνου, που χρησιμοποιήθηκε στα παρόντα πειράματα, σύμφωνα με τον κατασκευαστή είναι **SAR=0.64W/kg.**

Πειραματικές ομάδες

Η συγκρότηση των ομάδων έγινε κατά τα πειραματικά πρότυπα της συνεχούς και των τεσσάρων τύπων διακοπτόμενης έκθεσης, με διαφορετική διάρκεια έκθεσης στο GSM πεδίο και διαφορετικά ενδιάμεσα διαστήματα διακοπής μεταξύ των δόσεων (πίνακας 2.1).

Πίνακας 2.1 Πειραματικές ομάδες συνεχούς και διακοπτόμενης έκθεσης και ομάδας μάρτυρα.

Ομάδες	Τύπος έκθεσης	Αριθμός εκθέσεων	Διάρκεια κάθε έκθεσης	Χρόνος ενδιαμέσου διαστήματος διακοπής
C (1x6 min)	Συνεχής	1	6 min	-
I_1 (6x1min)	Διακοπτόμενος	6	1 min	10 min
I_2 (3x2 min)	Διακοπτόμενος	3	2 min	10 min
I_3 (2x3 min)	Διακοπτόμενος	2	3 min	10 min
I_4 (2x3 min)	Διακοπτόμενος	2	3 min	6 hours
SE (Μάρτυρας)	Συνεχής	-	-	-

Πίνακας 2.2 Πυκνότητα ισχύος και ένταση ηλεκτρικής συνιστώσας του Η/Μ κύματος, καθώς και τιμές έντασης των συνιστωσών του ηλεκτρικού και μαγνητικού πεδίου των ELF συχνοτήτων του συστήματος GSM-900 MHz.

Σύστημα έκθεσης	Απόσταση από τη συσκευή	Πυκνότητα ισχύος Η/Μ κύματος	Ένταση ηλεκτρικής συνιστώσας κύματος	Ένταση ηλεκτρικού πεδίου ELF συχνοτήτων	Ένταση μαγνητικού πεδίου ELF συχνοτήτων
GSM-900 MHz	0 cm	0.345±0.07 mW/cm^2	36.1 V/m	18.6±2.7 V/m	0.75±0.17 mG

Τεχνικές

- Πρωτόκολλο 2.3.1-Αναπαραγωγικής Ικανότητας του εντόμου με την καταμέτρηση του αριθμού των απογόνων της πρώτης θυγατρικής γενιάς.
- Πρωτόκολλο 2.3.2 Ωογένεσης

1. Χρώση με πορτοκαλί της ακριδίνης-2.4.1
2. Χρώση με τη διαδικασία TUNEL-2.4.2

3. Χρώση Φαλλοϊδίνης συνδεδεμένης με ροδαμίνη-2.4.3
4. Διπλή Χρώση φαλλοϊδίνης συδεδεμένης με ροδαμίνη και TUNEL-2.4.4

2.6.3.2 Επαγωγή χαρακτηριστικών κυτταρικού θανάτου από την GSM ακτινοβολία κινητών τηλεφώνων στα ωοθυλάκια της πρώιμης και μέσης ωογένεσης

Χαρακτηριστικά συστήματος έκθεσης

Ακολούθως παρατίθενται οι τιμές της πυκνότητας ισχύος και οι αντίστοιχες τιμές έντασης της ηλεκτρικής συνιστώσας του κύματος-πίνακας 2.3. Οι τιμές αυτές έχουν προκύψει ως μέσοι όροι 10 ανεξαρτήτων μετρήσεων στον ίδιο χώρο κατά την διαμορφωμένη εκπομπή της ακτινοβολίας του συστήματος **GSM-900/1800MHz** κατά τη διάρκεια των **t=6min**. Σημειώνεται ότι, στην περίπτωση αυτή καταγραφές με τον αναλυτή φάσματος έδειξαν ότι το πεδίο GSM εκπέμπει και στις δύο συχνότητες 900 και 1800 MHz. Η τιμή SAR του κινητού τηλεφώνου που χρησιμοποιήθηκε είναι **SAR=0.64 W/kg**, σύμφωνα με τον κατασκευαστή.

Πειραματικές ομάδες

Οι ομάδες που εξετάστηκαν στην παρούσα ενότητα είναι ένας τύπος εκτεθειμένης ομάδας (exposed) και μίας ομάδα μάρτυρα-SE (sham exposed).

Πίνακας 2.3 Τιμές έντασης ηλεκτρικής συνιστώσας και οι αντίστοιχες τιμές πυκνότητας ισχύος του Η/Μ κύματος

Ομάδες	Σύστημα έκθεσης	Απόσταση από τη συσκευή	Ένταση ηλεκτρικής συνιστώσας Η/Μ κύματος	Πυκνότητα ισχύος Η/Μ κύματος
Exposed	GSM900/1800 MHz	0cm	20 ± 2 V/m	0.106 mW/cm^2
SE	GSM900/1800 MHz	0cm	-	-

Τεχνικές

Πρωτόκολλο 2.3.2 Ωογένεσης

1. Χρώση με ιωδιούχο προπίδιο (PI)-2.4.5
2. Διπλή χρώση με ιωδιούχο προπίδιο (PI) και TUNEL-2.4.6
3. Αναστολέας κασπασών FITC-VAD-FMK-2.4.7

2.6.3.3 Μελέτη επίδρασης της GSM ακτινοβολίας κινητών τηλεφώνων στα ωοθυλάκια της όψιμης ωογένεσης

Χαρακτηριστικά συστήματος έκθεσης

A. Η έκθεση της ομάδας exposed πραγματοποιήθηκε σε επαφή με το κινητό τηλέφωνο του συστήματος GSM-900MHz για 6 min ημερησίως κατά τα πρώτα 6 24ωρα της ενήλικης ζωής των εντόμων. Τα χαρακτηριστικά της έκθεσης είναι αντίστοιχα της ενότητας **2.6.3.1** για την περίπτωση της συνεχούς έκθεσης.

B. Η έκθεση της μίας ομάδας exposed-**EXP6** πραγματοποιήθηκε σε επαφή με το κινητό τηλέφωνο του συστήματος GSM900/1800 MHz για 6 min ημερησίως, ενώ η έκθεση της δεύτερης ομάδας exposed-**EXP30** για 30 min ημερησίως, κατά τα πρώτα 6 24ωρα της ενήλικης ζωής των εντόμων. Ακολούθως παρατίθενται οι τιμές της πυκνότητας ισχύος και οι αντίστοιχες τιμές έντασης της ηλεκτρικής συνιστώσας του κύματος-πίνακας 2.4. Οι τιμές αυτές έχουν προκύψει ως μέσοι όροι 10 ανεξαρτήτων μετρήσεων στον ίδιο χώρο κατά την διαμορφωμένη εκπομπή της ακτινοβολίας του συστήματος GSM-900/1800MHz κατά τη διάρκεια των **t=6min/t=30min** της έκθεσης στο πεδίο. Η τιμή SAR του κινητού τηλεφώνου που χρησιμοποιήθηκε είναι **0.64 W/kg**, σύμφωνα με τον κατασκευαστή.

<u>Πειραματικές ομάδες</u>

A. Οι ομάδες που μελετήθηκαν είναι: η εκτεθειμένη ομάδα (exposed) και η ομάδα μάρτυρας-SE (sham exposed).
B. Οι ομάδες που μελετήθηκαν είναι: οι εκτεθειμένες ομάδες EXP6, EXP30 και η ομάδα μάρτυρας-SE (sham exposed).

Πίνακας 2.4 Τιμές έντασης ηλεκτρικής συνιστώσας και οι αντίστοιχες τιμές πυκνότητας ισχύος του Η/Μ κύματος για τις ομάδες EXP6, EXP30 και SE (**ενότητα B**).

Ομάδες	Σύστημα έκθεσης και συχνότητα (MHz)	Απόσταση από τη συσκευή	Ένταση ηλεκτρικής συνιστώσας Η/Μ κύματος	Πυκνότητα ισχύος Η/Μ κύματος	Ημερήσια διάρκεια έκθεσης
EXP6	GSM900/1800	0cm	35 ± 6 V/m	0.325 mW/cm^2	**6 min**
EXP30	GSM900/1800	0cm	35 ± 6 V/m	0.325 mW/cm^2	**30 min**
SE	GSM900/1800	0cm	-	-	-

Τεχνικές

A. Πρωτόκολλο 2.3.2 Ωογένεσης

1. Χρώση με πορτοκαλί της ακριδίνης-2.4.1
2. Χρώση Φαλλοϊδίνης συνδεδεμένης με ροδαμίνη-2.4.3

3. Χρώση με υπόστρωμα ο-διανισιδίνη-H_2O_2-2.4.8

Β. Πρωτόκολλο 2.3.2 Ωογένεσης

1. Έγκλειση σε εποξεικές ρητίνες-2.5.1
2. Τομές-2.5.2
3. Χρώση με μπλε της τολουϊδίνης-2.5.3.1
4. Χρώσεις με κιτρικό μόλυβδο και οξεϊκό ουρανύλιο-2.5.3.2

2.6.3.4 Μελέτη επίδρασης της GSM ακτινοβολίας κινητών τηλεφώνων στην *in vitro* ανάπτυξη των ωοθυλακίων

Το αναπτυξιακό σύστημα *in vitro* (**Petri et. al., 1979**) επιτρέπει την ωρίμανση των ωοθυλακίων αρχικού σταδίου 11 μέχρι το τελευταίο στάδιο 14 σε θρεπτικό μέσο Schneider's σε ένα ποσοστό 75%. Κατά τη διάρκεια των σταδίων αυτών τα τροφοκύτταρα σχηματίζουν τις δέσμες ακτίνης για την προώθηση του κυτταροπλασματικού τους υλικού στο ωοκύτταρο (dumping) και την απαραίτητη συγκράτηση του πυρήνα τους, ενώ στη συνέχεια εκφυλίζονται και τα υπολείμματά τους απορροφώνται φυσιολογικά. Η ικανότητα των τροφοκυττάρων να ολοκληρώσουν *in vitro* τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο όπως σε συνθήκες *in vivo* καταδεικνύει είτε ότι στην αρχή του σταδίου 11 τα ωοθυλάκια φέρουν την απαιτούμενη βιολογική πληροφορία για την εκτέλεση ενός αυτόνομου προγράμματος κυτταρικού θανάτου, είτε ότι το σήμα θανάτου δεν προέρχεται από εξωγενείς παράγοντες. Σε ένα ποσοστό περίπου 25% η ανάπτυξη δεν ολοκληρώνεται ακόμα και όταν τα τροφοκύτταρα παρουσιάζουν χαρακτηριστικά κυτταρικού θανάτου. Το ποσοστό αυτό αποδίδεται σε τυχαίους τραυματισμούς των ωοθυλακίων κατά την ανατομία είτε στην τοπική έλλειψη θρεπτικών στοιχείων του μέσου (**Νέζης, 2002; Nezis et. al., 2006**).

Στην περίπτωση της *in vitro* μελέτης επίδρασης της ακτινοβολίας η έκθεση των ωοθυλακίων πραγματοποιείται στο μακρινό πεδίο της κεραίας του κινητού τηλεφώνου για χρονικό διάστημα **3h (45min on/15min off).** Τα ωοθυλάκια τοποθετούνται μέσα σε κατάλληλο δοχείο και το κινητό σε απόσταση 10cm από αυτά (εικ. 2.7). Παράλληλα πραγματοποιείται καταγραφή της εκπεμπόμενης έντασης της ηλεκτρικής συνιστώσας του Η/Μ κύματος με το κατάλληλο πεδιόμετρο, καθώς και καταγραφή της θερμοκρασίας με ψηφιακό θερμόμετρο. Η ομάδα μάρτυρας μεταφέρεται στον ίδιο χώρο με την εκτεθειμένη ομάδα με τη διαφορά ότι τοποθετείται εντός καταλλήλου κλωβού Faraday, που έχουμε κατασκευάσει στο εργαστήριο από μεταλλικό πλέγμα καταλλήλων οπών, προκειμένου με τον τρόπο αυτό η εκπεμπόμενη ακτινοβολία από το κινητό τηλέφωνο να ανακλάται από το πλέγμα επομένως η ομάδα μάρτυρας εντός αυτού να μην επηρεάζεται από την ακτινοβολία (εικ. 2.7). Οι τιμές πυκνότητας ισχύος και έντασης ηλεκτρικής συνιστώσας του Η/Μ κύματος αναφέρονται στον πίνακα 2.5 και έχουν προκύψει ως μέσοι όροι 10 ανεξαρτήτων μετρήσεων στον ίδιο χώρο κατά την διαμορφωμένη εκπομπή της ακτινοβολίας του συστήματος GSM-900/1800MHz κατά τη διάρκεια των **t=3h** της έκθεσης στο πεδίο. Η τιμή SAR του κινητού τηλεφώνου που χρησιμοποιήθηκε είναι **0.64 W/kg**, σύμφωνα με τον κατασκευαστή.

Χαρακτηριστικά συστήματος έκθεσης

Πίνακας 2.5 Τιμές έντασης ηλεκτρικής συνιστώσας και οι αντίστοιχες τιμές πυκνότητας ισχύος του Η/Μ κύματος.

Ομάδα	**Σύστημα έκθεσης**	**Απόσταση από τη συσκευή**	**Ένταση ηλεκτρικής συνιστώσας Η/Μ κύματος**	**Πυκνότητα ισχύος Η/Μ κύματος**
Exposed	GSM900/1800 MHz	15 cm	12 ± 2 V/m	0.038 mW/cm^2
SE	GSM900/1800MHz	-	-	-

Τεχνικές

Πρωτόκολλο *In vitro* ανάπτυξης ωοθυλακίων του εντόμου-2.3.3

-Χρώση Φαλλοϊδίνης συνδεδεμένης με ροδαμίνη-2.4.3

Εικόνα 2.7 Α) έκθεση των απομονωμένων ωοθυλακίων στο μακρινό πεδίο της κεραίας του κινητού τηλεφώνου και καταμέτρηση της έντασης της ακτινοβολίας και της θερμοκρασίας. Β) Τοποθέτηση της ομάδας μάρτυρα εντός κλωβού Faraday, για την προστασία των ωοθυλακίων από την ακτινοβολία.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Επίδραση της GSM ακτινοβολίας στο DNA και τον κυτταροσκελετό της ακτίνης - Σύγκριση βιολογικής επίδρασης συνεχούς και διακοπτόμενης έκθεσης στην GSM ακτινοβολία των κινητών τηλεφώνων

3.1.1 Στόχος πειραματικής σειράς

Σε προηγούμενες ερευνητικές εργασίες του εργαστηρίου μας, έχει διαπιστωθεί η σημαντική μείωση της αναπαραγωγικής ικανότητας των εντόμων λόγω της συνεχούς έκθεσης του εντόμου στο πεδίο του συστήματος GSM-900 MHz κινητής τηλεφωνίας για 6 min ημερησίως κατά τα πρώτα 6 24ωρα της ενήλικης ζωής. Στην παρούσα ενότητα διερευνήσαμε την επίδραση της ακτινοβολίας στο DNA και τον κυτταροσκελετό της ακτίνης στα κύτταρα των ωοθυλακίων της πρώιμης και μέσης ωογένεσης (στ. 1-10) των εκτεθειμένων εντόμων. Παράλληλα, πραγματοποιήσαμε σύγκριση της βιολογικής επίδρασης ανάμεσα στον συνεχή και τους τέσσερις τύπους διακοπτόμενης έκθεσης στο GSM πεδίο ίδιας συνολικής διάρκειας (6min).

Σημειώνεται ότι, τα αποτελέσματα της παρούσας ενότητας, όπως αναφέρονται στους πίνακες: 3.1, 3.3-3.5 και στις εικόνες: 3.7a-d, 3.9a-c, 3.11 και 3.12a, δημοσιεύτηκαν το 2010: "***Comparison of biological effects between continuous and intermittent exposure to GSM-900-MHz mobile phone radiation: Detection of apoptotic cell-death features***". **Chavdoula ED**, Panagopoulos DJ, Margaritis LH. Mutation research, 700: 51-61 (βλ. Παράρτημα ΙΙ-Επισύναψη Δημοσίευσης).

3.1.2. Αποτελέσματα

3.1.2.1 Επίδραση συνεχούς και διακοπτόμενης GSM έκθεσης στην Αναπαραγωγική Ικανότητα

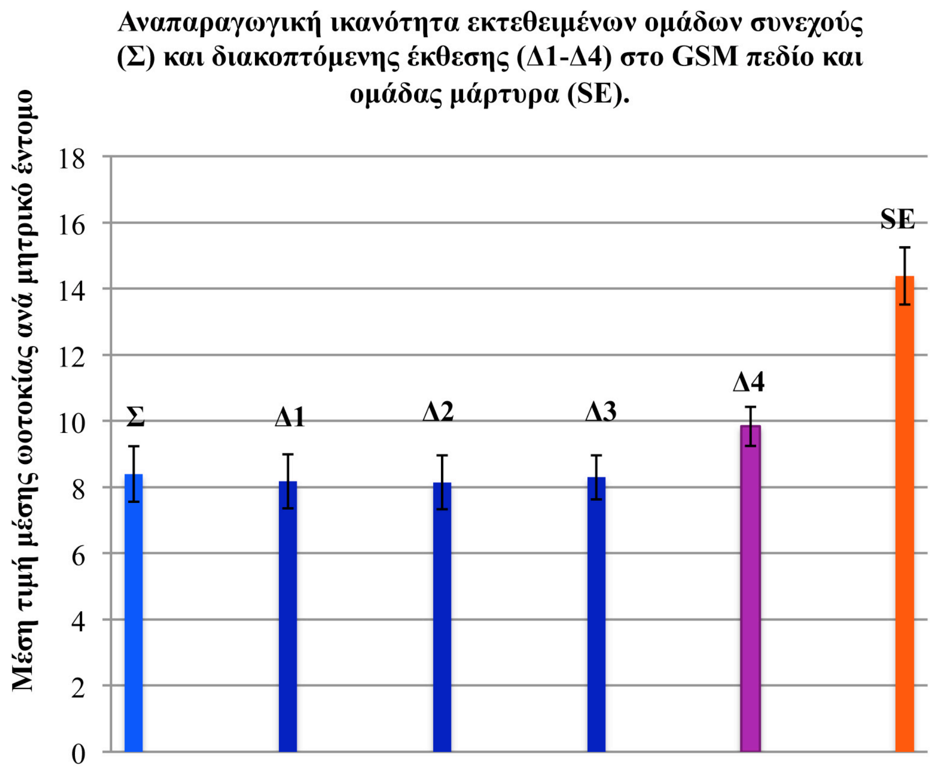
Ο **πίνακας 3.1** παρουσιάζει το μέσο όρο του αριθμού των F1 χρυσαλίδων των εκτεθειμένων (Σ, $Δ_1$, $Δ_2$, $Δ_3$, $Δ_4$) και των ομάδων μάρτυρα (SE) όπως έχουν προκύψει από το σύνολο οκτώ πειραμάτων. Όλα τα πρωτόκολλα έκθεσης στην ακτινοβολία προκάλεσαν μείωση του αριθμού των θυγατρικών χρυσαλίδων στις εκτεθειμένες ομάδες συγκρινόμενες με τις ομάδες μάρτυρες. Πιο συγκεκριμένα, οι εκτεθειμένες ομάδες της συνεχούς Σ, και οι τρεις τύποι διακοπτόμενης έκθεσης $Δ_1$, $Δ_2$, και $Δ_3$ παρουσίασαν παρόμοια ποσοστά μείωσης της αναπαραγωγικής ικανότητας, 41.6%-Δ, 43.2%-$Δ_1$, 43.4%-$Δ_2$ και 42.3%-$Δ_3$, ενώ το χαμηλότερο ποσοστό μείωσης σημειώθηκε από την ομάδα $Δ_4$ (31.6%), λόγω του μεγαλυτέρου διαστήματος που μεσολαβούσε μεταξύ των δόσεων ακτινοβόλησης. Οι διαφορές που σημειώθηκαν μεταξύ των ομάδων Σ, $Δ_1$, $Δ_2$, και $Δ_3$ βρέθηκαν εντός της τυπικής απόκλισης, ωστόσο αξίζει να σημειωθεί ότι, τα ποσοστά μείωσης των ομάδων $Δ_1$ και $Δ_2$ είναι κατά έναν πολύ μικρό βαθμό υψηλότερα σε σχέση με τα αντίστοιχα των ομάδων Σ και $Δ_3$ (**Πίνακας 3.1** και **εικ. 3.1**).

Πίνακας 3.1. Αναπαραγωγική ικανότητα εκτεθειμένων ομάδων συνεχούς (Σ) και διακοπτόμενης έκθεσης (Δ1-4) στο GSM πεδίο και ομάδων μάρτυρα (SE).

Αριθμός πειράματος	Ομάδες	Μέσος όρος αριθμού F1 χρυσαλίδων ανά μητρικό έντομο	% Απόκλιση από το Μάρτυρα
1	Σ (1x6 min)	7.49	-42.56
	$Δ_1$ (6x1min)	7.25	-44.40
	$Δ_2$ (3x2 min)	7.43	-43.02
	$Δ_3$ (2x3 min)	7.44	-42.94
	$Δ_4$ (2x3 min)	9.12	-30.06
	SE (Μάρτυρας)	13.04	
2	Σ (1x6 min)	9.54	-37.85
	$Δ_1$ (6x1min)	9.24	-39.80
	$Δ_2$ (3x2 min)	8.42	-45.15
	$Δ_3$ (2x3 min)	9.12	-40.59
	$Δ_4$ (2x3 min)	10.29	-32.96
	SE (Μάρτυρας)	15.35	
3	Σ (1x6 min)	8.55	-39.19
	$Δ_1$ (6x1min)	8.75	-37.77
	$Δ_2$ (3x2 min)	9.13	-35.06
	$Δ_3$ (2x3 min)	8.79	-37.48
	$Δ_4$ (2x3 min)	9.85	-29.94
	SE (Μάρτυρας)	14.06	

Αριθμός πειράματος	Ομάδες	Μέσος όρος αριθμού F1 χρυσαλίδων ανά μητρικό έντομο	% Απόκλιση από το Μάρτυρα
4	Σ (1x6 min)	7.43	-44.59
	Δ_1 (6x1min)	7.22	-46.16
	Δ_2 (3x2 min)	8.14	-39.30
	Δ_3 (2x3 min)	7.88	-41.24
	Δ_4 (2x3 min)	10.00	-25.43
	SE (Μάρτυρας)	13.41	
5	Σ (1x6 min)	7.47	-49.63
	Δ_1 (6x1min)	8.14	-45.11
	Δ_2 (3x2 min)	7.36	-50.37
	Δ_3 (2x3 min)	8.12	-45.25
	Δ_4 (2x3 min)	9.45	-36.28
	SE (Μάρτυρας)	14.83	
6	Σ (1x6 min)	8.54	-44.26
	Δ_1 (6x1min)	7.42	-51.57
	Δ_2 (3x2 min)	7.33	-52.15
	Δ_3 (2x3 min)	7.54	-50.78
	Δ_4 (2x3 min)	9.28	-39.43
	SE (Μάρτυρας)	15.32	

Αριθμός πειράματος	Ομάδες	Μέσος όρος αριθμού F1 χρυσαλίδων ανά μητρικό έντομο	% Απόκλιση από το Μάρτυρα
7	Σ (1x6 min)	9.51	-36.81
	Δ_1 (6x1min)	9.23	-38.67
	Δ_2 (3x2 min)	9.43	-37.34
	Δ_3 (2x3 min)	9.26	-38.47
	Δ_4 (2x3 min)	11.03	-26.71
	SE (Μάρτυρας)	15.05	
8	Σ (1x6 min)	8.63	-38.45
	Δ_1 (6x1min)	8.19	-41.58
	Δ_2 (3x2 min)	7.94	-43.37
	Δ_3 (2x3 min)	8.26	-41.08
	Δ_4 (2x3 min)	9.67	-31.03
	SE (Μάρτυρας)	14.02	
Μέσος όρος±SD	Σ (1x6 min)	**8.40±0.87**	**-41.63**
	Δ_1 (6x1min)	**8.18±0.84**	**-43.15**
	Δ_2 (3x2 min)	**8.15±0.81**	**-43.36**
	Δ_3 (2x3 min)	**8.30±0.69**	**-42.32**
	Δ_4 (2x3 min)	**9.84±0.62**	**-31.62**
	SE (Μάρτυρας)	**14.39±0.88**	



Εικόνα 3.1. Διαγραμματική απεικόνιση μέσου όρου μέσης ωοτοκίας ανά μητρικό έντομο εκτεθειμένων ομάδων Σ, $Δ_1$, $Δ_2$, $Δ_3$, $Δ_4$ και ομάδας μάρτυρα SE. Στο διάγραμμα απεικονίζεται και η τυπική απόκλιση της κάθε ομάδας.

Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων αναπαραγωγικής ικανότητας

Με βάση τη στατιστική ανάλυση η πιθανότητα για τις εκτεθειμένες ομάδες Σ, $Δ_1$, $Δ_2$ και $Δ_3$ να διαφέρουν μεταξύ τους εξαιτίας τυχαίων γεγονότων είναι πολύ μεγάλη ($P>0.92$). Αντιθέτως, οι πιθανότητες για τις ομάδες Σ και SE, όπως και για τις $Δ_4$ και SE να διαφέρουν μεταξύ τους εξαιτίας της τυχαιότητας είναι πολύ μικρές $P<10^{-8}$ και στις δύο περιπτώσεις, ενώ οι αντίστοιχες πιθανότητες για κάθε μία από τις ομάδες $Δ_1$, $Δ_2$, $Δ_3$ να διαφέρουν από την ομάδα SE εξαιτίας της τυχαιότητας είναι σε όλες τις περιπτώσεις $P<10^{-9}$. Η πιθανότητα για την κάθε μία από τις ομάδες $Δ_1$, $Δ_2$, $Δ_3$ να διαφέρουν οι τιμές τους σε σύγκριση με την ομάδα $Δ_4$ εξαιτίας της τυχαιότητας βρέθηκε να είναι $P<10^{-3}$, ενώ η αντίστοιχη πιθανότητα μεταξύ των ομάδων Σ και $Δ_4$ είναι $P< 2x10^{-3}$.

3.1.2.2. Επίδραση συνεχούς και διακοπτόμενης GSM-έκθεσης στην ωογένεση του εντόμου

Η μελέτη ανίχνευσης του αποδομημένου DNA διεξήχθη 1) με τη χρώση πορτοκαλί της ακριδίνης και 2) με την τεχνική TUNEL, η απεικόνιση του κυτταροσκελετού της ακτίνης με τη χρώση φαλλοϊδίνης συνδεδεμένης με ροδαμίνη, ενώ τέλος η ταυτόχρονη παρατήρηση θρυμματισμένου DNA και δομής κυτταροσκελετού της ακτίνης με τη διπλή χρώση TUNEL-φαλλοϊδίνης.

Σε μία σειρά **προκαταρκτικών** πειραμάτων εξετάσαμε την **επίδραση του χρόνου (**t=0h, t=3-5h, t=6-8h, t=9-11h)**,** που μεσολαβεί από την τελευταία έκθεση των εντόμων στο GSM πεδίο μέχρι τη στιγμή της ανατομίας και χρώσης με πορτοκαλί της ακριδίνης για την ανίχνευση θετικού σήματος θρυμματισμένου DNA. Σύμφωνα με τις ενδείξεις αυτές, το **μέγιστο ποσοστό** ανίχνευσης ωοθυλακίων με θετικό σήμα ακριδίνης παρατηρείται στο χρονικό διάστημα **t=3-5h**, κατά το διάστημα **t=6-8h** το ποσοστό έχει μειωθεί σημαντικά, ενώ στο διάστημα των t=**9-11h** τα επίπεδα των ωοθυλακίων με θετικό σήμα είναι αντίστοιχα των ομάδων μάρτυρα, όπως συμβαίνει και στην περίπτωση του χρόνου **t=0h** (**πίν. 3.2** και **εικ**. **3.2, 3.6**).

Τα αποτελέσματά μας, με τις ανατομίες των εντόμων να έχουν πραγματοποιηθεί εντός του χρονικού διαστήματος των 3-5h μετά την τελευταία έκθεση στο GSM πεδίο και όπως έχουν προκύψει από το σύνολο των τεσσάρων διαφορετικών πειραμάτων, που έχουν διεξαχθεί στην περίπτωση της κάθε τεχνικής, παρατίθενται στους **πίνακες 3.3-3.5** και στις **εικόνες 3.7-3.10**. Σύμφωνα με τα ευρήματα της παρούσας ενότητας όλοι οι τύποι έκθεσης έχουν ως αποτέλεσμα την επαγωγή υψηλών ποσοστών θρυμματισμένου DNA και αποδιοργανωμένου δικτύου ακτίνης σε όλα τα στάδια των ωοθυλακίων της πρώιμης και μέσης ωογένεσης.

Ο **πίνακας 3.3** παρουσιάζει τα ποσοστά αποδομημένου DNA στα κύτταρα των ωοθυλακίων μετά από χρώση με πορτοκαλί της ακριδίνης. Το συνολικό ποσοστό των ωοθυλακίων με θετικό σήμα ακριδίνης προς το σύνολο των ωοθυλακίων όλων των σταδίων (από στο στάδιο του γερμαρίου μέχρι και το στάδιο 10) ± S.D. στις εκτεθειμένες ομάδες Σ, $Δ_1$, $Δ_2$, $Δ_3$ και $Δ_4$ είναι 0.50 ± 0.06, 0.52 ± 0.06, 0.52 ± 0.05, 0.50 ± 0.04 και 0.40 ± 0.04, αντιστοίχως. Στην ομάδα μάρτυρα SE η αντίστοιχη τιμή είναι 0.06 ± 0.02.

Τα ποσοστά αποδόμησης DNA μετά την τεχνική TUNEL παρουσιάζονται στον **πίνακα 3.4**. Το ποσοστό των ωοθυλακίων με θετικό σήμα TUNEL προς το σύνολο των ωοθυλακίων όλων των σταδίων ± S.D., για τις εκτεθειμένες ομάδες Σ, $Δ_1$, $Δ_2$, $Δ_3$ και $Δ_4$ είναι 0.51 ± 0.05, 0.52 ± 0.04, 0.53 ± 0.05, 0.52 ± 0.05 και 0.41 ± 0.05, αντιστοίχως. Στην ομάδα μάρτυρα SE η αντίστοιχη τιμή είναι 0.06 ± 0.02.

Τέλος, στον **πίνακα 3.5** αναφέρονται τα αποτελέσματα ανίχνευσης αποδιοργανωμένου δικτύου ακτίνης μετά τη χρώση φαλλοϊδίνης συνδεδεμένης με ροδαμίνη. Σύμφωνα με αυτά, τα ποσοστά των ωοθυλακίων με αποδιοργανωμένο κυτταροσκελετό ακτίνης προς τον συνολικό αριθμό ωοθυλακίων όλων των σταδίων ± S.D. για τις ομάδες Σ, $Δ_1$, $Δ_2$, $Δ_3$ και $Δ_4$ είναι 0.48 ± 0.05, 0.49 ± 0.05, 0.48 ± 0.06, 0.47 ± 0.06 και 0.37 ± 0.05, αντιστοίχως. Στην ομάδα μάρτυρα SE η αντίστοιχη τιμή είναι 0.05 ± 0.02. Αξίζει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση της φαλλοϊδίνης στα ποσοστά κυτταρικού θανάτου δεν έχει καταμετρηθεί το στάδιο του γερμαρίου, καθώς δεν είναι δυνατόν να ανιχνευθεί η κατανομή του κυτταροσκελετού σε αυτό. Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο τα ποσοστά εμφανίζονται μειωμένα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα των δύο προηγουμένων τεχνικών, όπως διακρίνεται και στη διαγραμματική απεικόνιση της **εικόνας 3.4**.

Όπως ήταν αναμενόμενο, τα ωοθυλάκια των δύο σημείων ελέγχου της ωογένεσης (γερμάριο και στάδια 7-8) επέδειξαν τη μεγαλύτερη ευαισθησία απέναντι σε αυτόν τον παράγοντα στρες όπως διαπιστώνεται εύκολα στο διάγραμμα της **εικόνας 3.5**, που δείχνει τα ποσοστά ανίχνευσης θετικού σήματος αποδόμησης DNA συναρτήσει των αναπτυξιακών σταδίων, όπως αυτό έχει προκύψει ως μ.ο. των ποσοστών με θετικό σήμα αποδόμησης DNA στις ομάδες Σ, Δ1-3, οι οποίες παρουσίασαν ποσοστά με διαφορές εντός της τυπικής απόκλισης.

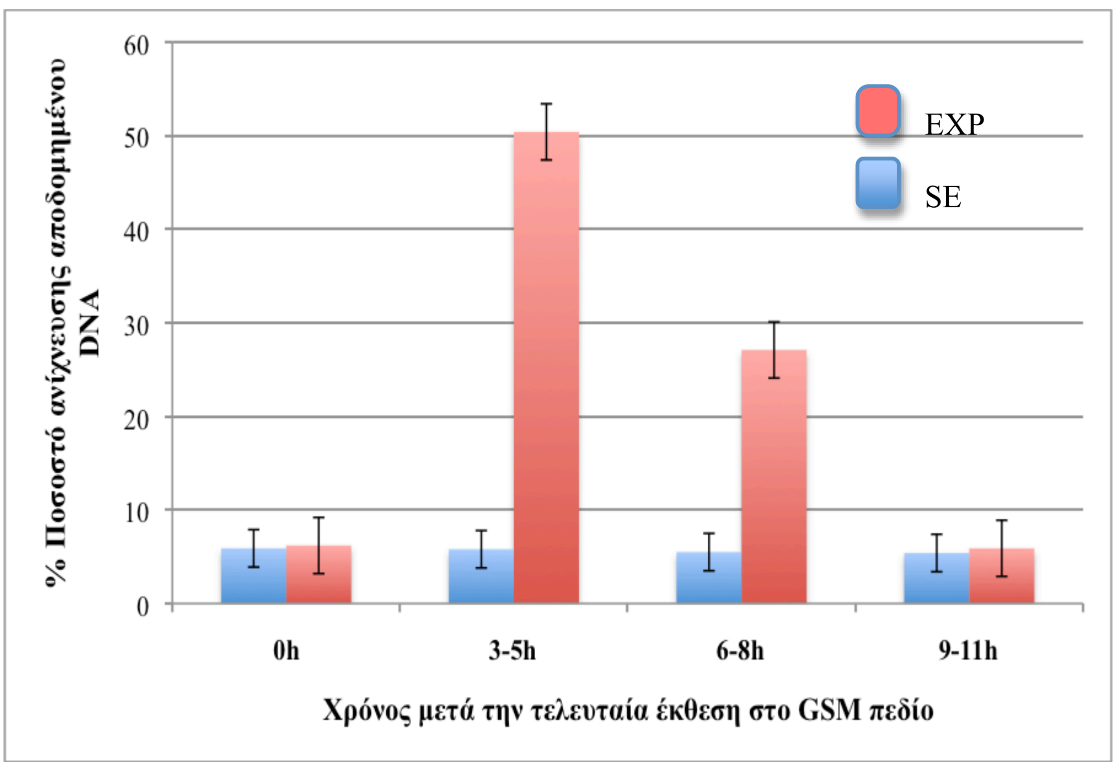
Χαρακτηριστικές φωτογραφίες ωοθυλακίων που προέκυψαν από τις παραπάνω τεχνικές παρατίθενται στις **εικόνες 3.7-3.10**. Στην **εικόνα 3.7a** παρουσιάζεται ένα ωοθηκάριο από έντομο μάρτυρα με αρνητικό σήμα ακριδίνης στα ωοθυλάκια όλων των σταδίων που το αποτελούν, δηλαδή από το στάδιο του γερμαρίου (G) μέχρι και το στάδιο 8 (S8). Αντίστοιχες είναι και οι φωτογραφίες ωοθηκαρίων από έντομα μάρτυρες με αρνητικό σήμα Tunel. Στην **εικόνα 3.7b** απεικονίζεται ένα ωοθηκάριο από εκτεθειμένο έντομο (ομάδα $Δ_4$) με θετικό σήμα ακριδίνης στα τροφοκύτταρα (NC) των ωοθυλακίων στα δύο σημεία ελέγχου της ωογένεσης, γερμάριο και στάδιο 8. Ανάλογη απεικόνιση φέρουν και τα ωοθηκάρια από εκτεθειμένες ομάδες στην περίπτωση της τεχνικής Tunel. Η **εικόνα 3.7c** δείχνει ένα ωοθηκάριο από εκτεθειμένο έντομο της ομάδας $Δ_1$ με θετικό σήμα ακριδίνης τόσο στους πυρήνες των τροφοκυττάρων (NC) όσο και των θυλακοκυττάρων (FC) στα ωοθυλάκια όλων των σταδίων που το αποτελούν (G, S1-4, S8). Αντίστοιχες είναι και οι φωτογραφίες της τεχνικής Tunel και σε αυτή την περίπτωση. Τέλος, η **εικόνα 3.7d** αποτελεί μία αντιπροσωπευτική απεικόνιση δείγματος από εκτεθειμένη ομάδα εντόμων με έναν αριθμό ωοθυλακίων σταδίων 6-8 (S6-8) να φέρει θετικό σήμα Tunel ανάμεσα σε ένα σύνολο ωοθυλακίων με αρνητικό σήμα φθορισμού διαφόρων αναπτυξιακών σταδίων. Αντίστοιχες απεικονίσεις από την ίδια τεχνική και στις υπόλοιπες εκτεθειμένες ομάδες (**εικ. 3.7e-h**). Οι **εικόνες 3.8a-f** μετά από χρώση με πορτοκαλί της ακριδίνης, ομοίως αποτελούν αντιπροσωπευτικές απεικονίσεις του υψηλού ποσοστού ωοθυλακίων διαφόρων σταδίων με θετικό σήμα θρυμματισμένου DNA ανάμεσα σε φυσιολογικά ωοθυλάκια αντιστοίχων σταδίων, όπως προέκυψαν από όλους τους τύπους έκθεσης.

Οι **εικόνες 3.9** μικροσκοπίας φθορισμού (**εικ. 3.9b, c**) και συνεστιακής μικροσκοπίας laser (CLSM) (**3.9a**), μετά από χρώση φαλλοϊδίνης συνδεδεμένης με ροδαμίνη, παρουσιάζουν φυσιολογικά και ανώμαλα ωοθυλάκια. Στις **εικόνες 3.9a και b**, παρουσιάζονται ένα αντιπροσωπευτικό ωοθηκάριο με ωοθυλάκια σταδίων 3, 5 και 9 (S3, S5, S9) και ένα ωοθυλάκιο σταδίου 10 (S10) από έντομο μάρτυρα με φυσιολογική κατανομή και οργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης στα τροφοκύτταρα (NC), τα θυλακοκύτταρα (FC) και το ωοκύτταρο (OC), που γίνεται περισσότερο σαφής με την απεικόνιση της υποφλοιώδους ακτίνης στο ωοθυλάκιο σταδίου 10. Χαρακτηριστική είναι και η παρουσία των δακτυλιοειδών καναλιών (RC). Η **εικόνα 3.9c**, δείχνει ωοθυλάκια από εκτεθειμένα έντομα (ομάδα $Δ_1$) εκ των οποίων το ένα, σταδίου 7 (S7), είναι ανώμαλο με αποδιοργανωμένο κυτ/τό και με τη συσσώρευση δεσμίδων ακτίνης, ενώ απουσιάζουν τα δακτυλιοειδή κανάλια. Τα άλλα δύο ωοθυλάκια είναι φυσιολογικά (S6, S9). Στην επόμενη φωτονιογραφία μικροσκοπίας φθορισμού **3.9d**, αποδιοργανωμένο κυτ/τό ακτίνης εμφανίζει ένα ωοθυλάκιο σταδιου 9. Το ίδιο ωοθυλάκιο απεικονίζεται και στην εικόνα **3.10c,** αλλά στην περίπτωση αυτή η φωτογραφία προέρχεται από μικροσκόπιο CLSM. Οι εικόνες **3.10a-d**, φωτονιογραφίες CLSM, ομάδας μάρτυρα (**3.10a**) και εκτεθειμένων ομάδων (**3.10b-d**) παρουσιάζουν ένα σύνολο φυσιολογικών και με αλλοιώσεις στον κυτταροσκελετό τους ωοθυλακίων. Πιο αναλυτικά, η **εικόνα 3.10a** δείχνει ένα ωοθηκάριο με φυσιολογικά ωοθυλάκια σταδίων 6, 7 και 9 (S6, S7, S9), ενώ ακολουθεί η **εικόνα 3.10b** με ωοθυλάκια αντιστοίχων σταδίων, εκ των οποίων το ωοθυλάκιο σταδίου 6 (S6) φέρει αποδιοργανωμένο κυτταροσκελετό (ομάδα $Δ_3$). Στην **εικόνα 3.10c**, αλλοιώσεις εμφανίζει μόνο το ωοθυλάκιο σταδίου 9 (S9) (ομάδα $Δ_4$), ενώ στην **3.10d**, οι αλλοιώσεις επεκτείνονται και στα μικρότερα ωοθυλάκια σταδίων 3, 5, 6 (S3-6) πλην του σταδίου 9 (S9) (ομάδα $Δ_2$).

Τέλος, η διπλή χρώση Tunel-φαλλοϊδίνης επέτρεψε τον ταυτόχρονο εντοπισμό και των δύο χαρακτηριστικών κυτταρικού θανάτου, αποδόμησης του DNA και αποδιοργάνωσης του κυτ/τού της ακτίνης στα ίδια ωοθυλάκια εκτεθειμένων ομάδων. Στις **εικόνες 3.11a-f** παρουσιάζονται δύο ωοθυλάκια σταδίων 8 (**a-c**) και 10 (**d-f**) με αποδιοργανωμένο δικτύο ακτίνης στα τροφοκύτταρα (**a, d**), αλλά και στο ωοκύτταρο (**d**), με σήμα θρυμματισμένου DNA στους τροφοκυτταρικούς πυρήνες (**b, e**), και με τις δύο αλλοιώσεις να ανιχνεύονται ταυτόχρονα (**c, f**). Αντίστοιχες οι απεικονίσεις και στις **εικόνες 3.12 a-c**, σε ωοθυλάκια σταδίων 3, 4, 9 και 10 (S3, S4, S9, S10).

Πίνακας 3.2. Ποσοστά ανίχνευσης θρυμματισμένου DNA στους τροφοκυτταρικούς πυρήνες των ωοθυλακίων της πρώιμης και μέσης ωογένεσης σε συνάρτηση με το χρόνο που παρήλθε μετά την τελευταία έκθεση των εντόμων στο GSM πεδίο.

Χρόνος μετά την τελευταία έκθεση στο GSM πεδίο (h)	Μ.ο. ποσοστού ανίχνευσης αποδομημένου DNA-ομάδα SE (%)	Μ.ο. ποσοστού ανίχνευσης αποδομημένου DNA-ομάδα EXP (%)
0	5.9	6.2
3-5	5.8	50.4
6-8	5.5	27.1



Εικόνα 3.2. Διαγραμματική απεικόνιση του μ.ό. του % ποσοστού ανίχνευσης αποδομημένου DNA στα κύτταρα ωοθυλακίων της πρώιμης και μέσης ωογένεσης, μετά από χρώση με πορτοκαλί της ακριδίνης, συναρτήσει του χρόνου ανατομίας-χρώσης μετά την τελευταία έκθεση (6min) των ομάδων στο GSM πεδίο.

Πίνακας 3.3 Αποτελέσματα ανίχνευσης αποδομημένου DNA στα κύτταρα ωοθυλακίων της πρώιμης και μέσης ωογένεσης μετά από χρώση με πορτοκαλί της ακριδίνης.

Ομάδες	**Αναπτυξιακά στάδια**	**Αριθμός θετικών σε ακριδίνη ωοθυλακίων προς το σύνολο ωοθυλ. κάθε σταδίου**	**Συνολικός αριθμός ωοθυλ. με σήμα /σύνολο ωοθυλ όλων των σταδίων**	**Ποσοστό ωοθυλ. με σήμα (%)**	**Απόκλιση από το μάρτυρα (%)**
Σ	Γερμάριο	78/92			
	1-6	315/714	623/1236	50.40	+44.59
	7-8	181/286			
	9-10	49/144			
Δ1	Γερμάριο	82/93			
	1-6	320/702	637/1219	52.26	+46.45
	7-8	190/279			
	9-10	45/145			
Δ2	Γερμάριο	80/98			
	1-6	333/722	624/1205	51.78	+45.97
	7-8	171/265			
	9-10	40/120			
Δ3	Γερμάριο	78/91			
	1-6	303/735	596/1199	49.71	+43.90
	7-8	161/242			
	9-10	54/131			
Δ4	Γερμάριο	70/90			
	1-6	213/692	480/1206	39.80	+33.99
	7-8	158/295			
	9-10	39/129			
SE	Γερμάριο	11/92			
	1-6	19/729	71/1221	5.81	
	7-8	36/274			
	9-10	5/126			

Πίνακας 3.4 Αποτελέσματα ανίχνευσης αποδομημένου DNA στα κύτταρα ωοθυλακίων της πρώιμης και μέσης ωογένεσης μετά την τεχνική Tunel.

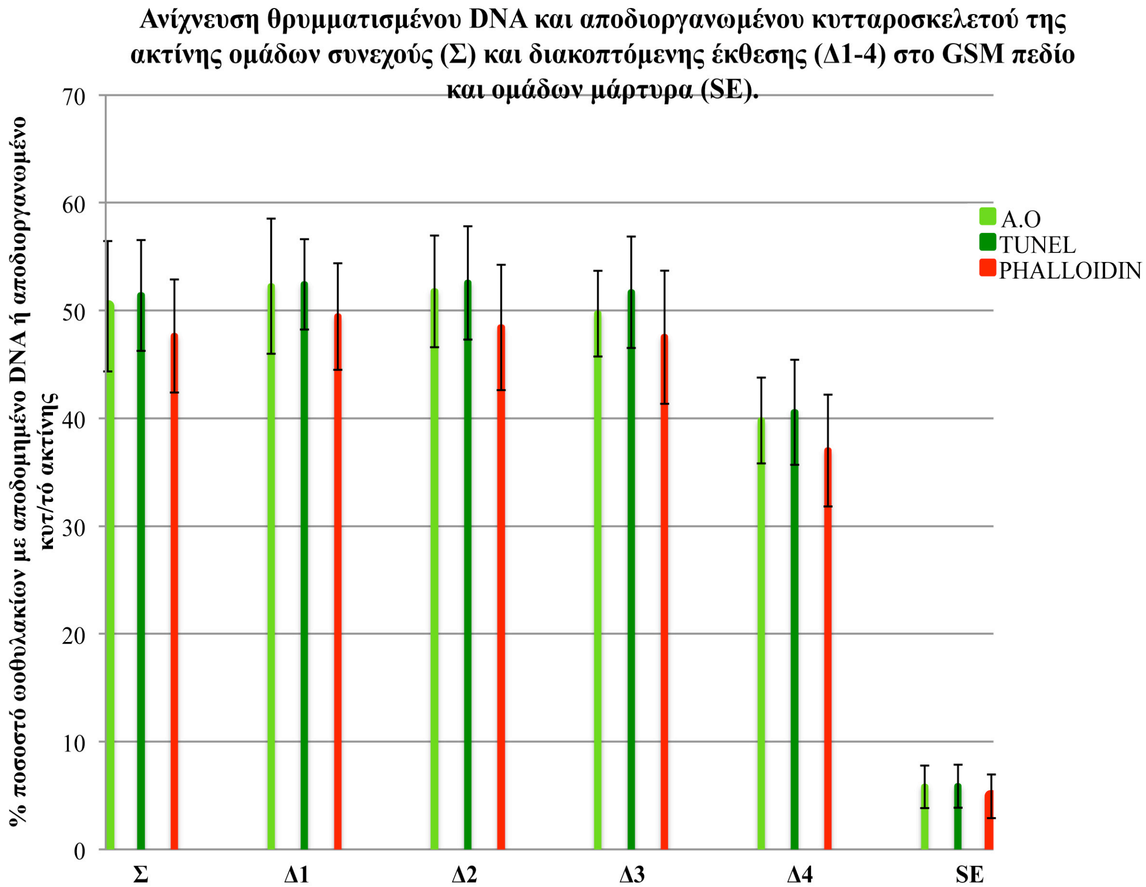
Ομάδες	Αναπτυξιακά στάδια	Αριθμός ωοθυλ. με σήμα/αριθμό ωοθυλ. κάθε σταδίου	Συνολικός αριθμός ωοθυλ. με σήμα /σύνολο ωοθυλ όλων των σταδίων	Ποσοστό ωοθυλ. με σήμα (%)	Απόκλιση από το μάρτυρα (%)
Σ	Γερμάριο	79/90			
	1-6	329/718	643/1251	51.4	+45.53
	7-8	181/302			
	9-10	54/141			
Δ1	Γερμάριο	80/94			
	1-6	330/724	647/1234	52.43	+46.56
	7-8	188/282			
	9-10	49/134			
Δ2	Γερμάριο	85/98			
	1-6	322/695	637/1212	52.56	+46.69
	7-8	183/275			
	9-10	47/144			
Δ3	Γερμάριο	79/97			
	1-6	345/722	655/1267	51.70	+45.83
	7-8	178/295			
	9-10	53/153			
Δ4	Γερμάριο	68/91			
	1-6	221/696	492/1213	40.56	+34.69
	7-8	162/288			
	9-10	41/138			
SE	Γερμάριο	12/94			
	1-6	16/723	73/1243	5.87	
	7-8	37/285			
	9-10	8/141			

Πίνακας 3.5 Αποτελέσματα αποδιοργάνωσης κυτ/τού της ακτίνης στα κύτταρα ωοθυλακίων της πρώιμης και μέσης ωογένεσης μετά από χρώση φαλλοϊδίνης συνδεδεμένης με ροδαμίνη.

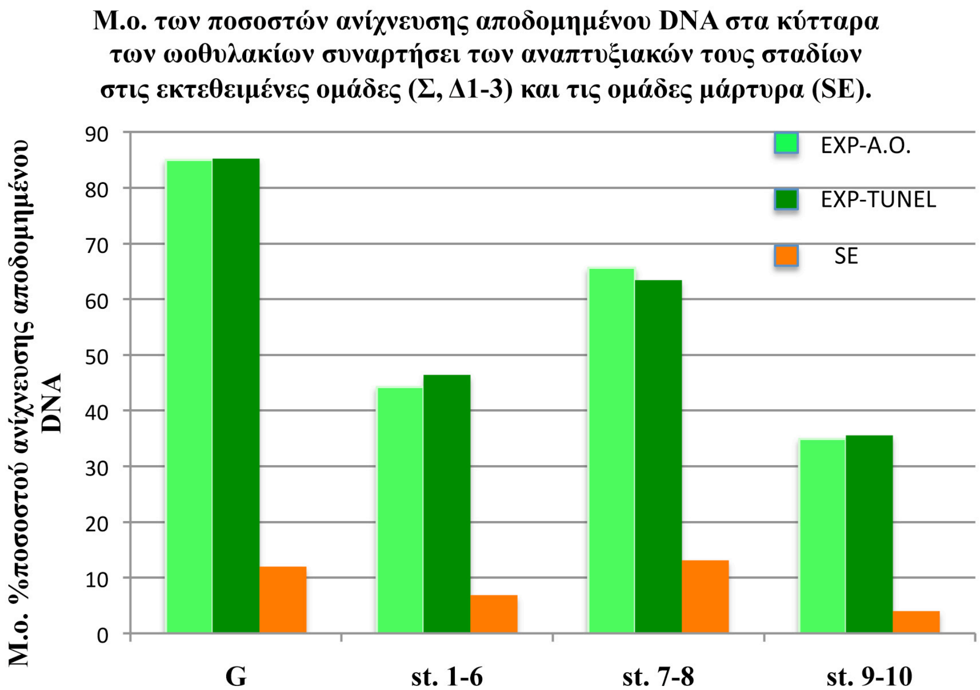
Ομάδες	**Αναπτυξιακά στάδια**	**Αριθμός ωοθυλ. με αποδ. κυτ/τό προς τον αριθμό ωοθυλ. κάθε σταδίου**	**Σύνολο ωοθυλ. με αποδ. κυτ/τό /σύνολο ωοθυλ. όλων των σταδίων**	**Ποσοστό ωοθυλ. με αποδ. κυτ/τό (%)**	**Απόκλιση από το μάρτυρα (%)**
Σ	1-6	321/743			
	7-8	193/288	565/1186	47.64	+42.71
	9-10	51/155			
Δ1	1-6	328/739			
	7-8	189/274	572/1157	49.44	+44.51
	9-10	55/144			
Δ2	1-6	312/756			
	7-8	194/294	569/1175	48.43	+43.50
	9-10	63/125			
Δ3	1-6	316/759			
	7-8	199/291	574/1208	47.52	+42.59
	9-10	59/158			
Δ4	1-6	233/729			
	7-8	154/307	436/1178	37.01	+32.08
	9-10	49/142			
SE	1-6	17/734			
	7-8	32/292	58/1177	4.93	
	9-10	9/151			

Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Η στατιστική ανάλυση σε όλες τις περιπτώσεις έδειξε ότι η πιθανότητα οι διαφορές μεταξύ της κάθε εκτεθειμένης ομάδας και της ομάδας μάρτυρα να οφείλονται στην τυχαιότητα είναι πολύ μικρή $P < 10^{-4}$.



Εικόνα 3.4. Διαγραμματική απεικόνιση του % ποσοστού ωοθυλακίων με χαρακτηριστικά κυτταρικού θανάτου στις εκτεθειμένες Σ, $Δ_1$, $Δ_2$, $Δ_3$, $Δ_4$ ομάδες και στην ομάδα μάρτυρα ± S.D., μετά από τις τεχνικές πορτοκαλί της ακριδίνης (A.O.), TUNEL και φαλλοϊδίνης (phalloidin).



Εικόνα 3.5. Διαγραμματική απεικόνιση του μ.ο. του %ποσοστού αποδομημένου DNA των ομά, από τις τεχνικές, πορτοκαλί της ακριδίνης (A.O.) και TUNEL, συναρτήσει των αναπτυξιακών σταδίων των ωοθυλακίων της πρώιμης και μέσης ωογένεσης. Χαρακτηριστική η καταγραφή των υψηλοτέρων ποσοστών στα δύο σημεία ελέγχου της ωογένεσης, γερμάριο (G) και στάδια 7-8 (st. 7-8).

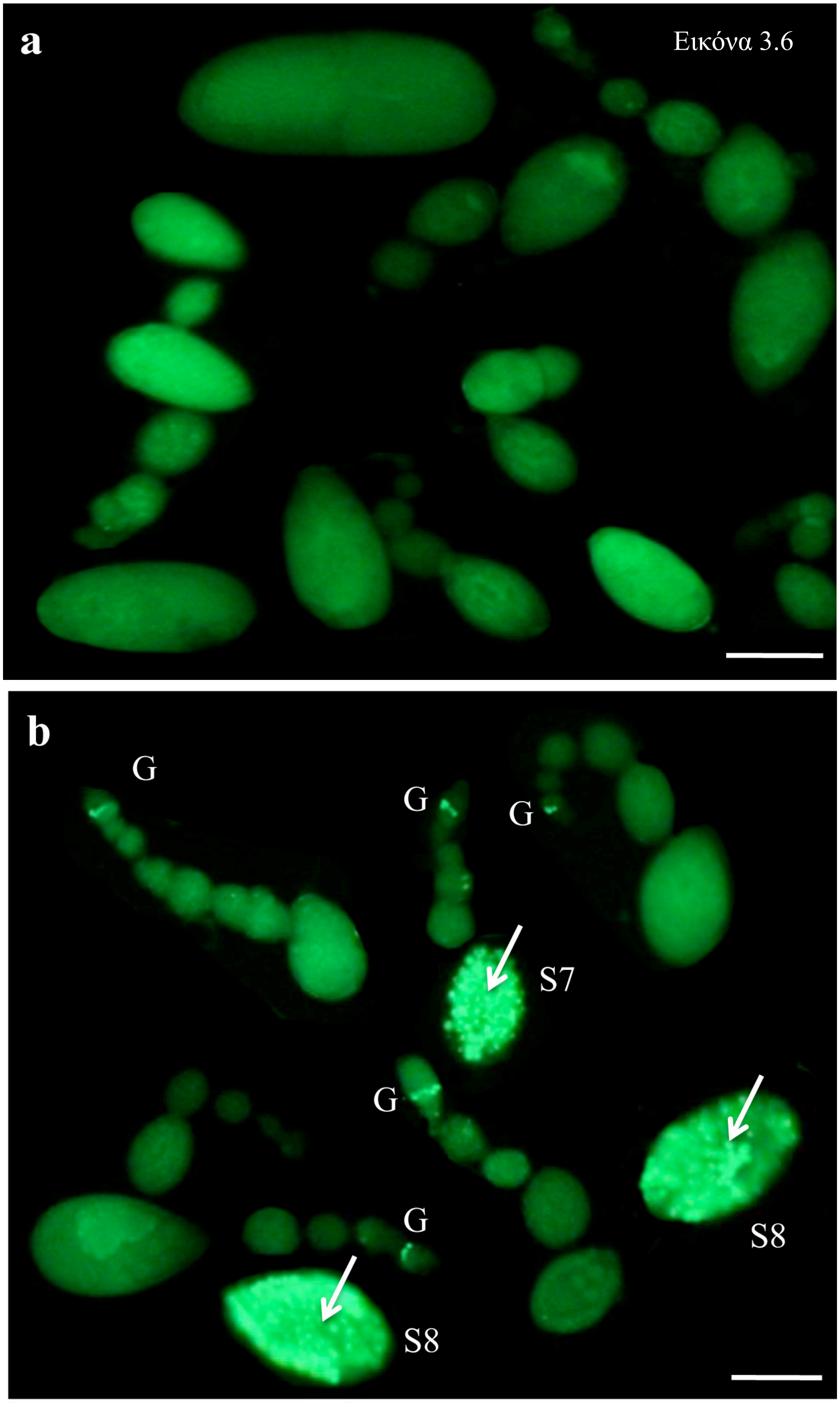
Επεξήγηση εικόνων

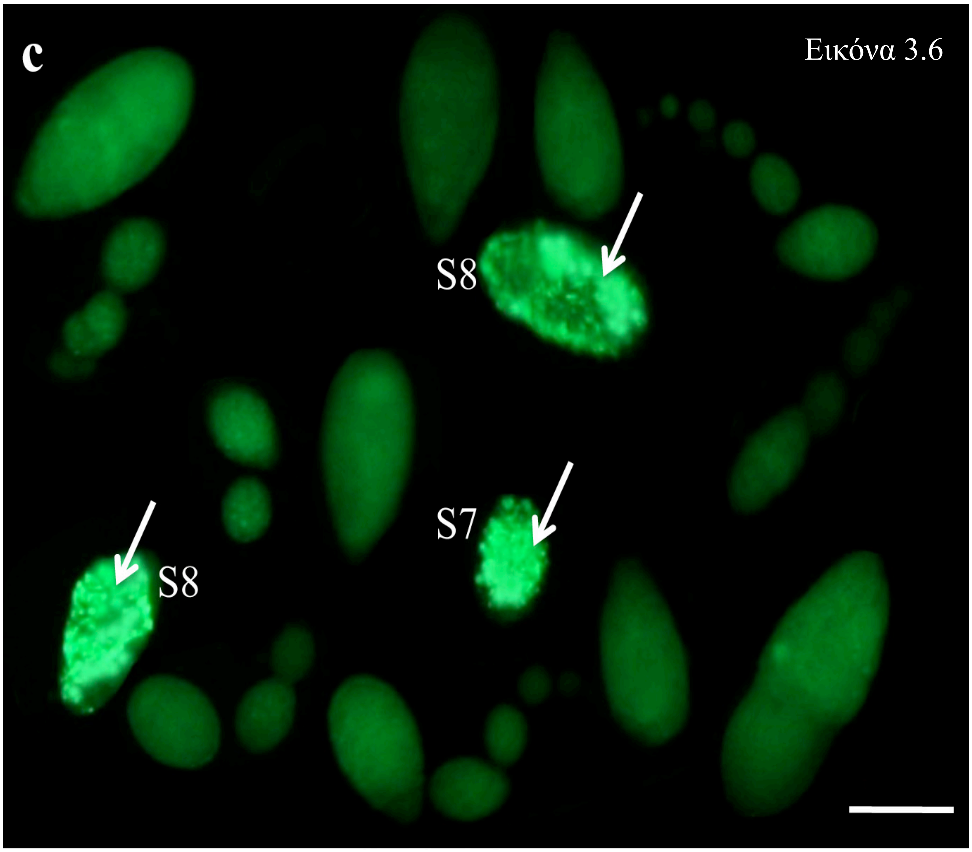
Σήμα αποδόμησης DNA [Τεχνική TUNEL, χρώση με πορτοκαλί της ακριδίνης (A.O.)]

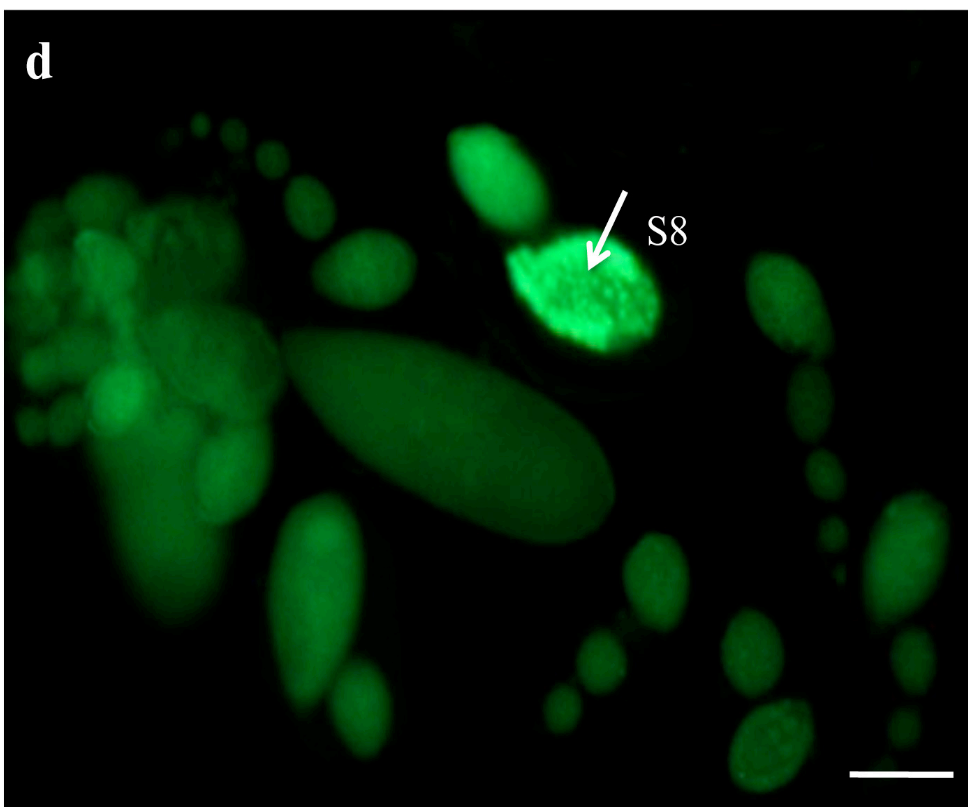
Εικόνα 3.6. Φωτονιογραφίες ωοθυλακίων μετά από χρώση με πορτοκαλί της ακριδίνης και παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού. a) Ωοθυλάκια από εκτεθειμένη ομάδα εντόμων προερχόμενα από ανατομία και χρώση αμέσως μετά (t=0h) την τελευταία έκθεση των εντόμων στο GSM πεδίο. Όλα τα ωοθυλάκια των σταδίων της πρώιμης και μέσης ωογένεσης παρουσιάζουν φυσιολογικό φθορισμό-Αντίστοιχη εικόνα ομάδων μάρτυρα (SE). b) Ωοθυλάκια από εκτεθειμένη ομάδα εντόμων προερχόμενα από ανατομία και χρώση t=3h μετά την τελευταία έκθεση των εντόμων στο GSM πεδίο. Θετικό σήμα φθορισμού παρατηρείται στα δύο σημεία ελέγχου της ωογένεσης: σε 5 γερμάρια (G) και 3 ωοθυλάκια σταδίων 7-8 (S7-8). c) σε χρόνο t=6h, με σήμα σε 3 ωοθυλάκια σταδίων 7-8 (βέλη) d) σε χρόνο t=9h, η εικόνα είναι αντίστοιχη με εικόνα ομάδας μάρτυρα με ένα μόνο ωοθυλάκιο σταδίου 8 (βέλος) να έχει θετικό σήμα ανάμεσα σε ένα πλήθος φυσιολογικών ωοθυλακίων. Γραμμές μεγέθυνσης: 150μm.

Εικόνα 3.7. Φωτονιογραφίες συνεστιακής μικροσκοπίας laser ωοθυλακίων μετά από χρώση με πορτοκαλί της ακριδίνης ή την τεχνική Tunel. a) χαρακτηριστική φωτογραφία ωοθηκαρίου εντόμου μάρτυρα με φυσιολογικό σήμα φθορισμού σε όλα τα ωοθυλάκια από το στάδιο του γερμαρίου (G) μέχρι και το στάδιο 8 (S8). b) Ωοθηκάριο εκτεθειμένου εντόμου (ομάδα Δ_4) με θετικό σήμα ακριδίνης στα τροφοκύτταρα (NC) ωοθυλακίων των δύο σημείων ελέγχου της ωογένεσης, στην περιοχή 2a/2b του γερμαρίου (G) και στο στάδιο 8 (S8). c) Χαρακτηριστική απεικόνιση ωοθηκαρίου με θετικό σήμα ακριδίνης στα τροφοκύτταρα (NC) και τα θυλακοκύτταρα (FC) των ωοθυλακίων όλων των σταδίων από το γερμάριο μέχρι το στάδιο 8 (G, S1-4, S8) (ομάδα Δ_1). d) Χαρακτηριστική απεικόνιση ωοθυλακίων από εκτεθειμένη ομάδα εντόμων (ομάδα Σ) με θετικό σήμα TUNEL στα τροφοκύτταρα και τα θυλακοκύτταρα ωοθυλακίων σταδίων 6-8 (S6-8) ανάμεσα σε ωοθυλάκια αντιστοίχων αναπτυξιακών σταδίων με φυσιολογικό φθορισμό (**Chavdoula et al., 2010**). Αντίστοιχες απεικονίσεις από την τεχνική Tunel με εμφανές το υψηλό ποσοστό των ωοθυλακίων διαφόρων σταδίων με θετικό σήμα αποδόμησης DNA (βέλη) μεταξύ φυσιολογικών ωοθυλακίων από εκτεθειμένες ομάδες Δ_1 (e), Δ_4 (f), Δ_3 (g), Δ_2 (h). Γραμμές μεγέθυνσης: a-c, h: 50μm, d-g: 100μm.

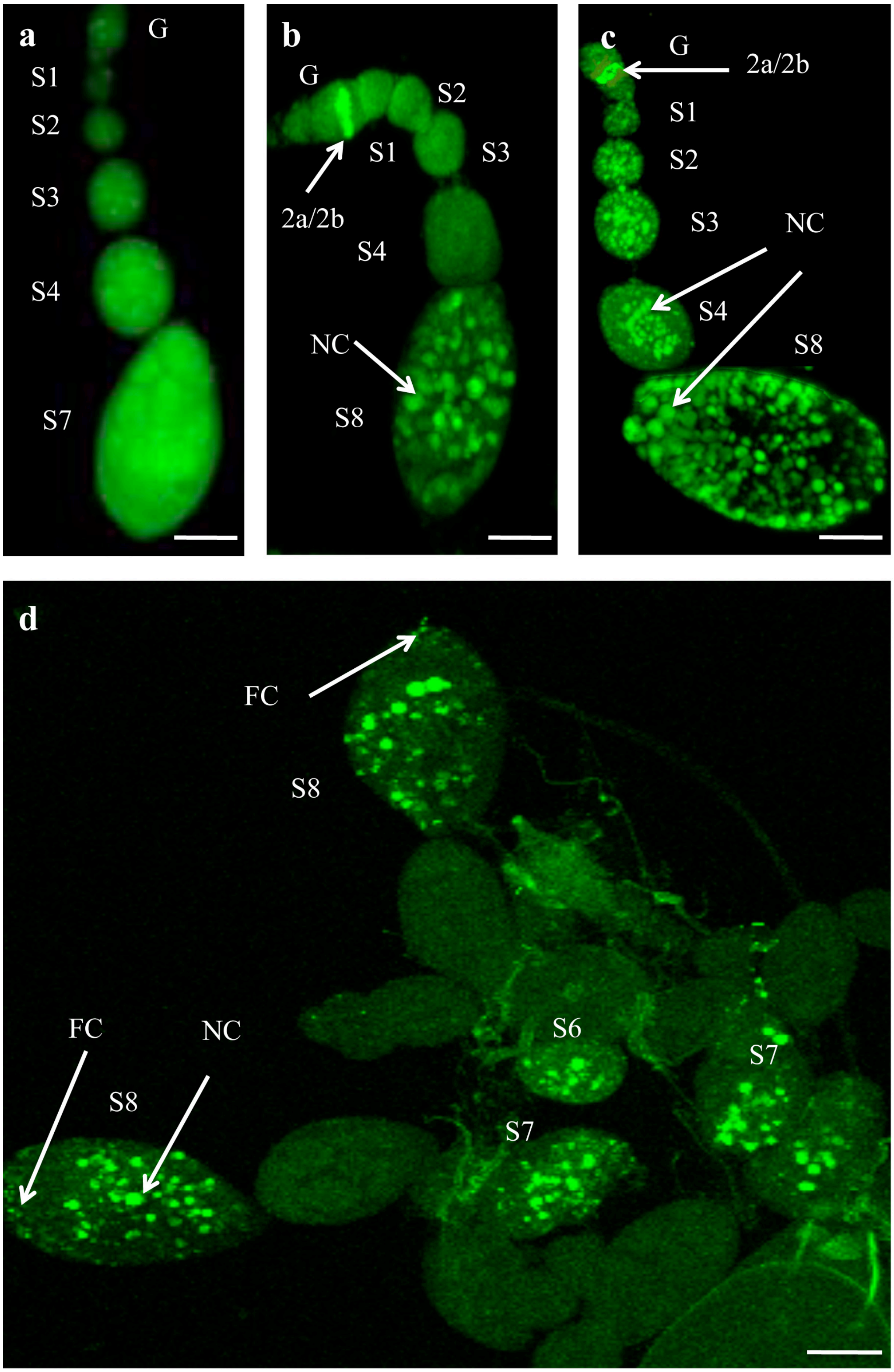
Εικόνα 3.8. Φωτονιογραφίες μικροσκοπίας φθορισμού ωοθυλακίων μετά από χρώση με πορτοκαλί της ακριδίνης. Οι φωτογραφίες είναι αντιπροσωπευτικές των υψηλών ποσοστών θρυμματισμένου DNA που σημειώθηκαν από τις ομάδες όλων των τύπων έκθεσης. a) φωτογραφία της ομάδας Σ, με θετικό σήμα φθορισμού σε δύο γερμάρια (μικρά βέλη) και σε άλλα 18 ωοθυλάκια σταδίων 3-9 (μεγάλα βέλη). b) φωτογραφία από την ομάδα Δ_1 με σήμα σε δύο γερμάρια (μικρά βέλη) και σε 15 ωοθυλάκια σταδίων 3-9 (μεγάλα βέλη). c) Απεικόνιση από δείγμα ομάδας Δ_2, με σήμα σε 3 γερμάρια (μικρά βέλη) και σε 11 ωοθυλάκια σταδίων 2-8 (μεγάλα βέλη). d) φωτογραφία ομάδας Δ_3 με σήμα σε ένα γερμάριο (μικρό βέλος) και σε άλλα 11 ωοθυλάκια σταδίων 5-8 (μεγάλα βέλη). e) Φωτογραφία ομάδας Δ_4, με σήμα σε 10 ωοθυλάκια σταδίων 7-9 (μεγάλα βέλη) και τέλος f) φωτογραφία και πάλι από την ομάδα Σ με θετικό σήμα σε ένα γερμάριο (μικρό βέλος) και σε άλλα 9 ωοθυλάκια σταδίων 5-9 (μεγάλα βέλη). Ενδεικτικά αναφέρονται τα στάδια ορισμένων ωοθυλακίων. Γραμμές μεγέθυνσης: 150μm.



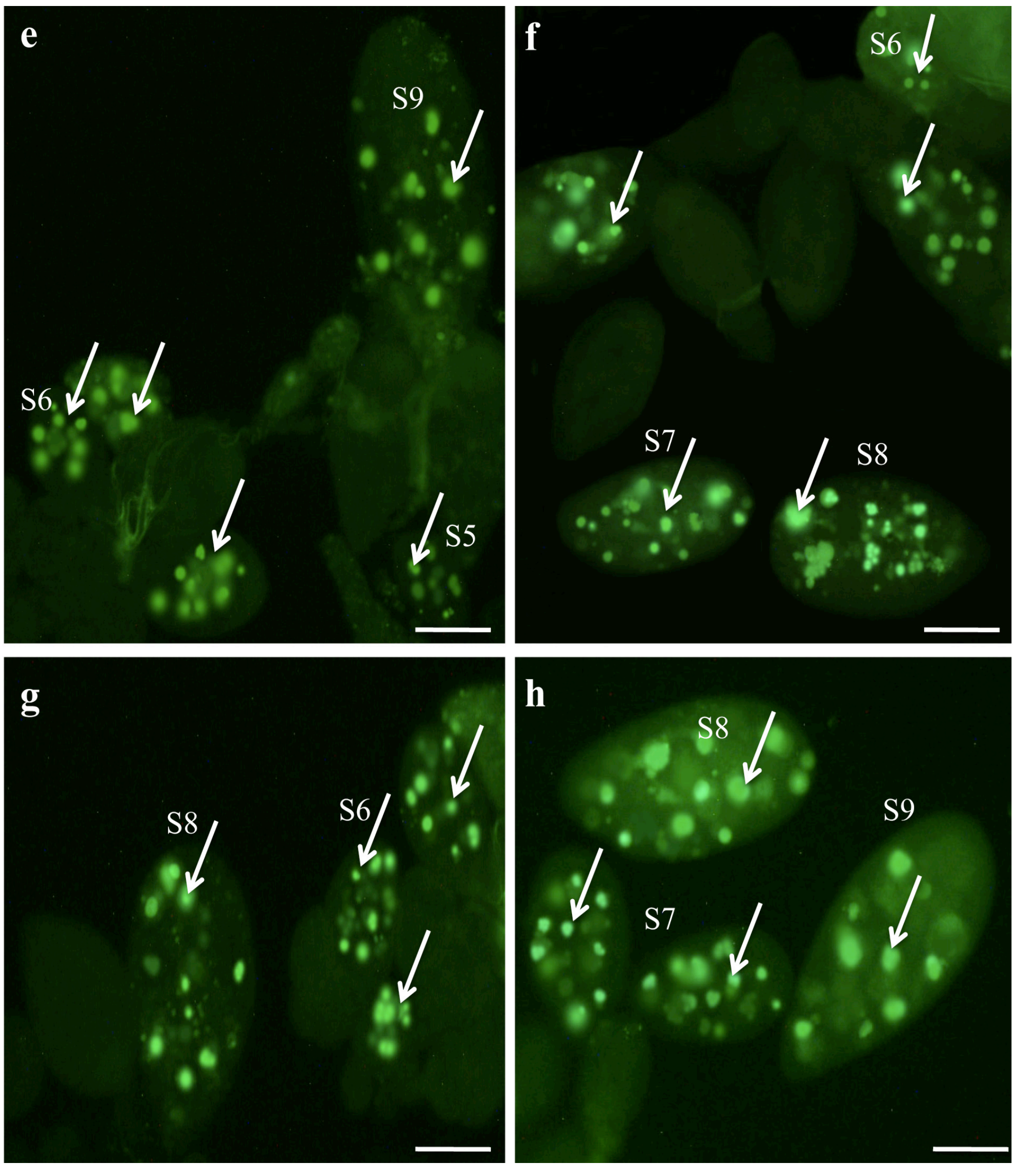

c
Εικόνα 3.6
S8
S7
S8

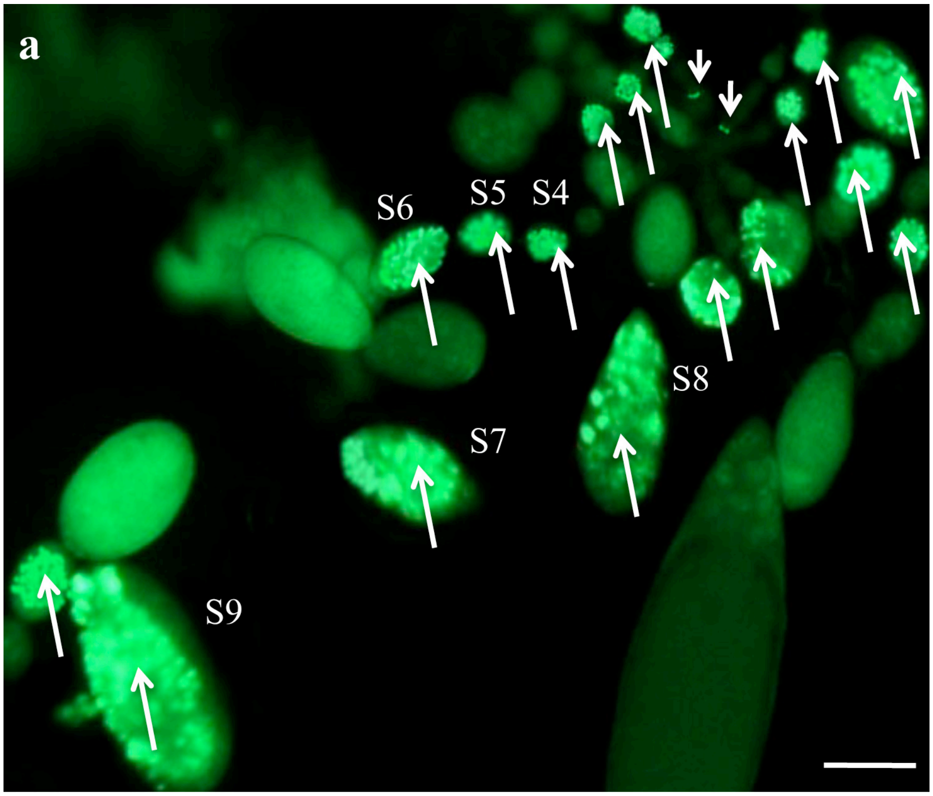

d
S8

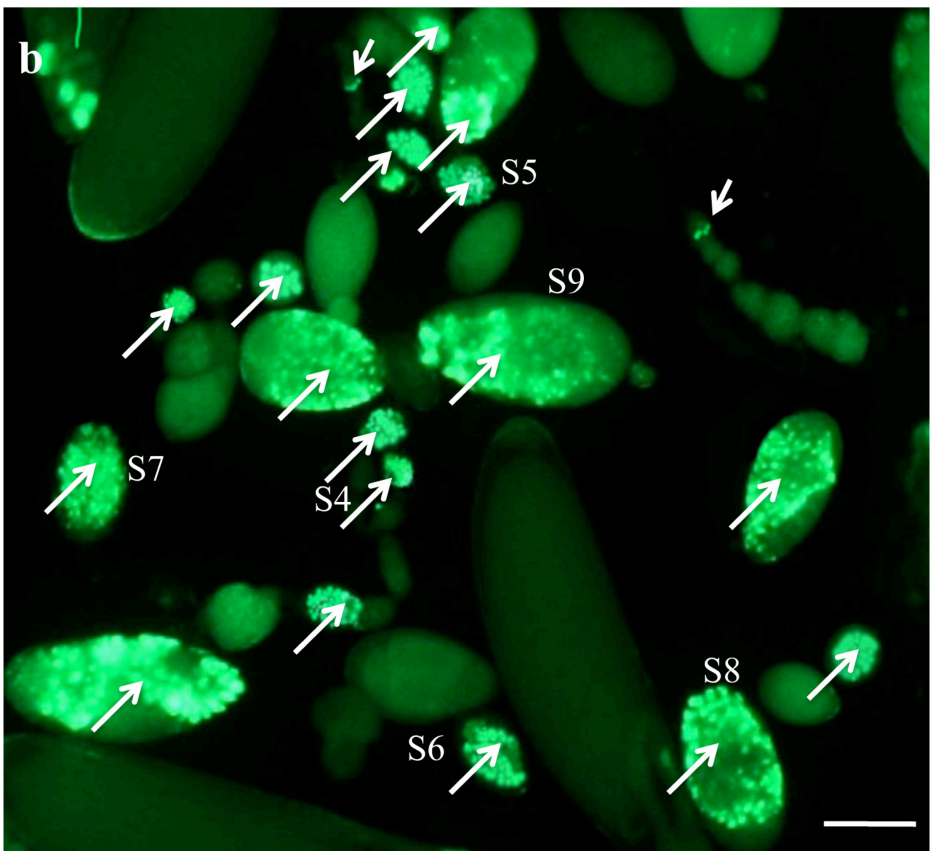
Εικόνα 3.7


a
G
S1
S2
S3
S4
S7
b
G
S2
S1
S3
2a/2b
S4
NC
S8
c
G
2a/2b
S1
S2
S3
NC
S4
S8
d
FC
S8
FC
NC
S8
S6
S7
S7

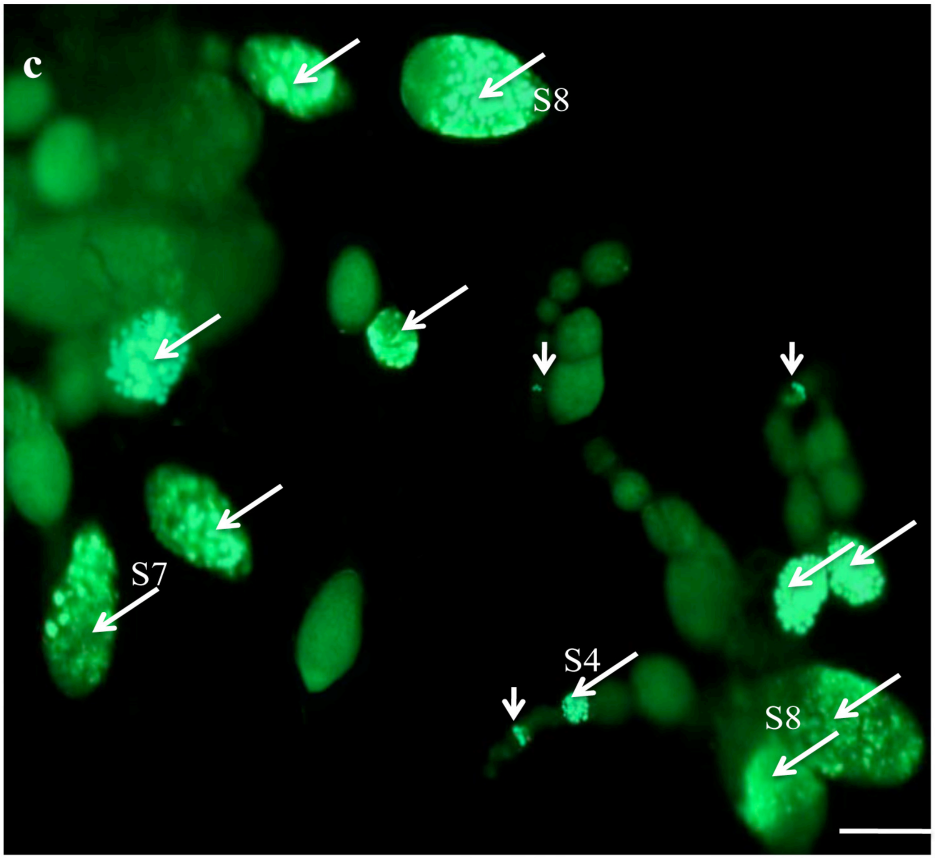
Εικόνα 3.7

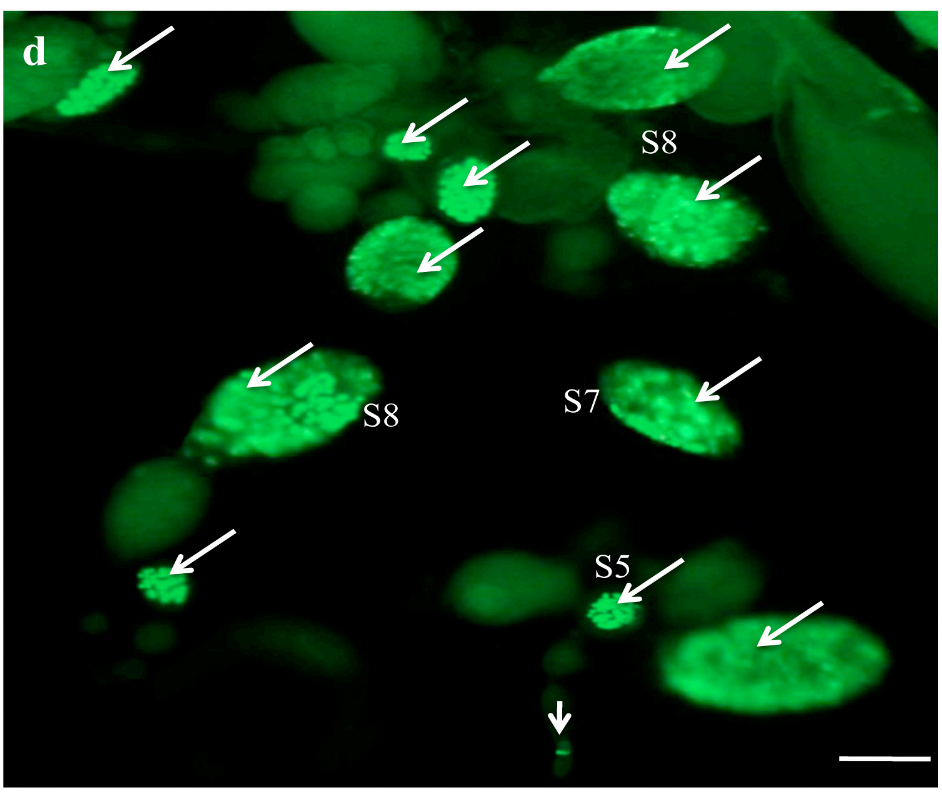



a
S6
S5
S4
S8
S7
S9

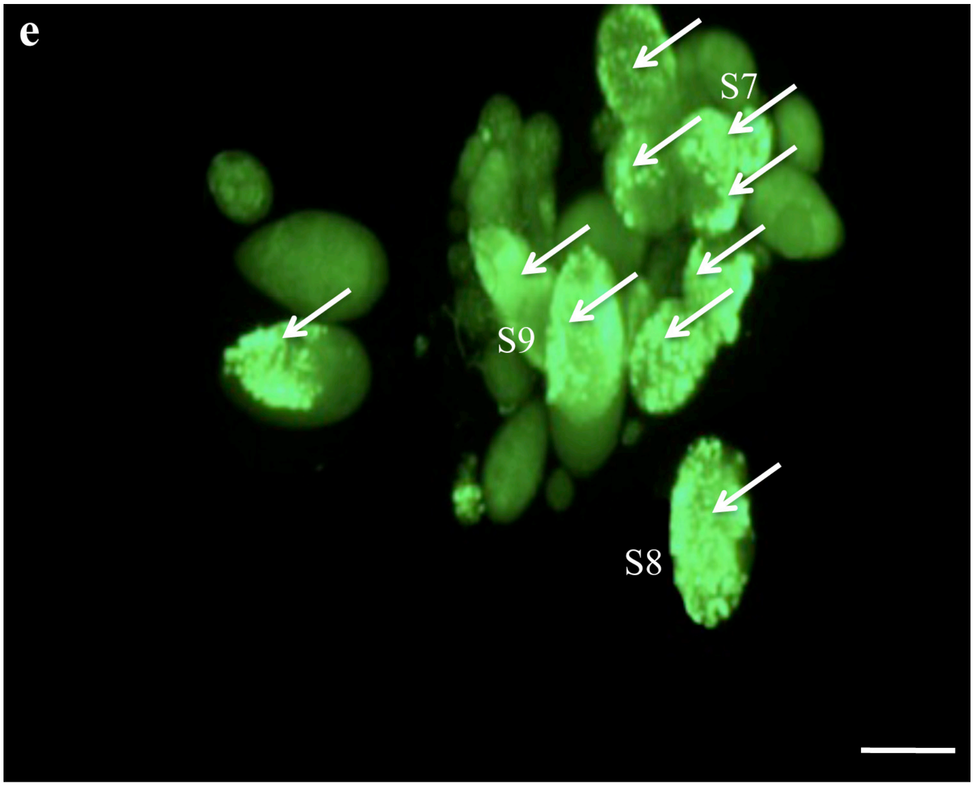

b
S5
S9
S7
S4
S8
S6

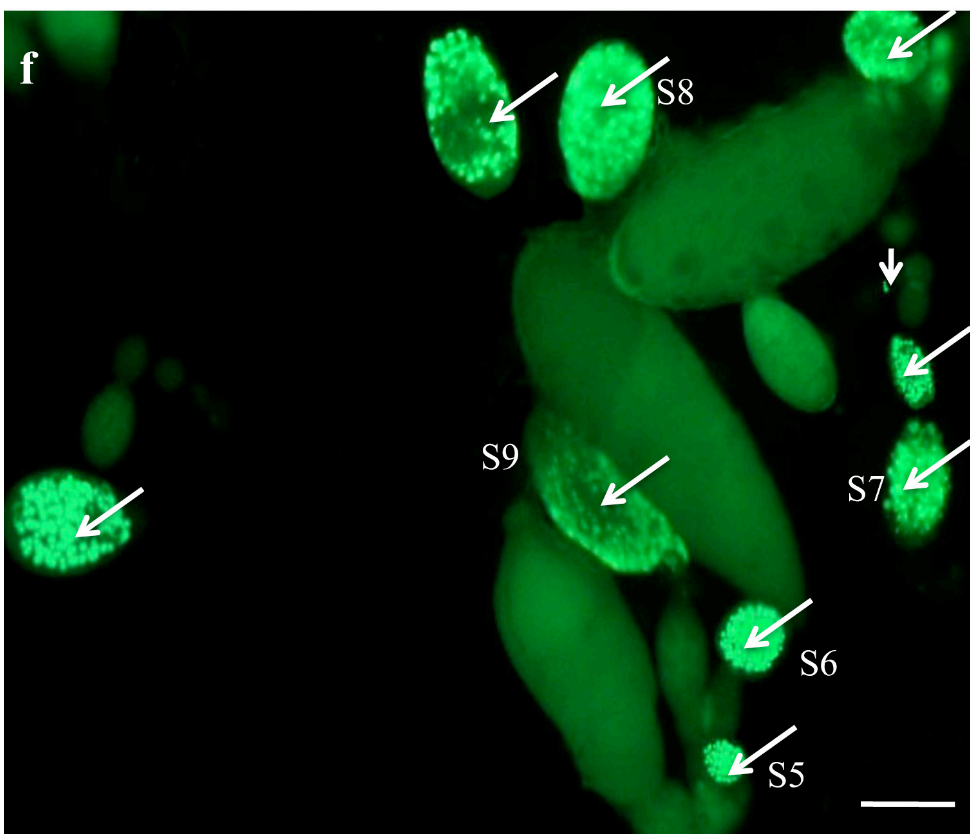
Εικόνα 3.8





Εικόνα 3.8





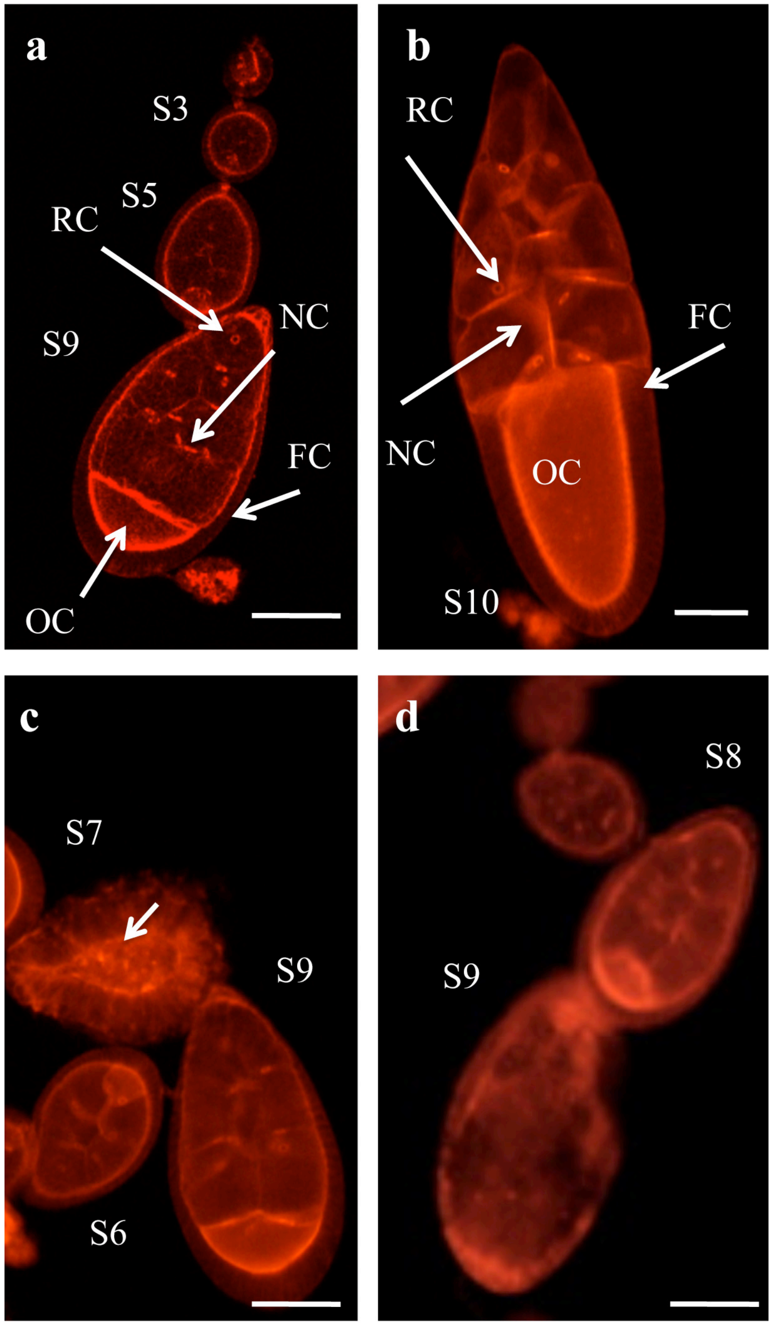
Επεξήγηση εικόνων

Απεικόνιση κυτ/τού της ακτίνης (χρώση φαλλοϊδίνη συνδεδεμένη με ροδαμίνη).

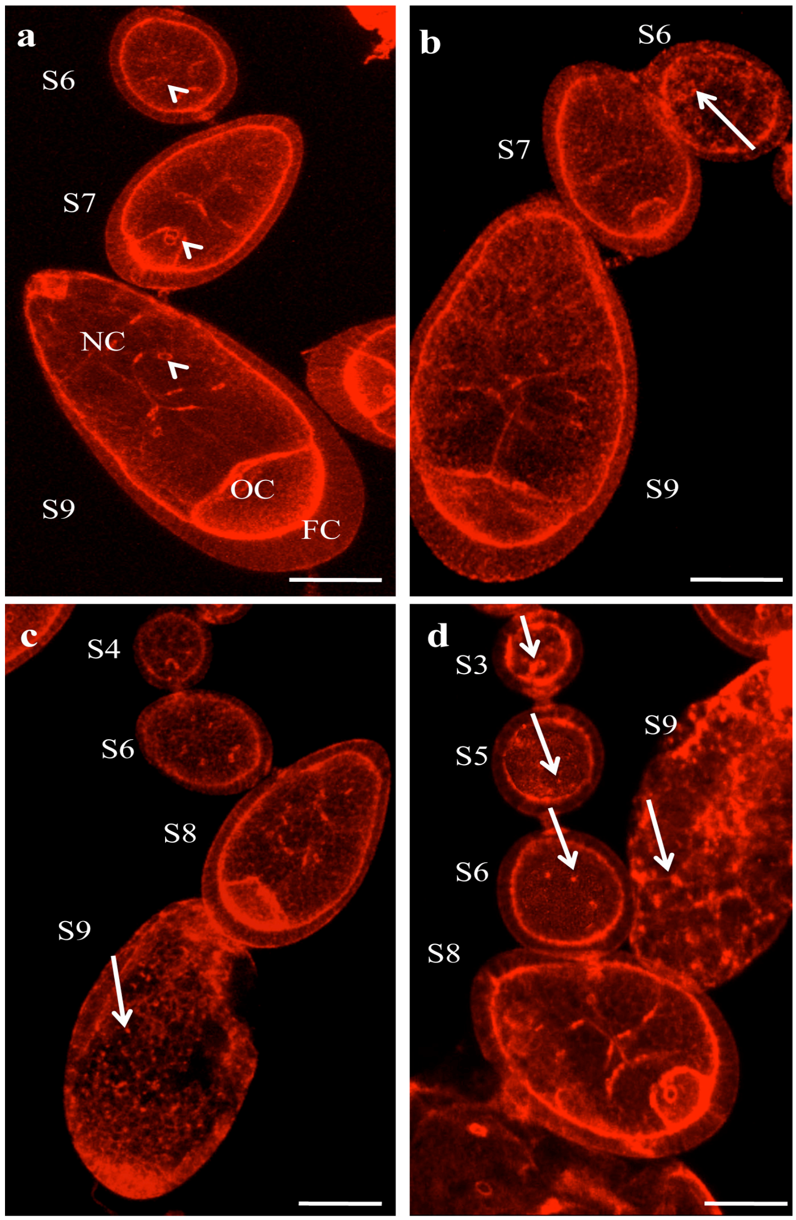
Εικόνα 3.9. Φωτονιογραφίες συνεστιακής μικροσκοπίας laser (a) και μικροσκοπίας φθορισμού (b, c, d) ωοθυλακίων μετά από χρώση φαλλοϊδίνης συνδεδεμένης με ροδαμίνη εκτεθειμένων και ομάδων μάρτυρα. Χαρακτηριστική απεικόνιση της κατανομής του κυτ/τού της ακτίνης στα τροφοκύτταρα (NC), το ωοκύτταρο (OC) και τα θυλακοκύτταρα (FC) στα ωοθυλάκια ενός ωοθηκαρίου (a) και ενός ωοθυλακίου σταδίου 10 (b) από έντομο μάρτυρα. Χαρακτηριστική η κατανομή και οργάνωση της υποφλοιώδους ακτίνης στα τρία είδη κυττάρων καθώς και το πολυγωνικό σχήμα των τροφοκυττάρων στο ωοθυλάκιο σταδίου 10. Επίσης, διακρίνεται η ακτίνη των των δακτυλιοειδών καναλιών (RC) (a, b-βέλη). c) Αποδιοργάνωση του κυτ/τού της ακτίνης με την παρουσία δεσμών ακτίνης (βέλος) και την απουσία δακτυλιοειδών καναλιών σε ανώμαλο ωοθυλάκιο σταδίου 7 (S7) από εκτεθειμένο έντομο (ομάδα Δ_1). Τα άλλα δύο ωοθυλάκια σταδίων 6 και 9 παρουσιάζουν φυσιολογική οργάνωση του κυτταροσκελετού (**Chavdoula et al., 2010**). d) Ωοθυλάκιο σταδίου 9 με αλλοιωμένο κυτ/τό ακτίνης (το ίδιο ωοθυλάκιο απεικονίζεται στην εικ. 3.10c από συνεστιακό μικροσκόπιο laser). Γραμμές μεγέθυνσης: a, c: 100μm, b: 50μm.

Εικόνα 3.10. Φωτονιογραφίες συνεστιακής μικροσκοπίας laser (a-d) ωοθυλακίων μετά από χρώση φαλλοϊδίνης συνδεδεμένης με ροδαμίνη εκτεθειμένων και ομάδας μάρτυρα. Φυσιολογική κατανομή και οργάνωση δικτύου ακτίνης σε ωοθυλάκια σταδίων 6, 7 και 9 (S6-9) στο ωοκύτταρο (OC), τα τροφοκύτταρα (NC), τα θυλακοκύτταρα (FC) και στα δακτυλιοειδή κανάλια (κεφαλή βέλους) από ομάδα μάρτυρα (a). Ωοθυλάκια αντιστοίχων σταδίων από εκτεθειμένη ομάδα (Δ_3) με αλλοιωμένο κυτταροσκελετό στο ωοθυλάκιο σταδίου 6 (S6) (b-βέλος). Ωοθηκάριο εκτεθειμένης ομάδας (Δ_4) με μεταβολές στο δίκτυο της ακτίνης σε ωοθυλάκιο σταδίου 9 (S9) (c-βέλος). Σύνολο ωοθυλακίων εκτεθειμένης ομάδας (Δ_2) με αποδιοργανωμένο κυτ/τό ακτίνης στα ωοθυλάκια των σταδίων 3, 5, 6 και 9 (S3, S5, S6, S9) (d-βέλη). Γραμμές μεγέθυνσης: 50μm.

Εικόνα 3.9



Εικόνα 3.10

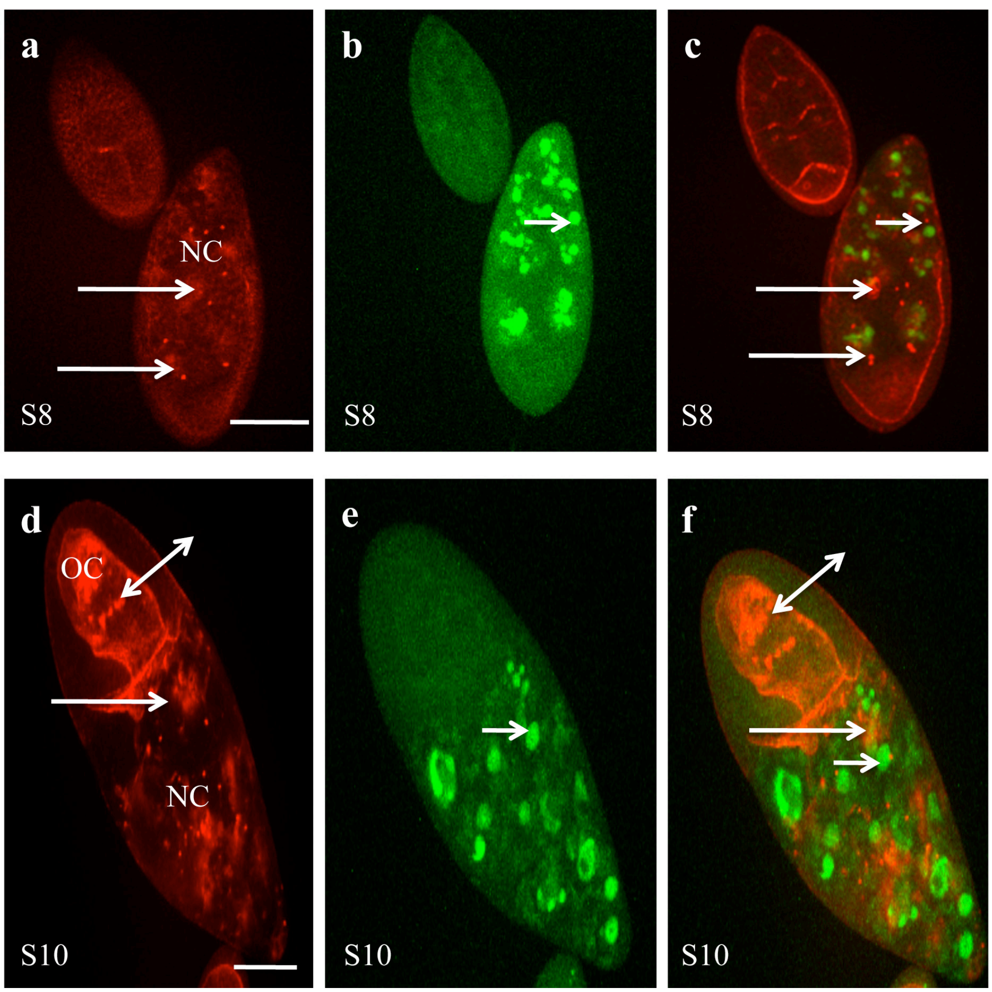


Ταυτόχρονη ανίχνευση αποδιοργανωμένου κυτ/τού ακτίνης και αποδομημένου DNA (διπλή χρώση φαλλοϊδίνης και TUNEL).

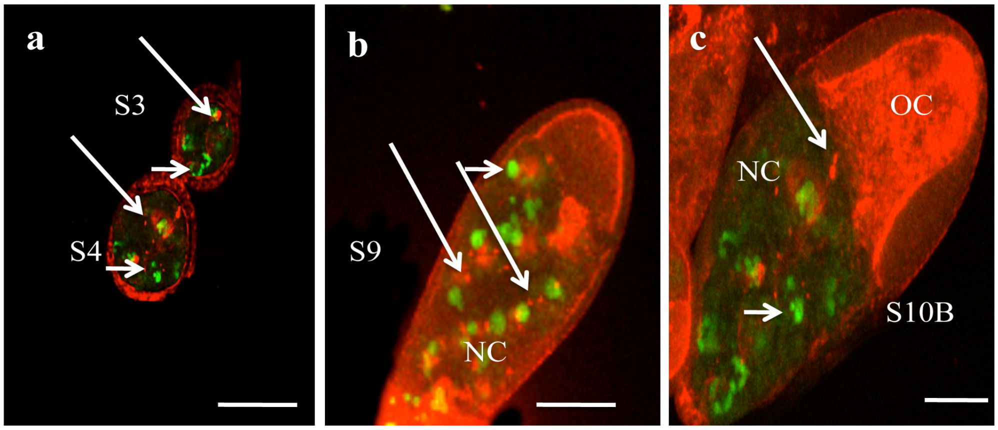
Εικόνα 3.11. Φωτονιογραφίες συνεστιακής μικροσκοπίας laser ωοθυλακίων μετά από διπλή χρώση TUNEL-φαλλοϊδίνης. a-c) Ωοθυλάκιο σταδίου 8 (S8) με αλλοιωμένο κυτταροσκελετό ακτίνης (a-μεγάλα βέλη), με θρυμματισμένο DNA (b-μικρό βέλος) και τέλος εικόνα με τα δύο αυτά χαρακτηριστικά να συμπίπτουν (c) στα τροφοκύτταρα (NC) του ωοθυλακίου. Το ωοθυλάκιο σταδίου 6 παρουσιάζεται φυσιολογικό. Αντίστοιχη σειρά απεικονίσεων (d-f) σε ωοθυλάκιο σταδίου 10 με αλλοιώσεις και στην ακτίνη του ωοκυττάρου (OC) (διπλό βέλος). Γραμμές μεγέθυνσης: 50μm (**Chavdoula et al., 2010**).

Εικόνα 3.12. a-c) Φωτονιογραφίες συνεστιακής μικροσκοπίας laser για την ταυτόχρονη ανίχνευση και των δύο χαρακτηριστικών (θρυμματισμένου DNA στους πυρήνες των τροφοκυττάρων (NC)-μικρό βέλος και αποδιοργανωμένου κυτταροσκελετού ακτίνης-μεγάλο βέλος) σε ωοθυλάκια σταδίων 3 και 4 (S3-4) (a) (**Chavdoula et al., 2010**), σταδίου 9 (b) και σταδίου 10B (c) με χαρακτηριστική και την αλλοίωση της ακτίνης του ωοκυττάρου (OC). Οι φωτογραφίες προέρχονται από δείγματα εκτεθειμένων ομάδων. Γραμμές μεγέθυνσης: 50μm.

Εικόνα 3.11



Εικόνα 3.12



3.2 Επαγωγή χαρακτηριστικών κυτταρικού θανάτου από την GSM ακτινοβολία κινητών τηλεφώνων στα ωοθυλάκια της πρώιμης και μέσης ωογένεσης

3.2.1 Στόχος πειραματικής σειράς

Η παρούσα πειραματική σειρά αποτελεί συνέχεια της προηγούμενης (ενότητα 3.1), στην οποία διαπιστώθηκε ότι τόσο η συνεχής όσο και οι διάφοροι τύποι διακοπτόμενης έκθεσης στην ακτινοβολία GSM-900MHz επιφέρουν μείωση της αναπαραγωγικής ικανότητας του εντόμου παράλληλα με υψηλά ποσοστά αποδομημένου DNA και αποδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης στα ωοθυλάκια της πρώιμης και μέσης ωογένεσης. Στην παρούσα μελέτη, εξετάστηκαν επιπλέον χαρακτηριστικά κυτταρικού θανάτου, όπως είναι η συμπύκνωση της πυρηνικής χρωματίνης, και η ενδεχόμενη ταύτιση αυτής με την αποδόμηση του DNA, καθώς και η ενεργοποίηση των κασπασών από το στρες της ακτινοβόλησης. Τα χαρακτηριστικά του συστήματος έκθεσης αναφέρονται στην αντίστοιχη παράγραφο (2.6.3.2).

3.2.2 Αποτελέσματα

Οι **πίνακες 3.6-3.8** παρουσιάζουν τα ποσοστά των ωοθυλακίων στα κύτταρα των οποίων έχουν ανιχνευθεί τα τρία χαρακτηριστικά κυτταρικού θανάτου: 1) συμπυκνωμένη πυρηνική χρωματίνη μετά από χρώση ιωδιούχο προπίδιο (PI) (**πίνακας 3.6**), 2) αποδόμηση του DNA ταυτόχρονα με την συμπύκνωση της πυρηνικής χρωματίνης μετά από διπλή χρώση με Tunel και PI (**πίνακας 3.7**) και 3) πρώιμα ενεργοποιημένες κασπάσες με τη χρήση του αναστολέα των ενεργοποιημένων κασπασών FITC-VAD-FMK (**πίνακας 3.8**). Η μελέτη των εκτεθειμένων ομάδων και ως προς τα τρία προαναφερθέντα χαρακτηριστικά κατέληξε σε αυξημένα και παρόμοια ποσοστά εμφάνισης αυτών των αλλοιώσεων. Πιο συγκεκριμένα, από το σύνολο 4 διαφορετικών πειραμάτων για την κάθε τεχνική το ποσοστό συμπύκνωσης της πυρηνικής χρωματίνης βρέθηκε να είναι 31.68%, το ποσοστό ταύτισης αυτής με το αποδομημένο DNA 29.76%, ενώ τέλος ο μέσος όρος του ποσοστού ανίχνευσης ενεργοποιημένων κασπασών 32.07%. Σημειώνεται ότι, οι διαφορές που καταγράφηκαν στα παραπάνω ποσοστά είναι εντός των τυπικών αποκλίσεων (**εικ. 3.13**). Αξίζει να σημειωθεί ότι και τα τρία χαρακτηριστικά συναντώνται κατά τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο.

Χαρακτηριστικές φωτογραφίες μικροσκοπίας φθορισμού και συνεστιακής μικροσκοπίας laser των ωοθυλακίων με τη χρήση των τριών παραπάνω τεχνικών παρατίθενται στις **εικόνες 3.14-3.17**. Στις **εικόνες 3.14, 3.15** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα χρώσης με ιωδιούχο προπίδιο (propidium iodide-PI). Στην **εικόνα 3.14a** φαίνονται ωοθηκάρια από έντομο μάρτυρα με φυσιολογικό σήμα φθορισμού στα ωοθυλάκια όλων των σταδίων που τα αποτελούν, δηλαδή από το στάδιο 1 μέχρι και το στάδιο 8, στα οποία εμφανίζονται οι ευμεγέθεις τροφοκυτταρικοί πυρήνες με φυσιολογική δομή χρωματίνης. Στην **εικόνα 3.14b** απεικονίζονται ωοθυλάκια διαφόρων σταδίων και μεταξύ αυτών και σταδίου 10 και πάλι από έντομο μάρτυρα με φυσιολογική δομή χρωματίνης στους πυρήνες των τροφοκυττάρων. Η **εικόνα 3.14c**, δίνει θετικό σήμα συμπύκνωσης χρωματίνης στους τροφοκυτταρικούς πυρήνες ενός ωοθυλακίου σταδίου 13 λόγω του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου στο στάδιο αυτό. Ακολουθούν οι **εικόνες 3.14d-f** από εκτεθειμένες ομάδες, με ένα ωοθηκάριο να δίνει θετικό σήμα στο ωοθυλάκιο σταδίου 5 (S5) (d), ένα ανώμαλο ωοθυλάκιο σταδίου 8 (S8) (e) και ένα ωοθυλάκιο σταδίου 10 επίσης με θετικό σήμα και με τους πυρήνες των τροφοκυττάρων να είναι έκτοποι εντός του ωοκυττάρου (f). Οι **εικόνες 3.15a-e** προερχόμενες επίσης από εκτεθειμένες ομάδες είναι αντιπροσωπευτικές των ποσοστών που καταγράφηκαν στον παραπάνω πίνακα. Πιο αναλυτικά, στην **3.15a** φαίνονται 3 ωοθυλάκια σταδίων 9-10, στην **3.15b** 3 ωοθυλάκια σταδίων 6, 7 και 10 με θετικό σήμα, στις **3.15c, d** 5 ωοθυλάκια σταδίων 5-10 με συμπυκνωμένη πυρηνική χρωματίνη ανάμεσα σε φυσιολογικά ωοθυλάκια αντιστοίχων σταδίων.

Φωτογραφίες ωοθυλακίων από εκτεθειμένα έντομα μετά από διπλή χρώση Tunel-PI, παρουσιάζονται στην **εικόνα 3.16**. Στις **εικόνες 3.16a,b** εμφανίζονται δύο ωοθυλάκια σταδίων 4 και 5 (S4, S5) με θετικό σήμα αποδομημένου DNA (**3.16a**) και θετικό σήμα συμπύκνωσης της πυρηνικής χρωματίνης στους ίδιους πυρήνες (**3.16b**). Στις επόμενες εικόνες **3.16c,d** παρουσιάζεται ένα ωοθυλάκιο σταδίου 9 (S9) με θρυμματισμένο DNA (**3.19c**) και ταυτόχρονα συμπυκνωμένη χρωματίνη (**3.16d**). Αντίστοιχη απεικόνιση ενός ωοθυλακίου σταδίου 10 (S10) με τη συνύπαρξη και των δύο χαρακτηριστικών κυτταρικού θανάτου παρατίθεται στις **εικόνες 3.16e, f**. Οι φωτογραφίες **3.16g,h,** προερχόμενες επίσης από εκτεθειμένη ομάδα εντόμων, παρέχουν ένα σύνολο ωοθυλακίων με τα ωοθυλάκια των σταδίων 5, 7 και 8 (S5, S7, S8) να φέρουν τα δύο χαρακτηριστικά κυτταρικού θανάτου στους τροφοκυτταρικούς τους πυρήνες. Τέλος, στις **εικόνες i, j** και πάλι από εκτεθειμένα έντομα, παρατηρείται ένα ωοθυλάκιο σταδίου 10 (S10) με θετικό σήμα και από τις δύο τεχνικές, μαζί με ένα φυσιολογικό ωοθυλάκιο σταδίου 12Α (S12) χωρίς σήμα.

Η **εικόνα 3.17** παρουσιάζει ωοθυλάκια από εκτεθειμένες ομάδες και ομάδες μάρτυρα μετά τη χρήση του αναστολέα FITC-VAD-FMK των ενεργοποιημένων κασπασών. Η **εικόνα 3.17a** δείχνει ένα ωοθηκάριο από έντομο μάρτυρα με φυσιολογικό φθορισμό στα ωοθυλάκια όλων των σταδίων που το αποτελούν, δηλαδή από το στάδιο 2 έως και το στάδιο 10 (S2-10). Η **3.17b** παρουσιάζει ένα ωοθυλάκιο σταδίου 12 στο οποίο το σήμα ενεργοποίησης κασπασών είναι φυσιολογικό στο κυτταρόπλασμα των τροφοκυττάρων του λόγω του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Οι επόμενες εικόνες προέρχονται από δείγματα εκτεθειμένων ομάδων. Η **εικόνα 3.17c** δίνει θετικό σήμα ενεργοποιημένων κασπασών στο κυτταρόπλασμα των τροφοκυττάρων σε ένα ωοθυλάκιο σταδίου 8 (S8). Στην **εικόνα 3.17d**, το σήμα εντοπίζεται σε ένα ωοθυλάκιο σταδίου 9 (S9), στις **3.17e,f** σήμα ανιχνεύεται σε ωοθυλάκια σταδίου 7 (S7), ενώ στην **3.17g** σε ωοθυλάκιο σταδίου 8 (S8). Τέλος, στις εικόνες **3.17h,i** και πάλι από εκτεθειμένες ομάδες εντόμων, παρατηρούμε το θετικό σήμα σε ένα ωοθυλάκιο σταδίου 7 (S7) λόγω επαγομένου θανάτου, ταυτόχρονα με το θετικό σήμα σε ένα ωοθυλάκιο σταδίου 13 (S13) λόγω ΠΚΘ (h), ενώ στην επόμενη φωτογραφία (i) απεικονίζεται ένα ωοθυλάκιο σταδίου 10Α (S10A) με ενεργοποιημένες κασπάσες λόγω επαγομένου θανάτου, σε αντίθεση με το σήμα που παρατηρείται φυσιολογικά, λόγω ΠΚΘ, στο ωοθυλάκιο σταδίου 11 (S11).

Πίνακας 3.6 Αποτελέσματα ανίχνευσης συμπυκνωμένης πυρηνικής χρωματίνης στα ωοθυλάκια πρώιμης και μέσης ωογένεσης μετά από έκθεση στο GSM πεδίο.

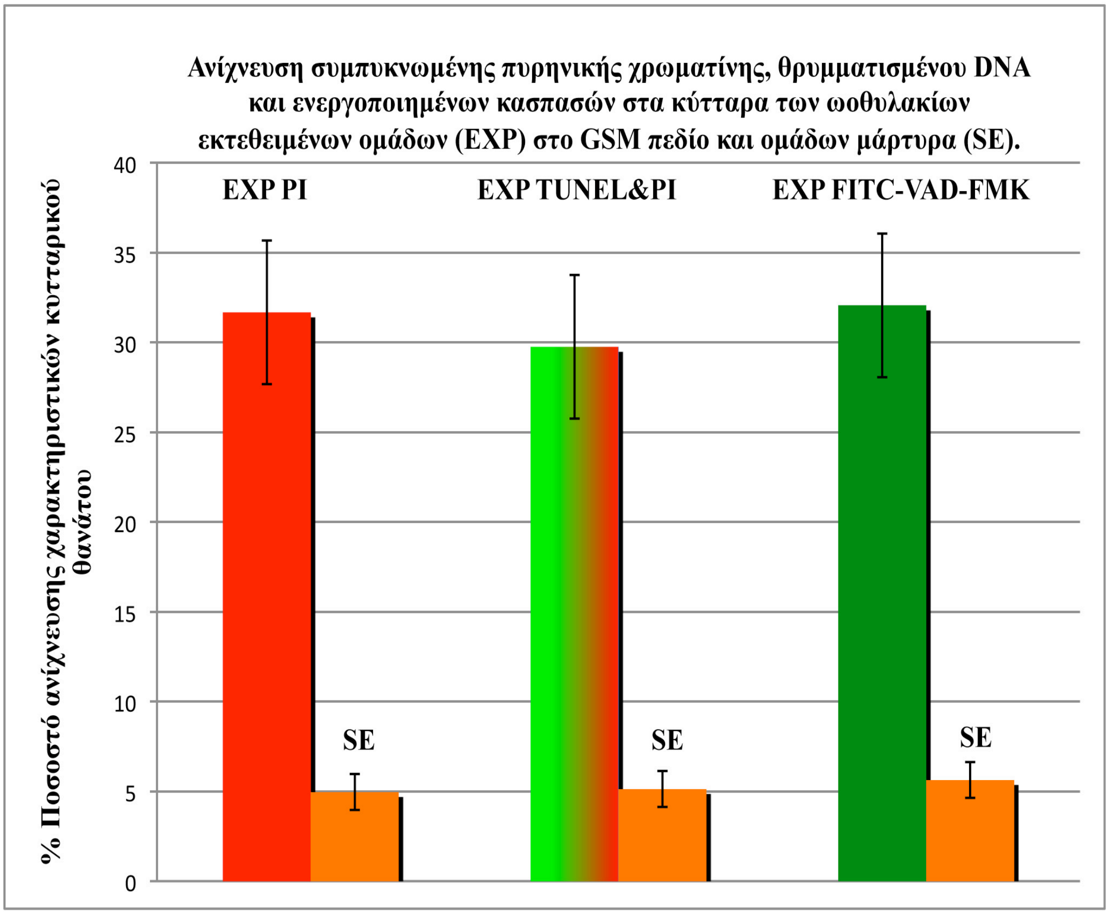
Αριθμός πειράματος	**Ομάδες**	**Σύνολο ωοθυλακίων με θετικό σήμα PI/συνολικό αριθμό ωοθυλακίων**	**Ποσοστό ωοθυλακίων με θετικό σήμα PI (%)**	**Απόκλιση από το μάρτυρα (SE) (%)**
1	Exp	89/329	**27.05**	+22.36
	SE	13/277	**4.69**	
2	Exp	93/291	**31.96**	+26.23
	SE	16/279	**5.73**	
3	Exp	98/306	**32.03**	+28.11
	SE	12/306	**3.92**	
4	Exp	101/276	**36.59**	+31.08
	SE	19/345	**5.51**	
Συνολικά	**Exp**	381/1202	**31.68±3.896**	+26.71
	SE	60/1207	**4.97±0.827**	

Πίνακας 3.7 Αποτελέσματα ανίχνευσης συμπυκνωμένης πυρηνικής χρωματίνης και θρυμματισμένου DNA στα ωοθυλάκια πρώιμης και μέσης ωογένεσης μετά από έκθεση στο GSM πεδίο.

Αριθμός πειράματος	**Ομάδες**	**Σύνολο ωοθυλακίων με θετικό σήμα PI&TUNEL/συνολικό αριθμό ωοθυλακίων**	**Ποσοστό ωοθυλακίων με θετικό σήμα PI&TUNEL (%)**	**Απόκλιση από το μάρτυρα (SE) (%)**
1	Exp	99/293	**33.79**	+27.33
	SE	19/294	**6.46**	
2	Exp	86/281	**30.61**	+25.61
	SE	15/300	**5.00**	
3	Exp	103/347	**29.68**	+25.00
	SE	14/299	**4.68**	
4	Exp	76/302	**25.2**	+20.76
	SE	13/293	**4.44**	
Συνολικά	**Exp**	364/1223	**29.76%±3.547**	+24.62
	SE	61/1186	**5.14%±0.906**	

Πίνακας 3.8 Αποτελέσματα ανίχνευσης ενεργοποιημένων κασπασών στα ωοθυλάκια πρώιμης και μέσης ωογένεσης μετά από έκθεση στο GSM πεδίο.

Αριθμός πειράματος	**Ομάδες**	**Σύνολο ωοθυλακίων με θετικό σήμα FITC-VAD-FMK/συνολικό αριθμό ωοθυλακίων**	**Ποσοστό ωοθυλακίων με θετικό σήμα FITC-VAD-FMK (%)**	**Απόκλιση από το μάρτυρα (SE) (%)**
1	Exp	105/289	**36.33**	+29.71
	SE	19/287	**6.62**	
2	Exp	76/251	**30.28**	+25.26
	SE	15/299	**5.02**	
3	Exp	103/294	**35.03**	+29.23
	SE	17/293	**5.8**	
4	Exp	89/329	**27.05**	+21.91
	SE	15/292	**5.14**	
Συνολικά	**Exp**	373/1163	**32.07%±4.292**	+26.43
	SE	66/1171	**5.64%±0.735**	



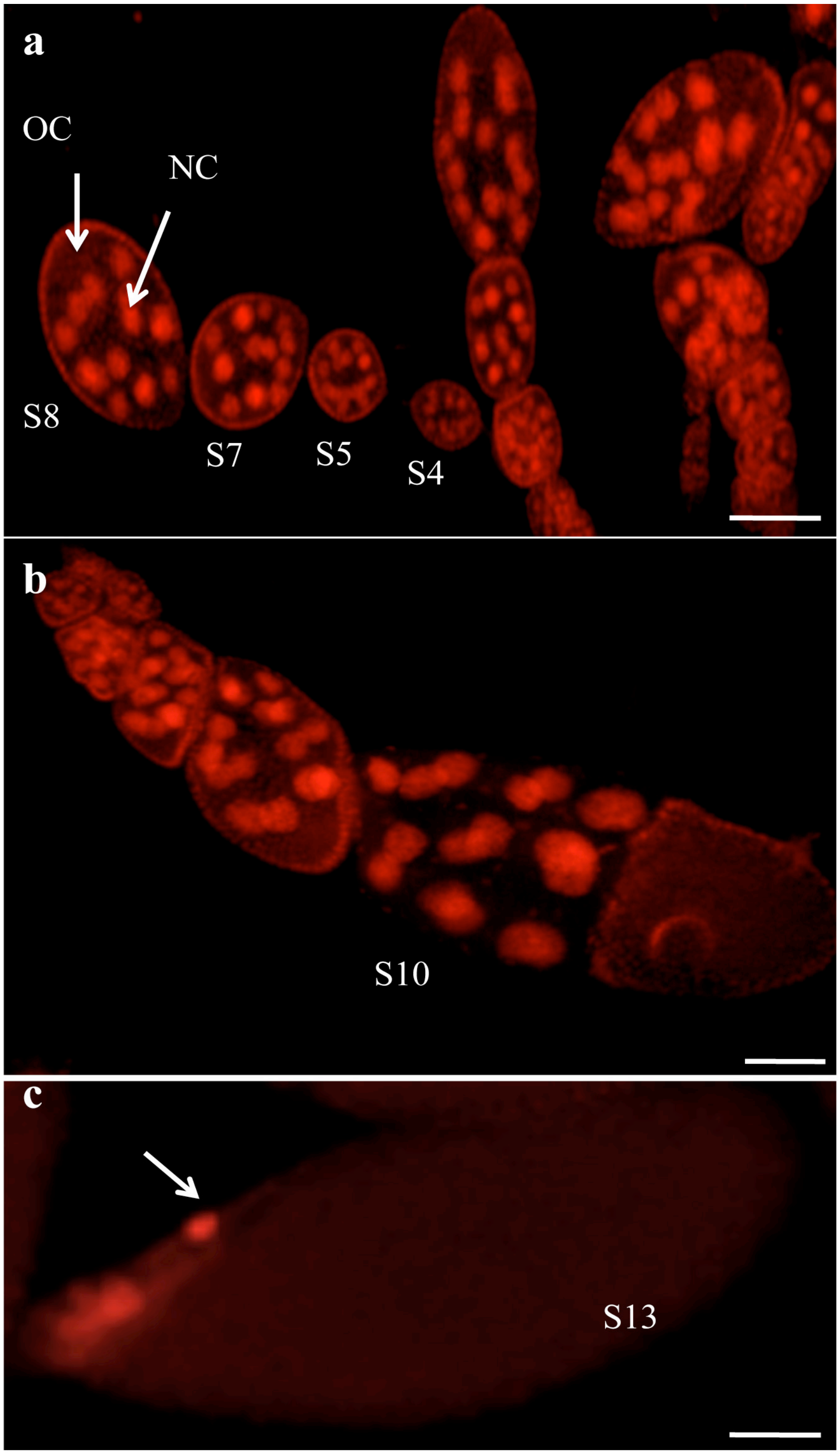
Εικόνα 3.13 Διαγραμματική απεικόνιση της μέσης τιμής του %ποσοστού των ωοθυλακίων ± SD, με χαρακτηριστικά: συμπύκνωσης πυρηνικής χρωματίνης (χρώση PI), αποδόμησης DNA και ταυτόχρονης συμπύκνωσης της πυρηνικής χρωματίνης (διπλή χρώση TUNEL&PI), καθώς και πρώιμα ενεργοποιημένων κασπασών (αντιδραστήριο FITC-VAD-FMK) σε εκτεθειμένες ομάδες (EXP) και ομάδες μάρτυρα (SE).

Απεικόνιση πυρήνων και ανίχνευση συμπυκνωμένης πυρηνικής χρωματίνης (χρώση με ιωδιούχο προπίδιο PI).

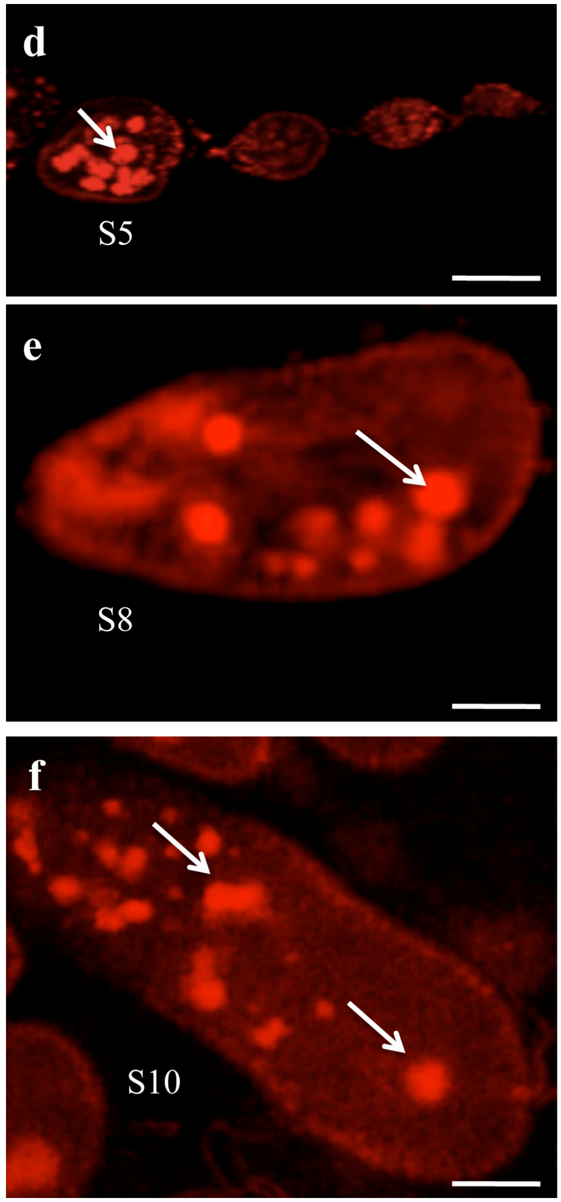
Εικόνα 3.14. Φωτονιογραφίες μικροσκοπίας φθορισμού ωοθυλακίων μετά από χρώση propidium-iodide (PI). a και b) Χαρακτηριστική απεικόνιση ωοθηκαρίων από έντομο μάρτυρα στα οποία παρατηρούνται οι φυσιολογικοί πυρήνες των τροφοκυττάρων (NC) σε ωοθυλάκια διαφόρων σταδίων από το γερμάριο μέχρι και το στάδιο 8 (S4, S5, S7, S8) (a) καθώς και σε ωοθυλάκιο σταδίου 10 (b). c) Ωοθυλάκιο σταδίου 13 με θετικό σήμα στους τροφοκυτταρικούς πυρήνες λόγω ΠΚΘ (βέλος). d) Ωοθηκάριο εκτεθειμένου εντόμου με συμπυκνωμένη χρωματίνη σε ένα ωοθυλάκιο σταδίου 5 (S5) (βέλος), ενώ τα υπόλοιπα είναι φυσιολογικά. e) Ανώμαλο ωοθυλάκιο σταδίου 8 (S8) από εκτεθειμένη ομάδα με χαρακτηριστικά συμπύκνωσης της πυρηνικής χρωματίνης (βέλος). f) Ωοθυλάκιο που ομοιάζει σε ωοθυλάκιο σταδίου 10 με έκτοπους τροφοκυτταρικούς πυρήνες (βέλη) στο ωοκύτταρο (OC) και θετικό σήμα PI από εκτεθειμένη ομάδα. Γραμμές μεγέθυνσης: a-d, f: 50μm, e: 20μm.

Εικόνα 3.15. Φωτονιογραφίες μικροσκοπίας φθορισμού με χαρακτηριστικές απεικονίσεις από εκτεθειμένες ομάδες εντόμων: a) 3 ωοθυλάκια σταδίων 9-10 (S9-10) με θετικό σήμα (βέλη), b) 3 ωοθυλάκια με θετικό σήμα σταδίων 6, 7 και 10 (S6, 7, 10) (βέλη). Χαρακτηριστική η μετατόπιση των τροφοκυτταρικών πυρήνων στο ωοκύτταρο. c, d) επίσης αντιπροσωπευτικές εικόνες με 5 ωοθυλάκια διαφόρων σταδίων (5-10) να φέρουν θετικό σήμα συμπυκνωμένης χρωματίνης (βέλη) ανάμεσα σε φυσιολογικά ωοθυλάκια αντιστοίχων σταδίων. Γραμμές μεγέθυνσης: a, c: 100 μm, b: 50 μm, d: 150 μm.

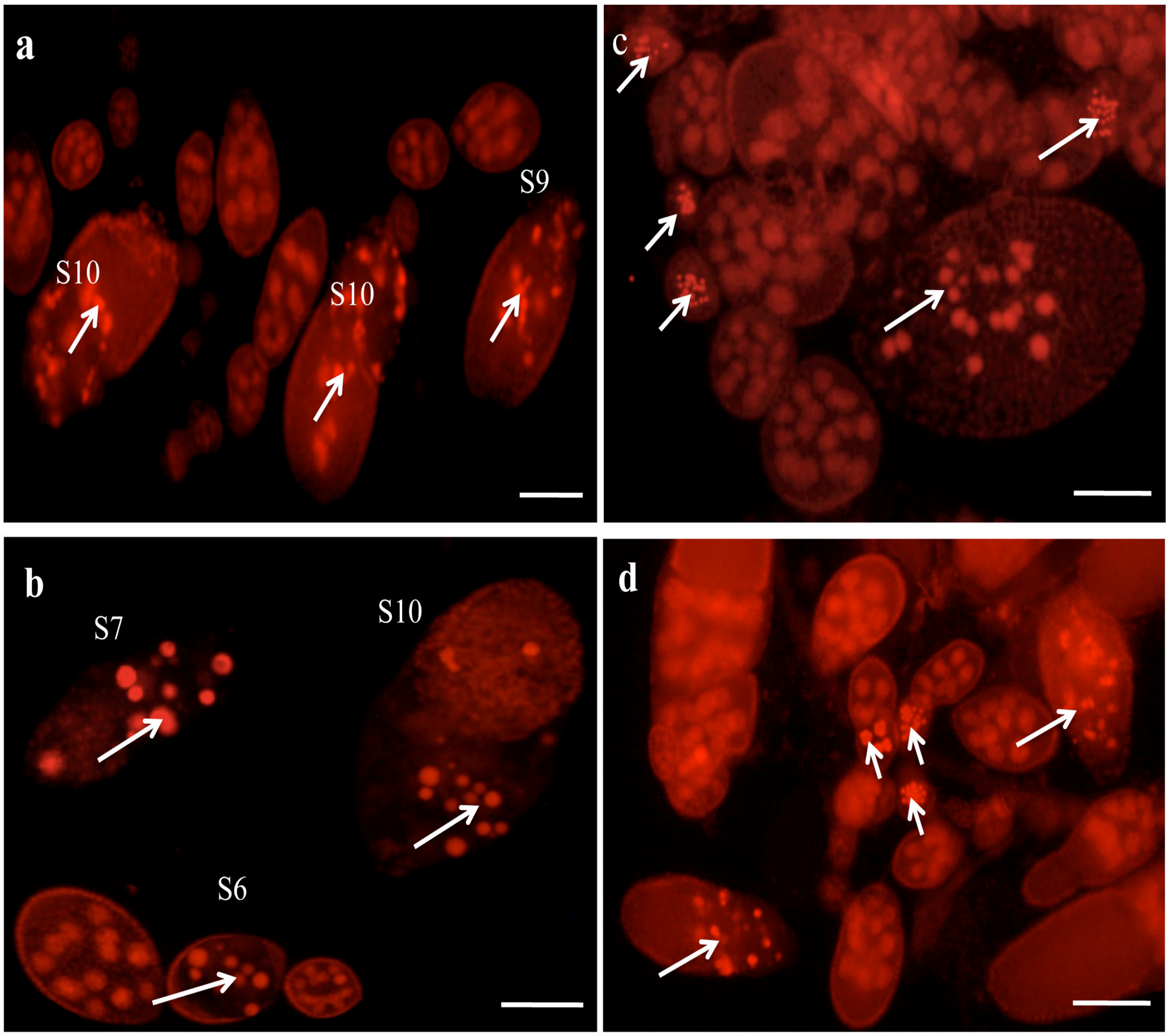
Εικόνα 3.14



Εικόνα 3.14



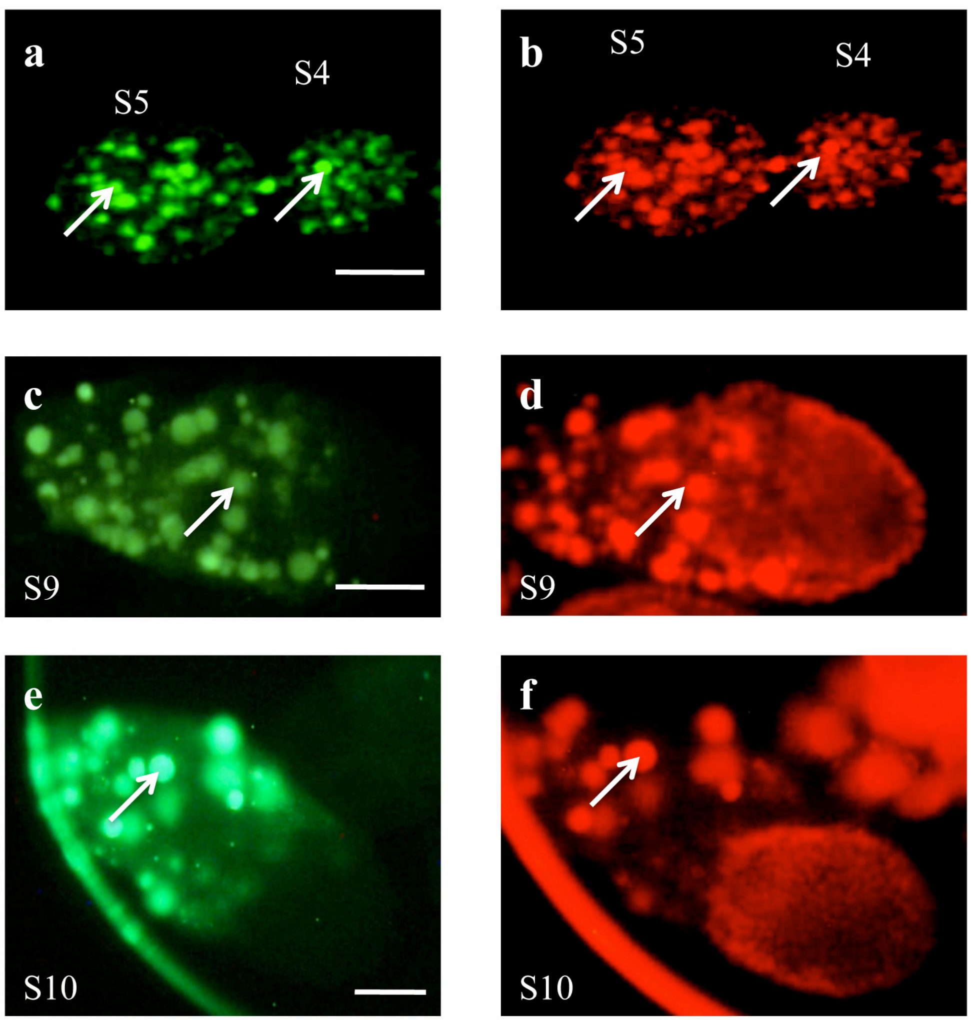
Εικόνα 3.15



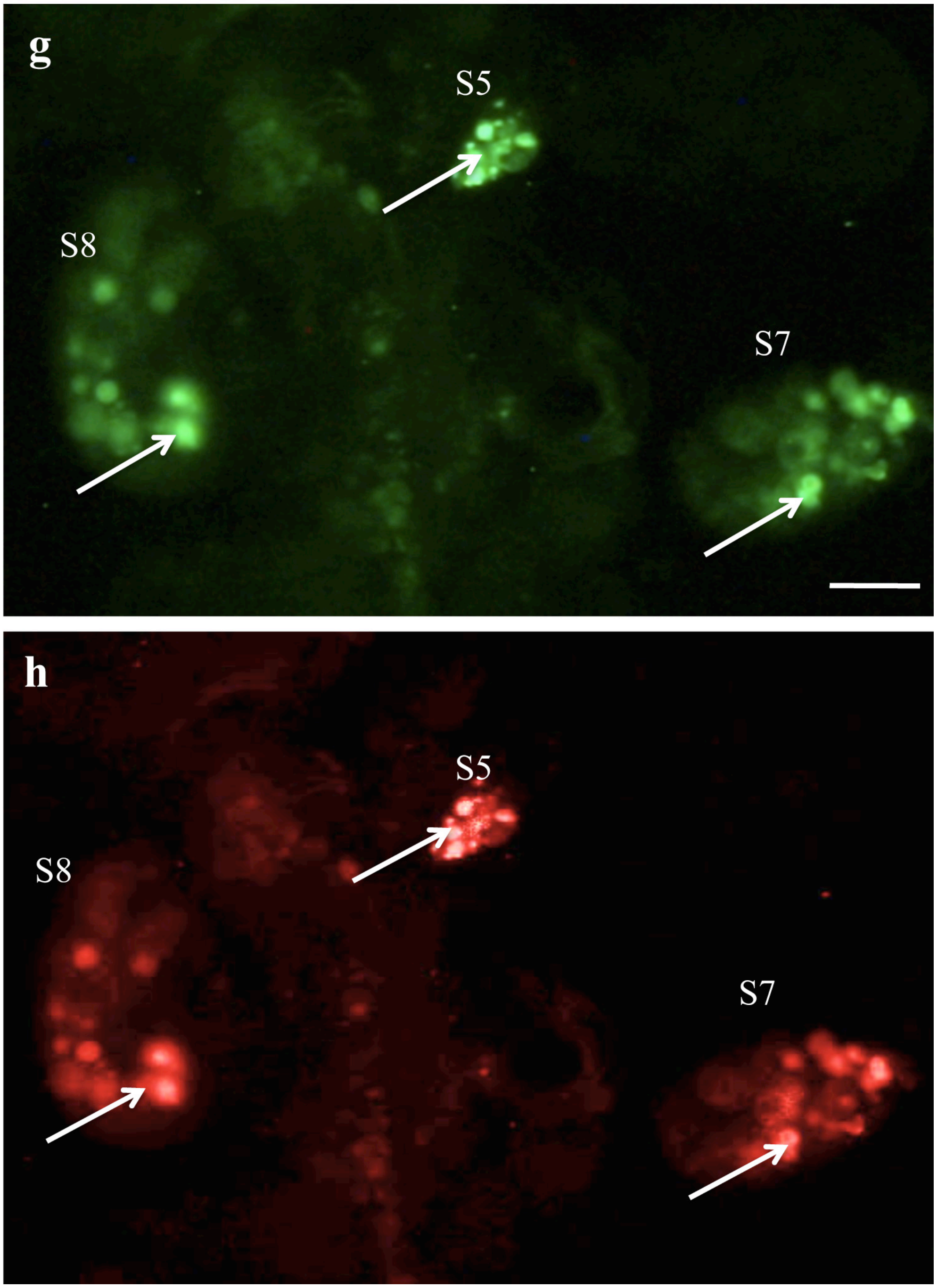
Ταυτόχρονη ανίχνευση αποδομημένου DNA και συμπυκνωμένης πυρηνικής χρωματίνης (διπλή χρώση TUNEL&PI).

Εικόνα 3.16. Φωτονιογραφίες, από μικροσκόπιο φθορισμού, ωοθυλακίων μετά από διπλή χρώση TUNEL&PI. a, c, e) Θετικό σήμα φθορισμού (βέλος) θρυμματισμένου DNA (TUNEL) σε ωοθυλάκια εκτεθειμένων εντόμων σταδίων 4, 5 (S4, 5) (a) σταδίου 9 (S9) (c), σταδίου 10 (S10) (e). b, d, f) Οι ίδιοι πυρήνες εμφανίζουν συμπυκνωμένη χρωματίνη (PI) (βέλη). g, h) Χαρακτηριστικές εικόνες ενός συνόλου ωοθυλακίων εκτεθειμένων ομάδων με τρία ωοθυλάκια σταδίων 5, 7 και 8 (S5, S7, S8) να φέρουν θετικό σήμα φθορισμού για την αποδόμηση του DNA και τη συμπύκνωση της πυρηνικής χρωματίνης (βέλη). i, j) Ωοθυλάκιο σταδίου 10 με θετικό σήμα TUNEL (i) και PI (j) και ωοθυλάκιο σταδίου 12A με αρνητικό σήμα αποδόμησης DNA (i) και συμπύκνωσης χρωματίνης (j). Γραμμές μεγέθυνσης: a-f, i-j: 50 μm, g-h: 100μm.

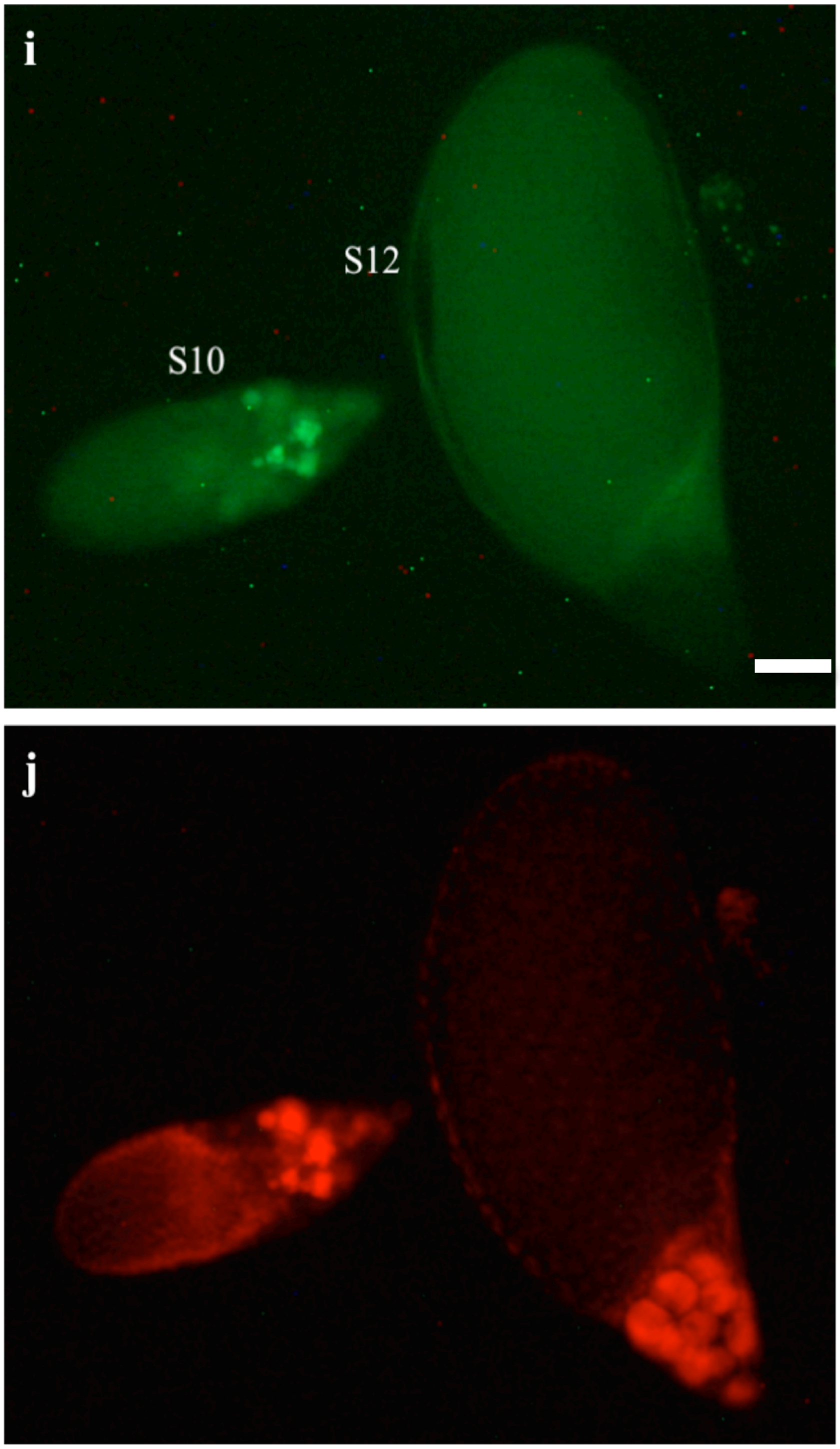
Εικόνα 3.16



Εικόνα 3.16



Εικόνα 3.16

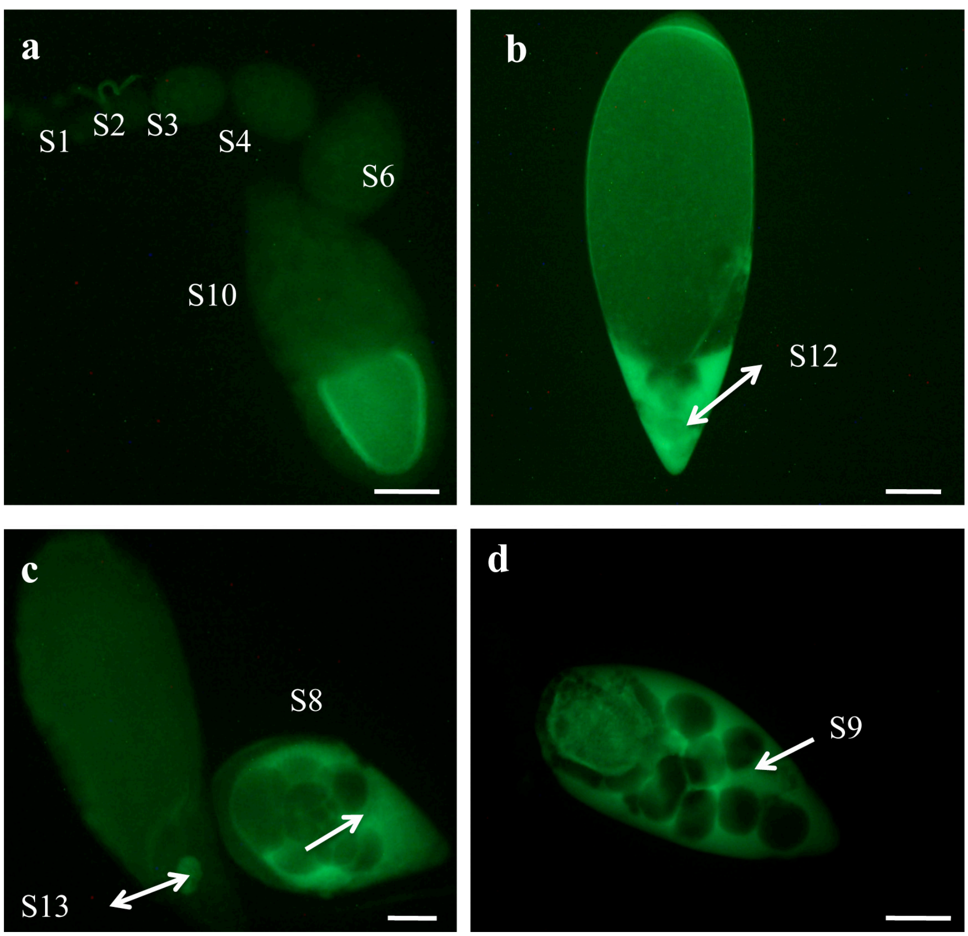


Επεξήγηση εικόνων

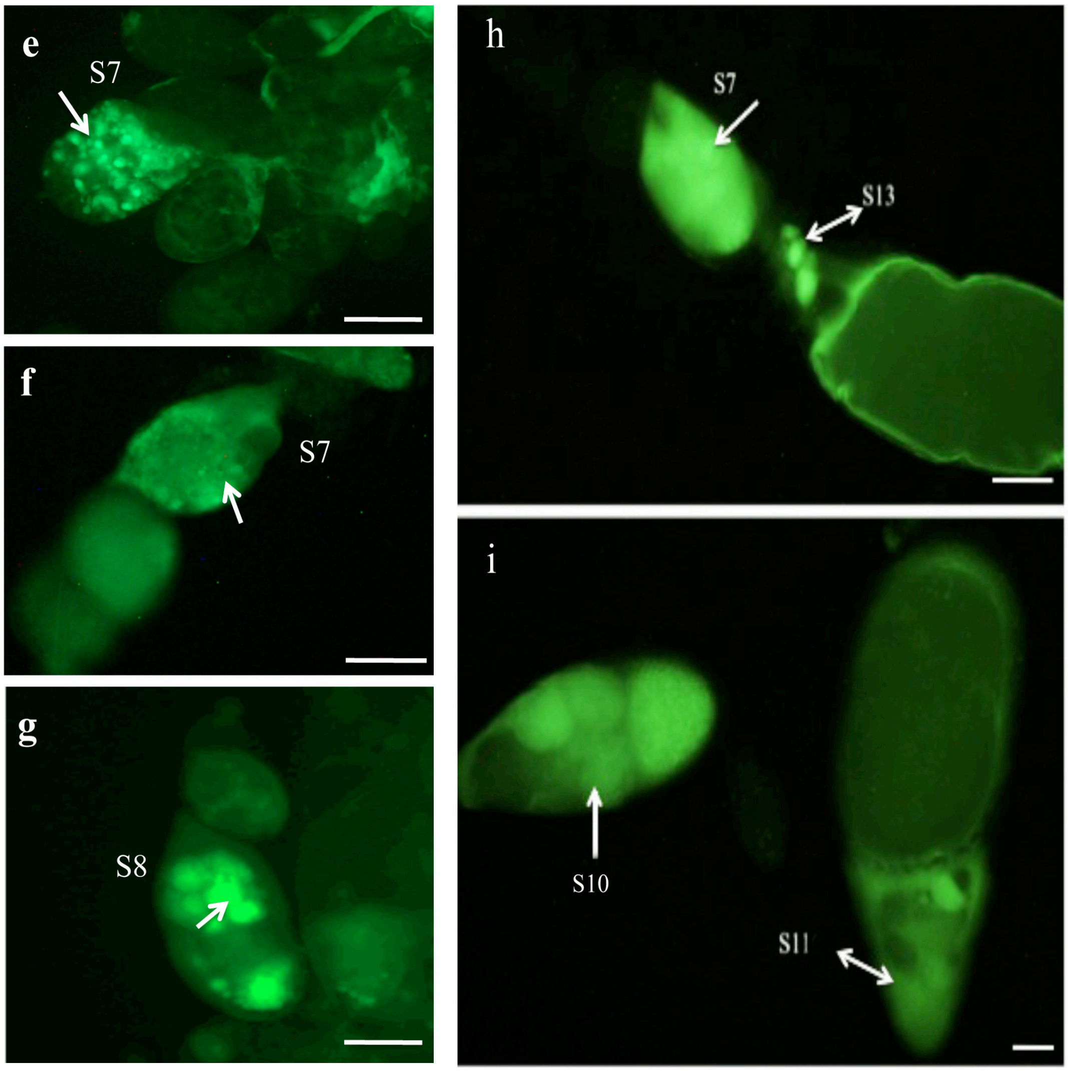
Ανίχνευση ενεργοποιημένων κασπασών (αναστολέας FITC-VAD-FMK).

Εικόνα 3.17. Φωτονιογραφίες, από μικροσκόπιο φθορισμού, ωοθυλακίων μετά τη χρήση του αναστολέα FITC-VAD-FMK. Ανίχνευση θετικού σήματος (βέλος) στο κυτταρόπλασμα των τροφοκυττάρων (NC). a) Ωοθηκάριο από έντομο μάρτυρα με φυσιολογικό φθορισμό στα ωοθυλάκια όλων των σταδίων που το αποτελούν (στάδια 2-10). b) Ωοθυλάκιο σταδίου 11C-12A στάδιο με θετικό σήμα φθορισμού λόγω ΠΚΘ στο στάδιο αυτό (διπλό βέλος). c-i) Ωοθυλάκια από εκτεθειμένες ομάδες εντόμων σταδίου 8 (c), σταδίου 9 (d), σταδίων 7 (e, f), σταδίου 8 (g), σταδίου 7 (h) και 10A (i) με θετικό σήμα λόγω επαγομένου κυτταρικού θανάτου (βέλη). Στις εικόνες c, h, i παρατηρείται θετικό σήμα και στα μεγαλύτερα ωοθυλάκια λόγω ΠΚΘ (διπλά βέλη). Γραμμές μεγέθυνσης: 50μm.

Εικόνα 3.17



Εικόνα 3.17



3.3 Μελέτη επίδρασης της GSM ακτινοβολίας κινητών τηλεφώνων στα ωοθυλάκια της όψιμης ωογένεσης

Ενδεχόμενες αλλοιώσεις στα χοριογενετικά στάδια της όψιμης ωογένεσης του εντόμου θα μπορούσαν να μαρτυρούν μεταβολές όχι απαραίτητα λόγω της επίδρασης της ακτινοβολίας στα στάδια αυτά, αλλά σε αμέσως προηγούμενα. Όπως είναι γνωστό, και έχει ήδη αναλυθεί στην Εισαγωγή, μέχρι το στάδιο 8, τα θυλακοκύτταρα διαμορφώνουν ένα κυβοειδές επιθήλιο που περιβάλλει τα κύτταρα της γενετικής σειράς. Κατά το στάδιο 9, τα θυλακοκύτταρα υφίστανται μία σειρά εκτεταμένων μεταβολών στο σχήμα τους, καθώς και μορφογενετικές διαφοροποιήσεις και μεταναστεύσεις. Οι διάφοροι υποπληθυσμοί των κυττάρων αυτών, που αρχίζουν από το στάδιο αυτό να γίνονται διακριτοί μεταξύ τους, μέσα από ένα σύνολο αναδιοργανώσεων, σχηματίζουν τις τελικές δομές του ωρίμου αυγού, όπως τις ζώνες του κελύφους και τα αναπνευστικά νημάτια. Πλήθος μορίων και μονοπατιών σηματοδότησης μεταξύ των θυλακοκυττάρων και των κυττάρων γενετικής σειράς, συμμετέχουν ενεργά και καταλυτικά στον καθορισμό των αξόνων πρόσθιο-οπίσθιας και ραχιαίο-κοιλιακής πολικότητας και κατ'επέκταση στο σχηματισμό των απαραίτητων δομών. Αξίζει να σημειώσουμε τον θεμελιώδους σημασίας ρόλο του κυτταροσκελετού της ακτίνης, καθώς και των διαφόρων πρωτεϊνικών μορίων που σχετίζονται με αυτόν, προκειμένου να καθίσταται δυνατή η μετανάστευση, η απατούμενη κυτταρική πρόσφυση, αλλά και η επικοινωνία των διαφόρων κυτταρικών τύπων κατά τη διεξαγωγή των παραπάνω βιολογικών διαδικασιών.

3.3.1.Α Στόχος πειραματικής σειράς

Αντικείμενο μελέτης των δύο προηγουμένων ενοτήτων αποτέλεσε η επίδραση της GSM ακτινοβολίας στα ωοθυλάκια της πρώιμης και μέσης ωογένεσης (στ. 1-10). Τα ποσοστά κυτταρικού θανάτου σχεδόν ταυτίζονταν με τα αντίστοιχα ποσοστά μείωσης της αναπαραγωγικής ικανότητας του εντόμου (**ενότητα 3.1**), γεγονός που μας οδήγησε στη διατύπωση της υπόθεσης ότι, τα ωοθυλάκια που διέφευγαν του κυτταρικού θανάτου αναπτύσσονταν φυσιολογικά στα επόμενα (χοριογενετικά) στάδια δίνοντας τέλεια έντομα. Ωστόσο, προκειμένου να επιβεβαιώσουμε την υπόθεση αυτή, εξετάσαμε ωοθυλάκια όψιμης ωογένεσης, σταδίων 11-13, προερχόμενα από εκτεθειμένα έντομα στο GSM-900MHz πεδίο για **6min** ημερησίως σύμφωνα με το πρωτόκολλο έκθεσης της πειραματικής ενότητας **3.1**. Η μελέτη εστιάστηκε:
1) Στα χαρακτηριστικά του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου των τροφοκυττάρων (στ. 11-13), συμπεριλαμβανομένης της διαδικασίας αδειάσματος του τροφοκυτταρικού υλικού προς το ωοκύτταρο (dumping) (στ. 11).
2) Στην ενεργότητα της υπεροξειδάσης του κελύφους (στ. 14) για τη σκλήρυνση του χορίου.

3.3.1.Β Στόχος πειραματικής σειράς

Υποθέτοντας ότι οι εξειδικευμένες δομές των χοριογενετικών ωοθυλακίων τα καθιστούν ιδιαίτερα ανθεκτικά απέναντι στον στρεσογόνο παράγοντα της έκθεσης στα πεδία των κινητών τηλεφώνων, λόγω π.χ. της ύπαρξης βιτελλινικής μεμβράνης και χορίου, δομές που μπορεί να μεταβάλλουν τις ιδιότητες απορρόφησης/διείσδυσης της

συγκεκριμένης ακτινοβολίας στα υποκείμενα αυτών των δομών κύτταρα, συγκρίναμε τη βιολογική επίδραση της ημερήσιας έκθεσης των **6min-EXP6** με την ημερήσια έκθεση των **30min-EXP30.** Η μελέτη επικεντρώθηκε:
1) Στον σχηματισμό της βιτελλινικής μεμβράνης, των ζωνών του χορίου, και τον θάνατο των θυλακοκυττάρων στα ωοθυλάκια των τελευταίων σταδίων της ωογένεσης (στ. 14).
2) Στον ΠΚΘ των τροφοκυττάρων, την ανάπτυξη των αναπνευστικών νηματίων, τη διαμόρφωση του επιθηλίου των θυλακοκυττάρων και το σχήμα του ωοκυττάρου στα ωοθυλάκια σταδίων 12-14.

3.3.2.Α Αποτελέσματα

1) Τα αποτελέσματα προέκυψαν από την εξέταση n=153 ωοθυλακίων προερχομένων από εκτεθειμένα έντομα **(6min/day, ομάδα-EXP)** στο GSM πεδίο συγκρινόμενα με αντίστοιχο αριθμό ωοθυλακίων από ομάδα μάρτυρα-SE. Σύμφωνα με αυτά, στα ωοθυλάκια σταδίων 12-13 των εκτεθειμένων ομάδων, και όχι νωρίτερα, ανιχνεύθηκε φυσιολογικά θετικό σήμα αποδομημένου DNA μετά από χρώση με πορτοκαλί της ακριδίνης, χαρακτηριστικό του ΠΚΘ των τροφοκυττάρων στα στάδια αυτά (**εικ. 3.18c,f, 3.19a,b, 3.19e,f**). Επιπροσθέτως, μετά από χρώση φαλλοϊδίνης συνδεδεμένης με ροδαμίνη για την απεικόνιση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, διαπιστώθηκε φυσιολογική κατανομή και οργάνωση της υποφλοιώδους ακτίνης και στα τρία είδη κυττάρων (τροφοκύτταρα-NC, θυλακοκύτταρα-FC, ωοκύτταρο-OC), (**εικ. 3.18a,b**), όπως και της ακτίνης των δακτυλιοειδών καναλιών (RC) και των συνοριακών κυττάρων (BC) στα ωοθυλάκια σταδίου 11 (**3.18b**). Χαρακτηριστική είναι επίσης η διάκριση του πολυγωνικού σχήματος των τροφοκυττάρων (**3.18a,b**), καθώς και η συγκρότηση των κυτταροπλασματικών δεσμίδων ακτίνης (AC) που εκτείνονται από τις μεμβράνες των τροφοκυττάρων μέχρι τους πυρήνες κατά τη διαδικασία του dumping προκειμένου να αποτραπεί η απόφραξη των καναλιών από αυτούς (**3.18b**). Αντίστοιχες απεικονίσεις από ομάδες μάρτυρα **(εικ. 3.18d,e**). Στο στάδιο 12, τα τροφοκύτταρα αλλάζουν σχήμα και από πολυγωνικά γίνονται κυκλικά με τις κυτταροπλασματικές δέσμες ακτίνης να έχουν χάσει τον συμμετρικό προσανατολισμό τους, να διατρέχουν σε τυχαίες κατευθύνσεις τα τροφοκύτταρα και να γίνονται παχύτερες. Παράλληλα, τα δακτυλιοειδή κανάλια φαίνεται να έχουν χάσει τον προσανατολισμό τους και να βρίσκονται εκτός θέσης. Οι δεσμίδες ακτίνης διασχίζουν το κυτταρόπλασμα καταλήγοντας κοντά στον πυρήνα στα στάδια 11-12, ενώ στα επόμενα στάδια τον διαπερνούν καθώς ο όγκος των κυττάρων έχει μειωθεί σημαντικά (**εικ. 3.19c,d**). Αντίστοιχη απεικόνιση και στην ομάδα μάρτυρα στα ωοθυλάκια σταδίων 12-13 (**3.19g,h**).

2) Η ενεργοποίηση της υπεροξειδικής αντίδρασης στα ωοθυλάκια σταδίου 14, με την ενδογενή παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου, που σχηματίζεται με την συμμετοχή της NADH οξειδάσης στη μεμβράνη των θυλακοκυττάρων και διαχέεται σε όλες τις χοριονικές ζώνες, διαπιστώθηκε φυσιολογική στα εκτεθειμένα δείγματα EXP δίνοντας τον σκούρο καφε-κόκκινο χρωματισμό μετά από χρώση με υπόστρωμα o-διανισιδίνη-H_2O_2 (**εικ. 3.20b**). Αντίστοιχη απεικόνιση είχε και η ομάδα μάρτυρας (**3.20a**).

Επεξήγηση εικόνων

1) Ανίχνευση θρυμματισμένου DNA (χρώση με πορτοκαλί της ακριδίνης), απεικόνιση του δικτύου της ακτίνης (χρώση φαλλοϊδίνης συνδεδεμένη με ροδαμίνη)

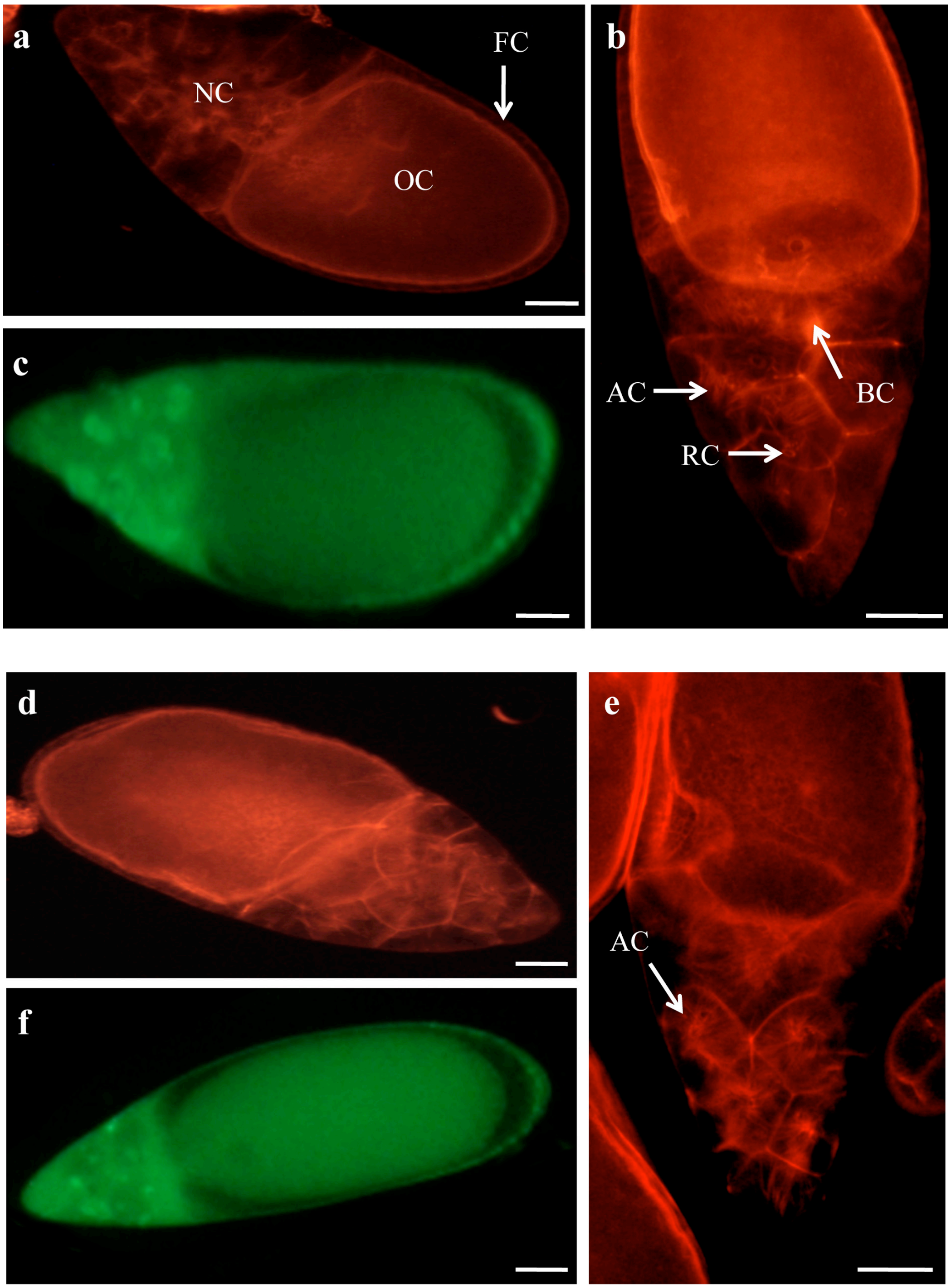
Εικόνα 3.18. Ωοθυλάκια σταδίου 11 από εκτεθειμένη ομάδα-EXP (a-c) και ομάδα μάρτυρα (d-f) μετά από χρώση φαλλοϊδίνης συνδεδεμένης με ροδαμίνη (a,b,d,e) και πορτοκαλί της ακριδίνης (c,f). Παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού. a, b). Φυσιολογική οργάνωση και κατανομή του κυτταροσκελετού της ακτίνης στα τροφοκύτταρα (NC), τα θυλακοκύτταρα (FC), το ωοκύτταρο (OC), τα δακτυλιοειδή κανάλια (RC) και τα συνοριακά κύτταρα (BC). Εμφανής η συγκρότηση των χαρακτηριστικών δεσμίδων ακτίνης (AC), που εκτείνονται από τις μεμβράνες μέχρι τους τροφοκυτταρικούς πυρήνες, πριν από τη διαδικασία αδειάσματος του κυτταροπλάσματος (b). c) Αρνητικό σήμα αποδομημένου DNA. Αντίστοιχες απεικονίσεις από ομάδα μάρτυρα (d-f). Γραμμές μεγέθυνσης: 50μm.

Εικόνα 3.19. Ωοθυλάκια σταδίων 12-13 από εκτεθειμένες ομάδες EXP (a-d) και ομάδες μάρτυρα (e-h) μετά από χρώση με πορτοκαλί της ακριδίνης (a,b,e,f) και φαλλοϊδίνης συνδεδεμένης με ροδαμίνη (c,d,g,h). Παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού. a, b) Θετική αντίδραση αποδομημένου DNA στα ωοθυλάκια σταδίων 12 (a) και 13 (b) χαρακτηριστική του ΠΚΘ των τροφοκυττάρων στα στάδια αυτά (βέλη). c, d) Χαρακτηριστική αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και σχηματισμός δεσμίδων ακτίνης (βέλη) με μεγαλύτερο πάχος σε ωοθυλάκιο σταδίου 12B (c) και 12C (d). Αντίστοιχες απεικονίσεις από ομάδα μάρτυρα (e-h) σε ωοθυλάκια σταδίων 12 (e), 13 (f), 12A (g) και 13 (h). Γραμμές μεγέθυνσης: 50μm.

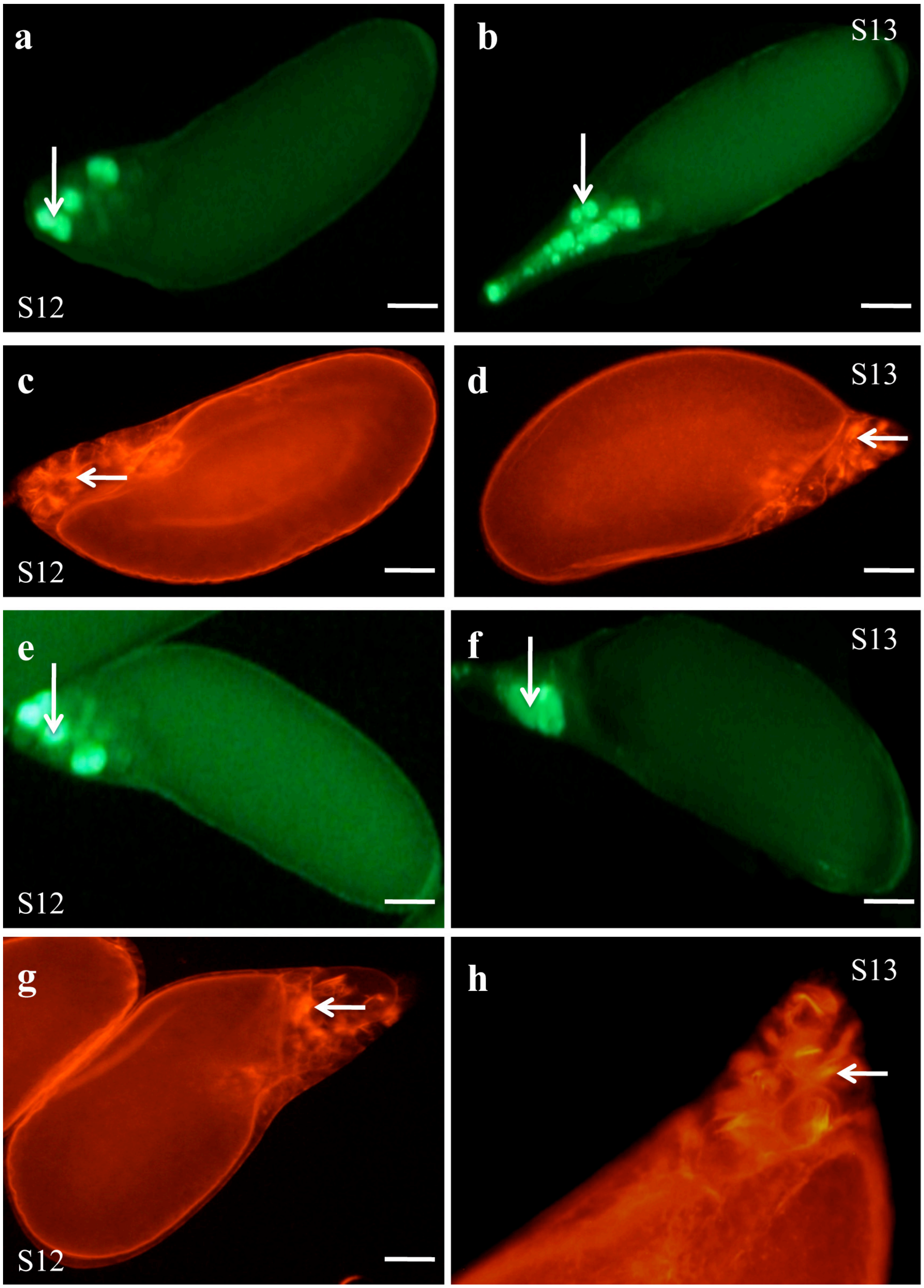
2) Ανίχνευση ενεργότητας υπεροξειδάσης του κελύφους (χρώση διανισιδίνης-H_2O_2).

Εικόνα 3.20. Φωτονιογραφίες ωοθυλακίων από ομάδα μάρτυρα (a) και εκτεθειμένη ομάδα-EXP (b) μετά από χρώση ο-διανισιδίνης και εξέταση στο φωτονικό μικροσκόπιο. Όλα τα ωοθυλάκια σταδίου 14 χαρακτηρίζονται από φυσιολογική ενεργοποίηση υπεροξειδάσης, όπως προκύπτει από τον σκούρο καφεκόκκινο χρωματισμό τους (θετική αντίδραση υπεροξειδικής ενεργότητας) τόσο στην ομάδα μάρτυρα (a) όσο και στην ομάδα-EXP (b). Γραμμές μεγέθυνσης: 50μm.

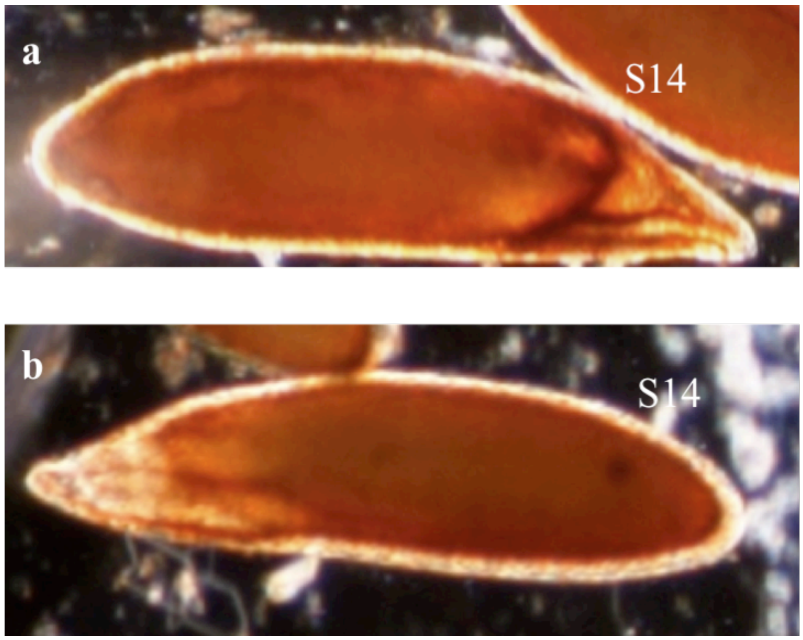
Εικόνα 3.18



Εικόνα 3.19



Εικόνα 3.20



3.3.2.Β Αποτελέσματα

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, από κανέναν τύπο έκθεσης δεν διαπιστώθηκαν αλλοιώσεις στη βιτελλινική μεμβράνη και τις ζώνες του χορίου, οι οποίες έχουν φυσιολογική μορφολογία (**εικ. 3.21a,b**). Επίσης, επίδραση δεν διαπιστώθηκε στη χρονική στιγμή έναρξης κυτταρικού θανάτου των θυλακοκυττάρων, με την απώλεια μικρολαχνών και την εμφάνιση κενοτοπίων να σημειώνεται φυσιολογικά στο τελευταίο στάδιο της ωογένεσης 14Β (**εικ. 3.21c,d**). Ομοίως, ο ΠΚΘ των τροφοκυττάρων φαίνεται να διεξάγεται φυσιολογικά με τη χαρακτηριστική εμφάνιση συμπυκνωμένης χρωματίνης σε ορισμένους τροφοκυτταρικούς πυρήνες στα ωοθυλάκια σταδίων 12-13 (**εικ. 3.22a**). Τέλος, στο ώριμο αυγό διακρίνεται το χόριο και η ανάπτυξη των αναπνευστικών νηματίων (**εικ. 3.22b**).

Ωστόσο, τα αποτελέσματα σύγκρισης της βιολογικής επίδρασης των δύο χρόνων ημερήσιας έκθεσης (**6min-EXP6 και 30 min-EXP30)** στο GSM πεδίο παρείχαν κάποιες πρώτες ενδείξεις σχετικά με τη μεγαλύτερη βιοδραστικότητα της έκθεσης των **30min,** καθώς σε ένα ποσοστό της τάξεως του **9,52%** στην ομάδα **EXP30** παρατηρήθηκαν ωοθυλάκια:

α) με ασυνέχειες στο επιθήλιο των θυλακοκυττάρων: σε ωοθυλάκια σταδίου 12C-13A της ομάδας **EXP30** διαπιστώθηκαν ασυνέχειες (κενά) στο επιθήλιο των θυλακοκυττάρων συνοδευόμενες από άδεια κυτταροποσικά κυστίδια εντός του ωοκυττάρου ακριβώς κάτω από τη βιτελλινική μεμβράνη (**εικ. 3.23b**), σε σύγκριση με τα φυσιολογικά ωοθυλάκια από έντομο μάρτυρα (**3.23a**) και την εκτεθειμένη ομάδα των **6min (EXP6)** (**3.23c**). Πιθανόν, οι δύο αλλοιώσεις να συνδέονται καθώς το ωοκύτταρο κατά τη διάρκεια της βιτελλογένεσης φέρει στην επιφάνειά του κυτταροποσικά κυστίδια που είναι γεμάτα λεκιθοπρωτεΐνες. Τα κυστίδια αυτά αυξάνουν σε μέγεθος με απορρόφηση μεγαλυτέρων ποσοτήτων λεκιθοπρωτεϊνών και αποχωρίζονται από τη μεμβράνη του ωοκυττάρου για να σχηματίσουν τα α-λεκιθοσφαιρίδια. Επομένως, τα κενά κυτταροποσικά κυστίδια μπορεί να οφείλονται σε προβλήματα πρόσληψης α-λεκιθοπρωτεϊνών προερχομένων από την αιμολέμφο είτε σε μεταβολές στα θυλακοκύτταρα, καθώς αυτά συμμετέχουν ενεργά στη βιτελλογένεση, δηλαδή στη μεταφορά και συσσώρευση λεκίθου από την αιμολέμφο στο ωοκύτταρο ενώ παράλληλα συνθέτουν και ένα ποσοστό των πρωτεϊνών της λεκίθου. Σημειώνεται ότι, εκτός από τα άδεια κυστίδια, στο αλλοιωμένο ωοθυλάκιο ανιχνεύονται και φυσιολογικά α-λεκιθοσφαιρίδια (**εικ. 3.23b**).

β) μεταβολές στο σχήμα του ωοκυττάρου: σε ωοθυλάκια σταδίου 14 της ομάδας **EXP30**, καθώς αυτό βρέθηκε συρρικνωμένο και απομακρυσμένο από τη ζώνη του χορίου (**εικ. 3.24b**), πιθανόν λόγω αλλοιώσεων στον κυτταροσκελετό του.

Πίνακας 3.9 Σύνοψη των παρατηρήσεων για τις εκτεθειμένες ομάδες EXP6 (6min/day) και EXP30 (30min/day).

Ομάδα	ΠΚΘ (NC/FC)	Βιτελλινική μεμβρ.-Ζώνες χορίου	Επιθήλιο FC	Σχήμα OC
EXP6	Φυσιολογικά	Φυσιολογικές	Φυσιολογικό	Φυσιολογικό
EXP30	Φυσιολογικά	Φυσιολογικές	**Ασυνέχειες**	**Συρρίκνωση**

Επεξήγηση εικόνων

Τομές ρητίνης: **χρώσεις κιτρικού μολύβδου και οξικού ουρανυλίου-Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, χρώση με μπλε τολουϊδίνης-Φωτονικό μικροσκόπιο.**

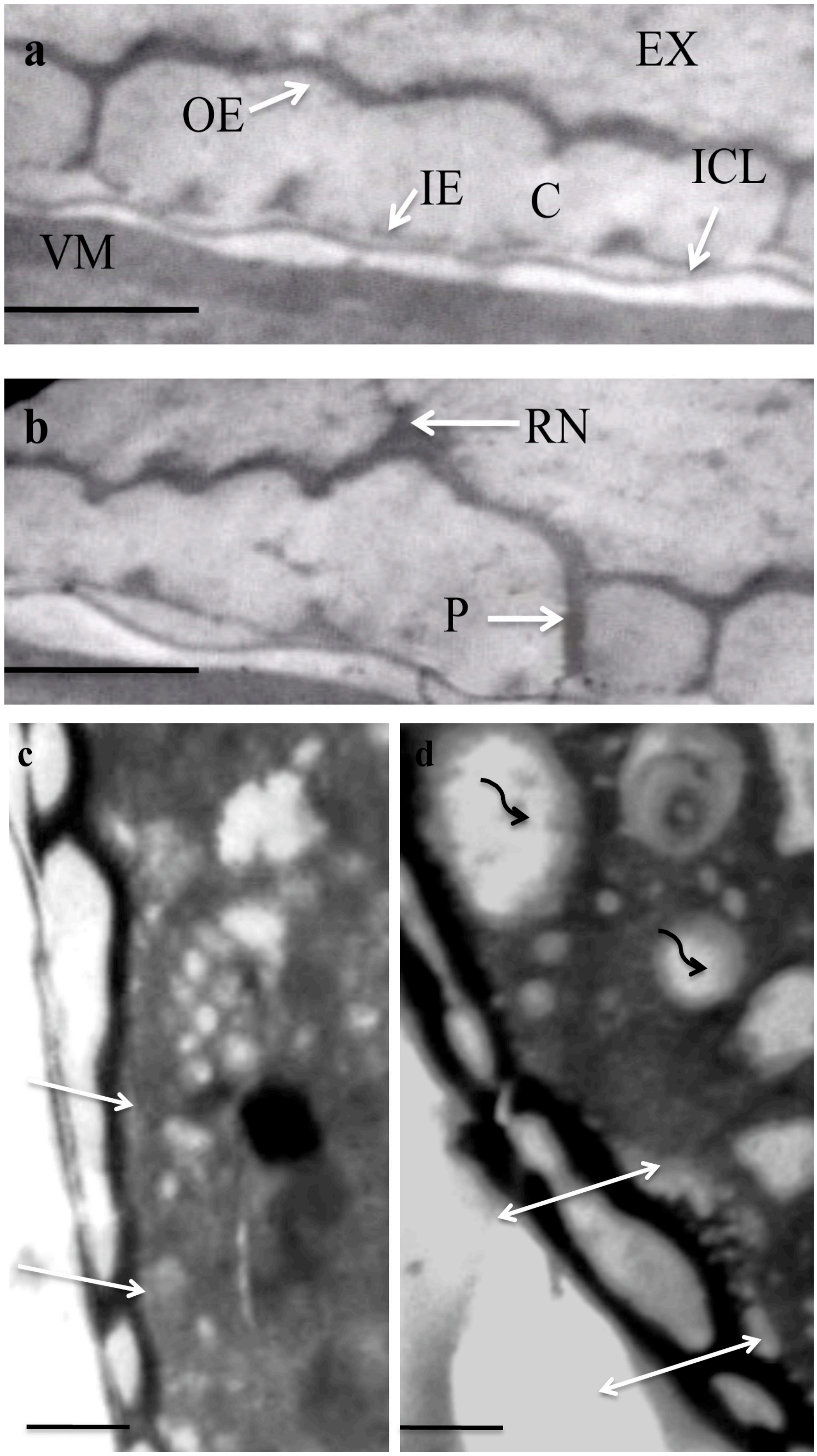
Εικόνα 3.21. Ηλεκτρονιογραφίες φυσιολογικών ωοθυλακίων σταδίου 14 εκτεθειμένων ομάδων: a) EXP6: Λεπτομερής απεικόνιση όλων των ζωνών του κελύφους σε ωοθυλάκιο σταδίου 14. Διακρίνονται οι ζώνες του κελύφους: βιτελλινική μεμβράνη (VM), εσώτερη χοριονική ζώνη (ICL), δάπεδο ενδοχορίου (IE), ενδοχόριο (C), οροφή ενδοχορίου (OE), και εξωχόριο (EX). b) EXP30: Αντίστοιχη φυσιολογική απεικόνιση. Διακρίνονται οι στυλίσκοι (P) και το δίκτυο οροφής (RN) μαζί με τις υπόλοιπες ζώνες. c) EXP6: Ωοθυλάκιο σταδίου 14 με χαρακτηριστικές μικρολάχνες στα θυλακοκύτταρα (FC) (βέλη)-Αντίστοιχη απεικόνιση παρατηρήθηκε και στην ομάδα EXP30. d) EXP30: Ωοθυλάκιο σταδίου 14 με πρώιμα χαρακτηριστικά κυτταρικού θανάτου στα θυλακοκύτταρα: Διακρίνεται η απώλεια μικρολαχνών (διπλά βέλη) και το πλήθος κενοτοπίων (καμπυλωτά βέλη)-Αντίστοιχη απεικόνιση παρατηρήθηκε και στην ομάδα EXP6. Γραμμές μεγέθυνσης: 1μm.

Εικόνα 3.22. Φωτονιογραφίες τομών ρητίνης ωοθυλακίου σταδίου 12C-13 ομάδας-EXP30 (a) και ωρίμου ωοθυλακίου ομάδας-EXP30 (b) μετά από χρώση με μπλε τολουϊδίνης. a) Παρατηρείται η συμπυκνωμένη χρωματίνη σε ορισμένους τροφοκυτταρικούς πυρήνες (NN) χαρακτηριστική του ΠΚΘ στα στάδια αυτά (διπλό βέλος). b) Φυσιολογική ανάπτυξη των αναπνευστικών νηματίων (RF) και του χορίου (CH), ενώ τα θυλακοκύτταρα (FC) έχουν απομακρυνθεί λόγω ΠΚΘ στο στάδιο 14B. OC (ωοκύτταρο).

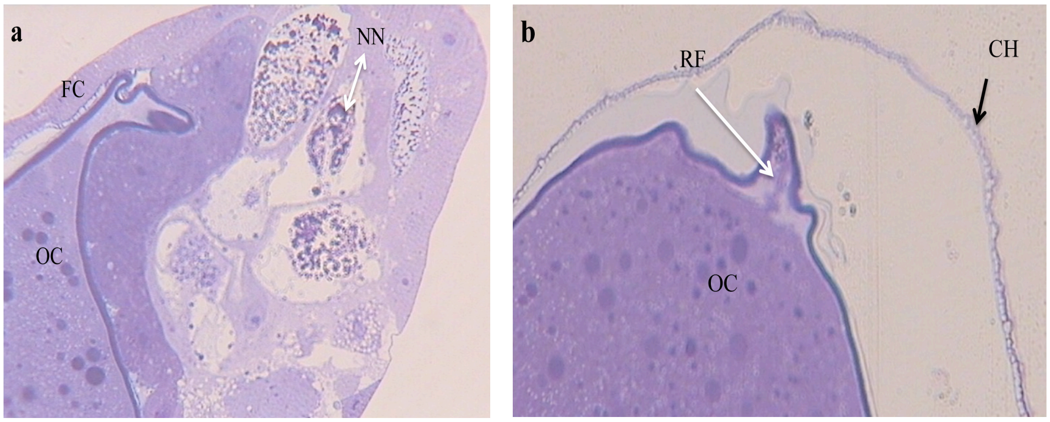
Εικόνα 3.23. Φωτονιογραφίες τομών ρητίνης ωοθυλακίων σταδίου 12C-13 από έντομο μάρτυρα (a), εκτεθειμένη ομάδα-EXP30 (b), και εκτεθειμένη ομάδα-EXP6 (c) μετά από χρώση με μπλε τολουϊδίνης. Στην ομάδα EXP30 (b) παρατηρούνται ασυνέχειες (βέλη) στο επιθήλιο των θυλακοκυττάρων (FC), καθώς και οι κενοί χώροι (άδεια κυτταροποσικά κυστίδια) κάτω από τη βιτελλινική μεμβράνη (κεφαλές βελών). Η ομάδα EXP6 (c) εμφανίζει φυσιολογικό επιθήλιο αντίστοιχο του μάρτυρα. OC (ωοκύτταρο).

Εικόνα 3.24. Φωτονιογραφίες τομών ρητίνης ωοθυλακίων σταδίου 14 από έντομο μάρτυρα (a) και από ομάδα-EXP30 (b) μετά από χρώση με μπλε τολουϊδίνης. Χαρακτηριστική η συρρίκνωση του ωοκυττάρου στην ομάδα-EXP30 (b-λευκό βέλος). FC (θυλακοκύτταρα), OC (ωοκύτταρο), VM (βιτελλινική μεμβράνη), CH (χόριο).

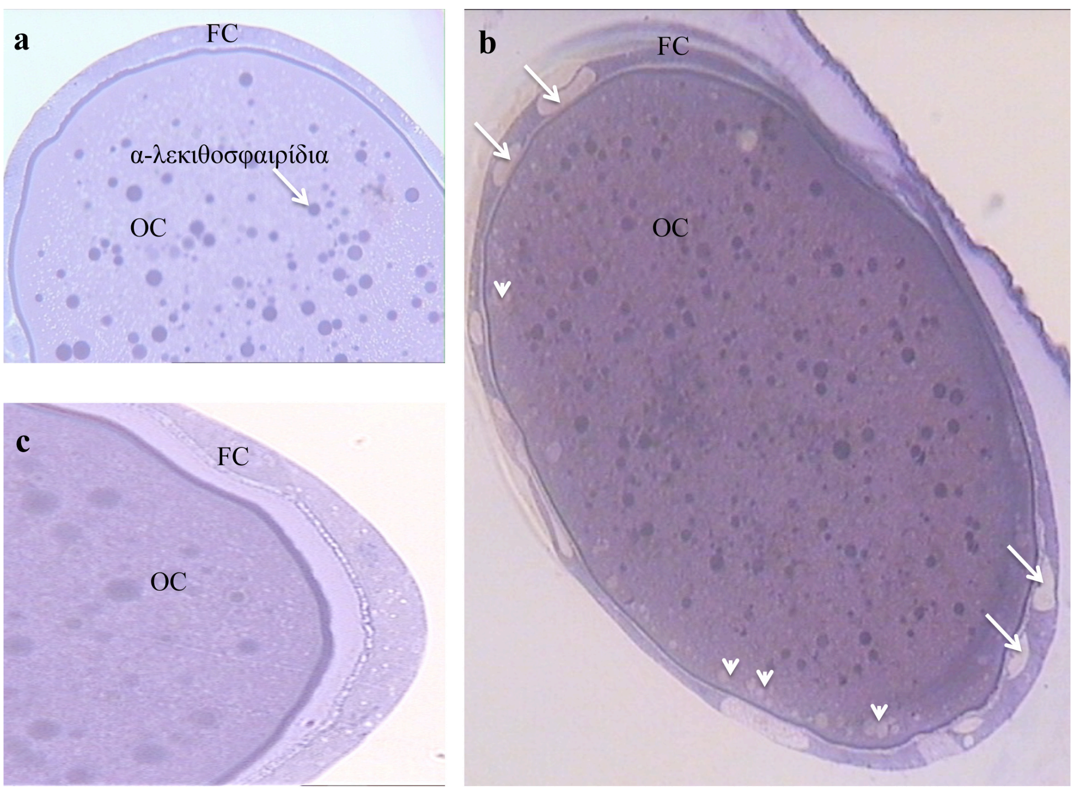
Εικόνα 3.21



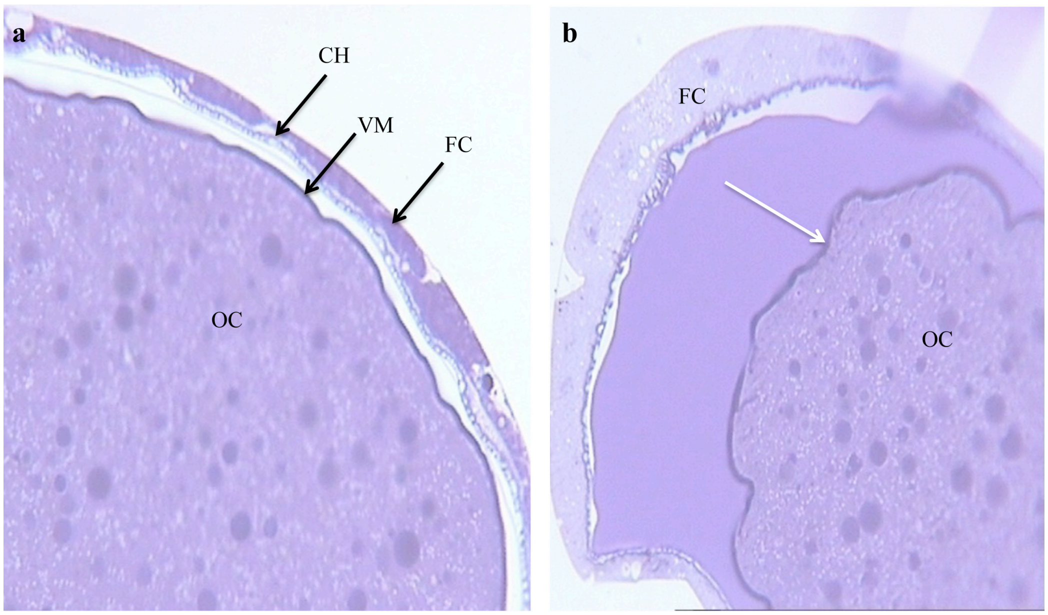
Εικόνα 3.22



Εικόνα 3.23



Εικόνα 3.24



3.4 Μελέτη επίδρασης της GSM ακτινοβολίας κινητών τηλεφώνων στην *in vitro* ανάπτυξη των ωοθυλακίων

3.4.1 Στόχος πειραματικής σειράς

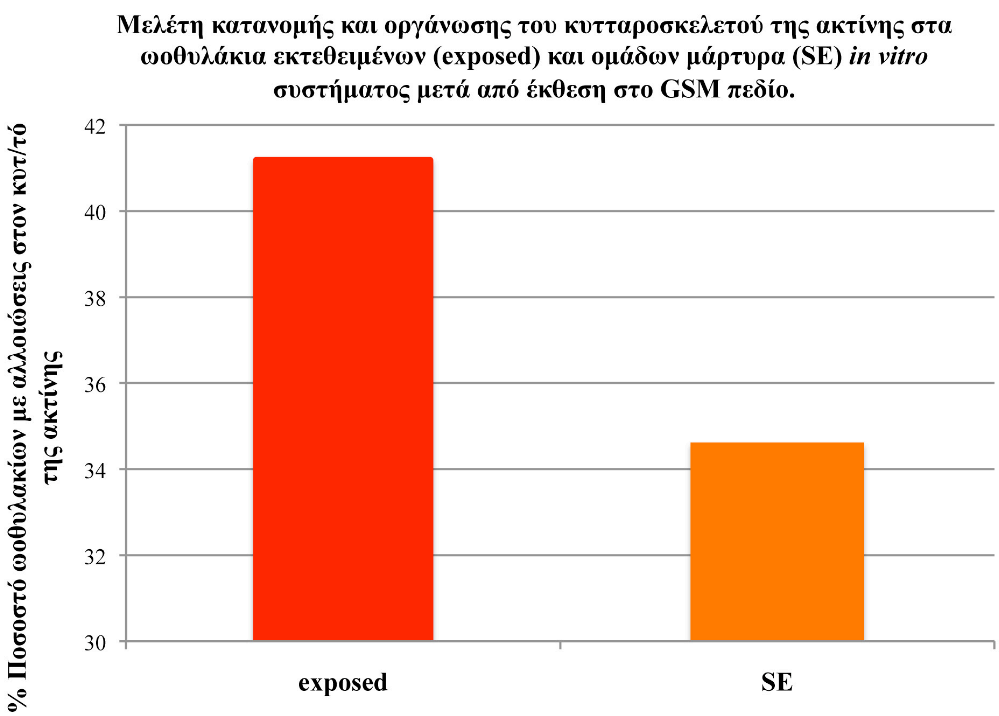
Στην ενότητα 3.3 μελετήσαμε τα ωοθυλάκια όψιμης ωογένεσης, που προήλθαν από την ημερήσια έκθεση των 6min/day, στα οποία δεν ανιχνεύθηκαν διαφορές σε σύγκριση με τις ομάδες μάρτυρα στην οργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και την στιγμή έναρξης του ΠΚΘ. Στην προσπάθεια να επεκτείνουμε τη μελέτη επίδρασης της ακτινοβολίας από συνθήκες έκθεσης *in vivo* σε *in vitro* σχεδιάσαμε το πρωτόκολλο έκθεσης απομονωμένων ωοθυλακίων χοριογενετικών σταδίων στο πεδίο του κινητού τηλεφώνου του συστήματος GSM (2.6.3.4) και διερευνήσαμε την οργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης στα ωοθυλάκια σταδίων 10-13.

3.4.2 Αποτελέσματα

Στην **εικόνα 3.26** απεικονίζονται απομονωμένα ωοθυλάκια σταδίων 10-11 αμέσως μετά την ανατομία (t=0h) και σε χρόνο t=3h μετά από την επώαση στο θρεπτικό μέσο με ένα ποσοστό αυτών να έχουν αναπτυχθεί στα στάδια 12-13 (βέλη). Σημειώνεται ότι ένα ποσοστό ωοθυλακίων (περίπου 30%) αναμένεται να μην προχωρήσει στα επόμενα στάδια ακόμα και στις ομάδες μάρτυρα λόγω έλλειψης θρεπτικών είτε λόγω τραυματισμού κατά τη διάρκεια της ανατομίας. Οι φωτογραφίες των ωοθυλακίων μετά τις 3h της επώασης και τη χρώση φαλλοϊδίνης συνδεδεμένης με ροδαμίνη, που επέτρεψε τη μελέτη της κατανομής και οργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης σε ωοθυλάκια σταδίου 10, 11 κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αδειάσματος του τροφοκυτταρικού κυτταροπλασματικού υλικού προς το ωοκύτταρο (dumping), όσο και σε ωοθυλάκια μεγαλυτέρων σταδίων 12, 13 παρατίθενται στις εικόνες **3.27-3.30**. Τα προκαταρκτικά αποτελέσματα αυτής της πειραματικής σειράς κατέγραψαν μία διαφορά στα ποσοστά ωοθυλακίων με αλλοιώσεις στον κυτταροσκελετό της ακτίνης, ανάμεσα στις εκτεθειμένες ομάδες (41.18%) και τις ομάδες μάρτυρα (34.62%) της τάξεως του 6.56% (εικ. 3.25). Σημειώνεται ότι, απαιτείται η διεξαγωγή περαιτέρω πειραμάτων για να είναι εφικτή η στατιστική ανάλυση των πειραματικών δεδομένων.

Στις ακόλουθες φωτογραφίες (**εικ. 3.27a,b**) απεικονίζονται ωοθυλάκια σταδίου 10 με φυσιολογική οργάνωση και κατανομή του δικτύου ακτίνης τόσο στην ομάδα μάρτυρα όσο και στην εκτεθειμένη ομάδα. Ακολουθούν οι **εικόνες 3.27a-c** με ωοθυλάκια σταδίου 11 από ομάδες μάρτυρα και με φυσιολογική κατανομή και οργάνωση της υποφλοιώδους ακτίνης και στα τρία είδη κυττάρων (τροφοκύτταρα-NC, θυλακοκύτταρα-FC, ωοκύτταρο-OC, συνοριακά κύτταρα-BC), (**εικ. 3.27a-c**), όπως και της ακτίνης των δακτυλιοειδών καναλιών (RC) (**εικ. 3.28b**). Χαρακτηριστική είναι επίσης η διάκριση του πολυγωνικού σχήματος των τροφοκυττάρων (**εικ. 3.28a,b**), καθώς και η συγκρότηση των κυτταροπλασματικών δεσμών ακτίνης (AC) που εκτείνονται από τις μεμβράνες των τροφοκυττάρων μέχρι τους πυρήνες κατά το dumping προκειμένου να αποτραπεί η απόφραξη των καναλιών από αυτούς (**εικ. 3.28c**). Αντίστοιχες απεικονίσεις ωοθυλακίων από εκτεθειμένες ομάδες (**εικ. 3.29a-c**) αποκαλύπτουν αλλοιώσεις στη μορφολογία του κυτταροσκελετού των ινιδίων ακτίνης. Τα όρια των τροφοκυττάρων δεν είναι διακριτά και κατ'επέκταση ούτε το σχήμα τους. (**εικ. 3.29a-c**). Οι κυτταροπλασματικές δέσμες ακτίνης δεν έχουν συγκροτηθεί, ενώ συσσώρευση ακτίνης ανιχνεύεται σε μεμονωμένα σημεία όπως τα όρια των πλασματικών μεμβρανών των τροφοκυττάρων. Οι αλλοιώσεις αυτές είναι αντίστοιχες με αυτές που παρατηρούνται σε φαινοτύπους dumpless από μεταλλαγμένα στελέχη εντόμων. Σε άλλες περιπτώσεις φαίνεται να εκλείπει από ορισμένα σημεία τελείως ο κυτταροσκελετός τόσο σε τροφοκύτταρα όσο και στο επιθήλιο των θυλακοκυττάρων και άρα να ακυρώνεται η ακεραιότητά του (**εικ. 3.29b, c**).

Τέλος, δεν διαπιστώθηκαν διαφορές στην φυσιολογική ανάπτυξη αλλά και την οργάνωση του δικτύου της ακτίνης σε ωοθυλάκια σταδίων 12-13 (**εικ. 3.30a-c**) ανάμεσα στις εκτεθειμένες και τις ομάδες μάρτυρα.



Εικόνα 3.25. Διαγραμματική απεικόνιση του %ποσοστού των ωοθυλακίων σταδίου 11 με αλλοιώσεις στον κυτταροσκελετό της ακτίνης μετά από χρώση φαλλοϊδίνης συνδεδεμένης με ροδαμίνη στην εκτεθειμένη ομάδα (exposed) και την ομάδα μάρτυρα (SE).

Επεξήγηση εικόνων

Εικόνα 3.26. *In vitro* ανάπτυξη ωοθυλακίων σε θρεπτικό μέσο Schneider's και εξέταση κάτω από το στερεοσκόπιο. a) Εικόνα ωοθυλακίων σταδίων 10, 11 αμέσως μετά την ανατομία t=0h. b) Ανάπτυξη των ωοθυλακίων σε χρόνο t=3h μέχρι τα στάδια 12-13 (βέλη) (b).

Απεικόνιση του κυτ/τού της ακτίνης (χρώση φαλλοϊδίνης συνδεδεμένης με ροδαμίνη).

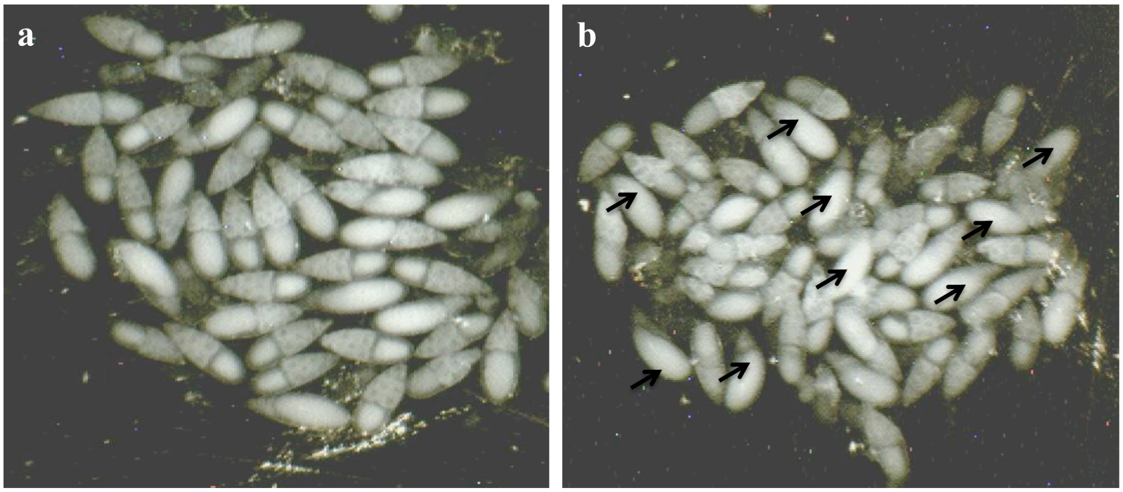
Εικόνα 3.27. Φωτονιογραφίες ωοθυλακίων (σταδίου 10) μετά από χρώση φαλλοϊδίνης και παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού. Διακρίνεται η υποφλοιώδης φυσιολογική κατανομή των ινιδίων της ακτίνης στα θυλακοκύτταρα (FC), τα τροφοκύτταρα (NC) (πολυγωνικό σχήμα), το ωοκύτταρο (OC), καθώς και η ακτίνη των δακτυλιοειδών καναλιών (RC) τόσο στην ομάδα μάρτυρα-SE (a) όσο και στην εκτεθειμένη ομάδα-Exposed (b). Γραμμές μεγέθυνσης: 50μm.

Εικόνα 3.28. Φωτονιογραφίες ωοθυλακίων (σταδίου 11) ομάδας μάρτυρα μετά από χρώση φαλλοϊδίνης και παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού. a, b, c: Διακρίνεται η υποφλοιώδης κατανομή των ινιδίων της ακτίνης στα θυλακοκύτταρα (FC), τα τροφοκύτταρα (NC) (πολυγωνικό σχήμα) και το ωοκύτταρο (OC) (a, b, c), καθώς και η ακτίνη των συνοριακών κυττάρων (BC) (a) και των δακτυλιοειδών καναλιών (RC) (b-βέλη). Εμφανής απεικόνιση της ακτίνης των θυλακοκυττάρων από επιφανειακή τομή (b-καμπυλωτό βέλος). Συγκρότηση των κυτταρ/κών δεσμών ακτίνης (AC) από τις μεμβράνες μέχρι τον πυρήνα των τροφοκυττάρων (διπλά βέλη). Γραμμές μεγέθυνσης: 50μm**.**

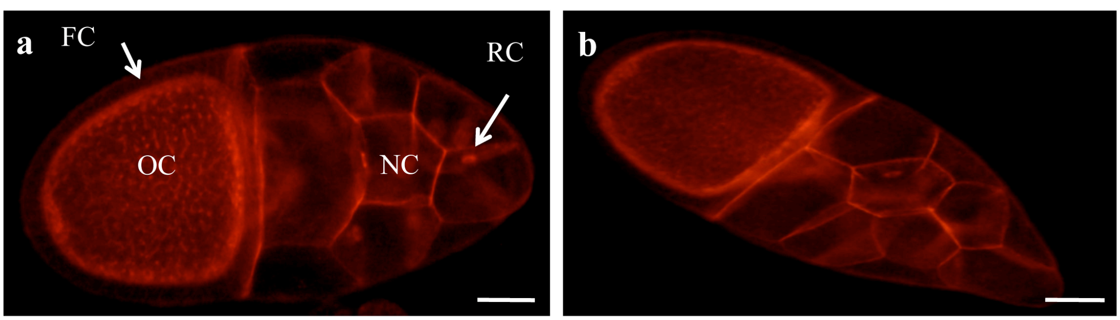
Εικόνα 3.29. Φωτονιογραφίες ωοθυλακίων (σταδίου 11) εκτεθειμένων ομάδων μετά από χρώση φαλλοϊδίνης και παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού. a, b, c: Εμφανής η αλλοιωμένη κατανομή και οργάνωση του κυτ/τού της ακτίνης στα τροφοκύτταρα (NC). Χαρακτηριστική η απώλεια του πολυγωνικού σχήματος των τροφοκυττάρων και η συγκέντρωση της ακτίνης στα όρια των πλασματικών μεμβρανών (βέλη). Η αποδιοργάνωση των ινιδίων της ακτίνης δεν έχει επιτρέψει τη συγκρότηση και έκταση των κυτταρ/κών δεσμών ακτίνης. Σε ορισμένα τροφοκύτταρα και θυλακοκύτταρα (FC) δεν ανιχνεύεται ακτίνη (διπλά βέλη). OC (ωοκύτταρο). Γραμμές μεγέθυνσης: 50μm.

Εικόνα 3.30. Φωτονιογραφίες ωοθυλακίων (σταδίων 12-13) μετά από χρώση φαλλοϊδίνης συνδεδεμένης με ροδαμίνη και παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού από ομάδα μάρτυρα-SE (a, b) και εκτεθειμένη-Exposed ομάδα (c). Εμφανής η φυσιολογική ανάπτυξη των ωοθυλακίων της εκτεθειμένης ομάδας με τα τροφοκύτταρα να είναι σχεδόν κυκλικά και τις δέσμες ακτίνης να έχουν αυξηθεί σε πάχος (βέλη). OC (ωοκύτταρο), NC (τροφοκύτταρα), FC (θυλακοκύτταρα). Γραμμές μεγέθυνσης: 50μm.

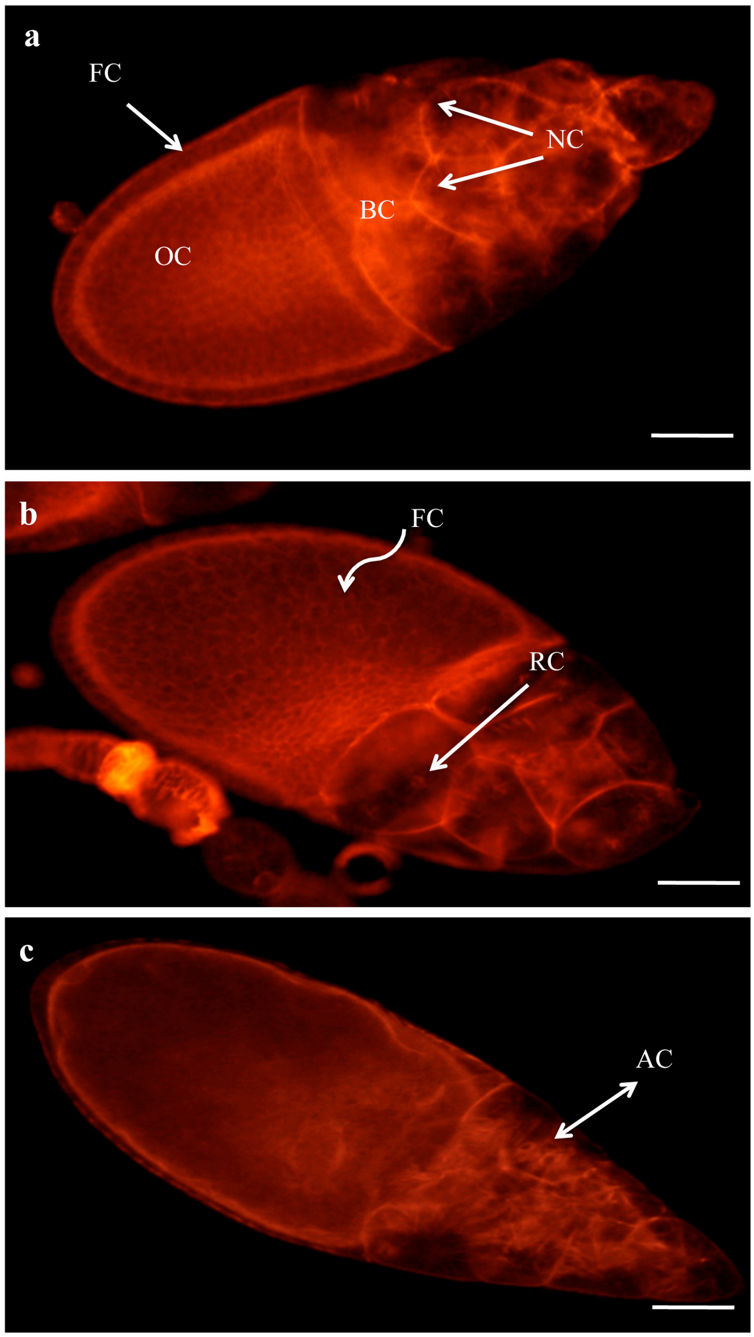
Εικόνα 3.26



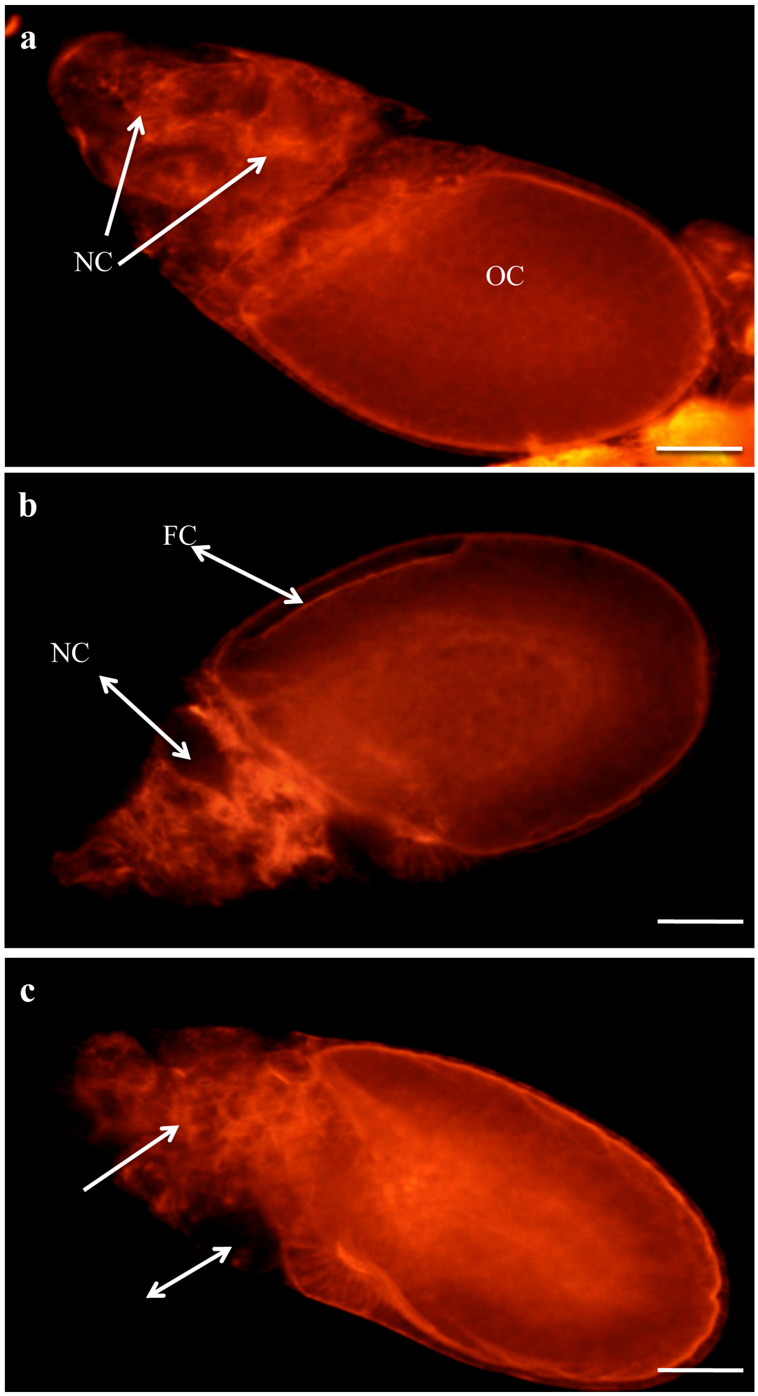
Εικόνα 3.27



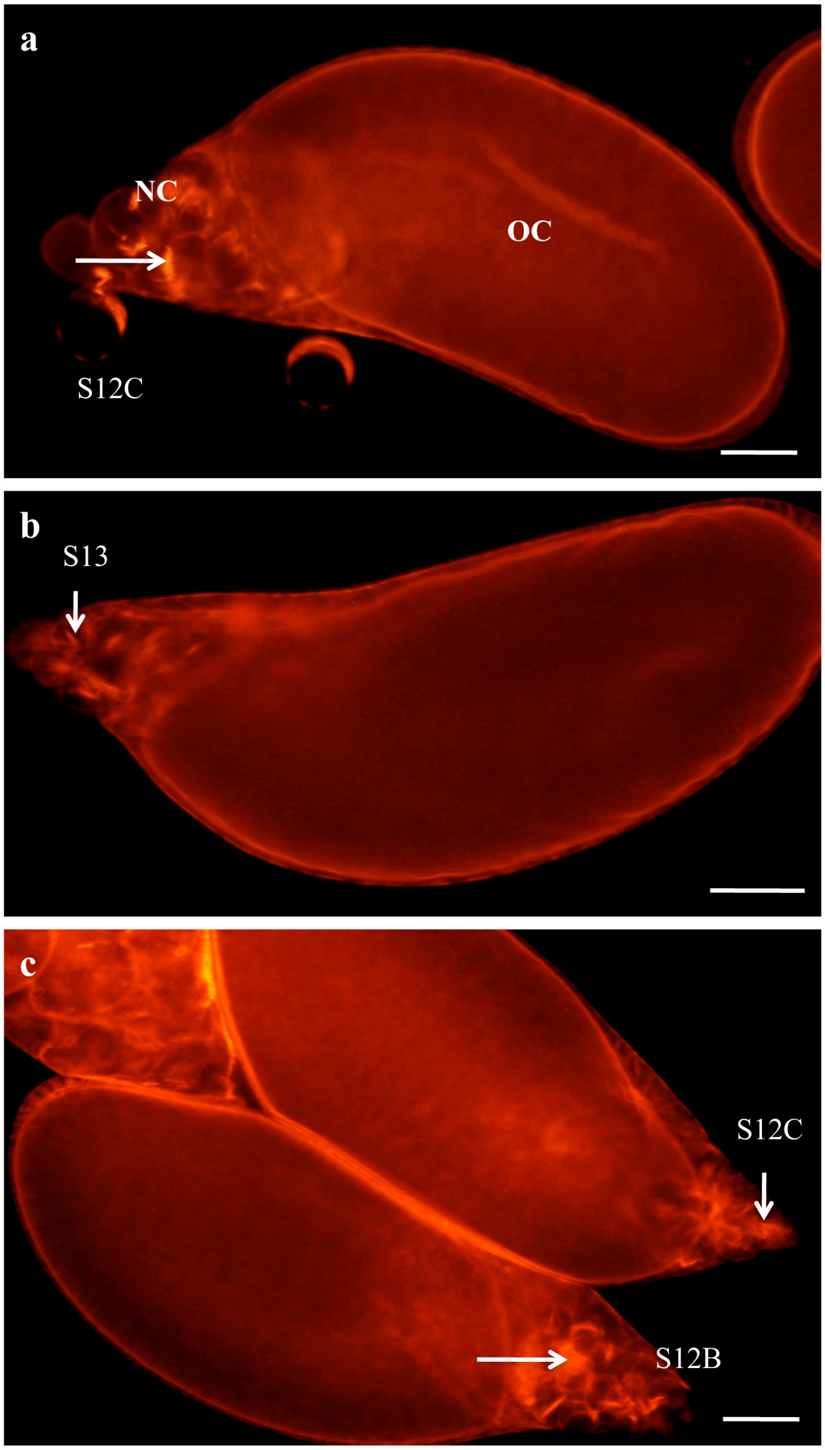
Εικόνα 3.28



Εικόνα 3.29



Εικόνα 3.30



ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Σχόλια ως προς τις επιδράσεις των Η/Μ πεδίων των κινητών τηλεφώνων που καταγράφηκαν στην παρούσα διατριβή

Το σύνολο των πειραμάτων της παρούσας διατριβής διεξήχθη στο βιολογικό σύστημα της Αναπαραγωγικής ικανότητας και Ωογένεσης του εντόμου *Drosophila melanogaster*. Όπως έχει εκτενώς αναφερθεί στην Εισαγωγή της παρούσας εργασίας, το σύστημα αυτό χαρακτηρίζεται από ένα σύνολο πολύπλοκων κυτταρικών λειτουργιών, εκ των οποίων πολλές συνιστώσες (συνιστώσες των μονοπατιών κυτταρικού θανάτου, μοριακές οδοί σηματοδότησης Jak/Stat, Notch, EGFR και MAPK κινασών κ.ά.), εμφανίζονται συντηρημένες και συναντώνται με αντίστοιχες λειτουργίες και σε άλλους οργανισμούς.

Τα πειράματα της παρούσας αποτελούν συνέχεια παλαιοτέρων μελετών του εργαστηρίου σχετικά με τη διερεύνηση επιδράσεων των τεχνητών ηλεκτρομαγνητικών πεδίων στον συγκεκριμένο οργανισμό, ο οποίος επιλέχθηκε πέρα από τους λόγους που έχουν ήδη αναφερθεί στην Εισαγωγή και για το γεγονός ότι τα έντομα, τουλάχιστον στην περίπτωση της ιονίζουσας ακτινοβολίας, θεωρούνται περισσότερο ανθεκτικά. Η διαπίστωση συνεπώς βιολογικών επιδράσεων από τη μη ιονίζουσα, αυτή τη φορά, ακτινοβολία σε έναν οργανισμό που θεωρητικά «ανθίσταται» σε μεγαλύτερο βαθμό, αυτομάτως θα σήμαινε ότι περισσότερο ισχυρές αναμένεται να είναι οι επιπτώσεις στους υπόλοιπους οργανισμούς. Καταγεγραμμένες επιδράσεις σε άλλα βιολογικά συστήματα έχουν ήδη αναφερθεί (βλ. Εισαγ. § 1.8) και θα παρουσιαστούν και στη συνέχεια, σε μία απόπειρα σύγκρισης των επιδράσεων που καταγράφηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας με αυτές άλλων ερευνητών. Ωστόσο, στο σημείο αυτό, θα πρέπει να τονιστεί ότι, η διατύπωση μίας ενιαίας άποψης ή υπόθεσης σχετικά με τις ενδεχόμενες επιδράσεις της ακτινοβολίας που να αφορά το σύνολο των ζωντανών οργανισμών είναι σχεδόν αδύνατη, καθώς οι βιολογικές επιπτώσεις στον κάθε έναν από αυτούς, εξαρτώνται από τα χαρακτηριστικά του εφαρμοζόμενου πεδίου (ένταση, διάρκεια, συχνότητα, διαμόρφωση, αριθμός δόσεων) σε συνδυασμό με τα ιδιαίτερα γενετικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά του κάθε οργανισμού, καθώς και τις ιδιαιτερότητες των βιομορίων και των ιστών του, παράγοντες που καθορίζουν τις ιδιότητες απορρόφησης της συγκεκριμένης ακτινοβολίας και κατανομής της ενέργειας στο χώρο και το χρόνο (**Lai, 1998; Levitt and Lai, 2010**). Η αλληλεπίδραση των παραπάνω παραγόντων εκφράζεται και στη σχέση που συνδέει τον ειδικό ρυθμό απορρόφησης SAR με την ένταση του πεδίου, αλλά και την ειδική ηλεκτρική αγωγιμότητα και πυκνότητα του εκάστοτε βιολογικού ιστού (βλ. Εισαγ. § 1.4.2).

Τα έντομα εκτέθηκαν σε **πραγματικό σήμα κινητού τηλεφώνου** κατά την **ομιλούσα** (διαμορφωμένη από την ομιλία) **εκπομπή**, προκειμένου να προσομοιάσουμε το δυνατόν περισσότερο τις συνθήκες έκθεσης ενός χρήστη (**Panagopoulos and Margaritis, 2002**). Όπως έχει διαπιστωθεί, η εκπεμπόμενη ένταση κατά την διαμορφωμένη εκπομπή είναι υψηλότερη σε σύγκριση με τη μη-διαμορφωμένη (μη ομιλούσα εκπομπή) (**Panagopoulos et al., 2000; Hyland, 2000**). Μάλιστα, σε συγκριτικές μελέτες ανάμεσα σε διαμορφωμένα και μη RF πεδία, βιολογικές επιπτώσεις ανιχνεύθηκαν στην περίπτωση των διαμορφωμένων πεδίων (**Bawin et al., 1975; 1978; Blackman et al., 1989**). Επιπροσθέτως, επιλέχθηκε το πραγματικό σήμα κινητού τηλεφώνου και όχι διατάξεις, τύπου Radial transmission lines, TEM ή άλλες γεννήτριες, που εκπέμπουν σήματα RF με σταθερά χαρακτηριστικά έντασης και συχνοτήτων, καθώς αυτά δεν συνάδουν με τα μεταβαλλόμενα χαρακτηριστικά των σημάτων RF που εκπέμπουν τα κοινά κινητά τηλέφωνα (βλ. Υλικά & Μέθοδοι § 2.6.2) και τα οποία σε αρκετές περιπτώσεις έχει διαπιστωθεί ότι δεν προκαλούν επιδράσεις συγκριτικά με τα αντίστοιχα διαμορφωμένα πεδία που προσομοιάζουν τα πεδία κινητής τηλεφωνίας **(Höytö et al., 2008; Franzelliti et al., 2010).** Άλλωστε, υπάρχει η άποψη ότι τα πεδία με μεταβαλλόμενα χαρακτηριστικά, ενδεχομένως λόγω της δυσκολίας των οργανισμών να προσαρμοστούν σε αυτά, εμφανίζουν μεγαλύτερη βιοδραστικότητα (**Goodman et al., 1995: Diem et al., 2005**).

Τέλος, σημειώνεται ότι, σε όλα τα πειραματικά πρωτόκολλα οι τιμές έντασης/πυκνότητας ισχύος της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας ήταν εντός των ορίων έκθεσης, όπως προτείνονται από την ICNIRP (1998).

Όπως προέκυψε από τα παρόντα ευρήματα το GSM πεδίο των κινητών τηλεφώνων επιφέρει αισθητή **μείωση της Αναπαραγωγικής Ικανότητας** (Α.Ι.) του εντόμου, η οποία συνοδεύεται από **αυξημένα ποσοστά αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου** στα κύτταρα των ωοθυλακίων της πρώιμης και μέσης ωογένεσης του εντόμου. Υψηλότερη ευαισθησία, όπως ήταν αναμενόμενο, επέδειξαν τα ωοθυλάκια των δύο σημείων ελέγχου της ωογένεσης (γερμάριο και στάδια 7-8). Επιπροσθέτως, η GSM ακτινοβολία, υπό ορισμένες συνθήκες έκθεσης, είναι ικανή να προκαλέσει αλλοιώσεις στο επιθήλιο των θυλακοκυττάρων στα ωοθυλάκια της όψιμης ωογένεσης, όπως επίσης να επηρεάσει τη διαδικασία μεταφοράς του τροφοκυτταρικού υλικού στο ωοκύτταρο. Παράλληλα, υπήρξαν σαφείς ενδείξεις ότι, το παρατηρούμενο βιολογικό αποτέλεσμα στο εξεταζόμενο σύστημα εξαρτάται συνολικά από τα χαρακτηριστικά της έκθεσης, όπως την **ένταση**, τον **τρόπο έκθεσης** (συνεχής vs διακοπτόμενος τύπος), τα **διαστήματα διακοπής** μεταξύ των δόσεων της ακτινοβολίας, και τέλος το **χρόνο έκθεσης** στο GSM πεδίο.

4.1.1 Επίδραση της GSM ακτινοβολίας στο DNA και τον κυτταροσκελετό της ακτίνης-Σύγκριση βιολογικής επίδρασης συνεχούς και διακοπτόμενης έκθεσης

Τα αποτελέσματα μείωσης της Αναπαραγωγικής Ικανότητας, όπως αυτά εκφράστηκαν μέσω της τιμής της μέσης ωοτοκίας ανά μητρικό έντομο, για τον συνεχή Σ και τους τρεις τύπους διακοπτόμενης έκθεσης $Δ_{1-3}$, ήταν της τάξεως του -41 έως -43%, ενώ για την ομάδα $Δ_4$ -31%. Αντίστοιχος βαθμός βιολογικής επίδρασης καταγράφηκε και στο επίπεδο της Ωογένεσης, μέσω των αυξημένων ποσοστών ανίχνευσης αποδομημένου DNA (44-46% για τις ομάδες Σ, $Δ_{1-3}$, και 34% για την ομάδα $Δ_4$) και αποδιοργανωμένου κυτταροσκελετού της ακτίνης (42-44% για τις Σ, $Δ_{1-3}$, και 32% για την ομάδα $Δ_4$) στα κύτταρα των ωοθυλακίων της πρώιμης και μέσης ωογένεσης (στάδια 1-10). Όπως διαπιστώνεται τα ποσοστά μείωσης της μέσης ωοτοκίας και ανίχνευσης χαρακτηριστικών κυτταρικού θανάτου για τις αντίστοιχες ομάδες σχεδόν συμπίπτουν, γεγονός που αποτέλεσε μία πρώτη ένδειξη ότι η κύρια αιτία μείωσης της μέσης ωοτοκίας είναι ο εκφυλισμός των ωοθυλακίων λόγω επαγομένου κυτταρικού θανάτου. Όπως ήταν αναμενόμενο, τα δύο σημεία ελέγχου της ωογένεσης, το γερμάριο (G) και τα στάδια 7-8 (S7-S8) αποδείχθηκαν τα πιο ευαίσθητα απέναντι στο στρες της ακτινοβόλησης δίνοντας τα μεγαλύτερα ποσοστά χαρακτηριστικών κυτταρικού θανάτου.

Η σύγκριση των αποτελεσμάτων κατέδειξε τη **σχεδόν ταυτόσημη επίδραση της συνεχούς Σ και των τριών τύπων διακοπτόμενης έκθεσης $Δ_{1-3}$** με τα σύντομα διαστήματα διακοπής (10 min) μεταξύ των δόσεων. Ωστόσο, μία ελαφρώς πιο έντονη δραστικότητα, εντός όμως των ορίων της τυπικής απόκλισης, διαπιστώθηκε από τους δύο διακοπτόμενους τύπους **$Δ_1$ και $Δ_2$** με τον **μεγαλύτερο αριθμό δόσεων** της ακτινοβολίας και τη σύντομη επανάληψή τους μετά από 10 min διακοπής (6x1min-$Δ_1$ και 3x2min-$Δ_2$), δείχνοντας ότι ο οργανισμός υφίσταται **πιο έντονο στρες** στην περίπτωση αυτή. Ενδεχομένως το περισσότερο πολύπλοκο πρωτόκολλο έκθεσης να μην επέτρεψε την ενεργοποίηση των μηχανισμών απόκρισης των εντόμων, πιθανώς με τη μορφή προσαρμοστικών μηχανισμών, όπως συνέβη στην περίπτωση του τετάρτου τύπου διακοπτόμενης έκθεσης $Δ_4$, στον οποίο σημειώθηκε χαμηλότερος βαθμός βιολογικής επίδρασης. Στην περίπτωση αυτή, ο μικρότερος αριθμός ακτινοβολήσεων (2x3min) σε συνδυασμό με το μεγαλύτερο διάστημα διακοπής μεταξύ αυτών (6 ώρες), επέτρεψε στους **προσαρμοστικούς μηχανισμούς των εντόμων** να αντικαταστήσουν τα κατεστραμμένα τους ωοθυλάκια με νέα. Όπως διαπιστώσαμε, η παρατήρηση των ωοθυλακίων όταν η ανατομία λαμβάνει χώρα 6h μετά την τελευταία έκθεση στο GSM πεδίο, μας δίνει χαμηλότερα ποσοστά ανίχνευσης σήματος κυτταρικού θανάτου συγκριτικά με αυτά που διαπιστώνονται στο χρονικό διάστημα των 3-5h, γεγονός ενδεικτικό της απόκρισης του βιολογικού συστήματος απέναντι στο στρες με την άμεση απομάκρυνση των εκφυλισμένων ωοθυλακίων.

Όπως προαναφέρθηκε, σημαντικό εύρημα της παρούσας ενότητας, πλην της δράσης της ακτινοβολίας στο **DNA**, ήταν η αποκάλυψη της δράσης των Η/Μ πεδίων και στον **κυτταροσκελετό της ακτίνης**, η αποδιοργάνωση του οποίου αποτελεί ένα ακόμα βασικό χαρακτηριστικό κυτταρικού θανάτου. Η διπλή χρώση TUNEL-φαλλοϊδίνης έκανε δυνατή την **ταυτόχρονη ανίχνευση και των δύο χαρακτηριστικών κυτταρικού θανάτου στα ίδια ωοθυλάκια** πρώιμης και μέσης ωογένεσης που είχαν επηρεαστεί από την ακτινοβολία. Σημειώνεται ότι, τα αποτελέσματα της παρούσας ενότητας, ως προς την μείωση της αναπαραγωγικής ικανότητας και την ανίχνευση αποδόμησης DNA στα ωοθυλάκια της πρώιμης και μέσης ωογένεσης από την έκθεση στο πεδίο GSM-900MHz, συμπίπτουν με αντίστοιχα αποτελέσματα από μελέτες που πραγματοποιήσαμε σε άλλες σειρές πειραμάτων (Panagopoulos DJ, **Chavdoula ED**, Nezis IP, Margaritis LH, 2007a; Panagopoulos DJ, **Chavdoula ED**, Karabarbounis A, Margaritis LH, 2007b).

Συνοψίζοντας, τα ευρήματα της σειράς αυτής υποδεικνύουν ότι **η επίδραση μίας συγκεκριμένης δόσης GSM ακτινοβολίας,** όσον αφορά στο συγκεκριμένο βιολογικό σύστημα εξαρτάται από το πειραματικό πρωτόκολλο έκθεσης, δηλαδή **από τα διαστήματα διακοπής μεταξύ των δόσεων και του χρόνου** που παρέχεται στα έντομα προκειμένου να ξεπεράσουν το στρες της έκθεσης. Σύμφωνα με τα δεδομένα αυτά, η επίδραση της ακτινοβολίας φαίνεται να εξαρτάται από τη συνολική ημερήσια δόση της ακτινοβολίας ανεξαρτήτως του τύπου έκθεσης δηλ. του αριθμού των εκθέσεων όταν οι δόσεις δεν απέχουν σε μεγάλο βαθμό χρονικά μεταξύ τους. Επομένως, στις περιπτώσεις αυτές οι επιδράσεις της ακτινοβολίας μπορούν να θεωρηθούν **αθροιστικές**. Αντιθέτως, όταν οι δόσεις της ακτινοβόλησης σημειώνονται σε αρκετά μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα, όπως συνέβη κατά τον τέταρτο τύπο έκθεσης Δ4, η επίδραση της ακτινοβολίας είναι αρκετά μειωμένη, γεγονός που αποκαλύπτει την **ενεργοποίηση ενός μηχανισμού επαναφοράς** στο διάστημα που μεσολαβεί μεταξύ των εκθέσεων, όπως ισχύει στην περίπτωση έκθεσης των ζωντανών οργανισμών σε δόσεις ιονίζουσας ακτινοβολίας (**Nias, 1998; Hall and Giaccia, 2006**). Στην περίπτωση της μη-ιονίζουσας ακτινοβολίας, μελέτη έχει καταγράψει τον περιορισμό των επιδράσεων των Η/Μ πεδίων στο επίπεδο μεταγραφής, λόγω της ενεργοποίησης των μηχανισμών αναπλήρωσης (**Nikolova et al., 2005**). Πιθανόν ο μηχανισμός στην περίπτωση του παρόντος βιολογικού συστήματος να σχετίζεται με την ενεργοποίηση της αυτοφαγίας είτε των μονοπατιών επιβίωσης εφόσον το στρες δεν είναι έντονο, με αποτέλεσμα να περιορίζεται το ποσοστό των κυττάρων που οδηγούνται σε θάνατο.

Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης συμφωνούν με τα αντίστοιχα ευρήματα άλλων ερευνητών, που σχετίζονται με επιδράσεις των Η/Μ πεδίων στις συχνότητες της κινητής τηλεφωνίας στο **DNA** (**Diem et al., 2005; Yao et al., 2008; De luiliis et al., 2009; Franzellitti et al., 2010; Kesari et al., 2012; Cam and Seyhan, 2012; El-Abd and Eltoweissy, 2012; Sun et al., 2012**), αλλά και στον κυτταροσκελετό της **ακτίνης** (**Nylund and Leszczynski, 2004; Fragopoulou et al., 2012**).

Τα ευρήματα αυτής της ενότητας συμφωνούν επίσης με ερευνητικές μελέτες ως προς **τα χαρακτηριστικά της έκθεσης στο Η/Μ πεδίο**: 1) Ισχυρή επίδραση από τη **διακοπτόμενη έκθεση** στο πεδίο συχνοτήτων κινητής τηλεφωνίας έχει καταγραφεί και σε άλλα βιολογικά συστήματα (**Yao et al., 2008; Franzellitti et al., 2010**), ενώ η συγκριτικά μεγαλύτερη δραστικότητα της διακοπτόμενης σε σχέση με τη συνεχή έκθεση έχει επίσης διαπιστωθεί, υπό δεδομένες συνθήκες, τόσο τόσο σε πεδία RF (**Diem et al., 2005; Zhang et al., 2008**) όσο και σε ELF συχνοτήτων (**Ivancsits et al., 2002**). 2) Σημαντικές βιολογικές επιδράσεις από την ολιγόλεπτη ημερήσια διάρκεια έκθεσης, της τάξεως των **5-45 λεπτών**, στο πεδίο των κινητών τηλεφώνων αναφέρονται επίσης από πλήθος ερευνητικών ομάδων σε διάφορα κύτταρα/οργανισμούς (**Mausset-Bonnefont et al., 2004; Ning et al., 2007; Ammari et al., 2008a;b; 2010; Gul et al., 2009; Bouji et al., 2012; Cam and Seyhan, 2012; El-Abd and Eltoweissy, 2012; Mortazavi et al., 2012; Tombini et al., 2012; Sun et al., 2012; Vecchio et al., 2012).**

Τέλος, τα αποτελέσματα της παρούσας ενότητας μπορούν να συσχετιστούν με ευρήματα από μελέτες επίδρασης της ακτινοβολίας στα αναπαραγωγικά κύτταρα άλλων οργανισμών, όπως μυών (**Aitken et al., 2005**), αρουραίων (**Gul et al., 2009; Mailankot et al., 2009; Meo et al., 2010)** και κουνελιών (**La Vignera et al., 2012).** Όπως έχει αναφερθεί και στην Εισαγωγή της παρούσας, πολλά στοιχεία καθιστούν την ακτινοβολία των κινητών τηλεφώνων υπεύθυνη της ανδρικής υπογονιμότητας στον ανθρώπινο πληθυσμό, με τις περισσότρες από αυτές να υποδεικνύουν το επαγόμενο οξειδωτικό στρες ως την κύρια αιτία **(Fejes et al., 2005; Agarwal et al., 2008 a; b; Baste et al., 2008; Wdowiak et al., 2007; De luiliis et al., 2009; Desai et al., 2009; Kesari et al., 2012).**

4.1.2 Επαγωγή χαρακτηριστικών αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου στα ωοθυλάκια της πρώιμης και μέσης ωογένεσης από την GSM ακτινοβολία

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, η έκθεση στην ακτινοβολία προκάλεσε τη **συμπύκνωση της πυρηνικής χρωματίνης**, αλλά και την **πρόωρη ενεργοποίηση των κασπασών** στο κυτταρόπλασμα των τροφοκυττάρων των ωοθυλακίων της πρώιμης και μέσης ωογένεσης. Χαρακτηριστικό εύρημα της ενότητας υπήρξε και η **σύμπτωση** των δύο χαρακτηριστικών**, αποδομημένου DNA** και **συμπύκνωσης της πυρηνικής χρωματίνης στους ίδιους τροφοκυτταρικούς πυρήνες**. Σημειώνεται ότι, τα ποσοστά ανίχνευσης χαρακτηριστικών κυτταρικού θανάτου αυτής της πειραματικής σειράς είναι χαμηλότερα, της τάξεως του 30%, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα της προηγούμενης ενότητας 3.1. Η διαφορά αυτή μπορεί να αποδοθεί κατ'αρχήν στη μικρότερη τιμή έντασης πεδίου στην οποία έλαβε χώρα η έκθεση των ομάδων σε αυτή την περίπτωση, όπως και στη διαφορά της φέρουσας συχνότητας, καθώς από μετρήσεις με ειδικό αναλυτή φάσματος προέκυψε ότι το χρησιμοποιούμενο σύστημα GSM εκπέμπει τόσο στη συχνότητα των 900 όσο και των 1800 MHz (βλ. Υλικά & Μέθοδοι § 2.6.3.2) και όχι μόνο στη συχνότητα των 900MHz όπως στην ενότητα 3.1. Τόσο η φέρουσα συχνότητα όσο και η τιμή έντασης του πεδίου μεταβάλλουν σημαντικά τον ειδικό ρυθμό απορρόφησης SAR, ο οποίος, όπως αναφέρθηκε και στην Εισαγωγή (§ 1.4.2), συνδέεται με την ένταση του πεδίου σύμφωνα με τη σχέση $\sigma E^2/p$ όπου,

σ: η ειδική ηλεκτρική αγωγιμότητα του βιολογικού ιστού (Si/m) σε συγκεκριμένη συχνότητα
ρ: η πυκνότητα του βιολογικού ιστού (Kg/m^3) και
Ε: είναι η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου μέσα στον ιστό (V/m).

Φαίνεται δηλαδή ότι ο SAR εξαρτάται τόσο από την τιμή έντασης του πεδίου Ε, όσο και από τη συχνότητα καθώς από αυτή καθορίζεται η τιμή της ηλεκτρικής αγωγιμότητας του ακτινοβολούμενου ιστού. Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι, ο συγκεκριμένος οργανισμός έχει πολύ μικρό μέγεθος-όγκο με διαφορετική διηλεκτρική σταθερά και πυκνότητα στο εσωτερικού των ιστών του. Εφόσον ο SAR εξαρτάται από την ειδική αγωγιμότητα, η οποία όμως μεταβάλλεται από ιστό σε ιστό, από κύτταρο σε κύτταρο, και από βιομόριο σε βιομόριο, δεν θα ήταν έγκυρη η καταγραφή μίας μέσης τιμής ηλεκτρικής αγωγιμότητας που θα οδηγούσε και στην υπεραπλούστευση της σχέσης. Για το λόγο αυτό αναφερόμαστε στις τιμές έντασης ή πυκνότητας ισχύος των πεδίων που χρησιμοποιήθηκαν στα παρόντα πειράματα και όχι στα χαρακτηριστικά απορρόφησης της ακτινοβολίας από το συγκεκριμένο βιολογικό σύστημα.

Η αλλαγή των τιμών έντασης οφείλεται στην επιλογή διαφορετικού χώρου ακτινοβόλησης στο εργαστήριο, αλλαγή που προκάλεσε και μεταβολές του σήματος λήψης του κινητού τηλεφώνου από τον πλησιέστερο σταθμό βάσης κινητής τηλεφωνίας. Αξίζει να τονιστεί ότι, οι συνθήκες έκθεσης του εντόμου αντανακλούν τις πραγματικές συνθήκες έκθεσης ενός χρήστης κινητού τηλεφώνου, καθώς τα χαρακτηριστικά των πεδίων στα οποία εκτίθεται παρουσιάζουν μεγάλες διακυμάνσεις κυρίως στις τιμές της έντασης και σε πολύ μικρότερο βαθμό της φέρουσας συχνότητας.

Καταλήγοντας, η **διαπίστωση επαγωγής και των υπολοίπων δύο χαρακτηριστικών κυτταρικού θανάτου** σε συνδυασμό με τα **αποτελέσματα της προηγούμενης ενότητας** συγκλίνουν στο συμπέρασμα ότι, ένα τουλάχιστον είδος κυτταρικού θανάτου που επάγεται στα κύτταρα των ωοθυλακίων, της πρώιμης και μέσης ωογένεσης, των εκτεθειμένων στο GSM πεδίο εντόμων και υπό τις δεδομένες συνθήκες έκθεσης, είναι η **απόπτωση**.

Η πρόκληση αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου από τη δράση των πεδίων σε συχνότητες κινητής τηλεφωνίας υποστηρίζεται και από άλλες ερευνητικές μελέτες ***(*Caraglia et al., 2005; Zhao et al., 2007; Lee et al., 2008; Joubert et al., 2008; Dasdag et al., 2009; Esmekaya et al., 2010; Liu et al., 2012; Lu et al., 2012*),*** με ορισμένες να έχουν διαπιστώσει και τη συμμετοχή των κασπασών ***(*Höytö et al., 2008; Palumbo et al., 2008; Eşmekaya et al., 2010; Liu et al., 2012; Lu et al., 2012**). Τα στοιχεία αυτών των μελετών έχουν αναλυθεί εκτενώς στην Εισαγωγή της παρούσας εργασίας.

Όσον αφορά στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων σε μοριακό επίπεδο, μπορούμε να αναφερθούμε στις πιθανές μεταβολές των ενδοκυτταρικών ιοντικών συγκεντρώσεων, (**Panagopoulos et al., 2002; Panagopoulos and Margaritis, 2008),** όσο και στο επαγόμενο οξειδωτικό στρες, που μπορεί να προκαλέσει η έκθεση στα πεδία των κινητών τηλεφώνων (**Friedman et al., 2007; Phillips et al., 2009**). Τόσο η διαταραχή της ηλεκτροχημικής ισορροπίας όσο και το οξειδωτικό στρες αποτελούν παράγοντες καθοριστικούς της επιλογής ανάμεσα στην κυτταρική επιβίωση ή τον κυτταρικό θάνατο (**Pinton et al., 2008; Decuypere et al., 2011; Golstein and Kroemer 2007; Kroemer et al., 2007**).

Συνεπώς, παραμένει ανοιχτό το ενδεχόμενο πλην της επαγωγής του αποπτωτικού να επέρχεται και νεκρωτικός, αλλά και αυτοφαγικός κυτταρικός θάνατος και μάλιστα στις περιπτώσεις που το στρες από την έκθεση στην ακτινοβολία είναι πιο έντονο και τα έντομα δεν είναι δυνατόν να προσαρμοστούν ή να αναπτύξουν τους αμυντικούς τους μηχανισμούς. Θα μπορούσαμε συνεπώς να υποθέσουμε ότι, είναι δυνατή η ενεργοποίηση του μονοπατιού της αυτοφαγίας ή της απόπτωσης σε ελεγχόμενα αυξημένες συγκεντρώσεις ιόντων Ca και σχετικά ήπιο οξειδωτικό στρες, ενώ σε περισσότερο σοβαρές και ανεξέλεγκτες μεταβολές αυτών τα κύτταρα να οδηγούνται στη νέκρωση (**Pinton et al., 2008**). Το ισχυρό όμως οξειδωτικό στρες μαζί με τις μεταβολές στην ομοιόσταση ιόντων Ca φαίνεται να ευθύνεται σε μεγάλο βαθμό και για τον αυτοφαγικό κυτταρικό θάνατο, ο οποίος με τη σειρά του μπορεί να ενισχύσει τον καταρράκτη των αποπτωτικών αντιδράσεων (**Eisenberg-Lerner et al., 2009; Decuypere et al., 2011; Chen and Klionsky, 2011**). Σημειώνεται ότι, ανάμεσα στην αυτοφαγία, την απόπτωση και τη νέκρωση υφίστανται σημαντικές αλληλεπιδράσεις ("συνομιλίες") που καθορίζουν το τελικό βιολογικό αποτέλεσμα, ενώ ο τελικός φαινότυπος εξαρτάται από το είδος του θανάτου που επικρατεί τη χρονική στιγμή που διεξάγεται η μελέτη (**Thornburn et al., 2008**, βλ. Εισαγ. § 1.15.3, 1.19, 1.20.6).

Οι συνθήκες έκθεσης της ενότητας αυτής μπορούν να θεωρηθούν περισσότερο "ήπιες" σε σύγκριση με τις αντίστοιχες της προηγούμενης ενότητας με πιθανή την ενεργοποίηση του μηχανισμού αυτοφαγίας είτε μονοπατιών επιβίωσης για την προστασία του οργανισμού. Αντιθέτως, η έκθεση του εντόμου σε υψηλότερες τιμές έντασης υποθέτουμε ότι οδήγησε σε ενεργοποίηση του αποπτωτικού ή/και νεκρωτικού θανάτου για την περισσότερο αποδοτική απομάκρυνση των αλλοιωμένων ωοθυλακίων, ενώ ρόλο μπορεί να παίζει και η εκτεταμένη αυτοφαγία που στην προκειμένη περίπτωση θα μπορούσε να ενισχύσει το θάνατο με την καταστροφή απαραίτητων για την κυτταρική επιβίωση μορίων (**Nezis et al., 2009**). Σε ανάλογα συμπεράσματα έχει καταλήξει και παρόμοια μελέτη στο ίδιο βιολογικό σύστημα με την ενεργοποίηση του μονοπατιού επιβίωσης των ERK κινασών σε μία σχετικά χαμηλή τιμή SAR, σε αντίθεση με την ενεργοποίηση του μονοπατιού κυτταρικού θανάτου της JNK κινάσης σε υψηλότερη τιμή SAR (**Lee et al., 2008**).

Τα αποτελέσματα των δύο ενοτήτων (3.1&3.2) μπορούν σε κάποιο βαθμό να συσχετιστούν με αντίστοιχα δεδομένα, που προέκυψαν από μελέτη μας, σχετικά με τον ρόλο της εκπεμπόμενης έντασης/πυκνότητας ισχύος Η/Μ κύματος του πεδίου GSM (900MHz, 1800MHz) στην αναπαραγωγική ικανότητα και ωογένεση του εντόμου (Panagopoulos DJ, **Chavdoula ED**, Margaritis LH, 2010). Σύμφωνα με τη μελέτη αυτή, υφίσταται μία **γραμμική εξάρτηση** της παρατηρούμενης βιολογικής επίδρασης από την πυκνότητα ισχύος του κύματος/ένταση πεδίου. Εξαίρεση αποτελεί ο εντοπισμός ενός «παραθύρου» έντασης υψηλού βαθμού βιοδραστικότητας, το οποίο αποκαλύφθηκε στην τιμή έντασης της τάξεως των 10 $\mu W/cm^2$ (Panagopoulos DJ, **Chavdoula ED**, Margaritis LH, 2010; **Panagopoulos and Margaritis, 2010a**).

Τέλος, όπως σημειώθηκε και στην αρχή της παρούσας παραγράφου το φάσμα εκπομπής του κινητού τηλεφώνου στην παρούσα πειραματική σειρά εμφάνισε δύο κορυφές, μία στα 900 MHz και μία στα 1800MHz, σε αντίθεση με το αντίστοιχο φάσμα της ενότητας 3.1 που εμφάνισε μία κορυφή στα 900 MHz. Η διαφορά στη φέρουσα συχνότητα, ταυτόχρονα με την χαμηλότερη τιμή έντασης, είναι δυνατόν να ερμηνεύσει τον διαφορετικό βαθμό επίδρασης της ακτινοβολίας στις δύο ενότητες 3.1 και 3.2. Όπως προβλέπεται και από τον προτεινόμενο βιοφυσικό μηχανισμό του εργαστηρίου (**Panagopoulos et al., 2002**), αλλά επιβεβαιώνεται και από αποτελέσματα πειραματικής σειράς που πραγματοποιήσαμε συγκρίνοντας τη βιοδραστικότητα των δύο συστημάτων GSM-900MHz και GSM/DCS-1800MHz (Panagopoulos DJ, **Chavdoula ED**, Margaritis LH, 2010; Panagopoulos DJ, **Chavdoula ED**, Karabarbounis A., Margaritis LH, 2007b; Panagopoulos DJ, **Chavdoula ED**, Nezis IP, Margaritis LH, 2007a), τα πεδία με τις χαμηλότερες συχνότητες (900MHz) θεωρούνται σε κάποιο βαθμό περισσότερο δραστικά σε σύγκριση με τα υψηλότερης συχνότητας (1800 MHz).

4.1.3 Επίδραση της GSM ακτινοβολίας στα ωοθυλάκια της όψιμης ωογένεσης

Στις προηγούμενες ενότητες εξετάστηκαν τα ωοθυλάκια της πρώιμης και μέσης ωογένεσης μετά την έκθεση των εντόμων στα GSM πεδία. Στην παρούσα ενότητα η μελέτη επεκτάθηκε στα ωοθυλάκια της όψιμης ωογένεσης, σε στάδια της οποίας παρατηρείται φυσιολογικά ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος τόσο των τροφοκυττάρων (στάδια 12-13) όσο και των θυλακοκυττάρων (στάδιο 14Β) (Νέζης, 2002). Παράλληλα, κατά τη διάρκεια των χοριογενετικών σταδίων εκκρίνονται οι διάφορες δομές του κελύφους μέσα από ένα σύνολο αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στους διαφόρους κυτταρικούς τύπους που έχουν ήδη ξεκινήσει από τα μικρότερα αναπτυξιακά στάδια, όπως έχει ήδη αναλυθεί στην Εισαγωγή της παρούσας (βλ. Εισαγ. § 1.12, 1.14).

Κύριος στόχος της παρούσας ενότητας ήταν η **αποκάλυψη της ενδεχόμενης ευαισθησίας των ωοθυλακίων μεγαλυτέρων σταδίων,** που είχαν ξεπεράσει το δεύτερο σημείο ελέγχου της ωογένεσης, απέναντι στον στρεσογόνο παράγοντα της έκθεσης στην ακτινοβολία, καθώς και η **ανίχνευση αλλοιώσεων της λεπτής δομής** των ωοθυλακίων, που θα μπορούσαν να οφείλονται σε μεταβολές που είχαν υποστεί σε μικρότερα αναπτυξιακά στάδια, αλλά δεν είχαν εντοπιστεί μέσω των τεχνικών των προηγουμένων ενοτήτων.

Σύμφωνα με τα δεδομένα που προέκυψαν από την **πρώτη ενότητα** μελέτης των ωοθυλακίων όψιμης ωογένεσης (**ενότητα 3.3.Α**), όπως αυτά προήλθαν από τις **συνθήκες** έκθεσης της **πειραματικής ενότητας 3.1**, ο **ΠΚΘ των τροφοκυττάρων** στα ωοθυλάκια σταδίου 12-13 φαίνεται να **διεξάγεται φυσιολογικά**, όπως προκύπτει από την ανίχνευση αποδομημένου DNA στα στάδια 12-13, και όχι νωρίτερα, με το ωοκύτταρο και ολόκληρο το ωοθυλάκιο να χαρακτηρίζονται από κανονικό μέγεθος και σχήμα, αλλά και τον κυτταροσκελετό της ακτίνης να εμφανίζει τη φυσιολογική οργάνωση και διαμόρφωση των δεσμών ακτίνης στα στάδια 11-13, γεγονός ενδεικτικό της επιτυχούς μεταφοράς του κυτταροπλασματικού υλικού των τροφοκυττάρων στο ωοκύτταρο. Παράλληλα, η **ενεργότητα της χοριονικής υπεροξειδάσης** στο τελευταίο στάδιο της ωογένεσης (στ. 14), με κύριο ρόλο τη σκλήρυνση του χορίου, διαπιστώθηκε ότι **δεν διαφέρει ανάμεσα στις εκτεθειμένες ομάδες και τις ομάδες μάρτυρα**.

Τα παραπάνω στοιχεία μπορούν να ερμηνεύσουν το γεγονός ότι, τα **ποσοστά κυτταρικού θανάτου** στις περιπτώσεις μελέτης των ωοθυλακίων των προ-βιτελλογενετικών και βιτελλογενετικών σταδίων **σχεδόν ταυτίζονταν** με τα αντίστοιχα ποσοστά **μείωσης της αναπαραγωγικής ικανότητας του εντόμου** (βλ. Συζ. § 4.1), καθώς όπως διαπιστώθηκε, **τα ωοθυλάκια που διέφευγαν του επαγομένου κυτταρικού θανάτου** μέχρι και το στάδιο 10, **αναπτύσσονταν φυσιολογικά** στα επόμενα (χοριογενετικά) στάδια δίνοντας τέλεια έντομα.

Τα ευρήματα της **δεύτερης ενότητας (3.3B),** που αφορούσε στη σύγκριση της βιολογικής επίδρασης ανάμεσα στις ομάδες των **6min/day (EXP6)** και **30min/day (EXP30)**, μαρτυρούν τη φυσιολογική διαμόρφωση και απόθεση τόσο της βιτελλινικής μεμβράνης όσο και των ζωνών του χορίου, καθώς και την ανάπτυξη των αναπνευστικών νηματίων, παράλληλα με τον φυσιολογικό ΠΚΘ των τροφοκυττάρων (στ. 12-13) και θυλακοκυττάρων (στ. 14) και στις δύο εκτεθειμένες ομάδες (6min και 30min). Ωστόσο, σε ένα μικρό ποσοστό ωοθυλακίων σταδίου 12C-13A εκτεθειμένων εντόμων (30min) διαπιστώθηκαν **ασυνέχειες (κενά) στο επιθήλιο** των θυλακοκυττάρων συνοδευόμενες από άδεια κυτταροποσικά κυστίδια εντός του ωοκυττάρου ακριβώς κάτω από τη βιτελλινική μεμβράνη σε σύγκριση με το ωοθυλάκιο. Πιθανόν, οι δύο αλλοιώσεις να συνδέονται, καθώς το ωοκύτταρο κατά τη διάρκεια της βιτελλογένεσης φέρει στην επιφάνειά του κυτταροποσικά κυστίδια που είναι γεμάτα λεκιθοπρωτεΐνες. Τα κυστίδια αυτά αυξάνουν σε μέγεθος με απορρόφηση μεγαλυτέρων ποσοτήτων λεκιθοπρωτεϊνών και αποχωρίζονται από τη μεμβράνη του ωοκυττάρου για να σχηματίσουν τα α-λεκιθοσφαιρίδια. Επομένως, τα κενά κυτταροποσικά κυστίδια μπορεί να οφείλονται σε προβλήματα πρόσληψης α-λεκιθοπρωτεϊνών προερχομένων είτε από την αιμολέμφο είτε τα θυλακοκύτταρα, καθώς αυτά συμμετέχουν ενεργά στη βιτελλογένεση, δηλαδή στη μεταφορά και συσσώρευση λεκίθου από την αιμολέμφο στο ωοκύτταρο, ενώ παράλληλα συνθέτουν και ένα ποσοστό των πρωτεϊνών της λεκίθου. Σημειώνεται ότι, εκτός από τα άδεια κυστίδια, στο αλλοιωμένο ωοθυλάκιο ανιχνεύονται και φυσιολογικά α-λεκιθοσφαιρίδια, πράγμα που σημαίνει ότι μερικώς μόνο έχει παρεμποδιστεί η παραπάνω διαδικασία.

Τέλος, και πάλι σε περιορισμένο αριθμό εκτεθειμένων δειγμάτων στα **30 min**, διαπιστώθηκε **μεταβολή στο σχήμα του ωοκυττάρου** σε ωοθυλάκια σταδίου 14, καθώς αυτό βρέθηκε συρρικνωμένο και απομακρυσμένο από τη ζώνη του χορίου. Η συρρίκνωση αυτή μπορεί να αποδοθεί σε αλλοιώσεις του **κυτταροσκελετού της ακτίνης και των μικροσωληνίσκων** και κατ'επέκταση μεταβολών στο σχήμα του ωοκυττάρου σε χοριογενετικά είτε σε μικρότερα στάδια. Δεδομένα επιδράσεων της ακτινοβολίας στον κυτταροσκελετό της ακτίνης αναφέρονται σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα (**Nylund and Leszczynski, 2004)** και εγκεφαλικά κύτταρα μυών **(Fragopoulou et al., 2012),** ενώ επιδράσεις στους μικροσωληνίσκους σε κύτταρα V79 **(Trosic and Pavicic, 2008)**.

Τα δεδομένα της ενότητας Β, τα οποία χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων, είναι ενδεικτικά της **μεγαλύτερης βιοδραστικότητας** που χαρακτηρίζει την έκθεση των 30min/day σε σύγκριση με αυτή των 6min/day. Η διαφορά ανάμεσα στους δύο τύπους έκθεσης έρχεται σε συμφωνία με τα ευρήματα που έχουν προκύψει από μελέτη του εργαστηρίου μας στο ίδιο βιολογικό σύστημα, σύμφωνα με τα οποία υφίσταται **μία γραμμικότητα** στη σχέση ανάμεσα στη διάρκεια έκθεσης και το παρατηρούμενο βιολογικό αποτέλεσμα, τουλάχιστον στις περιπτώσεις βραχυπρόθεσμης έκθεσης στο GSM πεδίο (**Panagopoulos and Margaritis, 2010b**).

Τα κενά στο επιθήλιο των θυλακοκυττάρων είναι δυνατόν να οφείλονται σε **μεταβολές που έχει υποστεί το επιθήλιο σε μικρότερα στάδια** και οφείλονται: 1) στον **επαγόμενο θάνατο** των θυλακοκυττάρων, 2) στις **μεταβολές των ιδιοτήτων πρόσφυσης** (ήδη από το στάδιο του γερμαρίου) μεταξύ των θυλακοκυττάρων, είτε μεταξύ των θυλακοκυττάρων και των κυττάρων της γενετικής σειράς καθ'όλη τη διάρκεια της πρώιμης και μέσης ωογένεσης, 3) στον **ελλιπή αριθμό θυλακοκυττάρων** λόγω μεταβολών στις διαδικασίες των **μιτωτικών τους διαιρέσεων** (στάδια 1-6). Σε σύγκριση με παλαιότερες μελέτες, έχει διαπιστωθεί η εμφάνιση ασυνεχειών στο σωματικό επιθήλιο σε έντομα μεταλλαγμένα για τα γονίδια Notch και συνιστωσών της σηματοδότησης EGFR (**Goode et al., 1992; Xu et al., 1992**). Τα κενά αυτά θεωρήθηκε ότι δεν προέρχονται από το θάνατο των θυλακοκυττάρων, αλλά από ανωμαλίες στην κυτταρική πρόσφυση ή τον πολλαπλασιασμό (**Goode et al., 1992**).

Ερευνητικές μελέτες κάνουν λόγο για ενδεχόμενη επίδραση των πεδίων κινητής τηλεφωνίας σε παραμέτρους που σχετίζονται με τον **κυτταρικό πολλαπλασιασμό**, όπως: μεταβολές στην απαιτούμενη διαμόρφωση των μικροσωληνίσκων κατά την κυτταρική διαίρεση (**Trosic and Pavicic, 2009**), μείωση του ρυθμού κυτταρικού πολλαπλασιασμού και του αριθμού των κυττάρων (**Capri et al., 2004; Sun et al., 2012**; **Sonmez et al., 2010; Rağbetli et al., 2010**). Επίσης, επιδράσεις έχουν καταγραφεί και σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης των πρωτεϊνών **κυτταρικής πρόσφυσης**, τουλάχιστον στην περίπτωση των νευρικών κυττάρων (**Yan et al., 2008; 2009**), ενώ τέλος, ενδεχόμενος στόχος των πεδίων φαίνεται να είναι και ο διαμεμβρανικός υποδοχέας EGFR (**Friedman et al., 2007; Sun et al., 2012**). Οι μελέτες επαγωγής κυτταρικού θανάτου από τα πεδία κινητών τηλεφώνων έχουν αναφερθεί στην προηγούμενη παράγραφο (§ 4.1.2).

Συνολικά, από τις παραπάνω παρατηρήσεις αυτές μπορούμε να συναγάγουμε το συμπέρασμα ότι, η συγκεκριμένη ακτινοβολία και υπό τις δεδομένες συνθήκες έκθεσης **(6min/day) δεν επιδρά** σε συνιστώσες που επηρεάζουν: 1) τη διαδικασία **dumping**, όπως είναι η μετανάστευση των θυλακοκυττάρων κεντρικά του ωοθυλακίου (centripetal) και οι δυναμικές μεταβολές του συμπλόκου ακτίνης-μυοσίνης, 2) τον **ΠΚΘ και των δύο κυτταρικών τύπων** (βλ. Εισαγ. § 1.20), 3) το σχηματισμό της **βιτελλινικής μεμβράνης, του χορίου και των εξειδικευμένων δομών του κελύφους**, όπως είναι τα διάφορα μονοπάτια σηματοδότησης, και πολλοί ακόμη παράγοντες που εκτενώς αναφέρονται στην Εισαγωγή της παρούσας (βλ. Εισαγ. § 1.12, 1.14).

Τα θυλακοκύτταρα, μετά το στάδιο 6, που παύουν να πολλαπλασιάζονται, αλλά και τα βιτελλογενετικά στάδια 9-10 που ολοκληρώνεται η διαφοροποίησή τους, μαζί με τις διάφορες αναδιαμορφώσεις και μετακινήσεις που υφίστανται μέχρι την τελική συγκρότηση του επιθηλίου (βλ. Εισαγ. § 1.14), **ενδέχεται να παρουσιάζουν χαμηλότερο βαθμό ευαισθησίας απέναντι στο στρες της ακτινοβολίας**. Επιπλέον, τα διαφορετικά ορμονικά χαρακτηριστικά που διέπουν την ανάπτυξη των ωοθυλακίων στα μεγαλύτερα στάδια, όπως και οι διαφορές στην επικοινωνία των διαφόρων κυτταρικών τύπων συγκριτικά με τα μικρότερα στάδια ανάπτυξης, ταυτόχρονα με την απόθεση της βιτελλινικής μεμβράνης και των ζωνών του χορίου, που είναι δυνατόν να μεταβάλλουν τις ιδιότητες διείσδυσης/απορρόφησης της συγκεκριμένης ακτινοβολίας από τα υποκείμενα αυτών των δομών κύτταρα, είναι δυνατόν να συμβάλλουν καθοριστικά στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας των ωοθυλακίων απέναντι στους διαφόρους παράγοντες στρες, συμπεριλαμβανομένης και της έκθεσης στο GSM πεδίο.

4.1.4 Επίδραση της GSM ακτινοβολίας στην in vitro ανάπτυξη των ωοθυλακίων

Στην παρούσα ενότητα η μελέτη επεκτάθηκε και σε δείγματα *in vitro* μετά την έκθεση απομονωμένων ωοθυλακίων στο GSM900/1800 MHz πεδίο. **Στόχος** της μελέτης ήταν η διερεύνηση **ενδεχόμενης ευαισθησίας** του παρόντος βιολογικού συστήματος απέναντι στην ακτινοβολία και σε **συνθήκες *in vitro***. Τα προκαταρκτικά αποτελέσματα αυτής της πειραματικής σειράς κατέγραψαν μία διαφορά στα ποσοστά ωοθυλακίων με

αλλοιώσεις στον κυτταροσκελετό της ακτίνης, ανάμεσα στις εκτεθειμένες ομάδες και τις ομάδες μάρτυρα της τάξεως του 6.56%. Οι μεταβολές αυτές διαπιστώθηκαν στα ωοθυλάκια σταδίου 11 και σχετίζονται με την διαδικασία αδειάσματος του κυτταροπλάσματος των τροφοκυττάρων στο ωοκύτταρο. Τα ωοθυλάκια σταδίου 10 βρέθηκαν φυσιολογικά χωρίς αλλοιώσεις στο δίκτυο της ακτίνης. Πιο συγκεκριμένα, χαρακτηριστικές ήταν οι αλλοιώσεις στη μορφολογία του κυτταροσκελετού των ινιδίων ακτίνης ταυτόχρονα με την απουσία διακριτών ορίων ανάμεσα στα γειτονικά τροφοκύτταρα και τη μεταβολή του σχήματός τους στα ωοθυλάκια σταδίου 11. Στις εκτεθειμένες ομάδες παρατηρήθηκε **αδυναμία συγκρότησης των κυτταροπλασματικών δεσμών ακτίνης κατά τη διαδικασία του dumping,** καθώς και υψηλή συγκέντρωση ακτίνης σε μεμονωμένα σημεία, όπως τα όρια των πλασματικών μεμβρανών των τροφοκυττάρων. Οι αλλοιώσεις αυτές είναι αντίστοιχες με αυτές που παρατηρούνται σε φαινοτύπους dumpless από μεταλλαγμένα στελέχη εντόμων (βλ. Εισαγ. § 1.21.1), ενώ είναι παρόμοιες με αυτές που ανιχνεύθηκαν και πάλι σε *in vitro* σύστημα ανάπτυξης ωοθυλακίων μετά την προσθήκη επαγωγέων της απόπτωσης (Nezis et al., 2006a). Σε άλλες περιπτώσεις φαίνεται να εκλείπει από ορισμένα σημεία τελείως ο κυτταροσκελετός τόσο σε τροφοκύτταρα όσο και στο επιθήλιο των θυλακοκυττάρων και άρα να ακυρώνεται η ακεραιότητά του.

Οι παρατηρούμενες αλλοιώσεις μπορούν να αποδοθούν στην επίδραση της ακτινοβολίας στα στοιχεία του κυτταροσκελετού της ακτίνης, είτε απευθείας στην ίδια την ακτίνη, είτε στα διάφορα πρωτεϊνικά μόρια που συνδέονται με αυτή επηρεάζοντας τη δομή, αλλά και τη λειτουργικότητά της. Μία πιθανή επίδραση είναι οι μεταβολές στις συγκεντρώσεις ιόντων Ca, όπως θα αναλυθεί στη συνέχεια, οι οποίες με τη σειρά τους μεταβάλλουν την ενεργότητα των πρωτεϊνικών μορίων που αλληλεπιδρούν με την ακτίνη, είτε τη συστολή του συμπλόκου ακτίνης-μυοσίνης κατά το τροφοκυτταρικό άδειασμα, είτε τέλος τη μετακίνηση των θυλακοκυττάρων προς το κέντρο του ωοθυλακίου (centripetal μετακίνηση (βλ. Εισαγ. § 1.22). Όμως, η ακτίνη μπορεί να αποτελεί και στόχο των ενώσεων ROS και άρα να πλήττεται σε περίπτωση επαγωγής οξειδωτικού στρες (**Trachootham et al., 2008**).

Αλλοιώσεις στον κυτταροσκελετό της ακτίνης σημειώθηκαν και στην πειραματική **ενότητα 3.1,** ενώ έχουν διαπιστωθεί και από άλλες ερευνητικές ομάδες σε ενδοθηλιακά και νευρικά κύτταρα λόγω έκθεσης σε πεδία κινητών τηλεφώνων (**Nylund and Leszczynski, 2004; Fragopoulou et al., 2012).**

Σημειώνεται ότι απαιτείται η διεξαγωγή περαιτέρω πειραμάτων για να είναι εφικτή η στατιστική ανάλυση των πειραματικών δεδομένων.

4.2 Βιοφυσική και βιοχημική ερμηνεία των βιολογικών επιδράσεων των Η/Μ πεδίων στα κύτταρα

4.2.1 Αλληλεπίδραση των Η/Μ πεδίων με τις βιολογικές μεμβράνες

Στο κεφάλαιο αυτό θα αναλυθούν οι **επικρατέστεροι βιοφυσικοί και βιοχημικοί μηχανισμοί** σε μία απόπειρα ερμηνείας της βιολογικής δράσης των Η/Μ πεδίων στα κύτταρα και κατ'επέκταση στους ζωντανούς οργανισμούς. Σύμφωνα με τους δύο προτεινόμενους βιοφυσικούς μηχανισμούς κύριος και κοινός στόχος των Η/Μ πεδίων φαίνεται να είναι οι βιολογικές μεμβράνες, με τα πεδία να επιδρούν σε ορισμένες πρωτεΐνες αυτών, όπως στην NADH οξειδάση (**Friedman et al., 2007**), επηρεάζοντας διάφορα μονοπάτια σηματοδότησης, αλλά και στα ιοντικά κανάλια, και κυρίως στα κανάλια ιόντων Ca^{+2} (**Panagopoulos et al., 2000b; 2002; 2003b; Panagopoulos and**

Margaritis, 2008) μεταβάλλοντας τις ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις αυτών και κατ'επέκταση πολλές συνιστώσες της κυτταρικής λειτουργίας. Τέλος, κοινό παρονομαστή των δύο μηχανισμών που αναφέρονται στην αλληλεπίδραση των πεδίων με τις βιολογικές μεμβράνες, αλλά και αυτού που κάνει λόγο για την παραγωγή ελευθέρων ριζών μέσω της αντίδρασης Fenton με τη συμμετοχή της Η/Μ ακτινοβολίας, αποτελεί η εμφάνιση του **οξειδωτικού στρες** με απρόβλεπτες και καταστροφικές συνέπειες για το κύτταρο (**Trachootham et al., 2008**). Τα πειραματικά δεδομένα που υποστηρίζουν την εμφάνιση του οξειδωτικού στρες λόγω της έκθεσης σε αυτού του τύπου την ακτινοβολία έχουν αναλυθεί στο κεφάλαιο της Εισαγωγής (§ 1.8.7).

4.2.1.1 Δράση των Η/Μ πεδίων στην NADH οξειδάση των βιολογικών μεμβρανών

Σύμφωνα με τον μηχανισμό του Friedman και των συνεργατών του (**Friedman et al., 2007**), το οξειδωτικό στρες που επήλθε οφειλόμενο στην αυξημένη παραγωγή ενώσεων οξυγόνου ROS (reactive oxygen species) μετά την έκθεση στα Η/Μ πεδία των κινητών τηλεφώνων, χάρη στην ενεργοποίηση της διαμεβρανικής NADH οξειδάσης, καταλήγει μέσω ενός καταρράκτη αντιδράσεων στην ενεργοποίηση του μονοπατιού ERK κινασών (extracellular-signal-regulated kinases) και κατ' επέκταση στην φωσφορυλίωση μεταγραφικών παραγόντων με αποτέλεσμα τη μεταβολή έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων (**Friedman et al., 2007**). Το οξειδωτικό στρες με τη μορφή των ενώσεων ROS διαπιστώθηκε στα κύτταρα Rat1 και HeLa, που εκτέθηκαν για λίγα λεπτά σε εντάσεις 0.07-0.31mW/cm^2, και σε συχνότητες 800, 875 και 950 MHz.

Οι ενώσεις ROS προτείνεται ότι ενεργοποίησαν τις διαμεμβρανικές μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs-matrix metalloproteinases), οι οποίες διασπούν και απελευθερώνουν τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα της ηπαρίνης, Hb-EGF (heparin-binding-epidermal growth factor), ο οποίος συνδέεται στον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα-EGFR (epidermal growth factor receptor). Στη συνέχεια, ο υποδοχέας επάγει την φωσφορυλίωση των ERK κινασών μέσω του μονοπατιού Ras/MEK, με τελικό αποτέλεσμα την αλληλεπίδραση των ενεργών ERK με διαφόρους μεταγραφικούς παράγοντες και την επερχόμενη μεταβολή της γονιδιακής έκφρασης. Πλην όμως της διέγερσης των κινασών ERK, που ανιχνεύθηκε μετά από τη σύντομη έκθεση των κυττάρων στα παραπάνω πεδία, επήλθε η ενεργοποίηση και της p38 MAPK κινάσης μετά από έκθεση μεγαλύτερης διάρκειας (**Friedman et al., 2007**).

4.2.1.2 Δράση Η/Μ πεδίων στα ιοντικά κανάλια των βιολογικών μεμβρανών

Οι προαναφερθείσες βιολογικές επιδράσεις των Η/Μ πεδίων της κινητής τηλεφωνίας στο εξεταζόμενο σύστημα μπορούν να ερμηνευθούν με βάση τον προταθέντα μηχανισμό του εργαστηρίου μας (**Panagopoulos et al., 2000b; 2002; Panagopoulos and Margaritis, 2003b; 2008**), ο οποίος θεωρείται ο πιο πλήρης και από τους επικρατέστερους από όσους έχουν προταθεί στο συγκεριμένο πεδίο έρευνας.

Σύμφωνα με το μηχανισμό αυτό, ακόμα και ασθενή ELF πεδία με τιμές έντασης της τάξεως των 10 mV/m, είναι ικανά να αλληλεπιδράσουν με τα ηλεκτροευαίσθητα κανάλια ιόντων των μεμβρανών προκαλώντας αντικανονικό άνοιγμα ή κλείσιμο (gating) αυτών διαταράσσοντας τις αντίστοιχες ενδοκυτταρικές ιοντικές συγκεντρώσεις. Το άνοιγμα ή κλείσιμο των καναλιών αυτών εξαρτάται από τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στους αισθητήρες των καναλιών και το διαμεμβρανικό δυναμικό, ενώ τα κανάλια μεταπίπτουν από ανοιχτά σε κλειστά, όταν η ηλεκτροστατική δύναμη που ασκείται από τις διαμεμβρανικές μεταβολές δυναμικού (π.χ. της τάξεως των 30mV) στα ηλεκτρικά φορτία των αισθητήρων, υπερβεί μία κρίσιμη τιμή (**Παναγόπουλος, 2001; Panagopoulos et al., 2000b; 2002; Panagopoulos and Margaritis, 2003b; 2008**).

Πιο αναλυτικά, ο μηχανισμός προτείνει ότι, κάθε μεταβαλλόμενο εξωτερικό ηλεκτρικό ή μαγνητικό πεδίο ασκεί μία μεταβαλλόμενη δύναμη στα ελεύθερα ιόντα που εντοπίζονται εκατέρωθεν των πλασματικών μεμβρανών, από τις οποίες τα ιόντα διέρχονται μέσω των διαμεμβρανικών ιοντικών καναλιών. Η δύναμη που ασκείται στα ιόντα μπορεί να προκαλέσει την εξαναγκασμένη ταλάντωση αυτών με συχνότητα ίδια με αυτή του εξωτερικού πεδίου. Όταν το πλάτος της ταλάντωσης ξεπεράσει μία κρίσιμη τιμή, οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις που ασκούνται από το φορτίο των ταλαντούμενων ιόντων στους αισθητήρες των ηλεκτροευαίσθητων διαμεμβρανικών ιοντικών καναλιών, μπορούν να δώσουν λάθος σήμα και να οδηγήσουν στο αντικανονικό άνοιγμα/κλείσιμο των καναλιών με τελικό αποτέλεσμα τη διαταραχή της ηλεκτροχημικής ισορροπίας του κυττάρου μέσω της μεταβολής των ενδοκυτταρικών ιοντικών συγκεντρώσεων (**Παναγόπουλος, 2001; Panagopoulos et al., 2000b; 2002; Panagopoulos and Margaritis, 2003b; 2008**).

Η διαταραχή των ιοντικών συγκεντρώσεων, όπως των ιόντων Ca^{+2}, που θεωρείται ότι κυριαρχεί, ευθύνεται για τη μεταβολή πολλών πτυχών της κυτταρικής λειτουργίας, που μπορούν να καταλήξουν σε κυτταρικό θάνατο, μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, οξειδωτικό στρες κ.ά. όπως έχει ήδη αναφερθεί στην Εισαγωγή της παρούσας εργασίας (**Pinton et al., 2008; Panagopoulos and Margaritis 2008; Adam-Vizi and Starkov 2010**) και θα εκτεθεί στη συνέχεια.

Όπως έχει διατυπωθεί και στην Εισαγωγή, τα RF Η/Μ πεδία της κινητής τηλεφωνίας μεταδίδονται με παλμούς ELF συχνοτήτων ή περιλαμβάνουν σήματα διαμορφωμένα σε ELF συχνότητες, με τιμές έντασης πολύ μεγαλύτερες των 10^{-3}V/m και συνεπώς πληρούν τις προϋποθέσεις του συγκεκριμένου μηχανισμού για να θεωρηθούν ως οι κυρίως υπεύθυνες για τις παρατηρούμενες βιολογικές επιδράσεις (**Panagopoulos et al., 2002; 2003b; Panagopoulos, 2011**). Αυτό ήταν άλλωστε και ένα από τα συμπεράσματα της μελέτης μας (Panagopoulos DJ, **Chavdoula ED**, Margaritis LH, 2010), σύμφωνα με τα οποία στις ομάδες που οι τιμές των ELF συνιστωσών είχαν μειωθεί σημαντικά, λόγω απόστασης από την πηγή έκθεσης, η μέση ωοτοκία και τα ποσοστά ανίχνευσης θρυμματισμένου DNA είχαν προσεγγίσει τα επίπεδα του μάρτυρα.

Σε επιβεβαίωση των παραπάνω, πειραματικά δεδομένα έκθεσης σε Η/Μ πεδία κινητών τηλεφώνων κάνουν λόγο για μεταβολές στα ιόντα Ca (βλ. Εισαγ. § 1.8.6), η αυξημένη εκροή ή εισροή των οποίων έχει διαπιστωθεί και στις περιπτώσεις έκθεσης στα μεταβαλλόμενα ELF μαγνητικά και ηλεκτρικά πεδία (**Bawin and Adey, 1976; Lindstrom et al., 1993; Walleczek and Liburdy, 1990; Lyle et al., 1991; Liburdy, 1992**).

Ένα από τα κύρια συμπεράσματα του συγκεκριμένου μηχανισμού αποτελεί η μεγαλύτερη βιοδραστικότητα που εμφανίζουν τα χαμηλότερης συχνότητας, καθώς και τα παλμικά πεδία, σε σύγκριση με τα υψηλότερης συχνότητας και συνεχή πεδία (**Panagopoulos et al., 2002**). Όσον αφορά στην πρώτη διαπίστωση, όντως τα πεδία GSM (900 MHz) εμφάνισαν μεγαλύτερη δραστικότητα σε σύγκριση με τα πεδία DCS/GSM (1800 MHz), όπως έχει καταγραφεί σε άλλες μελέτες μας (Panagopoulos DJ, **Chavdoula ED**, Margaritis LH, 2010; Panagopoulos DJ, **Chavdoula ED**, Karabarbounis A., Margaritis LH, 2007b; Panagopoulos DJ, **Chavdoula ED**, Nezis IP, Margaritis LH, 2007a).

Σημειώνεται ότι, η δράση των Η/Μ πεδίων κινητών τηλεφώνων μπορεί να επεκταθεί άμεσα ή έμμεσα και στις μεμβράνες διαφόρων οργανιδίων, όπως των μιτοχονδρίων και των λυσοσωμάτων (**Goldsworthy, 2007; Panagopoulos and Margaritis 2008; Boya and Kroemer, 2008**).

4.2.2 Παραγωγή ελευθέρων ριζών από την Η/Μ ακτινοβολία

Τα ELF Η/Μ πεδία πιστεύεται ότι ευθύνονται για την παραγωγή ελευθέρων ριζών, κυρίως μέσω της αντίδρασης Fenton, όπως έχει βρεθεί σε ποικίλα βιολογικά συστήματα (**Lai and Singh, 1996; 1997; 2004; Simko, 2007; Phillips et al., 2009**). Η αντίδραση Fenton, καταλύεται από το Fe^{+2} και κατά τη διεξαγωγή της το H_2O_2, ως προϊόν της οξειδωτικής αναπνοής στα μιτοχόνδρια, με τη δράση της Η/Μ ακτινοβολίας μετατρέπεται σε υδροξυλικές ελεύθερες ρίζες (**Phillips et al., 2009**). Εφόσον πολλά πειραματικά δεδομένα τόσο από ELF όσο και από RF (βλ. Εισαγ. § 1.8.7) Η/Μ πεδία συνηγορούν υπέρ της παραγωγής ελευθέρων ριζών και άρα εμφάνισης οξειδωτικού στρες στα κυτταρικά συστήματα, μπορούμε να θεωρήσουμε ότι η διεξαγωγή της παραπάνω αντίδρασης είναι υπεύθυνη σε μεγάλο βαθμό για τις παρατηρούμενες βιολογικές επιπτώσεις (**Panagopoulos, 2011**). Επιπλέον, με βάση την υπόθεση αυτή, κύτταρα τα οποία είναι ιδιαίτερα μεταβολικώς ενεργά, και άρα χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερες συγκεντρώσεις H_2O_2, αλλά και κύτταρα με υψηλές συγκεντρώσεις ελευθέρου σιδήρου, θα είναι περισσότερο ευαίσθητα στην ακτινοβολία. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι, σύμφωνα με τον παρόντα μηχανισμό, τα νευρικά κύτταρα αποδεικνύονται ιδιαιτέρως ευάλωτα, καθώς πέρα από το γεγονός ότι φέρουν υψηλά επίπεδα Fe^{+2}, δεν χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερες ικανότητες επιδιόρθωσης, γεγονός που σημαίνει ότι η συσσώρευση των βλαβών καταλήγει σε μεταβολές της κυτταρικής λειτουργίας, αλλά και σε κυτταρικό θάνατο, και άρα μπορεί να προκαλέσει ή να ενισχύσει την εμφάνιση νευροεκφυλιστικών νόσων. Αντιθέτως, κύτταρα με υψηλά επίπεδα αντιοξειδωτικών παραγόντων καθίστανται ιδιαίτερα ανθεκτικά στη δράση των Η/Μ πεδίων (**Phillips et al., 2009**).

4.3 Κύρια συμπεράσματα της διατριβής και προτεινόμενο μοντέλο δράσης της ακτινοβολίας των κινητών τηλεφώνων στο εξεταζόμενο βιολογικό σύστημα

4.3.1 Ο κυτταρικός θάνατος ως αποτέλεσμα της μεταβολής των ιοντικών συγκεντρώσεων και της παρουσίας οξειδωτικού στρες

Τα κύρια συμπεράσματα της παρούσας εργασίας αποτελούν η **αισθητή μείωση της αναπαραγωγικής ικανότητας (Α.Ι.)** ταυτόχρονα με τα **αυξημένα ποσοστά θανάτου στα κύτταρα των ωοθυλακίων της πρώιμης και μέσης ωογένεσης** των εκτεθειμένων στην ακτινοβολία εντόμων, τα οποία κατά κύριο λόγο φαίνεται να ευθύνονται για την παρατηρούμενη μείωση της ωοτοκίας. Τα χαρακτηριστικά κυτταρικού θανάτου που ανιχνεύθηκαν, δηλαδή η **αποδόμηση του DNA**, η **αποδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, η συμπύκνωση της πυρηνικής χρωματίνης και η ενεργοποίηση των κασπασών,** αποτελούν ενδείξεις επαγωγής **αποπτωτικού** κατά κύριο λόγο κυτταρικού θανάτου (**Nezis et al., 2000**).

4.3.1.1 Προτεινόμενο μοντέλο δράσης των Η/Μ πεδίων κινητών τηλεφώνων στο εξεταζόμενο βιολογικό σύστημα της ωογένεσης

Συνοψίζοντας, και συνδυάζοντας τα **πειραματικά αποτελέσματα** της παρούσας διατριβής και τους προταθέντες **βιοφυσικούς και βιοχημικούς μηχανισμούς δράσης** των Η/Μ πεδίων κινητής τηλεφωνίας και λαμβάνοντας υπ'όψιν **τις καταγεγραμμένες βιολογικές επιδράσεις** σε διάφορα άλλα βιολογικά συστήματα (βλ. Εισαγ. § 1.8), καθώς και τα **ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που διέπουν τη διαδικασία της ωογένεσης**, μπορούμε να καταλήξουμε στη διατύπωση ενός **πιθανού μοντέλου** δράσης των Η/Μ πεδίων κινητής τηλεφωνίας στο εξεταζόμενο βιολογικό σύστημα.

Η κυρίαρχη υπόθεση σχετίζεται με την επαγόμενη μεταβολή της ηλεκτροχημικής ισορροπίας από το αντικανονικό άνοιγμα-κλείσιμο των ιοντικών καναλιών, δράση κύρια εκφραζόμενη μέσω της μεταβολής στην ομοιόσταση των ιόντων Ca^{+2} (**Panagopoulos et al., 2002**). Η διαταραχή αυτή είναι δυνατόν να επιφέρει τον κυτταρικό θάνατο λόγω της αυξημένης πρόσληψης των ιόντων Ca^{+2} από τα μιτοχόνδρια και της αδυναμίας των τελευταίων να ελέγξουν τις υψηλές ιοντικές συγκεντρώσεις, με τελικό αποτέλεσμα την απελευθέρωση προ-αποπτωτικών παραγόντων και την ενεργοποίηση των κασπασών (**Kroemer et al., 2007; Pinton et al., 2008; βλ. Εισαγ. § 1.17**). Οι μεταβολές όμως των ενδοκυτταρικών ιοντικών συγκεντρώσεων είναι δυνατόν να επηρεάσουν και τις μιτωτικές διαιρέσεις των κυττάρων και τις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου (**Kunzelman, 2005**). Όσον αφορά στα ιόντα Ca, η αύξηση των ενδοκυτταρικών συγκεντρώσεων μπορεί να προκαλέσει το στρες του Ενδοπλασματικού δικτύου, ενώ η αυξημένη πρόσληψη των ιόντων από τα μιτοχόνδρια μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την υπερπαραγωγή ενώσεων ROS (**Pinton et al., 2008; Adam-Vizi and Starkov, 2010; βλ. Εισαγ. § 1.17**). Ωστόσο, παραγωγή ελευθέρων ριζών-ενώσεων ROS μπορεί να προκύψει και μέσω της αντίδρασης Fenton με τη δράση της συγκεκριμένης ακτινοβολίας (**Phillips et al., 2009**). Η δράση των ενώσεων ROS, μπορεί να επεκταθεί και στην περίπτωση της λυσοσωμικής μεμβράνης επιφέροντας την εκτεταμένη απελευθέρωση υδρολυτικών ενζύμων, ενδεχομένως παράλληλα και με τις μεταβολές των ιοντικών συγκεντρώσεων Ca, καταλήγοντας σε νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο (**Pinton et al., 2008; Golstein and Kroemer, 2007, McCall 2011; Boya and Kroemer, 2008; Golstein and Kroemer, 2007; βλ. Εισαγ. § 1.17**). Η υπερπαραγωγή των ενώσεων ROS αυξάνει σε μεγάλο βαθμό τον κίνδυνο εμφάνισης οξειδωτικού στρες και άρα την οξείδωση πρωτεϊνών, λιπιδίων και DNA με αποτέλεσμα τη μεταβολή ενεργότητας των πρωτεϊνών, την αποσταθεροποίηση των μεμβρανών και τις DNA βλάβες (**Trachootham et al., 2008**). Οι ενώσεις ROS μπορούν να προκαλέσουν και την ενεργοποίηση του μονοπατιού κυτταρικού θανάτου της JNK κινάσης (**Shen and Liu, 2006**) με καταστροφικές συνέπειες για το κύτταρο. Σε περισσότερο ήπιες συνθήκες, οι ενώσεις ROS με την οξείδωση διαφόρων πρωτεϊνικών μορίων είναι δυνατόν να ενεργοποιήσουν τους μηχανισμούς αποικοδόμησης των λυσοσωμάτων και συνεπώς τη δημιουργία αυτοφαγικών κυστιδίων (**Chen et al., 2008; Zhang et al., 2009**), ενώ τέλος αλληλεπιδρούν και με διάφορες πτυχές του μονοπατιού μεταφοράς ιόντων π.χ. ιοντικά κανάλια των μεμβρανών εντείνοντας περαιτέρω το βιολογικό αποτέλεσμα (**Kourie, 1998; Giordano, 2005; Feissner et al., 2009**).

Πειραματικά δεδομένα από μελέτες Η/Μ πεδίων κινητής τηλεφωνίας σε διαφόρους κυτταρικούς τύπους και οργανισμούς αποκαλύπτουν τόσο τις μεταβολές στις ιοντικές **συγκεντρώσεις Ca^{+2}** (βλ. Εισαγ. §1.8.6), την πρόκληση **οξειδωτικού στρες** (βλ. Εισαγ. §1.8.7) όσο και **αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου** λόγω της έκθεσης (βλ. Εισαγ. § 1.8.8).

Πλήθος διαδικασιών κατά την αναπτυξιακή πορεία των ωοθυλακίων εξαρτάται από τις ενδοκυτταρικές ιοντικές συγκεντρώσεις, με την παρουσία συγκεκριμένων ιοντικών ρευμάτων ανάλογα το στάδιο ανάπτυξης (βλ. Εισαγ. § 1.22) και με τα ιόντα Ca^{+2} να εμπλέκονται σε κρίσιμες λειτουργίες. Παράλληλα, το εξεταζόμενο βιολογικό σύστημα χαρακτηρίζεται από μία ευαισθησία απέναντι στο οξειδωτικό στρες (βλ. Εισαγ. § 1.20.5), ενώ μελέτες Η/Μ πεδίων κινητής τηλεφωνίας (**Lee et al., 2008**) και ασυρμάτου τηλεφώνου (**Manta and Margaritis, υπό δημοσίευση**) στις ωοθήκες του εντόμου έχουν αποκαλύψει την επαγωγή του οξειδωτικού στρες λόγω της έκθεσης.

Επιπροσθέτως, τα μόρια «πρωταγωνιστές» του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου των κυττάρων των θηλαστικών, όπως είναι τα μιτοχόνδρια και οι πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2, αποκαλύφθηκε, σε σχετικά πρόσφατη έρευνα, να παίζουν σημαντικό ρόλο και στην περίπτωση κυτταρικού θανάτου της μέσης ωογένεσης του εντόμου (**Tanner et al., 2011**), ενώ καταλυτική φαίνεται να είναι η συμμετοχή της αυτοφαγίας αναρροϊκά της αποδόμησης του DNA και της ενεργοποίησης των κασπασών στα δύο σημεία ελέγχου της ωογένεσης (**Nezis et al., 2009**).

Στα παρόντα πειράματα ανιχνεύθηκαν χαρακτηριστικά αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου (αποδόμηση DNA, συμπύκνωση πυρηνικής χρωματίνης, αποδιοργάνωση κυτταροσκελετού της ακτίνης, ενεργοποίηση κασπασών) στα κύτταρα των ωοθυλακίων σταδίων 1-10. Ωστόσο, δεν μπορεί να αποκλεισθεί τόσο το ενδεχόμενο επαγωγής και της διαδικασίας της αυτοφαγίας ως ενός μηχανισμού προστασίας πρωταρχικά απέναντι στον στρεσογόνο παράγοντα, π.χ. για την απομάκρυνση οξειδωμένων πρωτεϊνών, διαδικασία η οποία όταν επεκτείνεται σε μεγάλο βαθμό μπορεί να οδηγήσει σε απόπτωση λόγω αποικοδόμησης κρίσιμων για την επιβίωση του κυττάρου πρωτεϊνών, όσο και της νέκρωσης σε περιπτώσεις σοβαρών διαταραχών της κυτταρικής λειτουργίας.

Περισσότερο "ήπιες" συνθήκες στρες θα μπορούσαν να θεωρηθούν οι συγκριτικά χαμηλότερες τιμές έντασης της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας της ενότητας 3.2 σε σχέση με την ενότητα 3.1, είτε οι συνθήκες διακοπτόμενης έκθεσης με τα μεγάλα διαστήματα διακοπής (6h) ανάμεσα στις δύο δόσεις ακτινοβολίας, σε αντίθεση με τον μεγαλύτερο αριθμό δόσεων ακτινοβολίας και τα πιο σύντομα διαλείμματα (10 min) μεταξύ τους (ενότητα 3.1).

Αξίζει να σημειωθεί ότι, η διαταραχή της ηλεκτροχημικής ισορροπίας παράλληλα με τη δράση των ενώσεων ROS, μπορεί να έχουν σοβαρές επιπτώσεις σε ποικίλες πτυχές της κυτταρικής λειτουργίας, πλην των άμεσα εμπλεκομένων με τον κυτταρικό θάνατο, όπως σε συνιστώσες του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της διακυτταρικής επικοινωνίας, της κυτταρικής πρόσφυσης και της μεταγωγής σήματος και στους τρεις κυτταρικούς τύπους, όπως θα αναλυθεί στις επόμενες παραγράφους, ικανές να οδηγήσουν είτε στον εκφυλισμό των ωοθυλακίων της πρώιμης και μέσης ωογένεσης, είτε σε διάφορες άλλες αλλοιώσεις στα ωοθυλάκια μεγαλυτέρων σταδίων. Τα κύρια σημεία του παραπάνω προτεινόμενου μοντέλου συνοψίζονται στην **εικόνα 4.1**.

4.3.2 Επίδραση της ακτινοβολίας των κινητών τηλεφώνων στις συνιστώσες του κυτταρικού πολλαπλασιασμού

Ο εκφυλισμός των ωοθυλακίων, που παρατηρήθηκε μέσω του κυτταρικού θανάτου, θα μπορούσε να είναι το αποτέλεσμα του ανεπαρκούς αριθμού των θυλακοκυττάρων και άρα της ελλιπούς κάλυψης του ωοθυλακίου από το επιθήλιό του. Ήδη από τις πρώτες μελέτες είχε διαπιστωθεί ότι η έλλειψη του απαιτούμενου αριθμού θυλακοκυττάρων πέριξ του ωοθυλακίου κατά το σχηματισμό του στο στάδιο του γερμαρίου, θεωρείται αιτία εκφυλισμού του (**Drummond-Barbosa and Spradling, 2001**). Αν υποθέσουμε ότι, τα Η/Μ πεδία των κινητών τηλεφώνων, προκαλούν διαταραχές στις ιοντικές συγκεντρώσεις και άρα επηρεάζουν την ικανότητα των κυττάρων να μεταβαίνουν από τη μία φάση του κυτταρικού κύκλου στην επόμενη, αλλά και ειδικά στη διαδικασία της μίτωσης (**Kunzelmann, 2005**), τότε, μπορεί να θεωρηθεί σοβαρή η πιθανότητα δράσης των πεδίων στην ικανότητα διαίρεσης των θυλακοκυττάρων, όπως αυτή διεξάγεται κατά τα αναπτυξιακά στάδια 1-6 (εικόνα 4.1). Μελέτες έχουν καταγράψει μεταβολές στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό λόγω έκθεσης σε αυτού του τύπου την ακτινοβολία (**Trosic and Pavicic, 2009**; **Capri et al., 2004; Sun et al., 2012**; **Sonmez et al., 2010; Rağbetli et al., 2010).**

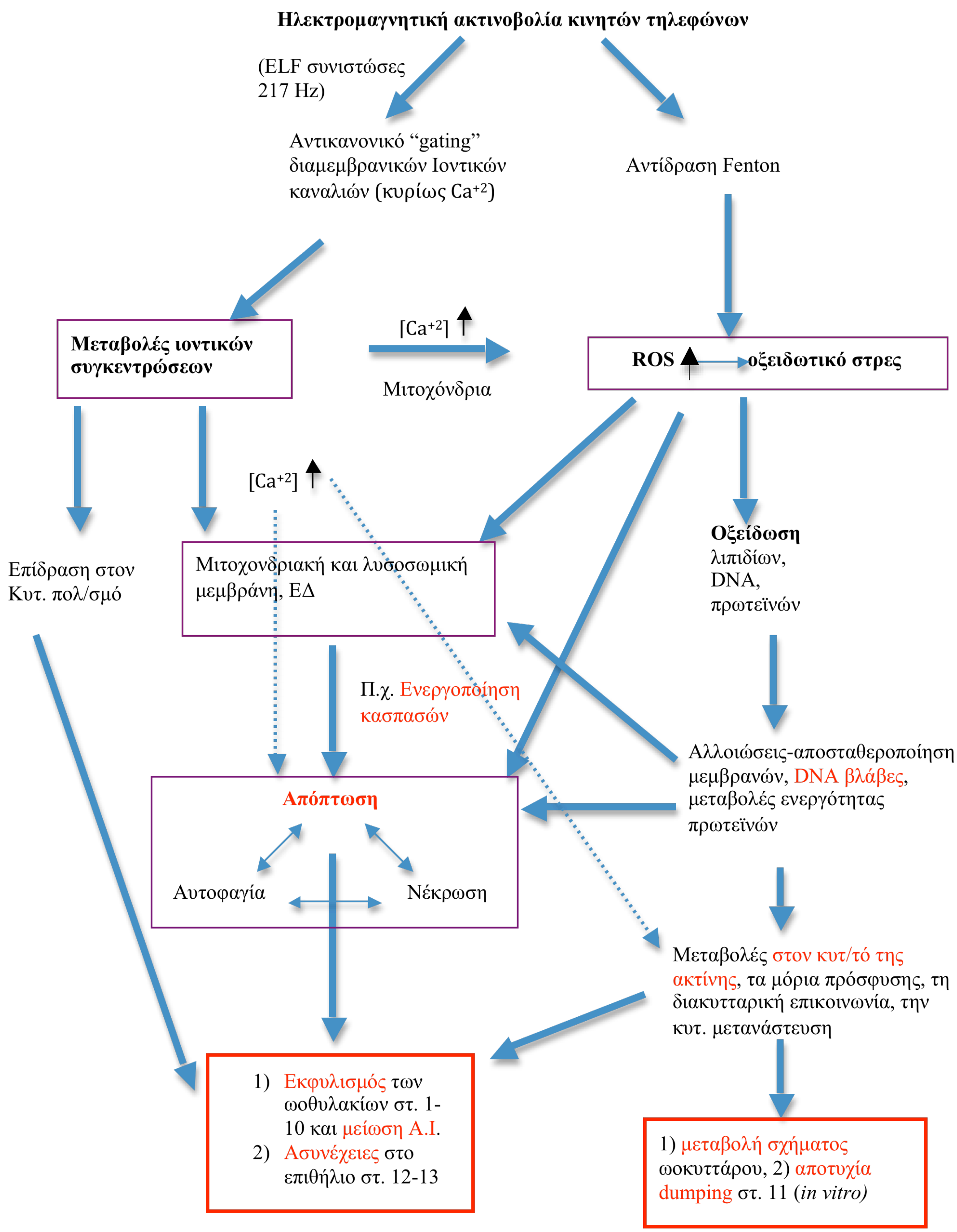
Πλην όμως της ενδεχόμενης δράσης των πεδίων στις μιτωτικές διαιρέσεις, "στόχο" της ακτινοβολίας μπορεί να αποτελεί και η διαδικασία της μετάβασής τους από την κατάσταση μίτωσης σε αυτή της ενδομίτωσης (στάδια 7-9). Στη μετάβαση αυτή, όπως έχει αναφερθεί στην Εισαγωγή (βλ. Εισαγ. § 1.14.3), συμμετέχουν κρίσιμα μονοπάτια όπως της κινάσης JNK, του υποδοχέα Notch (**Jordan et al., 2006**), σημαντικά οργανίδια όπως τα μιτοχόνδρια (**Mitra et al., 2012**), αλλά και ορμόνες όπως η εκδυσόνη (**Sun et al., 2008**), η οποία συμβάλλει στην επιβίωση των θυλακοκυττάρων και αλληλεπιδρά με διαφόρους παράγοντες όπως την κασπάση Dcp-1 (Kim et. al., 2010), την ορμόνη JH και το μονοπάτι **EGFR**-Ras (**Carney and Bender, 2000; Hackney et al., 2007**).

Αρκετοί από τους παραπάνω παράγοντες, όπως έχει διαπιστωθεί και για το παρόν, αλλά και για άλλα βιολογικά συστήματα, επηρεάζονται από τον συγκεκριμένο τύπο ακτινοβολίας (**Lee et. al., 2008; Friedman et al., 2007; Xu et al., 2009; Sun et al., 2012**). Τέλος, και τα τροφοκύτταρα, τα οποία πολλαπλασιάζονται κατά το σχηματισμό του ωοθυλακίου στην περιοχή του γερμαρίου και τα οποία χαρακτηρίζονται από μία παρατεταμένη G2 φάση (**Hsu et al., 2008**), ως έναν τρόπο ελέγχου και διασφάλισης της ακεραιότητας του ωοθυλακίου, ελέγχονται από παράγοντες οι οποίοι μπορεί να επιδεικνύουν ευαισθησία απέναντι στο στρες της έκθεσης. Ενδεικτικά μπορούμε να αναφέρουμε τον μεταγραφικό παράγοντα FOXO (**Hsu et al., 2008**), που τουλάχιστον στην περίπτωση των νευρώνων του εντόμου, το μονοπάτι σηματοδότησης JNK/FOXO ενεργοποιείται ως απόκριση στο οξειδωτικό στρες (**Lee et al., 2009**).

4.3.3 Επίδραση των πεδίων στα στοιχεία του κυτταροσκελετού, τα μόρια κυτταρικής πρόσφυσης και διακυτταρικής επικοινωνίας

Η ενεργότητα των ιοντικών καναλιών και η επαγόμενη ρύθμιση των ιοντικών συγκεντρώσεων, όπως έχει ήδη αναφερθεί, σχετίζεται με τα στοιχεία του κυτταροσκελετού, με τη δράση των μορίων κυτταρικής πρόσφυσης, αλλά και την διακυτταρική επικοινωνία.

Ο κυτταροσκελετός της ακτίνης βρέθηκε αλλοιωμένος σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραματικών ενοτήτων 3.1 (σε σχέση με τον κυτταρικό θάνατο), και 3.4, (σε σχέση με τη διαδικασία αδειάσματος του κυτταροπλάσματος). Τα στοιχεία του κυτταροσκελετού, ακτίνη και μικροσωληνίσκοι, συμμετέχουν σε μία πληθώρα διαδικασιών κατά την ανάπτυξη του ωοθυλακίου, ανάμεσα στις οποίες η μεταφορά μορίων, η αγκίστρωση των μορφογενετικών καθοριστών του ωοκυττάρου, ο καθορισμός πολικότητας, η διακυτταρική επικοινωνία, το κυτταρικό σχήμα, η ακεραιότητα των μεμβρανών, η διαδικασία αδειάσματος του τροφοκυτταρικού υλικού, η κυτταρική πρόσφυση κλπ. (βλ. Εισαγ. § 1.12.1.3, 1.21). Συνεπώς, οποιαδήποτε μεταβολή στις πρωτεϊνες του κυτταροσκελετού, λόγω οξείδωσης είτε αλλαγής στις ιοντικές συγκεντρώσεις, π.χ. ιόντων Ca^{+2} που θα επηρεάσουν τη δομή και λειτουργικότητα των κυτταροσκελετικών στοιχείων και των μορίων που αλληλεπιδρούν με αυτά, μπορεί να επιφέρει ανωμαλίες στο ωοθυλάκιο οδηγώντας το σε εκφυλισμό (εικόνα 4.1).



Εικόνα 4.1. Προτεινόμενο μοντέλο δράσης της Η/Μ ακτινοβολίας των κινητών τηλεφώνων στο εξεταζόμενο βιολογικό σύστημα. Με κόκκινο χρώμα σημειώνονται τα ευρήματα της παρούσας διατριβής.

Τα μόρια κυτταρικής πρόσφυσης, επίσης ευθύνονται για σημαντικές πτυχές της αναπτυξιακής πορείας των ωοθυλακίων, όπως είναι η μετάδοση σημάτων επιβίωσης στα προγονικά κύτταρα και η διατήρηση της αδιαφοροποίητης κατάστασής τους (βλ. Εισαγ. § 1.13), καθώς και η διαμόρφωση και αναδιοργάνωση του επιθηλίου των θυλακοκυττάρων και οι κυτταρικές μεταναστεύσεις (βλ. Εισαγ. § 1.14). Και στην περίπτωση αυτή, οξείδωση των συγκεκριμένων πρωτεϊνικών μορίων ή αλλαγή ενεργότητας λόγω μεταβολών των ενδοκυτταρικών ιοντικών συγκεντρώσεων συνεπάγεται σημαντικές αλλοιώσεις στο αναπτυσσόμενο ωοθυλάκιο (εικόνα 4.1). Επιπλέον, πρόσφατα σχετικά δεδομένα κάνουν λόγο για τη φυσική και λειτουργική σύνδεση και "συνομιλία" ανάμεσα στα μόρια κυτταρικής πρόσφυσης και τα διαμεμβρανικά ιοντικά κανάλια (**Arcangeli and Becchetti, 2010**), τα οποία αποτελούν ενδεχόμενο στόχο της ακτινοβολίας (εικόνα 4.1). Αυξημένα επίπεδα mRNA μορίων πρόσφυσης έχουν καταγραφεί σε νευρικά κύτταρα μυών μετά από έκθεση στην ακτινοβολία κινητού τηλεφώνου (**Yan et al., 2008; 2009).**

Σημαντική τέλος, είναι η επικοινωνία ανάμεσα στους διαφόρους κυτταρικούς τύπους, που επιτυγχάνεται, εκτός των άλλων, μέσω των χασμοδεσμών (**Mahowald, 1972; Giorgi and Postlethwait, 1985**). Η επικοινωνία αυτή ελέγχεται από τα ιόντα Ca (**Bohrmann and Assenbaum, 1993**), αλλά και το δυναμικό των πλασματικών μεμβρανών των συζευγμένων κυττάρων (**Robinson and Messerli, 2003**). Επιπροσθέτως, μεταβολή της επικοινωνίας των κυττάρων μπορεί σε κάθε περίπτωση να επέλθει λόγω απώλειας της ακεραιότητας των μεμβρανών, λόγω οξείδωσης των λιπιδίων τους (**Trachootham et al., 2008**), είτε αλλοιώσεων στα κυτταροσκελετικά στοιχεία (**Sarkar and Lakhotia, 2008**), με σοβαρό ενδεχόμενο και πάλι την εμφάνιση αλλοιώσεων (ενότητες 3.3, 3.4) είτε τον εκφυλισμό του ωοθυλακίου (ενότητες 3.1-2) (εικόνα 4.1).

4.4 Μελλοντικές βιολογικές επιδράσεις

Μία άποψη που θα μπορούσε κανείς να υποστηρίξει είναι ότι σε όσο περισσότερες συχνότητες εκθέτουμε ένα βιολογικό σύστημα τόσο αυξάνονται και οι πιθανότητες να βρεθούν συχνότητες ή και «παράθυρα» συχνοτήτων, στις οποίες τα πεδία να ασκούν ισχυρή βιολογική επίδραση. Το σύστημα της κινητής τηλεφωνίας έχει ήδη εξελιχθεί και χρησιμοποιεί ένα πλήθος συχνοτήτων, καθώς έχει γενικευτεί η χρήση των τηλεφώνων της 3^{ης} και 4^{ης} γενιάς με κωδικοποίηση των πληροφοριών πλέον κατά κώδικα, και όχι κατά συχνότητα ή κατά χρόνο όπως συνέβαινε στα παλαιότερα συστήματα, που σημαίνει χρήση ενός πλήθους διαφορετικών συχνοτήτων από τα συστήματα UMTS (Universal Mobile Telephone System) και Wimax (Worldwide Interoperability for Microwave Access) (**Κανάτας, 2008**). Μέχρι στιγμής, μελέτες σχετικά με τη διερεύνηση επίδρασης των συχνοτήτων του συστήματος UMTS, που σε αρκετές περιπτώσεις είναι συγκριτικές ανάμεσα σε αυτό και το παλαιότερο σύστημα GSM είναι περιορισμένες και αντικρουόμενες χωρίς να έχουν καταδείξει ισχυρότερη επίδραση του UMTS στα εξεταζόμενα βιολογικά συστήματα (**Belyaev et al., 2007; 2009; Riddervold et al., 2008; Schwartz et al., 2008; Unterlechner et al., 2008; Söderqvist et al., 2009**). Για το λόγο αυτό απαιτούνται περισσότερα στοιχεία για την επιβεβαίωση της παραπάνω υπόθεσης.

Εφόσον κύριος αποδέκτης της ακτινοβολίας των κινητών τηλεφώνων είναι ο εγκέφαλος είναι λογικό να υποθέσουμε ότι τις επόμενες δεκαετίες η αυξημένη χρήση των κινητών τηλεφώνων αναπόφευκτα θα οδηγήσει σε αυξημένα κρούσματα ασθενειών, που οφείλονται σε δυσλειτουργία των νευρικών κυττάρων, όπως για παράδειγμα των νευροεκφυλιστικών (**Hardell and Sage, 2008; Phillips et al., 2009**). Στο συμπέρασμα αυτό μπορούμε να καταλήξουμε αν λάβουμε υπ'όψιν ότι η εμφάνιση των περισσοτέρων νευροεκφυλιστικών νόσων συνδέεται με το οξειδωτικό στρες, καθώς και τον επαγόμενο κυτταρικό θάνατο**.** Το οξειδωτικό στρες, ο διαταραγμένος μεταβολισμός της γλυκόζης, και η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων αποτελούν κύρια χαρακτηριστικά και γενεσιουργά σε ορισμένες περιπτώσεις αίτια της ασθένειας (**Gibson and Shi, 2010**). Ταυτόχρονα, τα επίπεδα της μελατονίνης, της ορμόνης με αντιοξειδωτική και προστατευτική δράση λόγω των αντι-αποπτωτικών της ιδιοτήτων διαπιστώνονται σημαντικά μειωμένα **(Wang, 2009).** Τέλος, η μεταβολή της ομοιόστασης των ιόντων Ca που παρατηρείται φυσιολογικά κατά τη γήρανση ενισχυμένη από επιπρόσθετους παράγοντες στρες μπορεί να αποτελέσει αιτία πρόκλησης, αλλά και προώθησης για την εξέλιξη της νόσου (**Mattson et al., 2001; Wojda et al., 2008**), καθώς συμμετέχει στην παραγωγή των Aβ αμυλοειδών, στη φωσφορυλίωση της πρωτεϊνης tau (**Pierrot et al., 2004; 2006**) αλλά και στη μεταβολή της μιτοχονδριακής λειτουργίας και την παραγωγή ενώσεων ROS (**Wojda et al., 2008; Adam-Vizi and Starkov 2010**).

Ανάμεσα στις καταγεγραμμένες έως τώρα βιολογικές επιδράσεις σε **νευρικά κύτταρα**, λόγω της έκθεσης στην ακτινοβολία των κινητών τηλεφώνων, συναντάμε: τις μεταλλαγές στο μιτοχονδριακό DNA (**Xu et al., 2009**), την ενίχυση της γονιδιακής έκφρασης διαφόρων προ-αποπτωτικών παραγόντων, όπως κασπασών (**Zhao et al., 2007**), αλλά και τη μεταβολή των επιπέδων έκφρασης πλήθους πρωτεϊνών που εμπλέκονται στο οξειδωτικό στρες και την απόπτωση (**Fragopoulou et al., 2012**), την αλλαγή στο μεταβολισμό της γλυκόζης (**Kwon et al., 2011**), τη μείωση των επιπέδων της μελατονίνης (**Burch et al., 2002; Hardell and Sage, 2008**), την επαγωγή του οξειδωτικού στρες (**Köylü et al., 2006; Ilhan et al., 2004; Sokolovic et al., 2008**) και την αύξηση στην κυτταροπλασματική συγκέντρωση των ιόντων Ca (**Rao et al., 2008**).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abdel-Rassoul G., El-Fateh O.A., Salem M.A., Michael A., Farahat F., El-Batanouny M., Salem E. 2007. Neurobehavioral effects among inhabitants around mobile phone base stations. Neurotoxicology, 28: 434-40.
2. Adam-Vizi V. and Starkov A.A. 2010. Calcium and mitochondrial reactive oxygen species generation: how to read the facts Journal of Alzheimer's Disease, 20: S413–S426.
3. Agarwal A., Desai N.R., Ruffoli R., Carpi A. 2008a. Lifestyle and testicular dysfunction: a brief update, Biomed Pharmacother, 62(8): 550-3. Review.
4. Agarwal A, Deepinder F, Sharma RK, Ranga G, Li J. 2008b. Effect of cell phone usage on semen analysis in men attending infertility clinic: an observational study. Fertil Steril. 89(1): 124-8.
5. Agarwal A., Desai N.R., Makker K., Varghese A., Mouradi R., Sabanegh E., Sharma R. 2009. Effects of radiofrequency electromagnetic waves (RF-EMW) from cellular phones on human ejaculated semen: an in vitro pilot study. Fertil Steril., 92: 1318-25.
6. Aitken R.J., Bennetts L.E., Sawyer D., Wiklendt A.M., King B.V. 2005. Impact of radio frequency electromagnetic radiation on DNA integrity in the male germline. Int J Androl., 28: 171-9.
7. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. 1994. Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing, Inc., NY, USA.
8. Ammari M., Lecomte A., Sakly M., Abdelmelek H., de-Seze R. 2008a. Exposure to GSM 900 MHz electromagnetic fields affects cerebral cytochrome c oxidase activity. Toxicology, 250: 70-4.
9. Ammari M., Brillaud E., Gamez C., Lecomte A., Sakly M., Abdelmelek H., de Seze R. 2008b. Effect of a chronic GSM 900 MHz exposure on glia in the rat brain. Biomed Pharmacother. 62(4): 273-81.
10. Ammari M., Gamez C., Lecomte A., Sakly M., Abdelmelek H., De Seze R. 2010. GFAP expression in the rat brain following sub-chronic exposure to a 900 MHz electromagnetic field signal. Int J Radiat Biol. 86(5): 367-75.
11. Andrenacci D., Cavaliere V., Cernilogar F.M., Gargiulo G. 2000. Spatial activation and repression of the *Drosophila* vitelline membrane gene *VM32E* are switched by a complex *cis*-regulatory system. Dev Dyn., 218: 499–506.
12. Andreyev A.I,, Kushnareva Y.E., StarkovA.A. 2005. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. Biochemistry-Moscow 70: 200-214.
13. Arcangeli A. and Becchetti A. 2010. Integrin structure and functional relation with ion channels. Adv Exp Med Biol., 674: 1-7.
14. Arama E., Agapite J., Steller H. 2003. Caspase activity and a specific cytochrome c are required for sperm differentiation in Drosophila. Dev Cell, 4: 687-697.
15. Arbouzova N.I., Zeidler M.P. 2006. JAK/STAT signalling in Drosophila: insights into conserved regulatory and cellular functions. Development, 133(14): 2605–16.
16. Arico S., Petiot A., Bauvy C., Dubbelhuis P.F., Meijer A.J., Codogno P., Ogier-Denis E. 2001. The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. J Biol Chem, 276: 35243–35246.
17. Armstrong J.S. 2006. Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death. Bioessays, 28: 253-60.
18. Arnetz B.B., Wiholm C., Kuster N., Hillert L., Moffat S.D. 2009. Exploring exposure to mobile-phone electromagnetic fields and psychophysiological and self-rated symptoms. Psychosom Med., 71: 115-6
19. Ashburner M. and Wright T.R.F. (Eds). 1980. The Genetics and Biology of Drosophila. Academic Press, New York.
20. Assa-Kunik E., Torres I.L., Schejter E.D., Johnston D.S., Shilo B.Z. 2007. Drosophila follicle cells are patterned by multiple levels of Notch signaling and antagonism between the Notch and JAK/STAT pathways. Development, 134(6): 1161–9.
21. Atfi A., Buisine M., Mazars A., Gespach C. 1997. Induction of apoptosis by DPC4, a transcriptional factor regulated by transforming growth factor-beta through stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) signaling pathway. J Biol Chem., 272(40): 24731-4
22. Autret A. and Martin S. J. 2010. Bcl-2 family proteins and mitochondrial fission/fusion dynamics. Cell. Mol. Life Sci., 67: 1599-1606.

23. Auvinen A., Hietanen M., Luukonen R., Koskela R.S. 2002. Brain tumors and salivary gland cancers among cellular telephone users. Epidemiology, 13: 356-359.
24. Avery S.V. 2011. Molecular targets of oxidative stress. Biochem J., 434(2): 201-10.
25. Awasthi Y.C., Sharma R., Cheng J.Z., Yang Y., Sharma A., Singhal S.S., Awasthi S. 2003. Role of 4-hydroxynonenal in stress-mediated apoptosis signaling. Mol Aspects Med, 24: 219–230
26. Babu K., Cai Y., Bahri S., Yang X., Chia W. 2004. Roles of Bifocal, Homer, and F-actin in anchoring Oskar to the posterior cortex of Drosophila oocytes. Genes Dev., 18(2): 138--143.
27. Baehrecke E.H. 2003. Autophagic programmed cell death in Drosophila. Cell Death Differ, 10: 940–945.
28. Baehrecke E.H. 2005. Autophagy: dual roles in life and death? Nat Rev Mol Cell Biol., 6(6): 505-10. Review.
29. Bai J., Uehara Y., Montell D.J. 2000. Regulation of invasive cell behavior by Taiman, a Drosophila protein related to AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast cancer. Cell 103: 1047–1058.
30. Bakhrat A., Pritchett T., Peretz G., McCall K., Abdu U. 2010. Drosophila Chk2 and p53 proteins induce stage-specific cell death independently during oogenesis. Apoptosis, 15(12): 1425-34
31. Baksa K., Parke T., Dobens L.L., Dearolf C.R. 2002. The Drosophila STAT protein, stat92E, regulates follicle cell differentiation during oogenesis. Dev Biol, 243(1): 166–75.
32. Balci M., Devrim E., Durak I. 2007. Effects of mobile phones on oxidant/antioxidant balance in cornea and lens of rats, Curr Eye Res., 32: 21-5.
33. Bangs P. and White K. 2000. Regulation and execution of apoptosis during Drosophila development. Dev Dyn, 218:68-79.
34. Bao X., Zhang W., Krencik R., Deng H., Wang Y., Girton J., Johansen J., Johansen K.M. 2005. The JIL-1 kinase interacts with lamin Dm0 and regulates nuclear lamina morphology of Drosophila nurse cells. J Cell Sci, 118: 5079–87.
35. Barker A.T., Jaffe L.F., Vanable J.W. 1982. The glabrous epidermis of cavies contains a powerful battery. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 242: R358–R366
36. Barteri M., Pala A., Rotella S. 2005. Structural and kinetic effects of mobile phone microwaves on acetylcholinesterase activity. Biophys Chem., 113: 245-253
37. Bass B.P., Cullen K., McCall K. 2007. The axon guidance gene lola is required for programmed cell death in the Drosophila ovary. Dev Biol, 304: 771–85.
38. Bass B.P., Tanner E.A., Mateos San Martin D., Blute T., Kinser R.D., Dolph P.J., McCall K. 2009. Cell autonomous requirement for DNaseII in non-apoptotic cell death. Cell Death Differ, 16(10): 1362-71
39. Baste V., Riise T., Moen B.E. 2008. Radiofrequency electromagnetic fields; male infertility and sex ratio of offspring. Eur J Epidemiol., 23(5): 369-77.
40. Basu A., DuBois G., Haldar S. 2006. Posttranslational modifications of Bcl2 family members: a potential therapeutic target for human malignancy. Frontiers Biosci, 11: 1508–1521
41. Bate M. and Martinez-Arias A. 1993. The mesoderm and its derivatives. In The development of Drosophila melanogaster. pp. 1013-1090. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
42. Baum J.S., Arama E., Steller H., McCall K. 2007. The Drosophila caspases Strica and Dronc function redundantly in programmed cell death during oogenesis. Cell Death Differ, 14: 1508–1517.
43. Bawin S.M., Kaczmarek L.K. Adey, W.R. 1975. Effects of modulated VMF fields, on the central nervous system, Ann.N.Y. Acad.Sci., 247: 74-81.
44. Bawin S.M. and Adey W.R. 1976. Sensitivity of calcium binding in cerebral tissue to weak environmental electric fields oscillating at low frequency, Proc. Natl.Acad.Sci., U.S.A., 73: 1999-2003.
45. Bawin S.M., Adey W.R., Sabbot I.M. 1978. Ionic factors in release of 45Ca 2+ from chick cerebral tissue by electromagnetic fields. Proc.Natl.Acad.Sci., U.S.A., 75: 6314-6318.
46. Bayir H., Fadeel B., Palladino M.J., Witasp E., Kurnikov I.V., Tyurina Y.Y., Tyurin V.A., Amoscato A.A., Jiang J., Kochanek P.M., DeKosky S.T., Greenberger J.S., Shvedova A.A., Kagan V.E. 2006. Apoptotic interactions of cytochrome c: redox flirting with anionic phospholipids within and outside of mitochondria. Biochim Biophys Acta, 1757: 648–659
47. Beccari S., Teixeira L., Rorth P. 2002. The JAK/STAT pathway is required for border cell migration during Drosophila oogenesis. Mech Dev, 111(12): 115–23.
48. Behari J., Paulraj R. 2007. Biomarkers of induced electromagnetic field and cancer. Indian J Exp Biol, 45: 77-85.
49. Βελέντζας Α. Δ. 2006. Διερεύνηση μηχανισμών προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου κατά την ωογένεση στα έντομα. Διδακτορική Διατριβή. Πανεπιστήμιο Αθηνών.
50. Belyaev I.Y., Hillert L., Protopopova M., Tamm C., Malmgren L.O., Persson B.R., Selivanova G., Harms-

Ringdahl M. 2005. 915 MHz microwaves and 50 Hz magnetic field affect chromatin conformation and 53BP1 foci in human lymphocytes from hypersensitive and healthy persons, Bioelectromagnetics, 26: 173-84.
51. Belyaev I.Y., Koch C.B., Terenius O., Roxstrom-Lindquist K., Malmgren L.O., H. Sommer W., Salford L.G., Persson B.R. 2006. Exposure of rat brain to 915 MHz GSM microwaves induces changes in gene expression but not double stranded DNA breaks or effects on chromatin conformation. Bioelectromagnetics, 27: 295-306.
52. Belyaev I.Y., Grigoriev Y.G. 2007. Problems in assessment of risks from exposures to microwaves of mobile communication. Radiats Biol Radioecol., 47: 727-32.
53. Belyaev I.Y., Markovà E., Hillert L., Malmgren L.O., Persson B.R. 2009. Microwaves from UMTS/GSM mobile phones induce long-lasting inhibition of 53BP1/gamma-H2AX DNA repair foci in human lymphocytes. Bioelectromagnetics, 30: 129-41.
54. Berg C.A. 2005. The Drosophila shell game: patterning genes and morphological change. Trends Genet., 21(6): 346-55. Review.
55. Bernardi P., Azzone G.F. 1981. Cytochrome c as an electron shuttle between the outer and inner mitochondrial membranes. J Biol Chem, 256: 7187–7192
56. Bernardi P., Krauskopf A., Basso E., Petronilli V., Blachly-Dyson E., Di Lisa F., Forte M.A. 2006. The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target. FEBS J., 273: 2077–2099
57. Bernardi F., Duchi S., Cavaliere V., Donati A., Andrenacci D., Gargiulo G. 2007. Egfr signaling modulates *VM32E* gene expression during *Drosophila* oogenesis. Dev Genes Evol., 217: 529–540.
58. Berridge M.J., Bootman M.D., Lipp P. 1998. Calcium—a life and death signal. Nature, 395: 645–648
59. Berridge M.J., Lipp P., Bootman M.D. 2000. The versatility and universality of calcium signalling. Nat Rev Mol Cell Biol., 1: 11–21.
60. Berridge M.J. 2006. Calcium microdomains: organization and function. Cell Calcium, 40(5-6): 405-12
61. Berry D.L. and Baehrecke E.H. 2007. Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in Drosophila. Cell, 131: 1137–48.
62. Besse F., Busson D., Pret A.M. 2002. Fused-dependent Hedgehog signal transduction is required for somatic cell differentiation during Drosophila egg chamber formation. Development, 129(17): 4111–24.
63. Besse F. and Pret A.M. 2003. Apoptosis-mediated cell death within the ovarian polar cell lineage of Drosophila melanogaster. Development, 130(5): 1017-27.
64. Betin V.M. and Lane J.D. 2009. Atg4D at the interface between autophagy and apoptosis. Autophagy, 5(7): 1057-9
65. Bezprozvanny I., Watras J., Ehrlich B.E. 1991. Bell-shaped calciumresponse curves of Ins(1,4,5)P3- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. Nature, 351: 751–754
66. Bhat N.R., Feinstein D.L., Shen Q., Bhat A.N. 2002. p38 MAPK-mediated transcriptional activation of inducible nitric-oxide synthase in glial cells. Roles of nuclear factors, nuclear factor kappa B, cAMP response element-binding protein, CCAAT/enhancer-binding protein-beta, and activating transcription factor-2. The Journal of biological chemistry, 277: 29584–29592.
67. Bhalla N. and Dernburg A.F. 2005. A conserved checkpoint monitors meiotic chromosome synapsis in Caenorhabditis elegans. Science, 310: 1683–6.
68. Blackman C.F., Benane S.G., Elder J.A., House D.E., Lampe J.A., Faulk J.M. 1980. Induction of calcium - ion efflux from brain tissue by radiofrequency radiation: Effect of sample number and modulation frequency on the power - density window. Bioelectromagnetics, (N.Y.), 1: 35 - 43.
69. Blackman C.F., Kinney L.S., House D.E., Joines W.T. 1989. Multiple power-density windows and their possible origin. Bioelectromagnetics, 10(2): 115-128.
70. Blair SS. 1995. Compartments and appendage development in Drosophila. Bioessays, 17(4): 299-309.
71. Blank M., Goodman R. 2008. A mechanism for stimulation of biosynthesis by electromagnetic fields: charge transfer in DNA and base pair separation.J Cell Physiol., 214: 20-6.
72. Bloch Qazi M.C., Heifetz Y., Wolfner M.F. 2003. The developments between gametogenesis and fertilization: ovulation and female sperm storage in Drosophila melanogaster. Dev Biol., 256(2): 195-211. Review.
73. Block M.L. and Moody W.J. 1990. A voltage-dependent chloride current linked to the cell cycle in ascidian embryos. Science, 247: 1090–1092
74. Blomgran R., Zheng L., Stendahl O. 2007. Cathepsin-cleaved Bid promotes apoptosis in human neutrophils via oxidative stress-induced lysosomal membrane permeabilization. J Leukoc Biol., 81: 1213-23.
75. Blommaart E.F., Luiken J.J., Meijer A.J. 1997. Autophagic proteolysis: control and specificity. Histochem J., 29(5): 365-85. Review.
76. Boehning D. and Joseph S.K. 2000. Functional properties of recombinant ype I and type III inositol 1,4,5-

trisphosphate receptor isoforms expressed in COS-7 cells. J Biol Chem, 275: 21492–21499
77. Boehning D., Patterson R.L., Sedaghat L., Glebova N.O., Kurosaki T., Snyder S.H. 2003. Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. Nat Cell Biol, 5: 1051–1061
78. Boehning D., Patterson R.L., Snyder S.H. 2004. Apoptosis and calcium: new roles for cytochrome c and inositol 1,4,5-trisphosphate. Cell Cycle 3: 252–254
79. Bohrmann J. 1981. Enrwicklung der Follikel der Drosophila-Mutante dicephalic in vitro. Staatsexamensarbeit, Universitat Freiburg.
80. Bohrmann J., Huebner E., Sander K., Gutzeit H. 1986a. Intracellular electrical potential measurements in Drosophila follicles. J Cell Sci., 81: 207-21.
81. Bohrmann J., Dorn A., Sander K., Gutzeit H. 1986b. The extracellular electrical current pattern and its variability in vitellogenic Drosophila follicles. J Cell Sci., 81: 189-206.
82. Bohrmann J. 1991. Potassium uptake into Drosophila ovarian follicles: relevance to physiological and developmental processes. J. Insect Physiol., 37: 937-946.
83. Bohrmann J. and Biber K. 1994. Cytoskeleton-dependent transport of cytoplasmic particles in previtellogenic to midvitellogenic ovarian follicles of Drosophila: Timelapse analysis using video-enhanced contrastmicroscopy. J Cell Sci, 107: 849-858.
84. Bohrmann J. and Assenbaum A. 1993. Gap junctions in ovarian follicles of Drosophila melanogaster: inhibition and promotion of dye-coupling between oocyte and follicle cells. Cell Tissue Res, 273: 163-173.
85. Bohrmann J., Heinrich U.R. 1994. Localisation of potassium pumps in Drosophila ovarian follicles. Zygote, 2(3): 189-99.
86. Bohrmann J. and Braun B. 1999. Na,K-ATPase and V-ATPase in ovarian follicles of Drosophila melanogaster. Biol Cell., 91(2): 85-98.
87. Bohrmann J. and Zimmermann J. 2008. Gap junctions in the ovary of Drosophila melanogaster: localization of innexins 1, 2, 3 and 4 and evidence for intercellular communication via innexin-2 containing channels. BMC Dev Biol. 8: 111.
88. Boisclair Lachance J.F., Fregoso Lomas M., Eleiche A., Bouchard Kerr P., Nilson L.A. 2009. Graded Egfr activity patterns the Drosophila eggshell independently of autocrine feedback. Development. 136(17): 2893-902
89. Boldin M.P., Goncharov T.M., Goltsev Y.V., Wallach D. 1996. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD interacting protease, in Fas/APO-1-and TNF receptor-induced cell death. Cell, 85: 803-815.
90. Bortner C.D. and Cidlowski J.A. 2004. The role of apoptotic volume decrease and ionic homeostasis in the activation and repression of apoptosis. Pflugers Arch, 448: 313–318
91. Bortner C.D., Hughes F.M. Jr., Cidlowski, J.A. 1997. A primary role for K+ and Na+ efflux in the activation of apoptosis. J Biol Chem, 272: 32436–32442
92. Bossy-Wetzel E., Newmeyer D.D., Green D.R. 1998. Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. EMBO J 17: 37-49.
93. Boudreau N., Sympson C.J., Werb Z., Bissell M.J. 1995. Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. Science, 267(5199): 891-3.
94. Bouji M., Lecomte A., Hode Y., de Seze R., Villégier A.S. 2012. Effects of 900 MHz radiofrequency on corticosterone, emotional memory and neuroinflammation in middle-aged rats. Exp Gerontol. 47(6): 444-51.
95. Bownes M. 1994. The regulation of the yolk protein genes, a family of sex differentiation genes in Drosophila melanogaster. Bioessays., 16(10): 745-52. Review.
96. Bownes M. and Blair M. 1986. The effects of a sugar diet and hormones on the expression of the *Drosophila* yolk protein genes. J. Insect Physiol., 32: 493-501.
97. Boya P., Gonzalez-Polo R.A., Casares N., Perfettini J.L., Dessen P., Larochette N., Metivier D., Meley D., Souquere S., Yoshimori T., Pierron G., Codogno P., Kroemer G. 2005. Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. Mol Cell Biol, 25: 1025–1040
98. Boya P. and Kroemer G. 2008. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. Oncogene, 27(50): 6434-51. Review.
99. Brady N.R., Hamacher-Brady A., Yuan H., Gottlieb R.A. 2007. The autophagic response to nutrient deprivation in the hl-1 cardiac myocyte is modulated by Bcl-2 and sarco/endoplasmic reticulum calcium stores. FEBS J., 274(12): 3184-97.

100. Breckenridge D.G., Germain M., Mathai J.P., Nguyen M., Shore G.C. 2003. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. Oncogene, 22(53): 8608-18. Review.
101. Bredesen D.E. 1995. Neural apoptosis. Ann Neurol, 38:839-51.
102. Breitschopf K., Haendeler J., Malchow P., Zeiher A.M., Dimmeler S. 2000. Posttranslational modification of Bcl-2 facilitates its proteasome- dependent degradation: molecular characterization of the involved signaling pathway. Mol Cell Biol, 20: 1886–1896
103. Brennan M.D., Weiner A.J., Goralski T.J., Mahowald A.P. 1982. The follicle cells are a major site of vitellogenin synthesis in Drosophila melanogaster. Dev Biol., 89(1): 225-36
104. Brini M., Bano D., Manni S., Rizzuto R., Carafoli E. 2000. Effects of PMCA and SERCA pump overexpression on the kinetics of cell Ca(2+) signalling. EMBO J., 19: 4926–4935
105. Brookes P.S., Yoon Y.S., Robotham J.L., Anders M.W., Sheu S.S. 2004. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. Am J Physiol Cell Physiol, 287: C817-C833.
106. Brown, M.J., and Loew, L.M. 1996. Graded fibronectin receptor aggregation in migrating cells. Cell Motil. Cytoskeleton, 34: 185–193.
107. Bryan J., Edwards R., Matsudaira P., Otto J., Wulfkuhle J. 1993. Fascin, an echinoid actinbundling protein, is a homolog of the Drosophila singed gene product. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 9115–19
108. Budd S.L., Nicholls D.G. 1996. A reevaluation of the role of mitochondria in neuronal Ca2+ homeostasis. J Neurochem, 66: 403–411.
109. Burch J.B., Reif J.S., Noonan C.W., Ichinose T., Bachand A.M., Koleber T.L., Yost M.G. 2002. Melatonin metabolite excretion among cellular telephone users. Int J Radiat Biol, 78: 1029-36.
110. Burney S., Niles J.C., Dedon P.C., Tannenbaum S.R. 1999. DNA damage in deoxynucleosides and oligonucleotides treated with peroxynitrite. Chem Res Toxicol, 12: 513–520.
111. Buszczak M., Freeman M.R., Carlson J.R., Bender M., Cooley L., Segraves W.A. 1999. Ecdysone response genes govern egg chamber development during mid-oogenesis in Drosophila. Development, 126(20): 4581-9.
112. Buszczak M. and Cooley L. 2000. Eggs to die for: cell death during Drosophila oogenesis. Cell Death Differ, 7: 1071-1074.
113. Butterfield D.A., Gnjec A., Poon H.F., Castegna A., Pierce W.M., Klein, J.B. and Martins, R.N. 2006. Redox proteomics identification of oxidatively modified brain proteins in inherited Alzheimer's disease: an initial assessment. J. Alzheim. Dis., 10: 391–397.
114. Byus C.V., Lundak R.L., Fletcher R.M., Adey W.R. 1984. Alterations in protein kinase activity following exposure of cultured human lymphocytes to modulated microwave fields. Bioelectromagnetics, 5(3): 341-51.
115. Byus C.V., Kartun K., Pieper S., Adey W.R. 1988. Increased ornithine decarboxylase activity in cultured cells exposed to low energy modulated microwave fields and phorbol ester tumor promoters. Cancer Res., 48(15): 4222-6.
116. Cahuana G.M., Tejedo J.R., Jimenez J., Ramirez R., Sobrino F., Bedoya F.J. 2004. Nitric oxide-induced carbonylation of Bcl-2, GAPDH and ANT precedes apoptotic events in insulin-secreting RINm5F cells. Exp Cell Res, 293: 22–30
117. Cain K., Bratton S.B., Cohen G.M. 2002. The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. Biochimie, 84: 203–214
118. Cakouros D., Daish T.J., Kumar S. 2004. Ecdysone receptor directly binds the promoter of the Drosophila caspase dronc, regulating its expression in specific tissues. J Cell Biol 165 (5): 631-640.
119. Calvi B.R., Lilly M.A., Spradling A.C. 1998. Cell cycle control of chorion gene amplification. Genes Dev., 12(5): 734-44.
120. Çam S.T. and Seyhan N. 2012. Single-strand DNA breaks in human hair root cells exposed to mobile phone radiation. Int J Radiat Biol., 88(5): 420-4.
121. Camacho, J., Sanchez, A., StuÅN hmer W., Pardo L.A. 2000. Cytoskeletal interactions determine the electrophysiological properties of human EAG potassium channels. Pflugers Arch., 441: 167–174
122. Camello P., Gardner J., Petersen O.H., Tepikin A.V. 1996. Calcium dependence of calcium extrusion and calcium uptake in mouse pancreatic acinar cells. J Physiol, 490 (Pt 3): 585–593.
123. Campos-Ortega, J.A. and Hartenstein, V. 1997. The embryonic development of *Drosophila melanogaster*. Berlin/Heidelberg/New-York/Tokyo.: Springer-Verlag.
124. Cantley L.C. 2002. The phosphoinositide 3-kinase pathway. Science 296: 1655–1657
125. Capri M., Scarcella E., Bianchi E., Fumelli C., Mesirca P., Agostini C., Remondini D., Schuderer J., Kuster N., Franceschi C., Bersani F. 2004a. 1800 MHz radiofrequency (mobile phones, different Global System for Mobile communication modulations) does not affect apoptosis and heat shock protein 70 level in peripheral blood mononuclear cells from young and old donors. Int J Radiat Biol., 80: 389-97.
126. Capri M., Scarcella E., Fumelli C., Bianchi E., Salvioli S., Mesirca P., Agostini C., Antolini A., Schiavoni

A., Castellani G., Bersani F., Franceschi C. 2004b. In vitro exposure of human lymphocytes to 900 MHz CW and GSM modulated radiofrequency: studies of proliferation, apoptosis and mitochondrial membrane potential, Radiat Res., 162: 211-8.
127. Carafoli E. and Molinari M. 1998. Calpain: a protease in search of a function? Biochem Biophys Res Commun, 247: 193–203
128. Carafoli E. 2010. The fateful encounter of mitochondria with calcium: how did it happen? Biochim Biophys Acta., 1797(6-7): 595-606
129. Caraglia M., Marra M., Mancinelli F., D'Ambrosio G., Massa R., Giordano A., Budillon A., Abbruzzese A., Bismuto E. 2005. Electromagnetic fields at mobile phone frequency induce apoptosis and inactivation of the multi-chaperone complex in human epidermoid cancer cells. J Cell Physiol., 204(2): 539-48.
130. Cardone M., Roy N., Stennicke H., Salvesen G.A., Franke T., Stanbridge E., Frisch S.M., Reed J. 1998. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. Science, 282: 1318–1321
131. Carney G.E. and Bender M. 2000. The Drosophila ecdysone receptor (EcR) gene is required maternally for normal oogenesis. Genetics, 154: 1203–1211.
132. Castilho R.F., Kowaltowski A.J., Meinicke A.R., Bechara EJ.H., Vercesi A.E. 1995. Permeabilization of the inner mitochondrial-membrane by Ca2+ ions is stimulated by Tbutyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species generated by mitochondria. Free Radic Biol Med, 18: 479-486.
133. Catz S.D. and Johnson J.L. 2001. Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor kappa B and its significance in prostate cancer. Oncogene, 20: 7342–7351
134. Cavaliere V., Spano` S., Andrenacci D., Cortesi L., Gargiulo G. 1997. Regulatory elements in the promoter of the vitelline membrane gene *VM32E* of *Drosophila melanogaster* direct gene expression in distinct domains of the follicular epithelium. Mol Gen Genet., 254: 231–237.
135. Cavaliere V., Taddei C., Gargiulo G. 1998. Apoptosis of nurse cells at the late stages of oogenesis of Drosophila melanogaster, Dev Genes Evol, 208: 106–112.
136. Cavaliere V., Donati A., Hsouna A., Hsu T., Gargiulo G. 2005. dAkt kinase controls follicle cell size during Drosophila oogenesis. Dev Dyn, 232(3): 845–54.
137. Cavaliere V., Bernardi F., Romani P., Duchi S., Gargiulo G. 2008. Building up the Drosophila eggshell: first of all the eggshell genes must be transcribed. Dev Dyn., 237(8): 2061-72.
138. Cerbone A., Toaldo C., Laurora S., Briatore F., Pizzimenti S., Dianzani M. U., Ferretti C., Barrera G. 2007. 4-Hydroxynonenal and PPARγ ligands affect proliferation, differentiation, and apoptosis in colon cancer cells. Free Radical Biol. Med., 42: 1661–1670
139. Chan S.L. and Mattson M.P. 1999. Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and cell death. J Neurosci Res, 58: 167–190
140. Chan D.C. 2006. Mitochondrial fusion and fission in mammals. Annu Rev Cell Dev Biol., 22: 79-99. Review.
141. Chan H. L., Chou H. C., Duran M., Gruenewald J., Waterfield M. D., Ridley A., Timms J. F. 2010. Major role of epidermal growth factor receptor and Src kinases in promoting oxidative stress-dependent loss of adhesion and apoptosis in epithelial cells. J. Biol. Chem., 285: 4307–4318
142. Chao S.H. and Nagoshi R.N. 1999. Induction of apoptosis in the germline and follicle layer of Drosophila egg chambers. Mech. Dev., 88: 159-172.
143. Chávez V.M., Marqués G., Delbecque J.P., Kobayashi K., Hollingsworth M., Burr J., Natzle J.E., O'Connor M.B. 2000. The Drosophila disembodied gene controls late embryonic morphogenesis and codes for a cytochrome P450 enzyme that regulates embryonic ecdysone levels. Development, 127(19): 4115-26.
144. Chen P.S., Stumm-Zollinger E., Aigaki T., Balmer J., Bienz M., Bohlen P. 1988. A male accessory gland peptide that regulates reproductive behavior of female Drosophila melanogaster. Cell, 54: 291-298.
145. Chen C., Jack J., Garofalo R.S. 1996. The Drosophila insulin receptor is required for normal growth. Endocrinology, 137(3): 846-56.
146. Chen Y. and Schüpbach T. 1996. The role of brinker in eggshell patterning. Mech Dev., 123(5): 395-406.
147. Chen R.H., Chang T.Y. 1997. Involvement of caspase family proteases in transforming growth factor-beta-induced apoptosis. Cell Growth Differ., 8(7): 821-7.
148. Chen P., Rodriguez A., Erskine R., Thach T., Abrams J.M. 1998. Dredd, a novel effector of the apoptosis activators reaper, grim, and hid in Drosophila. Dev. Biol., 201: 202-216.
149. Chen M., He H., Zhan S., Krajewski S., Reed J.C., Gottlieb R.A. 2001. Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion. J. Biol. Chem., 276: 30724–30728
150. Chen H., Chomyn A., Chan D. C. 2005. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. J. Biol. Chem., 280: 26185–26192.

151. Chen C. H., Cheng T. H., Lin H., Shih N. L., Chen Y. L., Chen Y. S., Cheng C. F., Lian W. S., Meng T. C., Chiu W. T., Chen J. J. 2006. Reactive oxygen species generation is involved in epidermal growth factor receptor transactivation through the transient oxidization of Src homology 2-containing tyrosine phosphatase in endothelin-1 signaling pathway in rat cardiac fibroblasts. Mol. Pharmacol., 69: 1347–1355
152. Chen Y. and Gibson S.B. 2008. Is mitochondrial generation of reactive oxygen species a trigger for autophagy? Autophagy, 4: 246-248.
153. Chen Y. and Klionsky D.J. 2011. The regulation of autophagy - unanswered questions. J Cell Sci., 124(Pt 2): 161-70.
154. Chen Y., McMillan-Ward E., Kong J., Israels S. J., Gibson S. B. 2008. Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells. Cell Death Differ., 15: 171–182.
155. Chew S.K., Akdemir F., Chen P., Lu W.J., Mills K., Daish T., Kumar S., Rodriguez A., Abrams J.M. 2004. The apical caspase dronc governs programmed and unprogrammed cell death in Drosophila. Dev Cell, 7: 897–907.
156. Chiang M., Robinson K.R., Vanable J.W. Jr. 1992. Electrical fields in the vicinity of epithelial wounds in the isolated bovine eye. Exp Eye Res, 54: 999–1003
157. Chiang A.S., Lin W.Y., Liu H.P., Pszczolkowski M.A., Fu T.F., Chiu S.L., Holbrook G.L. 2002. Insect NMDA receptors mediate juvenile hormone biosynthesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 99(1): 37-42
158. Chipuk J.E. and Green D.R. 2005. Do inducers of apoptosis trigger caspaseindependent cell death? Nat Rev Mol Cell Biol, 6: 268–275
159. Christensen H.C., Schuz J., Kosteljanetz M., Poulsen H.S., Thomsen J., Johansen C. 2004. Cellular telephone use and risk of acoustic neuroma. Am J Epidemiol, 159: 277-283.
160. Cho M.R., Thatte H.S., Lee R.C., Golan, D.E. 1994. Induced redistribution of cell surface receptors by AC electric fields. FASEB J., 8: 771–776.
161. Cho M.R., Thatte H.S., Silvia M.T., Golan D.E. 1999. Transmembrane calcium influx induced by ac electric fields. FASEB J.13(6): 677-83.
162. Chua B.T., Guo K., Li P. 2000. Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases. J. Biol. Chem. 275: 5131–5135.
163. Circu, M. L. and Aw, T. Y. 2010. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. Free Radical Biol. Med., 48: 749–762
164. Clark A., Meignin C., Davis I. 2007. A Dynein-dependent shortcut rapidly delivers axis determination transcripts into the *Drosophila* oocyte. *Development*, 134: 1955-1965.
165. Claycomb J.M. and Orr-Weaver T.L. 2005. Developmental gene amplification: insights into DNA replication and gene expression. Trends Genet., 21(3): 149-62.
166. Cleary S.F., Du Z., Cao G., Liu L.M., McCrady C. 1996. Effect of isothermal radiofrequency radiation on cytolytic T lymphocytes. FASEB J, 10: 913-919.
167. Clerk A. 2003. The radical balance between life and death. J Mol Cell Cardiol., 35: 599-602.
168. Cole R.W. and Woodruff R.I. 2000. Vitellogenic ovarian follicles of Drosophila exhibit a charge-dependent distribution of endogenous soluble proteins. J Insect Physiol., 46(9): 1239-1248.
169. Colussi P.A., Quinn L.M., Huang D.C.S, Coombe M., Read S.H., Richardson H. and Kumar S. 2000. Debcl a proapoptotic Bcl-2 homologue, is a component of the Drosophila melanogaster cell death machinery. J Cell Biol, 148: 703–710.
170. Conder R., Yu H., Zahedi B., Harden N. 2007. The serine/threonine kinase dPak is required for polarized assembly of F-actin bundles and apical-basal polarity in the Drosophila follicular epithelium. Dev Biol., 305(2): 470-82.
171. Cooley L., Verheyen E., Ayers K. 1992. Chickadee encodes a profilin required for intercellular cytoplasm transport during Drosophila oogenesis. Cell, 69: 173-84.
172. Cooley L. and Theurkauf W.E. 1994. Cytoskeletal functions during Drosophila oogenesis. Science, 266: 590-596.
173. Corbett E.F. and Michalak M. 2000. Calcium, a signaling molecule in the endoplasmic reticulum? Trends Biochem Sci., 25(7): 307-11. Review.
174. Coschigano KT, and Wensink PC. 1993. Sex-specific transcriptional regulation by the male and female doublesex proteins of Drosophila. Genes Dev., 7(1): 42-54.
175. Cox R.T. and Spradling A.C. 2003. A Balbiani body and the fusome mediate mitochondrial inheritance during Drosophila oogenesis. Development., 130(8): 1579-90.
176. Crighton D., Wilkinson S., O'Prey J., Syed N., Smith P., Harrison P.R., Gasco M., Garrone O., Crook T., Ryan K.M. 2006. DRAM, a p53-Induced Modulator of Autophagy, Is Critical for Apoptosis. Cell, 126: 121–134.
177. Cross J.V. and Templeton D.J. 2006. Regulation of signal transduction through protein cysteine oxidation.

Antioxid Redox Signal, 8: 1819–1827
178. Cummings C.A. and Cronmiller C. 1994. The daughterless gene functions together with Notch and Delta in the control of ovarian follicle development in Drosophila. Development, 120(2): 381-94.
179. Curcio G., Ferrara M., Limongi T., Tempesta D., Di Sante G., De Gennaro L., Quaresima V., Ferrari M. 2009. Acute mobile phones exposure affects frontal cortex hemodynamics as evidenced by functional near-infrared spectroscopy. J Cereb Blood Flow Metab. 29(5): 903-10.
180. Czyz J., Guan K., Zeng Q., Nikolova T., Meister A., Schönborn F., Schuderer J., Kuster N., Wobus A.M. 2004. High frequency electromagnetic fields (GSM signals) affect gene expression levels in tumor suppressor p53-deficient embryonic stem cells. Bioelectromagnetics 25: 296-307
181. Dalle-Donne I., Rossi R., Giustarini D., Gagliano N., Lusini L., Milzani A., Di Simplicio P., Colombo R. 2001. Actin carbonylation: from a simple marker of protein oxidation to relevant signs of severe functional impairment. Free Radical Biol. Med., 31: 1075–1083.
182. Dasdag S., Akdag M.Z., Ulukaya E., Uzunlar A.K., Ocak A.R. 2009. Effect of mobile phone exposure on apoptotic glial cells and status of oxidative stress in rat brain. Electromagn Biol Med. 28(4): 342-54.
183. Dasdag S., Akdag M.Z., Kizil G., Kizil M., Cakir D.U., Yokus B. 2012. Effect of 900 MHz radio frequency radiation on beta amyloid protein, protein carbonyl, and malondialdehyde in the brain. Electromagn Biol Med., 31(1): 67-74.
184. Day M.L., Pickering S.J., Johnson M.H., Cook D.I. 1993. Cell-cycle control of a large-conductance K+ channel in mouse early embryos. Nature, 365: 560–562
185. Debatin K.M. and Krammer P.H. 2004. Death receptors in chemotherapy and cancer. Oncogene, 23: 2950–2966
186. Decotto E., Spradling A.C. 2005. The Drosophila ovarian and testis stem cell niches: similar somatic stem cells and signals. Dev Cell, 9(4): 501–10.
187. Decuypere J.P., Monaco G., Missiaen L., De Smedt H., Parys J.P., Bultynck G. 2011. IP3 Receptors, Mitochondria, and Ca2+ Signaling: Implications for Aging, Journal of Aging Research, 2011: 920178
188. Degterev A., Boyce M., Yuan J. 2003. A decade of caspases. Oncogene, 22: 8543-67
189. Dehay C. and Kennedy H. 2007. Cell-cycle control and cortical development. Nat Rev Neurosci., 8(6): 438-50. Review
190. Dej K.J. and Spradling A.C. 1999. The endocycle controls nurse cell polytene chromosome structure during Drosophila oogenesis. Development., 126(2): 293-303.
191. Del Castillo-Olivares A., Nunez de Castro I., Medina M. A. 2000. Dual role of plasma membrane electron transport systems in defense. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., 35: 197–220
192. De Lorenzo C., Strand D., Mechler B.M. 1999. Requirement of Drosophila I(2)g1 function for survival of the germline cells and organization of the follicle cells in a columnar epithelium during oogenesis. Int J Dev Biol, 43: 207-217.
193. De Loof A. 1983. The meroistic insect ovary as a miniature electrophoresis chamber. Minireview. Comp Biochem Physiol, 74A: 3-9.
194. De Iuliis G.N., Newey R.J., King B.V., Aitken R.J. 2009. Mobile phone radiation induces reactive oxygen species production and DNA damage in human spermatozoa in vitro. PLoS One., 4: e6446.
195. Demarchi F., Bertoli C., Copetti T., Eskelinen E.L., Schneider C. 2007. Calpain as a novel regulator of autophagosome formation. Autophagy, 3(3): 235-7.
196. Deng W.M. and Bownes M. 1998. Patterning and morphogenesis of the follicle cell epithelium during Drosophila oogenesis. Int J Dev Biol., 42(4): 541-52. Review.
197. Deng X., Xiao L., Lang W., Gao F., Ruvolo P., May W.S. Jr. 2001a. Novel role for JNK as a stress activated Bcl2 kinase. J Biol Chem 276: 23681–23688
198. Deng W.M., Althauser C., Ruohola-Baker H. 2001b. Notch-Delta signaling induces a transition from mitotic cell cycle to endocycle in Drosophila follicle cells. Development, 128(23): 4737–46.
199. Dent P., Yacoub A., Contessa J., Caron R., Amorino G., Valerie K., Hagan M. P., Grant S., Schmidt-Ullrich R. 2003. Stress and radiation-induced activation of multiple intracellular signaling pathways. Radiat. Res., 159: 283–300
200. Desai N., Sharma R., Makker K., Sabanegh E., Agarwal A. 2008. Physiologic and pathologic levels of reactive oxygen species in neat semen of infertile men. Fertil Steril., 92(5): 1626-31.
201. Desai N.R., Kesari K.K., Agarwal A. 2009. Pathophysiology of cell phone radiation: oxidative stress and carcinogenesis with focus on male reproductive system. Reprod Biol Endocrinol., 7: 114

202. Desnues B., Cuny C., Gregori G., Dukan S., Aguilaniu H., Nystrom, T. 2003. Differential oxidative damage and expression of stress defence regulons in culturable and non-culturable Escherichia coli cells. EMBO Rep., 4: 400–404
203. Dewaele M., Maes H., Agostinis P. 2010. ROS-mediated mechanisms of autophagy stimulation and their relevance in cancer therapy. Autophagy, 6(7): 838-54
204. Diem E., Schwarz C., Adlkofer F., Jahn O., Rudiger H. 2005. Non-thermal DNA breakage by mobile-phone radiation (1800 MHz) in human fibroblasts and in transformed GFSH-R17 rat granulosa cells in vitro. Mutat Res., 583: 178-83.
205. Dini L., Coppola S., Ruzittu M.T., Ghibelli L. 1996. Multiple pathways for apoptotic nuclear fragmentation. Exp Cell Res. 223(2): 340-7.
206. Dobens L.L. and Raftery L.A. 2000. Intergration of epithelial patterning and morphogenesis in Drosophila ovarian follicle cells. Dev Dyn, 218: 80-93.
207. Dobens L.L., Peterson J.S., Treisman J., Raftery L.A. 2000. Drosophila bunched integrates opposing DPP and EGF signals to set the operculum boundary. Development, 127: 745–754.
208. Dobens L., Jaeger A., Peterson J.S., Raftery L.A. 2005. Bunched sets a boundary for Notch signaling to pattern anterior eggshell structures during Drosophila oogenesis. Dev Biol, 287(2): 425–37.
209. Donald S.P., Sun X.Y., Hu C.A., Yu J., Mei J.M., Valle D., Phang J.M. 2001. Proline oxidase, encoded by p53-induced gene-6, catalyzes the generation of proline-dependent reactive oxygen species. Cancer Res, 61: 1810–1815.
210. Dong J., Ramachandiran S., Jia Z., Lau S.S., Monks T.J. 2004. EGFR-independent activation of p38 MAPK and EGFR-dependent activation of ERK1/2 are required for ROS-induced renal cell death. Am J Physiol Renal Physiol, 287: F1049–F1058.
211. Dorstyn L., Read S.H., Quinn L.M., Richardson H., Kumar S. 1999. DECAY, a novel Drosophila caspase related to mammalian caspase-3 and caspase-7. J. Biol. Chem., 274: 30778-30783.
212. Doumanis J., Quinn L., Richardson H., Kumar S. 2001. STRICA, a novel Drosophila melanogaster caspase with an unusual serine/threoninerich prodomain, interacts with DIAP1 and DIAP2. Cell Death Differ, 8: 387-94.
213. Doyle K.P., Simon R.P., Stenzel-Poore M.P. 2008. Mechanisms of ischemic brain damage. Neuropharmacology, 55(3): 310-8.
214. Dröge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev., 82(1): 47-95. Review.
215. Drummond-Barbosa D. and Spradling A.C. 2001. Stem cells and their progeny respond to nutritional changes during Drosophila oogenesis, Dev. Biol. 231, pp. 265–278.
216. Dubreuil D., Jay T., Edeline J.M. 2002. Does head-only exposure to GSM-900 electromagnetic fields affect the performance of rats in spatial learning tasks? Behav Brain Res., 129: 203-210
217. Dubreuil D., Jay T., Edeline J.M. 2003. Head-only exposure to GSM 900-MHz electromagnetic fields does not alter rat's memory in spatial and non-spatial tasks. Behav Brain Res., 145: 51-61
218. Duchek P., Somogyi K., Jékely G., Beccari S., Rørth P. 2001. Guidance of cell migration by the Drosophila PDGF/VEGF receptor. Cell, 107 (1): 17–26.
219. Duchek P. and Rorth P. 2001. Guidance of cell migration by EGF receptor signaling during Drosophila oogenesis. Science, 291(5501): 131–3.
220. Duchen M.R. 2000. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. J Physiol Lond, 529: 57-68.
221. Dutta S.K., Subramoniam A., Ghosh B., Parshad R. 1984. Microwave radiation-induced calcium ion efflux from human neuroblastoma cells in culture. Bioelectromagnetics, 5(1): 71– 78.
222. Dutta S.K., Ghosh B., Blackman C.F. 1989. Radiofrequency radiation-induced calcium ion efflux enhancement from human and other neuroblastoma cells in culture. Bioelectromagnetics, 10(2): 197–202.
223. Dykens J. 1994. Isolated cerebral and cerebellar mitochondria produce free radicals when exposed to elevated Ca^{+2} and Na^{+}: implications for neurodegeneration. J. Neurochem., 63: 584- 591.
224. Eberhardt J.L., Persson BR.R., Brun A.E., Salford L.G., Malmgren LOG. 2008. Blood-brain barrier permeability and nerve cell damage in rat brain 14 and 28 days after exposure to microwaves from GSM mobile phones. Electromagnetic Biology and Medicine, 27: 215–229.
225. Edwards K.A., Demsky M., Montague R.A., Weymouth N., Kiehart DP. 1997. GFP-moesin illuminates actin cytoskeleton dynamics in living tissue and demonstrates cell shape changes during morphogenesis in Drosophila. Dev Biol., 191(1): 103-17.
226. Eisenberg-Lerner A., Bialik S., Simon H.U., Kimchi A. 2009. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the crosstalk between them. Cell Death and Differentiation, vol. 16, no. 7, pp. 966–975.
227. Elmore S.P., Qian T., Grissom S.F., Lemasters J.J. 2001. The mitochondrial permeability transition initiates autophagy in rat hepatocytes. FASEB J, 15: 2286–2287

228. England K. and Cotter T.G. 2005. Direct oxidative modifications of signaling proteins in mammalian cells and their effects on apoptosis. Redox Rep, 10: 237–245
229. Erogul O., Oztas E., Yildirim I., Kir T., Aydur E., Komesli G., Irkilata H.C., Irmak M.K., Peker A.F. 2006. Effects of electromagnetic radiation from a cellular phone on human sperm motility: an in vitro study. Arch Med Res., 37(7): 840-3.
230. Escobar M.L., Echeverria O.M., Ortiz R., Vazquez-Nin G.H. 2008. Combined apoptosis and autophagy, the process that eliminates the oocytes of atretic follicles in immature rats. Apoptosis, 13: 1253–66
231. Eskelinen E.L. 2006. Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. Mol Aspects Med. 27(5-6): 495-502
232. Eskes R., Antonsson B., Osensand A., Montessuit S., Richter C., Sadoul R., Mazzei G., Nichols A., Martinou J.C. 1998. Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg2_ ions. J Cell Biol, 143: 217–224
233. Eşmekaya M.A., Seyhan N., Ömeroğlu S. 2010. Pulse modulated 900 MHz radiation induces hypothyroidism and apoptosis in thyroid cells: a light, electron microscopy and immunohistochemical study. Int J Radiat Biol., 86: 1106-16. Fariss M.W., Pascoe G.A., Reed D.J. 1985. Vitamin E reversal of the effect of extracellular calcium on chemically induced toxicity in hepatocytes. Science, 227: 751–754.
234. Feissner R.F., Skalska J., Gaum W.E., Sheu S.S. 2009. Crosstalk signaling between mitochondrial Ca2+ and ROS. Front Biosci, 14: 1197-1218.
235. Fejes I., Závaczki Z., Szöllosi J., Koloszár S., Daru J., Kovács L., Pál A. 2005. Is there a relationship between cell phone use and semen quality? Arch Androl., 51(5): 385-93.
236. Feldstein A.E., Werneburg N.W., Li Z., Bronk S.F., Gores G.J. 2006. Bax inhibition protects against free fatty acid-induced lysosomal permeabilization. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol., 290(6): G1339-46
237. Fesenko E.E., Makar V.R., Novoselova E.G., Sadovnikov V.B. 1999. Microwaves and cellular immunity. I. Effect of whole body microwave irradiation on tumor necrosis factor production in mouse cells. Bioelectrochem. Bioenerg., 49(1): 29–35
238. Fischer O. M., Hart S., Gschwind, A. and Ullrich, A. 2003. EGFR signal transactivation in cancer cells. Biochem. Soc. Trans., 31: 1203–1208
239. Foley K. and Cooley L. 1998. Apoptosis in late stage Drosophila nurse cells does not require genes within the H99 deficiency. Development, 125: 1075-1082.
240. Forbes A.J., Spradling A.C., Ingham P.W., Lin H. 1996. The role of segment polarity genes during early oogenesis in Drosophila. Development, 122(10): 3283–94.
241. Forgács Z., Kubinyi G., Sinay G., Bakos J., Hudák A., Surján A., Révész C., Thuróczy G. 2005. Effects of 1800 MHz GSM-like exposure on the gonadal function and hematological parameters of male mice, Magy Onkol., 49: 149-51.
242. Forgacs Z., Somosy Z., Kubinyi G., Bakos J., Hudak A., Surjan A., Thuroczy G. 2006. Effect of whole-body 1800MHz GSM-like microwave exposure on testicular steroidogenesis and histology in mice. Reprod. Toxicol., 22(1): 111–117.
243. Foskett J.K., White C., Cheung K.H., Mak D.O. 2007. Inositol trisphosphate receptor Ca2+ release channels. Physiol Rev., 87(2): 593-658. Review.
244. Foyouzi-Youssefi R., Arnaudeau S., Borner C., Kelley W.L., Tschopp J., Lew D.P., Demaurex N., Krause K.H. 2000. Bcl-2 decreases the free Ca2+ concentration within the endoplasmic reticulum. Proc Natl Acad Sci USA, 97: 5723–5728.
245. Franco R. and Cidlowski J. A. 2009. Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. Cell Death Differ. 16: 1303–1314
246. Fragopoulou A.F., Miltiadous P., Stamatakis A., Stylianopoulou F., Koussoulakos S.L., Margaritis L.H. 2010a. Whole body exposure with GSM 900MHz affects spatial memory in mice. Pathophysiology, 17: 179-87.
247. Fragopoulou A.F., Koussoulakos S.L., Margaritis L.H. 2010b. Cranial and postcranial skeletal variations induced in mouse embryos by mobile phone radiation. Pathophysiology, 17: 169-77.
248. Fragopoulou A**.**, Grigoriev Y., Johansson O., Margaritis L.H., Morgan L., Richter E., Sage C. 2010c. Scientific panel on electromagnetic field health risks: consensus points, recommendations, and rationales. Rev Environ Health 25: 307-17.
249. Fragopoulou A.F., Samara A., Antonelou M.H., Xanthopoulou A., Papadopoulou A., Vougas K., Koutsogiannopoulou E., Anastasiadou E., Stravopodis D.J., Tsangaris G.T., Margaritis L.H. 2012. Brain proteome response following whole body exposure of mice to mobile phone or wireless DECT base radiation. Electromagn Biol Med., 2012. [Epub ahead of print]

250. Franc N.C., Heitzler P., Ezekowitz A.B., White K. 1999. Requirement for croquemort in phagocytosis of apoptotic cells in Drosophila. Science 284: 1991-4.
251. Franke T., Hornik C., Segev L., Shostak G., Sugimoto C. 2003. PI3K/ Akt and apoptosis: size matters. Oncogene, 22: 8983–8998
252. Franklin-Tong, V. E. and Gourlay, C. W. 2008. A role for actin in regulating apoptosis/programmed cell death: evidence spanning yeast, plants and animals. Biochem. J., 413: 389–404
253. Franzellitti S., Valbonesi P., Contin A., Biondi C., Fabbri E. 2008. HSP70 expression in human trophoblast cells exposed to different 1.8 Ghz mobile phone signals. Radiat Res., 170: 488-97.
254. Franzellitti S., Valbonesi P., Ciancaglini N., Biondi C., Contin A., Bersani F., Fabbri E. 2010. Transient DNA damage induced by high-frequency electromagnetic fields (GSM 1.8 MHz) in the human trophoblast HTR-8/SVneo cell line evaluated with the alkaline comet assay. Mut Res, 683: 35-42.
255. Fraser A.G., McCarthy N.J., Evan G.I. 1997. drICE is an essential caspase required for apoptotic activity in Drosophila cells. EMBO J., 16: 6192-6199.
256. Freeman M.R., Dobritsa A., Gaines P., Segraves W.A., Carlson J.R. 1999. The dare gene: steroid hormone production, olfactory behavior, and neural degeneration in Drosophila. Development, 126(20): 4591-602.
257. French P.W., Penny R., Laurence J.A., McKenzie D.R. 2001. Mobile phones, heat shock proteins and cancer. Differentiation, 67: 93-7.
258. Friedman J., Kraus S., Hauptman Y., Schiff Y., Seger R. 2007. Mechanism of short-term ERK activation by electromagnetic fields at mobile phone frequencies. Biochem J., 405: 559-68
259. Frisch S.M. and Ruoslahti E. 1997. Integrins and anoikis. Curr Opin Cell Biol., 9(5): 701-6.
260. Fuentes-Prior P. and Salvesen G.S. 2004. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. Biochem J, 384: 201–232
261. Fulga T.A., Rorth P. 2002. Invasive cell migration is initiated by guided growth of long cellular extensions. Nat Cell Biol, 4(9): 715–9.
262. Friederich E., Pringault E., Arpin M., Louvard D. 1990. From the structure to the function of villin, an actin-binding protein of the brush border. BioEssays, 12: 403–8
263. Gadhia P.K., Shah T., Mistry A., Pithawala M., Tamakuwala D. 2003. A preliminary study to assess possible chromosomal damage among users of digital mobile phones, Electromagnetic Biology and Medicine, 22: 149-159.
264. Galindo K.A., Lu W.-J., Park J.H., Abrams J. M. 2009. The Bax/Bak ortholog in Drosophila, Debcl, exerts limited control over programmed cell death. Development, 136: 275-283.
265. Gandhi G. and Anita. 2005. Genetic damage in mobile phone users: some preliminary findings. Ind J Hum Genet 11: 99-104.
266. Garrido C., Galluzzi L., Brunet M., Puig P.E., Didelot-Mirjolet C., Kroemer G. 2006. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. Cell Death Differ., 13(9): 1423-33.
267. Ghiglione C., Devergne O., Georgenthum E., Carballès F., Médioni C., Cerezo D., Noselli S. 2002. The Drosophila cytokine receptor Domeless controls border cell migration and epithelial polarization during oogenesis. Development, 129(23): 5437–47.
268. Gibson G.E., Shi Q. 2010. A mitocentric view of Alzheimer's disease suggests multi-faceted treatments. J Alzheimers Dis., 20 Suppl 2: S591-607. Review.
269. Gincel D., Zaid H., Shoshan-Barmatz V. 2001. Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function. Biochem J., 358(Pt 1): 147-55.
270. Giordano F.J. 2005. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. J Clin Invest., 115: 500-8.
271. Giorgio M., Migliaccio E., Orsini F., Paolucci D., Moroni M., Contursi C., Pelliccia G., Luzi L., Minucci S., Marcaccio M., Pinton P., Rizzuto R., Bernardi P., Paolucci F., Pelicci P.G. 2005. Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. Cell, 122: 221–233
272. Giorgi F. 1979. In vitro induced pinocytotic activity by a juvenile hormone analogue in oocytes of Drosophila melanogaster. Cell Tissue Res., 203(2): 241-7
273. Giorgi C., Romagnoli A., Pinton P., Rizzuto R. 2008. Ca2+ signaling, mitochondria and cell death. Curr Mol Med, 8: 119–130
274. Giorgi F. and Deri P. 1976. Cell death in ovarian chambers of Drosophila melanogaster, J Embryol Exp Morphol 35, pp. 521–533.
275. Giorgi F., Postlethwait J.H. 1985. Development of gap junctions in normal and mutant ovaries of Drosophila melanogaster. J Morphol, 185: 115-129.
276. Giorgi C., Romagnoli A., Pinton P., Rizzuto R., 2008. Ca2+ signaling, mitochondria and cell death. Curr Mol Med, 8: 119–130.

277. Giugni T.D., Brastan D.L., Haigler H.T. 1987. Electric fieldinduced redistribution and postfield relaxation of epidermal growth factor receptors on A431 cells. J. Cell Biol., 104: 1291–1297.
278. Glazner G.W., Chan S.L., Lu C., Mattson M.P. 2000. Caspase-mediated degradation of AMPA receptor subunits: a mechanism for preventing excitotoxic necrosis and ensuring apoptosis. J Neurosci, 20: 3641–3649.
279. Godt D., Tepass U. 1998. Drosophila oocyte localization is mediated by differential cadherin-based adhesion. Nature 395(6700): 387–91.
280. Gogvadze V., Orrenius S., Zhivotovsky B. 2006. Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis. Biochim Biophys Acta, 1757: 639–647
281. Goldstein J., Waterhouse N., Juin P., Evan G., Green D. 2000. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. Nat Cell Biol, 2: 156–162
282. Goldsworthy A. 2007. The Biological Effects of Weak Electromagnetic Fields, Mast-Victims.org Forums / Health, Apr18
283. Golstein P. and Kroemer G. 2007. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. Trends Biochem. Sci. 32: 37–43.
284. Gonzalez-Polo R.A., Boya P., Pauleau A.L, Jalil A., Larochette N., Souquère S., Eskelinen E.L., Pierron G., Saftig P., Kroemer G. 2005. The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. J Cell Sci, 118: 3091–3102.
285. Goode S., Wright D., Mahowald A.P. 1992. The neurogenic locus brainiac cooperates with the Drosophila EGF receptor to establish the ovarian follicle and to determine its dorsal-ventral polarity, Development, 116(1): 177-92.
286. Goode S., Melnick M., Chou T.B., Perrimon N. 1996. The neurogenic genes egghead and brainiac define a novel signaling pathway essential for epithelial morphogenesis during Drosophila oogenesis. Development, 122(12): 3863–79.
287. Goode S., Morgan M., Liang Y.P., Mahowald A.P. 1996. Brainiac encodes a novel, putative secreted protein that cooperates with Grk TGF alpha in the genesis of the follicular epithelium. Dev Biol, 178(1): 35–50.
288. Goodman E.M., Greenebaum B. Marron M.T. 1995. Effects of Electro- magnetic Fields on Mollecules and Cells, International Rev. Cytol., 158: 279-338.
289. Gordon P.B., Holen I., Fosse M., Røtnes J.S., Seglen P.O. 1993. Dependence of hepatocytic autophagy on intracellularly sequestered calcium. J Biol Chem., 268(35): 26107-12.
290. Görlach A., Klappa P., Kietzmann T. 2006. The endoplasmic reticulum: folding, calcium homeostasis, signaling, and redox control. Antioxid Redox Signal., 8(9-10): 1391-418. Review.
291. Golstein P. and Kroemer G. 2007. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. Trends Biochem Sci 32: 37–43.
292. González-Polo R.A., Boya P., Pauleau A.L, Jalil A., Larochette N., Souquère S., Eskelinen E.L., Pierron G., Saftig P., Kroemer G. 2005. The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. J Cell Sci. 118(Pt 14): 3091-102
293. Gonzalez-Reyes A., Elliott H, St Johnston D. 1995. Polarization of both major body axes in Drosophila by gurken-torpedo signalling. Nature, 375(6533): 654–8.
294. Gonzalez-Reyes A., St Johnston D. 1998a. Patterning of the follicle cell epithelium along the anterior/posterior axis during Drosophila oogenesis. Development, 125(15): 2837–46.
295. Gonzalez-Reyes A., St Johnston D. 1998b. The Drosophila AP axis is polarised by the cadherin-mediated positioning of the oocyte. Development, 125(18): 3635–44.
296. González-Reyes A., Elliott H., St Johnston D. 1997. Oocyte determination and the origin of polarity in Drosophila: the role of the spindle genes. Development, 124(24): 4927-37.
297. Goodman E.M., Greenebaum B., Marron M.T. 1995. Effects of electro- magnetic fields on mollecules and cells. International Review of Cytology, 158: 279–338.
298. Gourlay C. W., Carpp L. N., Timpson P., Winder S. J., Ayscough K. R. 2004. A role for the actin cytoskeleton in cell death and aging in yeast. J. Cell Biol., 164: 803–809
299. Gourlay C.W. and Ayscough K.R. 2005. The actin cytoskeleton: a key regulator of apoptosis and ageing? Nat Rev Mol Cell Biol, 6: 583–589,
300. Grammont M., Irvine K.D. 2002. Organizer activity of the polar cells during Drosophila oogenesis. Development, 129(22): 5131–40.
301. Grammont M. 2007. Adherens junction remodeling by the Notch pathway in Drosophila melanogaster oogenesis. J Cell Biol 177(1):139–50.

302. Green D.R. and Kroemer G. 1998. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? Trends Cell Biol 8: 267–271
303. Green D.R. and Kroemer G. 2004. The pathophysiology of mitochondrial cell death. Science, 305: 626–629,
304. Grotemeier A., Alers S., Pfisterer S.G., Paasch F., Daubrawa M., Dieterle A., Viollet B., Wesselborg S., Proikas-Cezanne T., Stork B. 2010. AMPK-independent induction of autophagy by cytosolic Ca2+ increase. Cell Signal, 22(6): 914-25
305. Grigor'ev IuG. 2003. Biological effects of mobile phone electromagnetic field on chick embryo (risk assessment using the mortality rate), Radiats Biol Radioecol, 43: 541-3.
306. Griner E.M., Kazanietz M.G. 2007. Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. Nat Rev Cancer, 7: 281–294.
307. Green D.R. and Reed J.C. 1998. Mitochondria and apoptosis. Science, 281: 1309-1312.
308. Griner E.M. and Kazanietz M.G. 2007. Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. Nat Rev Cancer, 7: 281–294
309. Grotewiel M.S., Martin I., Bhandari P., Cook-Wiens E. 2005. Functional senescence in Drosophila melanogaster. Ageing Res Rev, 4: 372–397
310. Guicciardi M.E., Leist M., Gores G.J. 2004. Lysosomes in cell death. Oncogene, 23(16): 2881-90.
311. Guicciardi M.E., Bronk S.F., Werneburg N.W., Yin X.M., Gores G.J. 2005. Bid is upstream of lysosome-mediated caspase 2 activation in tumor necrosis factor alpha-induced hepatocyte apoptosis. Gastroenterology, 129(1): 269-84.
312. Gul A., Celebi H., Uğraş S. 2009. The effects of microwave emitted by cellular phones on ovarian follicles in rats. Arch Gynecol Obstet., 280: 729-33.
313. Gulbins E., Jekle A., Ferlinz K., Grassme H., Lang F. 2000. Physiology of apoptosis. Am. J Physiol Renal Physiol, 279: F605–F615
314. Guler G., Tomruk A., Ozgur E., Seyhan N. 2010. The effect of radiofrequency radiation on DNA and lipid damage in non-pregnant and pregnant rabbits and their newborns. Gen. Physiol. Biophys., 29: 59–66
315. Gurisik E., Warton K., Martin D.K., Valenzuela S.M. 2006. An in vitro study of the effects of exposure to a GSM signal in two human cell lines: monocytic U937 and neuroblastoma SK-N-SH. Cell Biol Int, 30: 793-9.
316. Gutzeit H.O. 1986. The role of microfilaments in cytoplasmic streaming in Drosophila follicles. J Cell Sci, 80: 159-69.
317. Gyulkhandanyan A.V., Pennefather P.S. 2004. Shift in the localization of sites of hydrogen peroxide production in brain mitochondria by mitochondrial stress. J Neurochem, 90: 405- 421.
318. Hackney J.F., Pucci C., Naes E., Dobens L. 2007. Ras signaling modulates activity of the ecdysone receptor EcR during cell migration in the Drosophila ovary. Dev Dyn, 236(5): 1213–26.
319. Haddad J.J. 2002. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. Cell Signal, 14: 879–897
320. Halestrap A.P. 2006. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. Biochem Soc Trans, 34: 232–237.
321. Halestrap A.P. 2009. What is the mitochondrial permeability transition pore? J Mol Cell Cardiol., 46(6): 821-31.
322. Halestrap A.P. 2010. A pore way to die: the role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection. Biochem Soc Trans., 38(4): 841-60.
323. Hall E.J. and Giaccia A.J. 2006. Radiobiology for the Radiologist, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
324. Halliwell B. and Gutteridge J. M. C. 1999. Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford University Press, Oxford
325. Halliwell B. 2000. The antioxidant paradox. Lancet, 355: 1179–1180
326. Ham Y.M., Lim J.H., Na H.K., Choi J.S., Park B.D., Yim H., Lee S.K. 2006. Ginsenoside-Rh2-induced mitochondrial depolarization and apoptosis are associated with reactive oxygen species- and Ca2+-mediated c-Jun NH2-terminal kinase 1 activation in HeLa cells. J Pharmacol Exp Ther., 319: 1276-85.
327. Hampton M.B. and Orrenius S. 1997. Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. FEBS Lett, 414: 552–556
328. Hancock J.T., Desikan R., Neill S.J. 2001. Does the redox status of cytochrome c act as a fail-safe mechanism in the regulation of programmed cell death? Free Radic Biol Med, 31: 697–703
329. Hansson M.J., Mansson R., Morota S., Uchino H., Kallur T., Sumi T., Ishii N., Shimazu M., Keep M.F., Jegorov A., Elmer E. 2008. Calcium-induced generation of reactive oxygen species in brain mitochondria is mediated by permeability transition. Free Radic Biol Med, 45: 284-294.
330. Hardell L., Carlberg M., Söderqvist F., Mild K.H., Morgan L.L. 2007. Long-term use of cellular phones

and brain tumours: increased risk associated with use for > or =10 years. Occup Environ Med., 64: 626-32. Review.

331. Hardell L., Carlberg M., Hansson Mild K. 2006. Pooled analysis of two case-control studies on use of cellular and cordless telephones and the risk for malignant brain tumours diagnosed in 1997-2003, Int Arch Occup Environ Health., 79: 630-9.
332. Hardell L. and Hansson Mild K. 2006. Mobile phone use and risk of acoustic neuroma: results of the interphone case-control study in five North European countries. Br J Cancer, 94: 1348-9.
333. Hardell L. and Sage C. 2008. Biological effects from electromagnetic field exposure and public exposure standards. Biomed Pharmacother., 62(2): 104-9.
334. Hardell L., Carlberg M., Hansson Mild K. 2009. Epidemiological evidence for an association between use of wireless phones and tumor diseases. Pathophysiology, 16: 113-22.
335. Harr M.W. and Distelhorst C.W. 2010. Apoptosis and autophagy: decoding calcium signals that mediate life or death. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2(10): a005579.
336. Harraz M. M., Dawson T. M., Dawson V. L. 2008. Advances in neuronal cell death 2007. Stroke, 39: 286–288
337. Harvey C. and French P.W. 1999. Effects on protein kinase C and gene expression in a human mast cell line, HMC-1, following microwave exposure. Cell Biol Int, 23: 739-48.
338. Harvey N.L., Daish T., Mills K., Dorstyn L., Quinn L.M., Read S.H., Richardson H., Kumar S. 2001. Characterization of the Drosophila caspase, DAMM. J Biol Chem, 276: 25342–25350.
339. Hayashi T., Martone M.E., Yu Z., Thor A., Doi M., Holst M.J., Ellisman M.H., Hoshijima M. 2009. Three-dimensional electron microscopy reveals new details of membrane systems for Ca2+ signaling in the heart. J Cell Sci., 122(Pt 7):1005-13
340. Harvey N.L., Daish T., Mills K., Dorstyn L., Quinn L.M., Read S.H., Richardson H., Kumar S. 2001. Characterization of the Drosophila caspase, DAMM. J. Biol. Chem., 276: 25342-25350
341. Hawkins C.J., Yoo S.J., Peterson E.P., Wang S.L., Vernooy S.Y., Hay B.A. 2000. The Drosophila caspase DRONC is a glutamate/aspartate protease whose activity is regulated by DIAP1, HID and GRIM. J. Biol. Chem., 275: 27084-27093.
342. Hay B.A. and Guo M. 2006. Caspase-dependent cell death in Drosophila. Ann Rev Cell Dev Biol, 22: 623–650.
343. Hay B.A., Wasserman D.A., Rubin G.M. 1995. Drosophila homologs of baculovirus inhibitor of apoptosis proteins function to block cell death. Cell, 83: 1253-1262.
344. Heinrich U.R. and Gutzeit H.O. 1985. Characterization of cation-rich follicle cells in vitellogenic follicles of Drosophila melanogaster. Differentiation, 28: 237-243.
345. Hirota J., Furuichi T., Mikoshiba K. 1999. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 is a substrate for caspase-3 and is cleaved during apoptosis in a caspase-3-dependent manner. J Biol Chem, 274: 34433–34437.
346. Hockenbery D.M., Oltvai Z.N., Yin X.M., Milliman C.L., Korsmeyer S.J. 1993. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. Cell, 75: 241–251
347. Holley C.L., Olson M.R., Colon-Ramos D.A., Kornbluth S. 2002. Reaper eliminates IAP proteins through stimulated IAP degradation and generalized translational inhibition. Nat Cell Biol, 4: 439-44.
348. Holma H. and Toskala A. 2002. WCDMA for UMTS. John Wiley & Sons Ltd.
349. Hombria J.C. and Brown S. 2002. The fertile field of Drosophila Jak/STAT signalling. Curr Biol, 12 (16): R569–75.
350. Honig B.H., Hubbell W.L., Flewelling R.F. 1986. Electrostatic interactions in membranes and proteins. Annu Rev Biophys Biophys Chem. 15: 163-93.
351. Hook G.J., Zhang P., Lagroye I., Li L., Higashikubo R., Moros E.G., Straube W.L., Pickard W.F., Baty J.D., Roti Roti J.L. 2004. Measurement of DNA damage and apoptosis in Molt-4 cells after in vitro exposure to radiofrequency radiation. Radiat Res., 161: 193-200.
352. Hou Y.C., Chittaranjan S., Barbosa S.G., McCall K., Gorski S.M. 2008. Effector caspase Dcp-1 and IAP protein Bruce regulate starvation-induced autophagy during Drosophila melanogaster oogenesis. J Cell Biol, 182: 1127–39.
353. Hou W., Han J., Lu C., Goldstein L.A., Rabinowich H. 2010. Autophagic degradation of active caspase-8: a crosstalk mechanism between autophagy and apoptosis. Autophagy, 6: 891–900.
354. Hoyer-Hansen M., Bastholm L., Szyniarowski P, Campanella M., Szabadkai G., Farkas T., Bianchi K., Fehrenbacher N., Elling F., Rizzuto R., Mathiasen I.S., Jäättelä M. 2007. Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2. Mol Cell, 25: 193–205.

355. Hoyto A., Juutilainen J., Naarala J. 2007. Ornithine decarboxylase activity is affected in primary astrocytes but not in secondary cell lines exposed to 872 MHz RF radiation. Int J Radiat Biol, 83: 367-374.
356. Höytö A., Luukkonen J., Juutilainen J., Naarala J. 2008. Proliferation, oxidative stress and cell death in cells exposed to 872 MHz radiofrequency radiation and oxidants. Radiat Res. 170(2): 235-43.
357. Hsu H.J., LaFever L., Drummond-Barbosa D. 2008. Diet controls normal and tumorous germline stem cells via insulin-dependent and -independent mechanisms in Drosophila. Dev Biol., 313(2): 700-12.
358. Hu Y., Benedict M.A., Ding L., Nunez G. 1999. Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis. EMBO J, 18: 3586-3595.
359. Hughes F.M. Jr., Cidlowski J.A. 1999. Potassiumis a critical regulator of apoptotic enzymes in vitro and in vivo. Adv Enzyme Regul., 39: 157–171
360. Hutter H.P., Moshammer H., Wallner P. Kundi M. 2006. Subjective symptoms, sleeping problems, and cognitive performance in subjects living near mobile phone base stations. Occupational and Environmental Medicine, 63: 307-313.
361. Huynh J.R. and St. Johnston D. 2004. The origin of asymmetry: early polarisation of the Drosophila germline cyst and oocyte. Curr Biol., 14(11): R438-49.
362. Hyland G.J., 2000. Physics and Biology of Mobile Telephony, Lancet, 356, 1833-36.
363. ICNIRP 1998. Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic and electromagnetic fields (up to 300GHz), Health Phys. 74: 494-522.
364. Ihrig I., Heese C., Glaser R. 1997. Alterations of intracellular calcium concentration in mice neuroblastoma cells by electrical field and UVA. Bioelectromagnetics, 18(8): 595-7.
365. Ilhan A., Gurel A., Armutcu F., Kamisli S., Iraz M., Akyol O., Ozen S. 2004. Ginkgo biloba prevents mobile phone-induced oxidative stress in rat brain. Clin Chim Acta, 340(1-2): 153-62.
366. Inskip P.D., Tarone R.E., Hatch E.E., Wilcosky T.C., Shapiro W.R., Selker R.G., Fine H.A., Black P.M., Loeffler J.S., Linet M.S. 2001. Cellular-telephone use and brain tumors. N Engl J Med., 344: 79-86.
367. Inoue M., Sato E.F., Nishikawa M., Park A.M., Kira Y., Imada I., Utsumi K. 2003. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. Curr Med Chem, 10: 2495–2505
368. Irigoin F., Inada N.M., Fernandes M.P., Piacenza L., Gadelha F.R., Vercesi A.E., Radi R. 2009. Mitochondrial calcium overload triggers complement-dependent superoxide-mediated programmed cell death in Trypanosoma cruzi. Biochem J, 418: 595-604.
369. Irmak M.K., Fadillioglu E., Gulec M., Erdogan H.,Yagmurca M., Akyol O. 2002. Effects of electromagnetic radiation from a cellular telephone on the oxidant and antioxidant levels in rabbits. Cell Biochem Funct, 20: 279–283.
370. IRPA 1988. Guidelines on limits of exposure to radiofrequency electromagnetic fields in the frequency range from 100kHz to 300GHz, Health Phys., 54: 115-123.
371. IRPA, 1990. Interim Guidelines on Limits of Exposure to 50 / 60 Hz Electric and Magnetic Fields, Health Physics, 58: 113-122.
372. Isaac P.G. and Bownes M. 1982. Ovarian and fat-body vitellogenin synthesis in Drosophila melanogaster. Eur J Biochem., 123(3): 527-34.
373. Ishihara N., Eura Y., Mihara K. 2004. Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. J Cell Sci., 117(Pt 26): 6535-46.
374. Israels L.G. and Israels E.D. 1999. Apoptosis. Review. Oncologist, 4: 332-9.
375. Ivancsits S., Diem E., Pilger A., Rudiger H.W., Jahn O. 2002. Induction of DNA strand breaks by intermittent exposure to extremely-low-frequency electromagnetic fields in human diploid fibroblasts, Mutat. Res., 519: 1–13.
376. Ivanovska I., Lee E., Kwan K.M., Fenger D.D., Orr-Weaver T.L. 2004. The Drosophila MOS ortholog is not essential for meiosis. Curr Biol., 14(1): 75-80.
377. Jaffe L.F. and Vanable J.W. Jr. 1984. Electric fields and wound healing. Clin Dermatol, 2(3): 34-44.
378. Jin J. and Petri W.H. 1993. Developmental control elements in the promoter of a *Drosophila* vitelline membrane gene. Dev Biol., 156: 557–565.
379. Johansen C., Boice J. Jr, McLaughlin J., Olsen J. 2001. Cellular telephones and cancer—a nationwide cohort study in Denmark. J Natl Cancer Inst., 93: 203-7.
380. Johnson G.L. and Lapadat R. 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. Science, 298(5600): 1911-2. Review.
381. Johnstone O. and Lasko P. 2001. Translational regulation and RNA localization in Drosophila oocytes and embryos. Annu Rev Genet., 35: 365-406.
382. Jordan K.C., Schaeffer V., Fischer K.A., Gray E.E., Ruohola-Baker H. 2006. Notch signaling through tramtrack bypasses the mitosis promoting activity of the JNK pathway in the mitotic-to-endocycle transition of Drosophila follicle cells. BMC Dev Biol., 6:16
383. Joseph W., Frei P., Roösli M., Thuróczy G., Gajsek P., Trcek T., Bolte J., Vermeeren G., Mohler E.,

Juhász P., Finta V., Martens L. 2010. Comparison of personal radio frequency electromagnetic field exposure in different urban areas across Europe. Environ Res. 110: 658-63
384. Joubert V., Leveque P, Cueille M, Bourthoumieu S, Yardin C. 2007. No apoptosis is induced in rat cortical neurons exposed to GSM phone fields. Bioelectromagnetics, 28: 115-21.
385. Joubert V., Bourthoumieu S., Leveque P., Yardin C. 2008. Apoptosis is induced by radiofrequency fields through the caspase-independent mitochondrial pathway in cortical neurons, Radiat Res, 169: 38-45.
386. Juutilainen J., Heikkinen P., Soikkeli H., Mäki-Paakkanen J. 2007. Micronucleus frequency in erythrocytes of mice after long-term exposure to radiofrequency radiation. Int J Radiat Biol., 83: 213-20.
387. Kagan V.E., Fabisiak J.P., Shvedova A.A., Tyurina Y.Y., Tyurin V.A., Schor N.F., Kawai K. 2000. Oxidative signaling pathway for externalization of plasma membrane phosphatidylserine during apoptosis. FEBS Lett, 477: 1–7
388. Kagan V.E., Tyurin V.A., Jiang J., Tyurina Y.Y., Ritov V.B., Amoscato A.A., Osipov A.N., Belikova N.A., Kapralov A.A., Kini V., Vlasova II., Zhao Q., Zou M., Di P., Svistunenko D.A., Kurnikov I.V., Borisenko G.G. 2005. cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. Nat Chem Biol, 1: 223–232
389. Kaiser W.J., Vucic D., Miller L.K. 1998. The Drosophila inhibitor of apoptosis DIAP1 suppresses cell death induced by the caspase drICE. FEBS Lett, 440: 243-248.
390. Kalwy S.A., Smith R., Kidd G.J. 1997. Myelin proteolipid protein expressed in COS-1 cells is targeted to actin-associated surfaces. J Neurosci Res., 48(3): 201-11.
391. Kamata H., Honda S.I., Maeda S., Chang L., Hirata H., Karin M. 2005. Reactive oxygen species promote TNFα-induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases, Cell, vol. 120, no. 5, pp. 649–661.
392. Κανάτας Α., Κωνσταντίνου Φ., Πάντος Γ. 2008. Συστήματα κινητών επικοινωνιών. Εκδόσεις Παπασωτηρίου.
393. Karim M.R., Sarraf M. 2002. W-CDMA and CDMA2000 for 3G mobile networks, McGraw-Hill.
394. Kazzaz J.A., Xu J., Palaia T.A., Mantell L., Fein A.M., Horowitz S. 1996. Cellular oxygen toxicity. Oxidant injury without apoptosis. J Biol Chem., 271(25): 15182-6.
395. Κεραμάρης Κ. 1999. Ανίχνευση, χαρακτηρισμός και συγκριτική μελέτη των υπεροξειδάσων στα ωοθυλάκια των εντόμων Drosophila melanogaster, Dacus oleae, Ceratitis capitata. Συσχέτιση με άλλες υπεροξειδάσες. Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Αθηνών
396. Kerr J.F.R., Wyllie A.H., Currie A.R. 1972. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer, 26: 239-257.
397. Kesari K.K., Kumar S., Nirala J., Siddiqui M.H., Behari J. 2012. Biophysical Evaluation of Radiofrequency Electromagnetic Field Effects on Male Reproductive Pattern. Cell Biochem Biophys. [Epub ahead of print].
398. Kharbanda S., Saxena S., Yoshida K., Pandey P., Kaneki M., Wang Q., Cheng K., Chen Y., Campbell A., Sudha T., Yuan Z., Narula J., Weichselbaum R., Nalin C., Kufe D. 2000. Translocation of SAPK/JNK to mitochondria and interaction with Bcl-x(L) in response to DNA damage. J Biol Chem, 275: 322–327
399. Khetani R.S. and Bickel S.E. 2007. Regulation of meiotic cohesion and chromosome core morphogenesis during pachytene in Drosophila oocytes. J Cell Sci, 120: 3123–37
400. Khurana V.G., Hardell L., Everaert J., Bortkiewicz A., Carlberg M., Ahonen M. 2010. Epidemiological evidence for a health risk from mobile phone base stations. Int J Occup Environ Health., 16: 263-7.
401. Kim J.A., Kang Y.S., Lee Y.S. 2003. Role of Ca2+-activated Cl) channels in the mechanism of apoptosis induced by cyclosporin A in a human hepatoma cell line. Biochem Biophys Res. Commun., 309: 291–297
402. Kim Y.K., Kim H.J., Kwon C.H., Kim J.H., Woo J.S., Jung J.S., Kim J.M. 2005. Role of ERK activation in cisplatin-induced apoptosis in OK renal epithelial cells. J Appl Toxicol., 25: 374-82.
403. Kim Y.I., Ryu T., Lee J., Heo Y.S., Ahnn J., Lee S.J., Yoo O. 2010. A genetic screen for modifiers of Drosophila caspase Dcp-1 reveals caspase involvement in autophagy and novel caspase-related genes. BMC Cell Biol., 11: 9.
404. King R.C., Aggarwal S.K., Aggarwal U. 1968. The development of the female Drosophila reproductive system. J Morphol 124(2): 143–66.
405. King R.C. 1970. Ovarian Development in Drosophila melanogaster. Academic Press.
406. Kirilly D., Spana E.P., Perrimon N., Padgett R.W., Xie T. 2005. BMP signaling is required for controlling somatic stem cell self-renewal in the Drosophila ovary. Dev Cell, 9(5): 651–62.
407. Klamt F., Zdanov S., Levine R. L., Pariser A., Zhang Y. Q., Zhang B. L., Yu L. R., Veenstra T. D., Shacter E. 2009. Oxidant-induced apoptosis is mediated by oxidation of the actin regulatory protein cofilin.

Nat. Cell Biol. 11, 1241–1246
408. Knott A.B., Perkins G., Schwarzenbacher R., Bossy-Wetzel E. 2008. Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. Nat Rev Neurosci., 9(7): 505-18.
409. Kobayashi S., Yamashita K., Takeoka T., Ohtsuki T., Suzuki Y., Takahashi R., Yamamoto K., Kaufmann S.H., Uchiyama T., Sasada M., Takahashi A. 2002. Calpain-mediated Xlinked inhibitor of apoptosis degradation in neutrophil apoptosis and its impairment in chronic neutrophilic leukemia. J Biol Chem, 277: 33968–33977
410. Koch E.A. and King R.C. 1966. The origin and early differentiation of the egg chamber of Drosophila melanogaster. J Morphol, 119(3): 283–303.
411. Komary Z., Tretter L., Adam-Vizi V. 2008. H2O2 generation is decreased by calcium in isolated brain mitochondria. Biochim Biophys Acta, 1777: 800-807.
412. Κομητοπούλου Κ., Κουγιανού Σ. 1992. Μοριακή Βιολογία Ανάπτυξης. Πανεπιστήμιο Αθηνών
413. Kothakota S., Azuma T., Reinhard C., Klippel A., Tang J., Chu K., McGarry T.J., Kirschner M. W. Koths K., Kwiatkowski D.J., Williams L.T. 1997. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. Science 278: 294-298.
414. Kourie J.I. 1998. Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. Am J Physiol. 275: C1-24.
415. Kourtis N. and Tavernarakis N. 2009. Autophagy and cell death in model organisms. Cell Death Differ., 16(1):21-30.
416. Kowaltowski A.J., Castilho R.F., Vercesi A.E. 1995. Ca2+-induced mitochondrial-membrane permeabilization – role of coenzyme-Q redox state. Am J Physiol Cell Physiol, 269: C141-C147.
417. Kowaltowski A.J., Castilho R.F., Vercesi A.E. 2001. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. FEBS Lett, 495: 12–15
418. Kowaltowski A.J., de Souza-Pinto N.C., Castilho R.F., Vercesi A.E. 2009. Mitochondria and reactive oxygen species. Free Radic Biol Med., 47: 333-43.
419. Köylü H., Mollaoglu H., Ozguner F., Naziroglu M., Delibas N. 2006. Melatonin modulates 900 Mhz microwave-induced lipid peroxidation changes in rat brain. Toxicol Ind Health. 22(5): 211-6.
420. Krause C.M., Sillanmäki L., Koivisto M., Häggqvist A., Saarela C., Revonsuo A., Laine M., Hämäläinen H. 2000. Effects of electromagnetic fields emitted by cellular phones on the electroencephalogram during a visual working memory task. Int J Radiat Biol., 76: 1659-67.
421. Krause C.M., Björnberg C.H., Pesonen M., Hulten A., Liesivuori T., Koivisto M., Revonsuo A., Laine M., Hämäläinen H. 2006. Mobile phone effects on children's event-related oscillatory EEG during an auditory memory task. Int J Radiat Biol., 82: 443-50.
422. Kroemer G. 1997. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. Nat Med., 3:614-620.
423. Kroemer G., Dallaporta B., Resche-Rigon M. 1998. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. Annu Rev Physiol, 60: 619–642
424. Kroemer G. and Jaattela M. 2005. Lysosomes and autophagy in cell death control. Nat Rev Cancer, 5: 886–897
425. Kroemer G. and Reed J.C. 2000. Mitochondrial control of cell death. Nat Med, 6: 513–519
426. Kroemer G. and Martin S.J. 2005. Caspase-independent cell death. Nat Med, 11: 725–730
427. Kroemer G., Galluzzi L., Brenner C. 2007. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. Physiol Rev., 87(1): 99-163
428. Kruman I., Guo Q., Mattson M.P. 1998. Calcium and reactive oxygen species mediate staurosporine-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in PC12 cells. J Neurosci Res, 51: 293–308.
429. Krysko D.V., Diez-Fraile A., Criel G., Svistunov A.A., Vandenabeele P., D'Herde K. 2008. Life and death of female gametes during oogenesis and folliculogenesis. Apoptosis, 13: 1065–87.
430. Kubli E. 1996. The *Drosophila* sex-peptide: a peptide pheromone involved in reproduction. Advances in Developmental Biochemistry 4, 99–128.
431. Kubota C., Torii S., Hou N., Saito N., Yoshimoto Y., Imai H., Takeuchi T. 2010. Constitutive reactive oxygen species generation from autophagosome/lysosome in neuronal oxidative toxicity. J Biol Chem., 285: 667-74.
432. Kugler J.M. and Lasko P. 2009. Localization, anchoring and translational control of oskar, gurken, bicoid and nanos mRNA during Drosophila oogenesis. Fly (Austin), 3(1): 15-28.
433. Kumar S. 1997. The Bcl-2 family of proteins and activation of ICE-CED-3 family of proteases: a balancing act in apoptosis? Cell Death Differ., 4: 2-3
434. Kumar S. 1999. Mechanisms mediating caspase activation in apoptosis. Cell Death Differ., 6: 1060-1066. Review
435. Kumar S. and Doumanis J. 2000. The fly caspases. Cell Death Differ. 7: 1039-1044.
436. Kundi M. 2004. Mobile phone use and cancer, Occup Environ Med,, 61: 560-570.

437. Kunzelmann K. 2005. Ion Channels and Cancer. J. Membrane Biol., 205: 159–173.
438. Kurinna S.M., Tsao C.C., Nica A.F., Jiffar T., Ruvolo P.P. 2004. Ceramide promotes apoptosis in lung cancer-derived A549 cells by a mechanism involving c-Jun NH2-terminal kinase. Cancer Res, 64: 7852–7856
439. Kurz T., Terman A., Gustafsson B., Brunk U.T. 2008. Lysosomes and oxidative stress in aging and apoptosis. Biochim Biophys Acta., 1780(11): 1291-303
440. Kusano H., Shimizu S., Koya R.C., Fujita H., Kamada S., Kuzumaki N., Tsujimoto Y. 2000. Human gelsolin prevents apoptosis by inhibiting apoptotic mitochondrial changes via closing VDAC. Oncogene, 19: 4807–4814
441. Kuwana T., Mackey M.R., Perkins G., Ellisman M.H., Latterich M., Schneiter R., Green D.R., Newmeyer D.D. 2002. Bid, Bax, lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. Cell, 111: 331–342
442. Kurz T., Terman A., Gustafsson B., Brunk U. T. 2008. Lysosomes and oxidative stress in aging and apoptosis. Biochim. Biophys. Acta., 1780: 1291–1303.
443. Kwee S. and Raskmark P. 1998. Changes in cell proliferation due to environmental nonionizing radiation: 2. Microwave radiation. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 44: 251-255.
444. Kwintkiewicz J. and Giudice L.C. 2009. The interplay of insulin-like growth factors, gonadotropins, and endocrine disruptors in ovarian follicular development and function. Semin Reprod Med., 27: 43–51.
445. Kwon M.S., Vorobyev V., Kännälä S., Laine M., Rinne J.O., Toivonen T., Johansson J., Teräs M., Lindholm H., Alanko T., Hämäläinen H. 2011. GSM mobile phone radiation suppresses brain glucose metabolism. J Cereb Blood Flow Metab. 31(12): 2293-301
446. LaFever L. and Drummond-Barbosa D. 2005. Direct control of germline stem cell division and cyst growth by neural insulin in Drosophila. Science, 309: 1071–3.
447. LaFerla F.M. 2002. Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. Nat Rev Neurosci., 3(11): 862-72. Review.
448. Lai J.CK., Dilorenzo J.C., Sheu K.FR. 1988. Pyruvatedehydrogenase complex is inhibited in calcium-loaded cerebrocortical mitochondria. Neurochem Res., 13: 1043-1048.
449. Lai H. and Singh N.P. 1995. Acute low-intensity microwave exposure increases DNA single-strand breaks in rat brain cells. Bioelectromagnetics, 16: 207-210.
450. Lai H. and Singh N.P. 1996. Single- and double-strand DNA breaks in rat brain cells after acute exposure to radiofrequency electromagnetic radiation. Int J Radiat Biol., 69: 513-21.
451. Lai H. and Singh N.P. 1997. Melatonin and a spin-trap compound block radiofrequency electromagnetic radiation-induced DNA strand breaks in rat brain cells. Bioelectromagnetics, 18: 446-54.
452. Lai H. 1998. Neurological effects of radiofrequency electromagnetic radiation, in: Mobile Phones and Health, Symposium, October 25–28, University of Vienna, Austria (http://www.waveguide.org/library/lai.html)
453. Lai H. and Singh N.P. 2004. Magnetic-field-induced DNA strand breaks in brain cells of the rat. Environ Health Perspect., 112: 687-94.
454. Lang F., Gulbins E., Szabo I., Lepple-Wienhues A., Huber S.M., Duranton C., Lang K.S., Lang P.A., Wieder T. 2004. Cell volume and the regulation of apoptotic cell death. J Mol. Recognit., 17: 473–480
455. Lantow M., Lupke M., Frahm J., Mattsson M.O., Kuster N., Simko M. 2006. ROS release and Hsp70 expression after exposure to 1,800 MHz radiofrequency electromagnetic fields in primary human monocytes and lymphocytes. Radiat Environ Biophys., 45: 55-62.
456. Lantz V., Chang J.S., Horabin J.I., Bopp D., Schedl P. 1994. The Drosophila orb RNA-binding protein is required for the formation of the egg chamber and establishment of polarity. Genes Dev., 8(5): 598-613.
457. Lassing I., Schmitzberger F., Bjornstedt M., Holmgren A., Nordlund P., Schutt C. E., Lindberg, U. 2007. Molecular and structural basis for redox regulation of β-actin. J. Mol. Biol., 370: 331–348
458. Laundrie B., Peterson J.S., Baum J.S., Chang J.C., Fileppo D., Thompson S.R., McCall K. 2003. Germline cell death in inhibited by P element insertions in the dcp-1/pita nested gene pair in Drosophila. Genetics, 165: 1881–1888.
459. La Vignera S., Condorelli R.A., Vicari E., D'Agata R., Calogero A.E. 2012. Effects of the exposure to mobile phones on male reproduction: a review of the literature. J Androl., 33(3): 350-6.
460. Lavin M.F., Watters D., Song Q. 1996. Role of protein kinase activity in apoptosis. Experientia, 52: 979–994.
461. Lee C.Y., Cooksey B.A., Baehrecke E.H. 2002. Steroid regulation of midgut cell death during Drosophila development. Dev Biol., 250: 101–111.

462. Lee J.W. and Juliano R. 2004. Mitogenic signal transduction by integrin- and growth factor receptor-mediated pathways. Mol Cells., 17(2): 188-202.
463. Lee S., Johnson D., Dunbar K., Dong H., Ge X., Kim Y.C., Wing C., Jayathilaka N., Emmanuel N., Zhou C.Q. 2005. 2.45 GHz radiofrequency fields alter gene expression in cultured human cells. FEBS Lett, 579: 4829-36.
464. Lee J. H., Koh H., Kim M., Park J., Lee S. Y., Lee S., Chung, J. 2006. JNK pathway mediates apoptotic cell death induced by tumor suppressor LKB1 in Drosophila. Cell Death Differ., 13: 1110-1122
465. Lee K.S., Choi J.S., Hong S.Y., Son T.H., Yu K. 2008. Mobile phone electromagnetic radiation activates MAPK signaling and regulates viability in Drosophila. Bioelectromagnetics, 29: 371-9.
466. Lee K.S., Iijima-Ando K., Iijima K., Lee W.J., Lee J.H., Yu K., Lee D.S. 2009. JNK/FOXO-mediated neuronal expression of fly homologue of peroxiredoxin II reduces oxidative stress and extends life span. J Biol Chem., 284(43): 29454-61.
467. Lee H.J., Pack J.K., Kim T.H., Kim N., Choi S.Y., Lee J.S., Kim S.H., Lee Y.S. 2010. The lack of histological changes of CDMA cellular phone-based radio frequency on rat testis. Bioelectromagnetics, 31: 528-34.
468. Lemasters J.J. 1999. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. Am. J. Physiol., 276: G1–G6.
469. Lemasters J.J., Theruvath T.P., Zhong Z., Nieminen A.L. 2009. Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death. Biochim Biophys Acta, 1787(11): 1395-401.
470. Leszczynski D., Joenväärä S., Reivinen J., Kuokka R. 2002. Non-thermal activation of the hsp27/p38MAPK stress pathway by mobile phone radiation in human endothelial cells: molecular mechanism for cancer- and blood-brain barrier-related effects. Differentiation, 70: 120-9.
471. Letai A., Bassik M.C., Walensky L.D., Sorcinelli M.D., Weiler S., Korsmeyer S.J. 2002. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. Cancer Cell, 2: 183–192.
472. Leulier F., Rodriguez A., Khush R.S., Abrams J.M., Lemaitre B. 2000. The Drosophila caspase Dredd is required to resist gram-negative bacterial infection. EMBO Rep, 1: 353–358.
473. Levine B. and Yuan J. 2005. Autophagy in cell death: an innocent convict? J Clin Invest., 115: 2679–2688
474. Levitt B. and Lai H. 2010. Biological effects from exposure to electromagnetic radiation emitted by cell tower base stations and other antenna arrays. Environ. Rev., 18: 369–395
475. Levine B. and Kroemer G. 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. Cell, 132(1): 27-42. Review.
476. Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S.M., Ahmad M., Alnemri E.S., Wang X.D. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. Cell, 91: 479–489
477. Liang X.H., Kleeman L.K., Jiang H.H., Gordon G., Goldman J.E., Berry G., Herman B., Levine B. Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. J Virol., 72: 8586–8596, 1998.
478. Liang X.H., Jackson S., Seaman M., Brown K., Kempkes B., Hibshoosh H., Levine B. 1999. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. Nature, 402: 672–676.
479. Liburdy R.P. 1992. Calcium signaling in lymphocytes and ELF fields. Evidence for an electric field metric and a site of interaction involving the calcium ion channel. FEBS Lett., 301(1): 53-9
480. Λιολιούσης Κ.Θ. 1997. Βιολογικές επιδράσεις της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Εκδόσεις Δίαυλος.
481. Lilly M.A. and Spradling A.C. 1996. The Drosophila endocycle is controlled by Cyclin E and lacks a checkpoint ensuring S-phase completion. Genes Dev., 10(19): 2514-26.
482. Lin H. and Spradling A.C. 1993. Germline stem cell division and egg chamber development in transplanted Drosophila germaria. Dev Biol., 159(1): 140-52.
483. Lin H., Yue L., Spradling A.C. 1994. The Drosophila fusome, a germline-specific organelle, contains membrane skeletal proteins and functions in cyst formation. Development, 120(4): 947–56.
484. Lin H. and Spradling A.C. 1997. A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the Drosophila ovary. Development, 124(12): 2463–76.
485. Lin H. 2002. The stem-cell niche theory: lessons from flies. Nat Rev Genet, 3(12): 931–40.
486. Lindström E., Lindström P., Berglund A., Mild K.H., Lundgren E. 1993. Intracellular calcium oscillations induced in a T-cell line by a weak 50 Hz magnetic field. J Cell Physiol., 156(2): 395-8.
487. Lixia S., Yao K., Kaijun W., Deqiang L., Huajun H., Xiangwei G., Baohong W., Wei Z., Jianling L., Wei W. 2006. Effects of 1.8 GHz radiofrequency field on DNA damage and expression of heat shock protein 70 in human lens epithelial cells. Mutat Res., 602: 135-42.
488. Liu X., Zou H., Slaughter C., Wang X. 1997. DFF, a heterodimetric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. Cell, 89: 175-84.

489. Liu X., Yue P., Khuri F.R., Sun S.Y. 2004. p53 upregulates death receptor 4 expression through an intronic p53 binding site. Cancer Res., 64: 5078–5083
490. Liu C.L., Xie L.X., Li M., Durairajan S.S., Goto S., Huang J.D. 2007. Salvianolic acid B inhibits hydrogen peroxide-induced endothelial cell apoptosis through regulating PI3K/Akt signaling. PLoS ONE, 2: e1321
491. Liu YX, Tai JL, Li GQ, Zhang ZW, Xue JH, Liu HS, Zhu H, Cheng JD, Liu YL, Li AM, Zhang Y. 2012. Exposure to 1950-MHz TD-SCDMA electromagnetic fields affects the apoptosis of astrocytes via caspase-3-dependent pathway.
492. Loeffler M., Daugas E., Susin S.A., Zamzami N., Metivier D., Nieminen A.L., Brothers G., Penninger J.M., Kroemer G. 2001. Dominant cell death induction by extramitochondrially targeted apoptosis-inducing factor. FASEB J, 15: 758–767
493. Lönn S., Ahlbom A., Hall P., Feychting M. 2005. Swedish Interphone Study Group.Long-term mobile phone use and brain tumor risk. Am J Epidemiol, 161: 526-535.
494. Lopez-Schier H., St Johnston D. 2001. Delta signaling from the germ line controls the proliferation and differentiation of the somatic follicle cells during Drosophila oogenesis. Genes Dev., 15(11): 1393–405.
495. Lopez-Schier H. 2003. The polarisation of the anteroposterior axis in Drosophila. Bioessays, 25(8): 781–91.
496. Loughran S.P., Wood A.W., Barton J.M., Croft R.J., Thompson B., Stough C. 2005. The effect of electromagnetic fields emitted by mobile phones on human sleep. Neuroreport, 16: 1973-6.
497. Lu B., Ye Z., Deng Y., Wu H., Feng J. 2010. MEK/ERK pathway mediates cytoprotection of salvianolic acid B against oxidative stress-induced apoptosis in rat bone marrow stem cells. Cell Biol Int., 34: 1063-8.
498. Lu Y.S., Huang B.T., Huang Y.X. 2012. Reactive oxygen species formation and apoptosis in human peripheral blood mononuclear cell induced by 900 MHz mobile phone radiation, Oxid Med Cell Longev., 2012: 740280.
499. Luther P.W., Peng H.B., Lin J.J. 1983. Changes in cell shape and actin distribution induced by constant electric fields. Nature, 303: 61–64.
500. Lyle D.B., Wang X.H., Ayotte R.D., Sheppard A.R., Adey W.R. 1991. Calcium uptake by leukemic and normal T-lymphocytes exposed to low frequency magnetic fields. Bioelectromagnetics, 12(3): 145-56.
501. Lynch K., Fernandez G., Pappalardo A., Peluso J.J. 2000. Basic fibroblast growth factor inhibits apoptosis of spontaneously immortalized granulosa cells by regulating intracellular free calcium levels through a protein kinase Cdelta-dependent pathway. Endocrinology, 141: 4209–4217
502. Macomber L., Rensing C., Imlay, J. A. 2007. Intracellular copper does not catalyze the formation of oxidative DNA damage in Escherichia coli. J. Bacteriol., 189: 1616–1626
503. Magras I.N. and Xenos T.D. 1997. RF radiation-induced changes in the prenatal development of mice. Bioelectromagnetics, 18: 455–461.
504. Mahajan-Miklos S. and Cooley L. 1994. Intercellular cytoplasm transport during Drosophila oogenesis. Dev Biol., 165: 336-351.
505. Mahowald A.P. 1972. Ultrastructural observations on oogenesis in Drosophila. J Morphol., 137: 29-48
506. Mahowald A.P., Caulton J.H., Edwards M.K., Floyd A.D. 1979. Loss of centrioles and polyploidization in follicle cells of Drosophila melanogaster. Exp Cell Res., 118(2): 404-10.
507. Mahowald, A.P. and Kambysellis, M. P. 1980. Oogenesis. In The Genetics and Biology of Drosophila vol. 2D (eds M. Ashburner and T. Wright) pp. 141-224. New York: Academic Press.
508. Mahowald A.P. 2001. Assembly of the Drosophila germ plasm. Int Rev Cytol., 203: 187-213. Review.
509. Mailankot M., Kunnath A.P., Jayalekshmi H., Koduru B., Valsalan R. 2009. Radio frequency electromagnetic radiation (RF-EMR) from GSM (0.9/1.8GHz) mobile phones induces oxidative stress and reduces sperm motility in rats. Clinics (Sao Paulo). 64: 561-5.
510. Maines J.Z., Stevens L.M., Tong X., Stein D. 2004. Drosophila dMyc is required for ovary cell growth and endoreplication. Development, 131(4): 775–86.
511. Maiuri M.C., Le Toumelin G., Criollo A., Rain J.C., Gautier F., Juin P., Tasdemir E., Pierron G., Troulinaki K., Tavernarakis N., Hickman J.A., Geneste O., Kroemer G. 2007. Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. Embo J, 26: 2527–2539.
512. Malli R. and Graier W.F. 2010. Mitochondrial Ca2+ channels: Great unknowns with important functions. FEBS Lett. 584(10): 1942-7.
513. Malyapa R.S., Ahern E.W., Straube W.L., Moros E.G., Pickard W.F., Roti Roti J.L. 1997a. Measurement of DNA damage after exposure to 2450 MHz electromagnetic radiation, Radiation Research, 148: 608-617.
514. Malyapa R.S., Ahern E.W., Straube W.L., Moros E.G., Pickard W.F., Roti Roti J.L. 1997b. Measurement

of DNA damage after exposure to electromagnetic radiation in the cellular phone communication frequency band, (835.62 and 847.74 MHz), Radiation Research, 148: 618-627.
515. Mancinelli F., Caraglia M., Abbruzzese A., d'Ambrosio G., Massa R., Bismuto E. 2004. Nonthermal effects of electromagnetic fields at mobile phone frequency on the refolding of an intracellular protein: myoglobin. J Cell Biochem., 93: 188-96.
516. Mancini M., Nicholson D.W., Roy S., Thornberry N.A., Peterson E.P., Casciola-Rosen L.A., Rosen A. 1998. The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signalling. J Cell Biol., 140: 485-95.
517. Mandic A., Viktorsson K., Strandberg L., Heiden T., Hansson J., Linder S., Shoshan M.C. 2002. Calpain-mediated Bid cleavage and calpain-independent Bak modulation: two separate pathways in cisplatin-induced apoptosis. Mol Cell Biol., 22: 3003–3013.
518. Μαργαρίτης Λ.Χ. 1974. Συμβολή στη μελέτη του σχηματισμού του χορίου στα ωοθυλάκια της Drosophila melanogaster. Διδακτορική διατριβή. Πανεπιστήμιο Αθηνών.
519. Μαργαρίτης Λ.Χ. 1980. Η χοριογένεση στη Drosophila melanogaster. Ένα πρότυπο σύστημα για τη μελέτη της κυτταρικής διαφοροποίησης. Διατριβή επί υφηγεσία. Πανεπιστήμιο Αθηνών.
520. Margariris L.H, Kafatos F.C, Petri W.H. 1980. The eggshell of Drosophila melanogaster. I. Fine structure of the layers and regions of the wild-type eggshell. J Cell Sci. 43: 1-35.
521. Μαργαρίτης Λ.Χ. 1996. Ραδιοβιολογία, Ακτινοβολίες και Ζωή. Πανεπιστήμιο Αθηνών.
522. Μαργαρίτης Λ.Χ., Γαλανόπουλος Β.Κ., Κεραμάρης Κ.Ε., Μαρίνος Ε.Σ., Παπασιδέρη Ι.Σ., Στραβοπόδης Δ.Ι., Τρουγκάκος Ι.Π. 2004. Βιολογία Κυττάρου, 4η Έκδοση. Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας
523. Margaritis L.H. 1985. Structure and physiology of the eggshell. In: Gilbert LI. and Kerkut GA, editors Comprehensive insect biochemistry, physiology and Pharmacology, Vol. 1 .Oxford and New York: Pergammon Press, p 151-230.
524. Margaritis. L.H. 1986. The eggshell of Drosophila melanogaster. New staging characteristics and fine structural analysis of choriogenesis, Can J Zool, 64: 2152–2175.
525. Margaritis L.H. and Mazzini M. 1998. Structure of the egg. In: Harrison FW, Locke M (eds) Microscopic Anatomy of lnvetebrates. vol 11C "Insecta". Wiley-Liss Publ, New York, pp 995- 1037.
526. Margolis J., Spradling A. 1995. Identification and behavior of epithelial stem cells in the Drosophila ovary. Development, 121(11): 3797–807.
527. Mariani B.D., Lingappa J.R., Kafatos F.C. 1988. Temporal regulation in development: negative and positive cis regulators dictate the precise timing of expression of a *Drosophila* chorion gene. Proc Natl Acad Sci USA, 85: 3029–3033.
528. Markkanen A., Penttinen P., Naarala J., Pelkonen J., Sihvonen A.P., Juutilainen J. 2004. Apoptosis induced by ultraviolet radiation is enhanced by amplitude modulated radiofrequency radiation in mutant yeast cells. Bioelectromagnetics, 25: 127-133.
529. Markova E., Hillert L., Malmgren L., Persson B.R., Belyaev I.Y. 2005. Microwaves from GSM mobile telephones affect 53BP1 and gamma-H2AX foci in human lymphocytes from hypersensitive and healthy persons. Environ Health Perspect., 113: 1172-7.
530. Marnett L.J., Riggins J. N., West J.D. 2003. Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. J. Clin. Invest., 111: 583–593
531. Martin S.J. 2002. Destabilizing influences in apoptosis: sowing the seeds of IAP destruction. Cell, 109: 793-796.
532. Martin S. G., Leclerc V., Smith-Litière K., St Johnston D. 2003. The identification of novel genes required for *Drosophila* anterior-posterior axis formation in a germline clone screen using GFP-Staufen. Development, 130(17): 4201-15.
533. Martin D.N. and Baehrecke E.H. 2004. Caspases function in autophagic programmed cell death in Drosophila. Development, 131: 275–284.
534. Martindale J.L., Holbrook N.J. 2002. Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival. J Cell Physiol., 192: 1–15.
535. Martinez A., Portero-Otin M., Pamplona R., Ferrer I. 2010. Protein targets of oxidative damage in human neurodegenerative diseases with abnormal protein aggregates. Brain Pathol., 20: 281-9.
536. Marzo I., Brenner C., Zamzami N., Jurgensmeier J.M., Susin S.A., Vieira H.L., Prevost M.C., Xie Z., Matsuyama S., Reed J.C., Kroemer G. 1998. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. Science, 281: 2027–2031.
537. Mashevich M., Folkman D., Kesar A., Barbul A., Korenstein R., Jerby E., Avivi L. 2003. Exposure of human peripheral blood lymphocytes to electromagnetic fields associated with cellular phones leads to chromosomal instability. Bioelectromagnetics, 24: 82-90.
538. Maskey D., Pradhan J., Aryal B., Lee C.M., Choi I.Y., Park K.S., Kim S.B., Kim H.G., Kim M.J. 2010. Chronic 835-MHz radiofrequency exposure to mice hippocampus alters the distribution of calbindin and

GFAP immunoreactivity. Brain Res., 1346: 237-46.
539. Mattson M.P., Chan S.L. 2001. Dysregulation of cellular calcium homeostasis in Alzheimer's disease: bad genes and bad habits. J Mol Neurosci., 17(2): 205-24. Review.
540. Mattson M.P., Chan S.L., Camandola S. 2001. Presenilin mutations and calcium signaling defects in the nervous and immune systems. Bioessays, 23(8): 733-44.
541. Mattson M.P., Chan S.L. 2003. Calcium orchestrates apoptosis. Nature Cell Biology, 5: 1041-1043.
542. Mattson M.P. 2004. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. Nature, 430(7000): 631-9. Review.
543. Mattson M.P. 2007. Calcium and neurodegeneration. Aging Cell. 6(3): 337-50. Review
544. Matova N., Mahajan-Miklos S., Mooseker M.S., Cooley L. 1999. Drosophila quail, a villin-related protein, bundles actin filaments in apoptotic nurse cells. Development, 126(24): 5645-57.
545. Matsuzawa A., Ichijo H. 2005. Stress-responsive protein kinases in redox-regulated apoptosis signaling. Antioxid Redox Signal., 7(3-4): 472-81. Review.
546. Mausset-Bonnefont A.L., Hirbec H., Bonnefont X., Privat A., Vignon J., de Sèze R. 2004. Acute exposure to GSM 900-MHz electromagnetic fields induces glial reactivity and biochemical modifications in the rat brain. Neurobiol Dis., 17: 445-54.
547. Mazzalupo S. and Cooley L. 2006. Illuminating the role of caspases during Drosophila oogenesis. Cell Death Differ., 13: 1950–9.
549. 548. McCaig C.D., Rajnicek A.M., Song B., Zhao M. 2005. Controlling cell behavior electrically: current views and future potential. Physiol Rev., 85(3): 943-78.
550. McCaig C.D., and Zhao, M. 1997. Physiological electrical fields modify cell behavior. Bioessays, 19: 819–826.
551. McCaig C.D., and Dover C.D. 1991. Factors influencing perpendicular elongation of embryonic frog muscle cells in a small applied electric field. J. Cell Sci., 98: 497–506.
552. McCall K. and Steller H. 1998. Requirement for DCP-1 caspase during Drosophila oogenesis. Science, 279: 230-234.
553. McCall K. 2004. Eggs over easy: cell death in the Drosophila ovary, Developmental Biology, 274: 3-14.
554. McCall K. 2011. Genetic control of necrosis - another type of programmed cell death. Curr Opin Cell Biol., (6): 882-8
555. McCormack J.G. and Denton R.M. 1979. Effects of calcium ions and adenine-nucleotides on the activity of pig-heart 2- oxoglutarate dehydrogenase complex Biochem J., 180: 533-544.
556. McCormack J.G. and Denton R.M. 1990. The role of mitochondrial Ca2+ transport and matrix Ca2+ in signal transduction in mammalian tissues. Biochim Biophys Acta., 1018(2-3): 287-91. Review.
557. McGregor J.R., Xi R., Harrison D.A. 2002. JAK signaling is somatically required for follicle cell differentiation in Drosophila. Development, 129(3): 705–17.
558. Mebratu Y. and Tesfaigzi Y. 2009. How ERK1/2 Activation Controls Cell Proliferation and Cell Death Is Subcellular Localization the Answer? Cell Cycle, 8: 1168–1175.
559. Medicherla B. and Goldberg A. L. 2008. Heat shock and oxygen radicals stimulate ubiquitin-dependent degradation mainly of newly synthesized proteins. J. Cell Biol., 182: 663–673
560. Mehrotra S., Maqbool S.B., Kolpakas A., Murnen K., Calvi B.R. 2008. Endocycling cells do not apoptose in response to DNA rereplication genotoxic stress. Genes Dev., 22: 3158–71.
561. Meier P., Silke J., Leevers S.J., Evan G.I. 2000. The Drosophila caspase DRONC is regulated by DIAPI. EMBO J., 19: 598-611.
562. Melendez A. and Neufeld T.P. 2008. The cell biology of autophagy in metazoans: a developing story. Development, 135: 2347–60.
563. Meo S.A., Al-Drees A.M., Husain S., Khan M.M., Imran M.B. 2010. Effects of mobile phone radiation on serum testosterone in Wistar albino rats. Saudi Med J., 30: 869-73.
564. Meral I., Mert H., Mert N., Deger Y., Yoruk I., Yetkin A., Keskin S. 2007. Effects of 900-MHz electromagnetic field emitted from cellular phone on brain oxidative stress and some vitamin levels of guinea pigs. Brain Res., 1169: 120-4.
565. Μεσσήνη-Νικολάκη Ν. 1982. Ωογένεση στη Drosophila melanogaster. Συμβολή στη μελέτη της βιτελλογένεσης και χοριογένεσης. Διδακτορική διατριβή. Πανεπιστήμιο Αθηνών
566. Meltz M.L. 2003. Radiofrequency exposure and mammalian cell toxicity, genotoxicity, and transformation, Bioelectromagnetics, suppl. 6: 196-213.
567. Mildaziene V., Baniene R., Nauciene Z., Bakker B.M., Brown G.C., Westerhoff H.V., Kholodenko B.N. 1995. Calcium indirectly increases the control exerted by the adenine nucleotide translocator over 2-

oxoglutarate oxidation in rat heart mitochondria. Arch Biochem Biophys., 324: 130-134.
568. Mills J.C., Stone N.L., Erhardt J., Pittman R.N. 1998. Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. J Cell Biol., 140: 627-636.
569. Mills J.C., Stone N.L., Pittman R.N. 1999. Extranuclear apoptosis. The role of the cytoplasm in the execution phase. J. Cell Biol., 146: 703-708.
570. Mitra K., Rikhy R., Lilly M., Lippincott-Schwartz J. 2012. DRP1-dependent mitochondrial fission initiates follicle cell differentiation during Drosophila oogenesis. J Cell Biol., 197(4): 487-97.
571. Modjtahedi N., Giordanetto F., Madeo F., Kroemer G. 2006. Apoptosis- inducing factor: vital and lethal. Trends Cell Biol., 16: 264–272
572. Montagne J., Stewart M.J., Stocker H., Hafen E., Kozma S.C., Thomas G. 1999. Drosophila S6 kinase: a regulator of cell size. Science, 285: 2126–9.
573. Montell D.J., Rorth P., Spradling A.C. 1992. slow border cells, a locus required for a developmentally regulated cell migration during oogenesis, encodes Drosophila C/EBP. Cell, 71(1): 51-62.
574. Mortazavi S.M., Rouintan M.S., Taeb S., Dehghan N., Ghaffarpanah A.A., Sadeghi Z., Ghafouri F. 2012. Human short-term exposure to electromagnetic fields emitted by mobile phones decreases computer-assisted visual reaction time. Acta Neurol Belg. 112(2): 171-5.
575. Moshitzky P., Fleischmann I., Chaimov N., Saudan P., Klauser S., Kubli E., Applebaum S.W. 1996. Sex-peptide activates juvenile hormone biosynthesis in the Drosophila melanogaster corpus allatum. Arch Insect Biochem Physiol., 32(3-4): 363-74.
576. Moulder J.E., Erdreich L.S., Malyapa R.S., Merritt J., Pickard W.F., Vijayalaxmi. 1999. Cell Phones and Cancer. What is the Evidence for a Connection? Radiat Res., 151: 513-531.
577. Moustafa Y.M., Moustafa R.M., Belacy A., Abou-El-Ela S.H., Ali F.M. 2001. Effects of acute exposure to the radiofrequency fields of cellular phones on plasma lipid peroxide and antioxidase activities in human erythrocytes. J Pharm Biomed Anal., 26(4): 605-8.
578. Murata T., Ishibashi, T., Hajime, I. 1993. Localizations of epidermal growth factor and proliferating cell nuclear antigen during corneal wound healing. Graefe’s Arch. Clin. Exp. Ophthalmol., 231: 104–108.
579. Muro I., Berry D.L., Huh J.R., Chen C.H., Huang H., Yoo S.J., Guo M., Baehrecke E.H., Hay B.A. 2006. The Drosophila caspase Ice is important for many apoptotic cell deaths and for spermatid individualization, a nonapoptotic process. Development, 133: 3305–3315.
580. Murphy A.M., Montell D.J. 1996. Cell type-specific roles for Cdc42, Rac, and RhoL in Drosophila oogenesis. J Cell Biol., 133(3): 617-30.
581. Muscat J.E., Malkin M.G., Thompson S., Shore R.E., Stellman S.D., McRee D., Neugut A.I., Wynder E.L. 2000. Handheld cellular telephone use and risk of brain cancer. JAMA., 284(23): 3001-7.
582. Muscat J.E., Malkin M.G., Shore R.E., Thompson S., Neugut A.I., Stellman S.D., Bruce J. 2002. Handheld cellular telephones and risk of acoustic neuroma. Neurology, 58: 1304-6.
583. Nagata S. 1997. Apoptosis by death factor. Cell, 88: 355-365.
584. Nakagawa T. and Yuan J. 2000. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. J Cell Biol., 150: 887–894
585. Nakagawa T., Zhu H., Morishima N., Li E., Xu J., Yankner B.A., Yuan J. 2000. Caspase-12 mediates endoplasmicreticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. Nature, 403: 98–103.
586. Nakagawa T., Shimizu S., Watanabe T., Yamaguchi O., Otsu K., Yamagata H., Inohara H., Kubo T., Tsujimoto Y. 2005. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. Nature, 434: 652–658,.
587. Nakano Y., Fujitani K., Kurihara J., Ragan J., Usui-Aoki K., Shimoda L., Lukacsovich T., Suzuki K., Sezaki M., Sano Y., Ueda R., Awano W., Kaneda M., Umeda M., Yamamoto D. 2001. Mutations in the novel membrane protein spinster interfere with programmed cell death and cause neural degeneration in Drosophila melanogaster. Mol Cell Biol 21: 3775-88.
588. Naor Z., Benard O., Seger R. 2000. Activation of MAPK cascades by G-protein-coupled receptors: the case of gonadotropin-releasing hormone receptor. Trends Endocrinol. Metab., 11: 91–99
589. Navarro Enrique A., Segura J., Portolés M., Claudio Gómez- Perretta de Mateo, 2003. The Microwave Syndrome: A Preliminary Study in Spain, Electromagnetic Biology and Medicine, 22: 161-169.
590. Nazıroğlu M., Ciğ B., Doğan S., Uğuz A.C., Dilek S., Faouzi D. 2012. 2.45-Gz wireless devices induce oxidative stress and proliferation through cytosolic Ca^{2+} influx in human leukemia cancer cells. Int J Radiat Biol. 88(6): 449-56.
591. Nemoto S., Takeda K., Yu Z.X., Ferrans V.J., Finkel T. 2000. Role for mitochondrial oxidants as regulators of cellular metabolism. Mol Cell Biol., 20: 7311–8.
592. Nezis I.P., Stravopodis D.J., Papassideri I., Robert-Nicoud M., Margaritis L.H. 2000. Stage specific apoptotic patterns during Drosophila oogenesis. Eur J Cell Biol., 79: 610-620.
593. Nezis I.P., Stravopodis D.J., Papassideri I., Margaritis L.H. 2001. Actin cytoskeleton reorganization of the

apoptotic nurse cells during the late developmental stages of oogenesis in Dacus oleae, Cell Motil Cytoskeleton, 48: 224–233.
594. Nezis I.P., Stravopodis D.J., Papassideri I., Robert-Nicoud M., Margaritis L.H. 2002. The dynamics of apoptosis in the ovarian follicle cells during the late stages of Drosophila oogenesis, Cell Tissue Res., 307: 401–409.
595. Νέζης Ι.Π. 2002. Κυτταροβιολογική μελέτη της απόπτωσης κατά τη διάρκεια της ωογένεσης στα Δίπτερα με έμφαση στη Drosophila melanogaster. Διδακτορική διατριβή. Πανεπιστήμιο Αθηνών.
596. Nezis I.P., Stravopodis D.J., Margaritis L.H., Papassideri I.S. 2006. Autophagy is required for the degeneration of the ovarian follicular epithelium in higher Diptera. Autophagy, 2: 297–8.
597. Nezis I.P., Stravopodis D.J., Margaritis L.H., Papassideri I.S. 2006a. Chromatin condensation of ovarian nurse and follicle cells is regulated independently from DNA fragmentation during Drosophila late oogenesis. Differentiation, 74(6): 293-304.
598. Nezis I.P., Lamark T., Velentzas A.D., Rusten T.E., Bjørkøy G., Johansen T., Papassideri I.S., Stravopodis D.J., Margaritis L.H., Stenmark H., Brech A. 2009. Cell death during Drosophila melanogaster early oogenesis is mediated through autophagy. Autophagy, 5: 298-302.
599. Nezis I.P., Shravage B.V., Sagona A.P., Johansen T., Baehrecke E.H., Stenmark H. 2010. Autophagy as a trigger for cell death: autophagic degradation of inhibitor of apoptosis dBruce controls DNA fragmentation during late oogenesis in Drosophila. Autophagy, 6(8): 1214-5.
600. Neuman-Silberberg F.S., Schupbach T. 1993. The Drosophila dorsoventral patterning gene gurken produces a dorsally localized RNA and encodes a TGF alphalike protein. Cell, 75: 165–174.
601. Neuman-Silberberg F.S., Schupbach T. 1996. The Drosophila TGF-alpha-like protein Gurken: expression and cellular localization during Drosophila oogenesis. Mech Dev., 59: 105–113.
602. Neumar R.W., Xu Y.A., Gada H., Guttmann R.P., Siman R. 2003. Cross-talk between calpain and caspase proteolytic systems during neuronal apoptosis. J Biol Chem., 278(16): 14162-7
603. Nias A.H.W. 1998. An Introduction to Radiobiology, 2nd ed., J. Wiley & sons
604. Nicholls D.G. 2009. Mitochondrial calcium function and dysfunction in the central nervous system. Biochim Biophys Acta 1787: 1416-1424.
605. Nicotera P. and Orrenius S. 1998. The role of calcium in apoptosis. Cell Calcium, 23: 173–180.
606. Nicotera P., Leist M., Ferrando-May E. 1998. Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. Toxicol Lett., 102–103: 139–142.
607. Niewiadomska P., Godt D., Tepass U. 1999. DE-Cadherin is required for intercellular motility during Drosophila oogenesis. J Cell Biol., 144(3): 533–47.
608. Nikolova T., Czyz J., Rolletschek A., Blyszczuk P., Fuchs J., Jovtchev G., Schuderer J., Kuster N., Wobus A.M. 2005. Electromagnetic fields affect transcript levels of apoptosis-related genes in embryonic stem cell-derived neural progenitor cells. ASEB J., 19: 1686-1688
609. Ning W., Xu S.J., Chiang H., Xu Z.P., Zhou S.Y., Yang W., Luo J.H. 2007. Effects of GSM 1800 MHz on dendritic development of cultured hippocampal neurons. Acta Pharmacol Sin. 28(12): 1873-80.
610. Nixon R.A., Saito K.I., Grynspan F., Griffin W.R., Katayama S., Honda T., Mohan P.S., Shea T.B., Beermann M. 1994. Calcium-activated neutral proteinase (calpain) system in aging and Alzheimer's disease. Ann N Y Acad Sci., 747: 77-91. Review.
611. Nuccitelli R. 1988. Physiologic electric fields can influence cell motility, growth, and polarity. Adv. Cell Biol., 2: 213–233.
612. Nylandsted J., Gyrd-Hansen M., Danielewicz A., Fehrenbacher N., Lademann U., Høyer-Hansen M., Weber E., Multhoff G., Rohde M., Jäättelä M. 2004. Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. J. Exp. Med., 200: 425–435.
613. Nylund R. and Leszczynski D. 2004. Proteomics analysis of human endothelial cell line EA.hy926after exposure to GSM 900 radiation. Proteomics, 4: 1359-1365.
614. Nylund R. and Leszczynski D. 2006. Mobile phone radiation causes changes in gene and protein expression in human endothelial cell lines and the response seems to be genome- and proteome-dependent. Proteomics, 6: 4769-4780.
615. Oakes S.A., Scorrano L., Opferman J.T., Bassik M.C., Nishino M., Pozzan T., Korsmeyer S.J. 2005. Proapoptotic BAX and BAK regulate the type 1 inositol trisphosphate receptor and calcium leak from the endoplasmic reticulum. Proc Natl Acad Sci U S A., 102(1): 105-10
616. Oda H., Uemura T., Takeichi M. 1996. Phenotypic analysis of null mutants for DE-cadherin and Armadillo in Drosophila ovaries reveals distinct aspects of their functions in cell adhesion and cytoskeletal organization. Genes to Cells, 2: 29–40.

617. Ohtsuka T., Ryu H., Minamishima Y.A., Macip S., Sagara J., Nakayama K.I., Aaronson S.A., Lee S.W. 2004. ASC is a Bax adaptor and regulates the p53-Bax mitochondrial apoptosis pathway. Nat Cell Biol., 6: 121–128
618. Okada E., Waddington C.H. 1959. The submicroscopic structure of the Drosophila egg. J Embryol Exp Morphol., 7: 583-97.
619. Okada Y., Maeno E., Shimizu T., Dezaki K., Wang J., Morishima S. 2001. Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). J Physiol., 532: 3–16
620. Okada Y., Maeno E., Shimizu T., Manabe K., Mori S., Nabekura T. 2004. Dual roles of plasmalemmal chloride channels in induction of cell death. Pflugers Arch., 448: 287–295
621. Oktem F., Ozguner F., Mollaoglu H., Koyu A., Uz E. 2005. Oxidative damage in the kidney induced by 900-MHz-emitted mobile phone: protection by melatonin. Arch Med Res., 36: 350-5.
622. Ono K., Kim S.O., Han J. 2003. Susceptibility of lysosomes to rupture is a determinant for plasma membrane disruption in tumor necrosis factor alpha-induced cell death. Mol Cell Biol., 23(2): 665-76.
623. Ono T., Saito Y., Komura J., Ikehata H., Tarusawa Y., Nojima T., Goukon K., Ohba Y., Wang J., Fujiwara O., Sato R. 2004. Absence of mutagenic effects of 2.45 GHz radiofrequency exposure in spleen, liver, brain, and testis of lacZ-transgenic mouse exposed in utero. Tohoku J Exp Med., 202: 93-103.
624. Onuma E.K., and Hui S.W. 1988. Electric field-directed cell shape changes, displacement, and cytoskeletal reorganization are calcium dependent. J. Cell. Biol., 106: 2067–2075.
625. Oral B., Guney M., Ozguner F., Karahan N., Mungan T., Comlekci S., Cesur G. 2006. Endometrial apoptosis induced by a 900-MHz mobile phone: preventive effects of vitamins E and C. Adv Ther., 23(6): 957-973.
626. O'Reilly A.M., Lee H.H., Simon M.A. 2008. Integrins control the positioning and proliferation of follicle stem cells in the Drosophila ovary. J Cell Biol., 182(4): 801-15.
627. Ott M., Robertson J.D., Gogvadze V., Zhivotovsky B., Orrenius S. 2002. Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. Proc Natl Acad Sci USA, 99: 1259–1263
628. Ott M., Zhivotovsky B., Orrenius S. 2007. Role of cardiolipin in cytochrome c release from mitochondria. Cell Death Differ., 14: 1243–1247
629. Overall R. and Jaffe L.F. 1985. Patterns of ionic current through Drosophila follicles and eggs. Dev Biol., 108(1): 102-19.
630. Ozguner F., Bardak Y., Comlekci S. 2006. Protective effects of melatonin and caffeic acid phenethyl ester against retinal oxidative stress in long-term use of mobile phone: a comparative study. Mol Cell Biochem., 282: 83-8.
631. Ozgur E., Güler G., Seyhan N. 2010. Mobile phone radiation-induced free radical damage in the liver is inhibited by the antioxidants N-acetyl cysteine and epigallocatechin-gallate. Int J Radiat Biol., 86(11): 935-45.
632. Pacini S., Ruggiero M., Sardi I., Aterini S., Gulisano F., Gulisano M. 2002. Exposure to global system for mobile communication (GSM) cellular phone radiofrequency alters gene expression, proliferation, and morphology of human skin fibroblasts. Oncol Res., 13: 19-24.
633. Pacquelet A. and Rorth P. 2005. Regulatory mechanisms required for DE-cadherin function in cell migration and other types of adhesion. J Cell Biol, 170(5): 803–12
634. Page A.R., Kovacs A., Deak P., Torok T., Kiss I., Dario P., Bastos C., Batista P., Gomes R., Ohkura H., Russell S., Glover D.M. 2005. Spotted-dick, a zinc-finger protein of Drosophila required for expression of Orc4 and S phase. EMBO J., 24: 4304–15.
635. Palmer A.E., Jin C., Reed J.C., Tsien R.Y. 2004. Bcl-2-mediated alterations in endoplasmic reticulum Ca2+ analyzed with an improved genetically encoded fluorescent sensor. Proc Natl Acad Sci USA, 101: 17404–17409.
636. Palumbo R., Brescia F., Capasso D., Sannino A., Sarti M., Capri M., Grassilli E., Scarfì M.R. 2008. Exposure to 900 MHz radiofrequency radiation induces caspase 3 activation in proliferating human lymphocytes. Radiat Res. 170(3): 327-34.
637. Pan K.Z., Palter J.E., Rogers A.N., Olsen A., Chen D., Lithgow G.J., Kapahi P. 2007. Inhibition of mRNA translation extends lifespan in Caenorhabditis elegans. Aging Cell, 6: 111–119
638. Παναγόπουλος Δ.Ι. 2001. Βιολογικές επιδράσεις ηλεκτρομαγνητικών πεδίων. Διδακτορική διατριβή. Πανεπιστήμιο Αθηνών.
639. Panagopoulos D.J., Messini N., Karabarbounis A., Philippetis A.L., Margaritis L.H. 2000a. Radio Frequency Electromagnetic Radiation within “safety levels” Alters the Physiological Function of Insects, In: Kostarakis P, Stavroulakis P, (ed), Millennium International Workshop on Biological Effects of Electromagnetic Fields, Proceedings, Heraklion, Crete, Greece, 169-175, ISBN: 960-86733-0-5.
640. Panagopoulos D.J., Messini N., Karabarbounis A., Filippetis A.L., Margaritis L.H. 2000b. A mechanism for Action of Oscillating Electric Fields on Cells, Biochemical and Biophysical Research Communications,

272: 634-640.
641. Panagopoulos D.J., Karabarbounis, A., Margaritis L.H. 2002. Mechanism for action of electromagnetic fields on cells, Biochem. Biophys. Res. Commun., 298: 95-102.
642. Panagopoulos D.J. and Margaritis L.H. 2003a. Effects of electromagnetic fields on the Reproductive Capacity of Drosophila melanogaster, In: Stavroulakis P. (ed.), Biological Effects of Electromagnetic Fields, Springer, 545-578.
643. Panagopoulos D.J. and Margaritis L.H. 2003b. Theoretical Considerations for the Biological Effects of Electromagnetic Fields, In: Stavroulakis P. (Ed.) “Biological Effects of Electromagnetic Fields”, Springer, 5-33.
644. Panagopoulos D.J., Karabarbounis A., Margaritis L.H. 2004. Effect of GSM 900-MHz Mobile Phone Radiation on the Reproductive Capacity of Drosophila melanogaster, Electromagnetic Biology and Medicine, 23: 29-43.
645. Panagopoulos D.J., Chavdoula E.D., Nezis I.P., Margaritis L.H. 2007a. Cell death induced by GSM 900-MHz and DCS 1800-MHz mobile telephony radiation. Mutation Research, 626(1-2): 69-78.
646. Panagopoulos D.J., Chavdoula E.D., Karabarbounis A., Margaritis L.H. 2007b. Comparison of Bioactivity Between GSM 900 MHz and DCS 1800 MHz Mobile Telephony Radiation. Electromagnetic Biology and Medicine, 26(1): 33-44.
647. Panagopoulos D.J. and Margaritis L.H. 2008. Mobile Telephony radiation effects on living organisms, In: Harper AC and Burees RV (Eds), Mobile Telephones, network applications and performance, Nova Science Publishers Inc, pp.107-149. Review.
648. Panagopoulos D.J., Chavdoula E.D., Margaritis L.H. 2010. Bioeffects of Mobile Telephony Radiation in relation to its Intensity or Distance from the Antenna, International Journal of Radiation Biology, 86: 345-357.
649. Panagopoulos D.J. and Margaritis L.H. 2010a. The Identification of an Intensity “Window” on the Bioeffects of Mobile Telephony Radiation, Int J Radiat Biol., 86: 358-366.
650. Panagopoulos D.J. and Margaritis L.H. 2010b. The Effect of exposure duration on the biological activity of Mobile Telephony Radiation, Mutat. Res., 699: 17-22.
651. Panagopoulos D.J. 2011. Analyzing the health impacts of modern telecommunications microwaves. In: Advances in Medicine and Biology. Volume 17, Nova Science Publishers, Inc.
652. Panov A., Dikalov S., Shalbuyeva N., Hemendinger R., Greenamyre J.T., Rosenfeld J. 2007. Species- and tissuespecific relationships between mitochondrial permeability transition and generation of ROS in brain and liver mitochondria of rats and mice. Am J Physiol Cell Physiol., 292: C708-C718.
653. Parker P.J. and Murray-Rust J. 2004. PKC at a glance. J Cell Sci., 117 (Pt 2): 131-2.
654. Parone P.A., Da Cruz S., Tondera D., Mattenberger Y., James D.I., Maechler P., Barja F., Martinou, J.C. 2008. Preventing mitochondrial fission impairs mitochondrial function and leads to loss of mitochondrial DNA. PLoS One 3, e3257.
655. Pastorino J.G., Tafani M., Farber J.L. 1999. Tumor necrosis factor induces phosphorylation and translocation of BAD through a phosphatidylinositide-3-OH kinase-dependent pathway. J Biol Chem., 274: 19411–19416
656. Paterson J., and O’Hare K. 1991. Structure and transcription of the singed locus of Drosophila melanogaster. Genetics 129: 1073–84
657. Pattingre S., Tassa A., Qu X., Garuti R., Liang X.H., Mizushima N., Packer M., Schneider M.D., Levine B. 2005. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. Cell, 122: 927–939
658. Pattingre S. and Levine B. 2006. Bcl-2 inhibition of autophagy: a new route to cancer? Cancer Res., 66: 2885–2888,
659. Paulraj R. and Behari J. 2006. Single strand DNA breaks in rat brain cells exposed to microwave radiation. Mutat Res., 596: 76-80.
660. Pearson G., Robinson F., Beers Gibson T., Xu B.E., Karandikar M., Berman K., Cobb M.H. 2001. Mitogenactivated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. Endocr Rev., 22: 153–183.
661. Peifer M. 1995. Cell adhesion and signal transduction: the Armadillo connection. Trends Cell Biol., 5(6): 224-9.
662. Peng T.-I. and Jou M.-J. 2010. Oxidative stress caused by mitochondrial calcium overload. Mitochondrial Research in Translational Medicine, 1201: 183–188
663. Perez-Romero J., Sallet O., Agusti R. 2005. Radio resource management strategies in UMTS. John Wiley & Sons Ltd.

664. Peretz G., Bakhrat A., Abdu U. 2007. Expression of the Drosophila melanogaster GADD45 homolog (CG11086) affects egg asymmetric development that is mediated by the c-Jun N-terminal kinase pathway. Genetics, 177(3): 1691-702.
665. Peri F. and Roth S. 2000. Combined activities of Gurken and decapentaplegic specify dorsal chorion structures of the Drosophila egg. Development, 127(4): 841-50.
666. Pessina G.P., Aldinucci C., Palmi M., Sgaragli G., Benocci A., Meini A., Pessina F. 2001. Pulsed electromagnetic fields affect the intracellular calcium concentrations in human astrocytoma cells. Bioelectromagnetics, 22(7): 503-10.
667. Peterson J.S., Barkett M., McCall K. 2003. Stage-specific regulation of caspase activity in Drosophila oogenesis. Dev Biol., 260: 113–123.
668. Peterson J.S., Bass B.P., Jue D., Rodriguez A., Abrams J.M., McCall K. 2007. Noncanonical cell death pathways act during Drosophila oogenesis. Genesis, 45: 396–404.
669. Petit P.X., Susin S.A., Zamzami N., Mignotte B., Kroemer G. 1996. Mitochondria and programmed cell death: back to the future. FEBS Lett., 396: 7-13.
670. Petryk A., Warren J.T, Marqués G., Jarcho M.P., Gilbert L.I., Kahler J., Parvy J.P., Li Y., Dauphin-Villemant C., O'Connor M.B. 2003. Shade is the Drosophila P450 enzyme that mediates the hydroxylation of ecdysone to the steroid insect molting hormone 20-hydroxyecdysone. Proc Natl Acad Sci U S A., 100(24): 13773-8.
671. Peyman A., Rezazadeh A.A., Gabriel C. 2001. Changes in the dielectric properties of rat tissue as a function of age at microwave frequencies. Phys Med Biol. 46(6):1617-29. Erratum in: Phys Med Biol, 47(12): 2187-8.
672. Phillips J.L., Ivaschuk O., Ishida-Jones T., Jones R.A., Campbell-Beachler M., Haggren W. 1998. DNA damage in Molt-4 T-lymphoblastoid cells exposed to cellular telephone radiofrequency fields in vitro. Bioelectrochem. Bioenerg., 45(1): 103–110.
673. Phillips J.L., Singh N.P., Lai H. 2009. Electromagnetic fields and DNA damage, Pathophysiology, 16: 79–88.
674. Pierrot N., Ghisdal P., Caumont A.S., Octave J.N. 2004. Intraneuronal amyloid-beta1-42 production triggered by sustained increase of cytosolic calcium concentration induces neuronal death. J Neurochem., 88(5): 1140-50.
675. Pierrot N., Santos S.F., Feyt C., Morel M., Brion J.P., Octave J.N. 2006. Calcium-mediated transient phosphorylation of tau and amyloid precursor protein followed by intraneuronal amyloid-beta accumulation. J Biol Chem., 281(52): 39907-14.
676. Pinchuk I., Schnitzer E., Lichtenberg D. 1998. Kinetic analysis of copper-induced peroxidation of LDL. Biochim Biophys Acta, 1389: 155–172
677. Pinton P., Ferrari D., Magalhaes P., Schulze-Osthoff K., Di Virgilio F., Pozzan T., Rizzuto R. 2000. Reduced loading of intracellular Ca(2+) stores and downregulation of capacitative Ca(2+) influx in Bcl-2-overexpressing cells. J Cell Biol., 148: 857–862.
678. Pinton P., Ferrari D., Rapizzi E., Di Virgilio F.D., Pozzan T., Rizzuto R. 2001b. The Ca2+ concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action. EMBO J., 20: 2690–2701.
679. Pinton P., Giorgi C., Siviero R., Zecchini E., Rizzuto R. 2008. Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca^{+2} transfer in the control of apoptosis. Oncogene, 27: 6407-6418
680. Pinton P. and Rizzuto R. 2006. Bcl-2 and Ca2+ homeostasis in the endoplasmic reticulum. Cell Death Differ., 13: 1409–1418
681. Pokrywka N.J. and Stephenson E.C. 1995. Microtubules are a general component of mRNA localization systems in Drosophila oocytes. Dev Biol., 167(1): 363-70.
682. Polster B.M., Basañez G., Etxebarria A., Hardwick J.M., Nicholls D.G. 2005. Calpain I induces cleavage and release of apoptosis-inducing factor from isolated mitochondria. J. Biol. Chem., 280: 6447–6454
683. Poo M., and Robison K.R. 1977. Electrophoresis of concanavalin. A receptors along embryonic muscle cell membrane. Nature, 265: 602–605.
684. Poppek D. and Grune T. 2006. Proteasomal defense of oxidative protein modifications. Antioxid Redox Signal., 8(1-2): 173-84. Review.
685. Poretsky L., Cataldo N.A., Rosenwaks Z., Giudice LC. 1999. The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. Endocr Rev., 20(4): 535-82. Review
686. Posey S.C. and Bierer B.E. 1999. Actin stabilization by jasplakinolide enhances apoptosis induced by cytokine deprivation. J. Biol. Chem., 274: 4259–4265
687. Prasad M. and Montell DJ. 2007. Cellular and molecular mechanisms of border cell migration analyzed using time-lapse live-cell imaging. Dev Cell, 12(6): 997–1005.
688. Pressman B.C. 1976. Biological applications of ionophores. Annu Rev Biochem., 45: 501–530.

689. Pret A.M., Khammari A., Agnes F., Gandille P., Boissonneau E. 2008. Physiological apoptosis in the Drosophila ovarian polar cell lineage involves Hid-mediated activation of a Diap1/Dronc/Drice cascade. Drosophila Research Conference.
690. Priault M., Bessoule J.J., Grelaud-Coq A., Camougrand N., Manon S. 2002. Bax-induced cell death in yeast depends on mitochondrial lipid oxidation. Eur. J. Biochem., 269: 5440–5450
691. Pritchett T.L., Tanner E.A., McCall K. 2009. Cracking open cell death in the Drosophila ovary. Apoptosis, 14: 969-979.
692. Queenan A.M., Ghabrial A., Schüpbach T. 1997. Ectopic activation of torpedo/Egfr, a Drosophila receptor tyrosine kinase, dorsalizes both the eggshell and the embryo. Development., 124(19): 3871-80.
693. Quo T.B., Lu J., Li T., Lu Z., Xu G., Xu M., Lu L., Dai W. 2005. Insulin-activated, K+-channel-sensitive Akt pathway is primary mediator of ML-1 cell proliferation. Am. J Physiol Cell Physiol, 289: C257–C263
694. Rachinsky A., Zhang J., Tobe S.S. 1994. Signal transduction in the inhibition of juvenile hormone biosynthesis by allatostatins: roles of diacylglycerol and calcium. Mol Cell Endocrinol., 105(1): 89-96.
695. Rağbetli M.C., Aydinlioğlu A., Koyun N., Rağbetli C., Bektas S., Ozdemir S. 2010. The effect of mobile phone on the number of Purkinje cells: a stereological study. Int J Radiat Biol., 86: 548-54.
696. Rahman I., Marwick J., Kirkham P. 2004. Redox modulation of chromatin remodeling: impact on histone acetylation and deacetylation, NF-kappaB and pro-inflammatory gene expression. Biochem Pharmacol., 68: 1255–1267
697. Rao V.S., Titushkin I.A., Moros E.G., Pickard W.F., Thatte H.S., Cho M.R. 2008. Nonthermal effects of radiofrequency-field exposure on calcium dynamics in stem cell-derived neuronal cells: elucidation of calcium pathways. Radiat Res., 169: 319-329.
698. Rasola A. and Bernardi P. 2007. The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. Apoptosis, 12(5): 815-33. Review.
699. Rasola A., Sciacovelli M., Pantic B., Bernardi P. 2010. Signal transduction to the permeability transition pore. FEBS Lett., 584(10): 1989-96.
700. Ravagnan L., Marzo I., Costantini P., Susin S.A., Zamzami N., Petit P.X., Hirsch F., Goulbern M., Poupon M.F., Miccoli L., Xie Z., Reed J.C., Kroemer G. 1999. Lonidamine triggers apoptosis via a direct, Bcl-2-inhibited effect on the mitochondrial permeability transition pore. Oncogene, 18: 2537–2546
701. Ravagnan L., Gurbuxani S., Susin S.A., Maisse C., Daugas E., Zamzami N., Mak T., Jaattela M., Penninger J.M., Garrido C., Kroemer G. 2001. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. Nat Cell Biol., 3: 839–843
702. Ravikumar B., Vacher C., Berger Z., Davies J.E., Luo S., Oroz L.G., Scaravilli F., Easton D.F., Duden R., O'Kane C.J., Rubinsztein D.C. 2004. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. Nat Genet., 36: 585–595,
703. Ray R.P. and Schupbach T. 1996. Intercellular signaling and the polarization of body axes during Drosophila oogenesis. Genes Dev., 10: 1711–1723.
704. Reddig P.J. and Juliano R.L. 2005. Clinging to life: cell to matrix adhesion and cell survival. Cancer Metastasis Rev., 24: 425–439
705. Reed J.C. 1997. Cytochrome c: can't live with it-can't live without it. Cell, 91: 559-562.
706. Regel S.J., Negovetic S., Röösli M., Berdiñas V., Schuderer J., Huss A., Lott U., Kuster N., Achermann P. 2006. UMTS base station-like exposure, well-being, and cognitive performance. Environ Health Perspect., 114: 1270-5.
707. Reimertz C., Kögel D., Lankiewicz S., Poppe M., Prehn J.H. 2001. Ca(2+)-induced inhibition of apoptosis in human SH-SY5Y neuroblastoma cells: degradation of apoptotic protease activating factor-1 (APAF-1). J Neurochem., 78(6): 1256-66.
708. Remillard C.V. and Yuan J.X. 2004. Activation of K+ channels: an essential pathway in programmed cell death. Am. J Physiol Lung Cell Mol. Physiol., 286: L49–L67
709. Remondini D., Nylund R., Reivinen J., Poulletier de Gannes F., Veyret B., Lagroye I., Haro E., Trillo M.A., Capri M., Franceschi C., Schlatterer K., Gminski R., Fitzner R., Tauber R., Schuderer J., Kuster N., Leszczynski D., Bersani F., Maercker C. 2006. Gene expression changes in human cells after exposure to mobile phone microwaves. Proteomics, 6: 4745-4754.
710. Repacholi M.H., Basten A., Gebski V., Noonan D., Finnie J., Harris A.W. 1997. Lymphomas in E mu-Pim1 transgenic mice exposed to pulsed 900 MHZ electromagnetic fields. Radiat Res., 147: 631-40.
711. Repnik U. and Turk B. 2010. Lysosomal-mitochondrial cross-talk during cell death. Mitochondrion, 10: 662-9.
712. Requena J.R., Levine R.L., Stadtman E.R. 2003. Recent advances in the analysis of oxidized proteins.

Amino Acids, 25: 221–226
713. Ricci J.E., Munoz-Pinedo C., Fitzgerald P., Bailly-Maitre B., Perkins G.A., Yadava N., Scheffler I.E., Ellisman M.H., Green D.R. 2004. Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain. Cell, 117: 773–786
714. Riddervold I.S., Pedersen G.F., Andersen N.T., Pedersen A.D., Andersen J.B., Zachariae R., Mølhave L., Sigsgaard T., Kjaergaard S.K. 2008. Cognitive function and symptoms in adults and adolescents in relation to rf radiation from UMTS base stations. Bioelectromagnetics., 29: 257-67.
715. Riddiford, L.M. and Ashburner, M. 1991. Effects of juvenile hormone mimics on larval development and metamorphosis of Drosophila melanogaster. Gen. Comp. Endocrinol., 82(2): 172--183.
716. Riddiford L.M. 1993. Hormone receptors and the regulation of insect metamorphosis. Receptor, 3(3): 203-9. Review
717. Riechmann V. and Ephrussi A. 2001. Axis formation during Drosophila oogenesis. Curr Opin Genet Dev., 11(4): 374-83.
718. Riparbelli M.G. and Callaini G. 1995. Cytoskeleton of the Drosophila egg chamber: new observations on microfilament distribution during oocyte growth. Cell Motil Cytoskeleton., 31(4): 298-306.
719. Rittenhouse K.R. and Berg C.A. 1995. Mutations in the Drosophila gene bullwinkle cause the formation of abnormal eggshell structures and bicaudal embryos. Development, 121: 3023–3033.
720. Rizzuto R., Bernardi P., Pozzan T. 2000. Mitochondria as all-round players of the calcium game. J Physiol Lond, 529: 37-47.
721. Rizzuto R., Duchen M.R., Pozzan T. 2004. Flirting in little space: the ER/mitochondria Ca2+ liaison. Sci STKE. 215: re1. Review.
722. Rizzuto R. and Pozzan T. 2006. Microdomains of intracellular Ca2+: molecular determinants and functional consequences. Physiol Rev., 86: 369–408.
723. Roberts D.B., (ed). 1998. Drosophila- a practical approach, 2nd ed., Oxford University Press.
724. Robinson K.R. 1985. The responses of cells to electrical fields: a review. J. Cell Biol., 101: 2023–2027.
725. Robinson D.N., Cant K., Cooley L. 1994. Morphogenesis of Drosophila ovarian ring canals. Development, 120(7): 2015-25.
726. Robinson D.N. and Cooley L. 1996. Stable intercellular bridges in development: the cytoskeleton lining the tunnel. Trends Cell Biol., 6(12): 474-9.
727. Robinson D.N. and Cooley L. 1997. Genetic analysis of the actin cytoskeleton in the Drosophila ovary. Annu Rev Cell Dev Biol., 13: 147-70. Review.
728. Robinson K.R. and Messerli M.A. 1996. Electric embryos: the embryonic epithelium as a generator of developmental information. In: Nerve Growth and Nerve Guidance, edited by McCaig CD. London: Portland
729. Robinson K.R. and Messerli M.A. 2003. Left/right, up/down: the role of endogenous electrical fields as directional signals in development, repair and invasion. Bioessays, 25(8): 759-66. Review.
730. Roderick C., Reinach P.S., Wang L., Lu L. 2003. Modulation of rabbit corneal epithelial cell proliferation by growth factor-regulated K(+) channel activity. J Membr. Biol., 196: 41–50
731. Rodriguez A., Oliver H., Zou H., Chen P., Wang X., Abrams J.M. 1999. Dark is a Drosophila homologue of Apaf-1/CED-4 and functions in an evolutionarily conserved death pathway. Nat. Cell Biol., 1: 272-279.
732. Rodriguez A., Chen P., Oliver H., Abrams J.M. 2002. Unrestrained caspase-dependent cell death caused by loss of Diap1 function requires the Drosophila Apaf-1 homolog, Dark. EMBO J., 21(9): 2189-97
733. Roman I., Clark A., Swanson P.D. 1981. The interaction of calcium-transport and ADP phosphorylation in brain mitochondria. Membrane Biochem., 4: 1-9.
734. Romani P., Bernardi F., Hackney J., Dobens L., Gargiulo G., Cavaliere V. 2009. Cell survival and polarity of Drosophila follicle cells require the activity of ecdysone receptor B1 isoform. Genetics, 181(1): 165-75.
735. Rosenspire A.J., Kindzelskii A.L., Petty H.R. 2001. Pulsed DC electric fields couple to natural NAD(P)H oscillations in HT-1080 fibrosarcoma cells. J Cell Sci., 114(Pt 8): 1515-20
736. Roth S., Neuman-Silberberg F.S., Barcelo G., Schüpbach T. 1995. cornichon and the EGF receptor signaling process are necessary for both anterior-posterior and dorsal-ventral pattern formation in Drosophila. Cell, 81(6): 967–78.
737. Rubinsztein D.C., Gestwicki J.E., Murphy L.O., Klionsky D.J. 2007. Potential therapeutic applications of autophagy. Nat Rev Drug Discov., 6: 304-12.
738. Ruohola-Baker H., Bremer K.A., Baker D., Swedlow J.R., Jan L.Y., Jan Y.N. 1991. Role of neurogenic genes in establishment of follicle cell fate and oocyte polarity during oogenesis in Drosophila. Cell, 66(3): 433–449.
739. Ruggero D. and Sonenberg N. 2005. The Akt of translational control. Oncogene, 24(50): 7426–34.
740. Salford L.G., Brun A.E., Eberhardt J.L., Marmgren L., Persson B.R. 2003. Nerve Cell Damage in

Mammalian Brain after Exposure to Microwaves from GSM Mobile Phones, Environmental Health Perspectives, 111: 881-883.
741. Salmon T.B., Evert B.A., Song B., Doetsch P.W. 2004. Biological consequences of oxidative stress-induced DNA damage in Saccharomyces cerevisiae. Nucleic Acids Res., 32(12): 3712-23.
742. Santini R., Santini P., Danze J.M., Le Ruz P., Seigne M. 2003. Symptoms experienced by people in vicinity of base stations: II/ Incidences of age, duration of exposure, location of subjects in relation to the antennas and other electromagnetic factors, Pathol Biol (Paris). 51: 412-5.
743. Sarimov R., Malmgren L.O.G., Markova E., Persson B.R.R. Belyaev I.Y. 2004. Nonthermal GSM microwaves affect chromatin conformation in human lymphocytes similar to heat shock. IEEE Trans Plasma Sci., 32: 1600-1608.
744. Sarkar S., Ali S., Behari J. 1994. Effect of low power microwave on the mouse genome: a direct DNA analysis. Mutat Res., 320: 141-147
745. Sarkar S. and Lakhotia S.C. 2008. Hsp60C is required in follicle as well as germline cells during oogenesis in Drosophila melanogaster. Dev Dyn., 237(5): 1334-47.
746. Savant S.S. and Waring G.L. 1989. Molecular analysis and rescue of a vitelline membrane mutant in *Drosophila*. Dev Biol., 135: 43–52.
747. Sawada M., Hayes P., Matsuyama S. 2003. Cytoprotective membranepermeable peptides designed from the Bax-binding domain of Ku70. Nat Cell Biol., 352–357
748. Scherz-Shouval R., Elazar Z. 2007. ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. Trends Cell Biol., 17: 422–427.
749. Scaffidi C., Fulda S., Srinivasan A., Friesen C., Li F., Tomaselli K.J., Debatin K.M., Krammer P.H., Peter M.E. 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. EMBO J., 17: 1675–1687
750. Schmidt-Ullrich R.K., Mikkelsen R.B., Dent P., Todd D.G., Valerie K., Kavanagh B.D., Contessa J.N., Rorrer W.K., Chen P.B. 1997. Radiation-induced proliferation of the human A431 squamous carcinoma cells is dependent on EGFR tyrosine phosphorylation. Oncogene, 15: 1191–1197
751. Schonfeld P. and Reiser G. 2007. Ca2+ storage capacity of rat brain mitochondria declines during the postnatal development without change in ROS production capacity. Antioxid Redox Signal, 9: 191-199.
752. Schroeter H., Boyd C.S., Ahmed R., Spencer J.P., Duncan R.F., Rice-Evans C., Cadenas E. 2003. c-Jun N-terminal kinase (JNK)-mediated modulation of brain mitochondria function: new target proteins for JNK signalling in mitochondrion-dependent apoptosis. Biochem J., 372: 359–369
753. Schupbach T. 1987. Germ line and soma cooperate during oogenesis to establish the dorsoventral pattern of egg shell and embryo in Drosophila melanogaster. Cell, 49: 699–707.
754. Schwarz C., Kratochvil E., Pilger A., Kuster N., Adlkofer F., Rüdiger H.W. 2008. Radiofrequency electromagnetic fields (UMTS, 1950 MHz) induce genotoxic effects in vitro in human fibroblasts but not in lymphocytes. Int Arch Occup Environ Health, 81: 755-67.
755. Scott R.C., Juhasz G., Neufeld T.P. 2007. Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death. Curr Biol, 17: 1–11.
756. Serway R.A. 1990. Physics for scientists and engineers. Ηλεκτρομαγνητισμός, Τόμος II, 3η έκδοση, Εκδόσεις Saunders college
757. Sevrioukov E.A., Burr J., Huang E.W., Assi H.H., Monserrate J.P., Purves D.C., Wu J.N., Song E.J., Brachmann C.B. 2007. Drosophila Bcl-2 proteins participate in stress-induced apoptosis, but are not required for normal development. Genesis, 45: 184-193.
758. Shallom J.M., DiCarlo A.L., Ko D., Penafiel L.M., Nakai A. 2002. Microwave exposure induces hsp70 and confers protection against hypoxia in chick embryos. J Cell Biochem., 86: 490-496.
759. Shen M.R., Yang T.P., Tang M.J. 2002. A novel function of BCL-2 overexpression in regulatory volume decrease Enhancing swelling-activated Ca(2+) entry and Cl()) channel activity. J Biol Chem., 277: 15592–15599
760. Shen H.M. and Liu Z.G. 2006. JNK signaling pathway is a key modulator in cell death mediated by reactive oxygen and nitrogen species. Free Radic Biol Med., 40(6): 928-39.
761. Shi R. and Borgens R.B. 1995. Three dimensional gradients of voltage during development of the nervous system as invisible coordinates for the establishment of the embryonic pattern. Dev Dynamics, 202: 101–114
762. Shibasaki F. and McKeon F. 1995. Calcineurin functions in Ca(2+)-activated cell death in mammalian cells. J Cell Biol., 131: 735–743
763. Shimizu S., Narita M., Tsujimoto Y. 1999. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. Nature, 399: 483–487

764. Shimizu S., Kanaseki T., Mizushima N., Mizuta T., Arakawa- Kobayashi S., Thompson C.B., Tsujimoto Y. 2004. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. Nat Cell Biol., 6:1221–1228.
765. Shimizu S., Konishi A., Kodama T., Tsujimoto Y. 2000. BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. Proc Natl Acad Sci USA, 97: 3100–3105
766. Shoshan-Barmatz V., De Pinto V., Zweckstetter M., Raviv Z., Keinan N., Arbel N. 2010. VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. Mol Aspects Med., 31(3): 227-85. Review.
767. Shravage B.V., Altmann G., Technau M., Roth S. 2007. The role of Dpp and its inhibitors during eggshell patterning in Drosophila. Development, 134(12): 2261-2271.
768. Silver D.L. and Montell D.J. 2001. aracrine signaling through the JAK/STAT pathway activates invasive behavior of ovarian epithelial cells in Drosophila. Cell, 107(7): 831–41.
769. Silver D.L., Geisbrecht E.R., Montell D.J. 2005. Requirement for JAK/STAT signaling throughout border cell migration in Drosophila. Development, 132(15): 3483–92.
770. Simkó M. 2007. Cell type specific redox status is responsible for diverse electromagnetic field effects, Curr. Med. Chem., 14:1141–1152.
771. Singleton K. and Woodruff R.I., 1994. The osmolarity of adult Drosophila hemolymph and its effect on oocyte-nurse cell electrical polarity. Developmental Biology, 161: 154–167.
772. Smith J.E., Cummings C.A., Cronmiller C. 2002. Daughterless coordinates somatic cell proliferation, differentiation ang germline cyst survival during follicle formation in Drosophila. Development, 129: 3255-67.
773. Smirnova E., Griparic L., Shurland D.L., Bliek A. 2001. Dynamin-related Protein Drp1 Is Required for Mitochondrial Division in Mammalian Cells. Mol Biol Cell, 12(8): 2245–2256.
774. Söderqvist F., Carlberg M., Hardell L. 2009. Use of wireless telephones and serum S100B levels: a descriptive cross-sectional study among healthy Swedish adults aged 18-65 years. Sci Total Environ., 407: 798-805.
775. Sokolovic D., Djindjic B., Nikolic J., Bjelakovic G., Pavlovic D., Kocic G., Krstic D., Cvetkovic T., Pavlovic V. 2008. Melatonin reduces oxidative stress induced by chronic exposure of microwave radiation from mobile phones in rat brain. J Radiat Res., 49(6): 579-86
776. Soller M., Bownes M., Kubli E. 1997. Mating and sex peptide stimulate the accumulation of yolk in oocytes of Drosophila melanogaster. Eur J Biochem., 243(3): 732-8.
777. Soller M., Bownes M., Kubli E. 1999. Control of oocyte maturation in sexually mature Drosophila females. Dev Biol., 208(2): 337-51.
778. Son Y., Cheong Y.K., Kim N.H., Chung H.T., Kang D.G., Pae H.O. 2011. Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways? J Signal Transduct., 2011: 792639.
779. Song Z., Guan B., Bergman A., Nicholson D.W., Thornberry N.A., Peterson E.P., Steller H. 2000. Biochemical and genetic interactions between Drosophila caspases and the proapoptotic genes rpr, hid, and grim. Mol Cell Biol., 20(8): 2907-14.
780. Song X. and Xie T. 2002. DE-cadherin-mediated cell adhesion is essential for maintaining somatic stem cells in the Drosophila ovary. Proc Natl Acad Sci U S A, 99(23): 14813–8.
781. Song X. and Xie T. 2003. Wingless signaling regulates the maintenance of ovarian somatic stem cells in Drosophila. Development, 130(14): 3259–68.
782. Song X., Zhu C.H., Doan C., Xie T. 2002. Germline stem cells anchored by adherens junctions in the Drosophila ovary niches. Science, 296(5574): 1855–7.
783. Song X., Wong M.D., Kawase E., Xi R., Ding B.C., McCarthy J.J., Xie T. 2004. Bmp signals from niche cells directly repress transcription of a differentiation-promoting gene, bag of marbles, in germline stem cells in the Drosophila ovary. Development, 131(6): 1353–64.
784. Song X., Call G.B., Kirilly D., Xie T. 2007. Notch signaling controls germline stem cell niche formation in the Drosophila ovary. Development, 134(6): 1071–80.
785. Sonmez O.F., Odaci E., Bas O., Kaplan S. 2010. Purkinje cell number decreases in the adult female rat cerebellum following exposure to 900 MHz electromagnetic field. Brain Res., 1356: 95-101.
786. Spahr C.S., Susin S.A., Bures E.J., Robinson J.H., Davis M.T., McGinley M.D., Kroemer G., Patterson S.D. 2000. Simplification of complex peptide mixtures for proteomic analysis: reversible biotinylation of cysteinyl peptides. Electrophoresis, 21: 1635–1650
787. Spradling A.C. 1993. Developmental genetics of oogenesis. In: Martinez-Arias, editor. the development of Drosophila melanogaster. cold spring harbor: cold spring harbor laboratory press, p. 1-70.
788. Squier T.C. 2006. Redox modulation of cellular metabolism through targeted degradation of signaling proteins by the proteasome. Antioxid Redox Signal, 8: 217–228

789. St Johnston D. 2005. Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. Nat Rev Mol Cell Biol., 6(5): 363-75. Review.
790. Starkov A.A., Polster B.M., Fiskum G. 2002. Regulation of hydrogen peroxide production by brain mitochondria by calcium and Bax. J Neurochem., 83: 220-228.
791. Starkov A.A. 2008. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. In Mitochondria and Oxidative Stress in Neurodegenerative Disorders, Gibson GE, Ratan RR, Beal MF, eds. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 37-52.
792. Steinberg M.S. 2007. Differential adhesion in morphogenesis: a modern view. Curr Opin Genet Dev, 17 (4): 281–6.
793. Steinhauer J. and Kalderon D. 2006. Microtubule polarity and axis formation in the Drosophila oocyte. Dev Dyn., 235(6): 1455-68
794. Steller H. 2000. Biochemical and genetic interactions between Drosophila caspases and the proapoptotic genes rpr, hid and grim. Mol. Cell Biol., 20: 2907-2914.
795. Steller H. 2008 Regulation of apoptosis in Drosophila. Cell Death Differ., 15: 1132–1138.
796. Stocker H. and Hafen E. 2000. Genetic control of cell size. Curr Opin Genet Dev., 10(5): 529–35.
797. Stone J.C., Dower N.A., Hauseman J., Cseko Y.M., Sederoff R.1983. The characterization of a mutant affecting DNA metabolism in the development of D. melanogaster. Can. J. Genet. Cytol., 25: 129–138.
798. Suen D.F., Norris K.L., Youle R.J. 2008. Mitochondrial dynamics and apoptosis. Genes Dev., 22(12): 1577–1590
799. Sun J. and Deng W.M. 2007. Hindsight mediates the role of notch in suppressing hedgehog signaling and cell proliferation. Dev Cell, 12(3): 431–42.
800. Sun Y.A. and Wyman R.J., 1987. Lack of an oocyte to nurse cell voltage difference in Drosophila. Neuroscience, 13: 1139.
801. Sun Y.A. and Wyman, R.J. 1993. Reevaluation of electrophoresis in the Drosophila egg chamber. Developmental Biology, 155: 206–215.
802. Sun L.X., Yao K., He J.L., Lu D.Q., Wang K.J., Li H.W. 2006. Effect of acute exposure to microwave from mobile phone on DNA damage and repair of cultured human lens epithelial cells in vitro. Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi., 24: 465-467
803. Sun J., Smith L., Armento A., Deng W.M. 2008. Regulation of the endocycle/gene amplification switch by Notch and ecdysone signaling. J Cell Biol., 182(5): 885-96.
804. Sun W., Shen X., Lu D., Fu Y., Lu D., Chiang H. 2012. A 1.8-GHz radiofrequency radiation induces EGF receptor clustering and phosphorylation in cultured human amniotic (FL) cells. Int J Radiat Biol. 88(3): 239-44.
805. Susin S.A., Zamzami N., Castedo M., Hirsch T., Marchetti P., Macho A., Daugas E., Geuskens M., Kroemer G. 1996. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. J Exp Med., 184: 1331–1342
806. Susin S.A., Lorenzo H.K., Zamzami N., Marzo I., Snow B.E., Brothers G.M., Mangion J., Jacotot E., Constantini P., Loeffler M., Larochette N., Goodlett D.R., Aebersold R., Siderovski D.P., Penninger J.M., Kroemer G. 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. Nature, 397: 441-446.
807. Suter B., Romberg L.M., Steward R. 1989. Bicaudal-D, a Drosophila gene involved in developmental asymmetry: localized transcript accumulation in ovaries and sequence similarity to myosin heavy chain tail domains. Genes Dev., 3(12A): 1957-68.
808. Sutko J.L. and Airey J.A. 1996. Ryanodine receptor Ca2+ release channels: does diversity in form equal diversity in function? Physiol Rev., 76(4): 1027-71. Review.
809. Suyama, R., Jenny, A., Curado, S., Pellis-van Berkel, W., Ephrussi, A. 2009. The actin-binding protein Lasp promotes Oskar accumulation at the posterior pole of the Drosophila embryo. Development, 136(1): 95-105.
810. Suzanne M., Perrimon N., Noselli S. 2001. The Drosophila JNK pathway controls the morphogenesis of the egg dorsal appendages and micropyle. Dev Biol., 237(2): 282-94.
811. Suzuki Y., Imai Y., Nakayama H., Takahashi K., Takio K., Takahashi R. 2001. Mol Cell, 8: 613-621.
812. Syntichaki P., Xu K., Driscoll M., Tavernarakis N. 2002. Specific aspartyl and calpain proteases are required for neurodegeneration in C. elegans. Nature, 419: 939–944.
813. Syntichaki P. and Tavernarakis N. 2002. Death by necrosis. Uncontrollable catastrophe, or is there order behind the chaos? EMBO Rep., 3(7): 604-9.
814. Szabo L., Bock J., Jekle A., Soddemann M., Adams C., Lang F., Zoratti M., Gulbins E. 2005. A novel

potassium channel in lymphocyte mitochondria. J Biol Chem., 280: 12790–12798
815. Takahashi A. and Earnshaw W.C. 1996. ICE-related proteases in apoptosis. Curr. Opin Genet Dev., 6: 50-55.
816. Takahashi S., Inaguma S., Cho Y.M., Imaida K., Wang J., Fujiwara O., Shirai T. 2002. Lack of Mutation Induction with Exposure to 1.5 GHz Electromagnetic Near Fields Used for Cellular Phones in Brains of Big Blue Mice. Cancer Res., 62: 1956-1960
817. Takano H., Zou Y., Hasegawa H., Akazawa H., Nagai T., Komuro I. 2003. Oxidative stress-induced signal transduction pathways in cardiac myocytes: involvement of ROS in heart diseases. Antioxid Redox Signal, 5: 789-94.
818. Tanentzapf G., Smith C., McGlade J., Tepass U. 2000. Apical, lateral, and basal polarization cues contribute to the development of the follicular epithelium during Drosophila oogenesis. J Cell Biol., 151(4): 891-904.
819. Tang H.L., Le A.H., Lung H.L. 2006. The increase in mitochondrial association with actin precedes Bax translocation in apoptosis. Biochem J., 396: 1–5
820. Tanner E.A., Blute T.A., Brachmann C.B., McCall K. 2011. Bcl-2 proteins and autophagy regulate mitochondrial dynamics during programmed cell death in the Drosophila ovary. Development, 138(2): 327-38.
821. Tardy C., Codogno P., Autefage H., Levade T., Andrieu-Abadie N. 2006. Lysosomes and lysosomal proteins in cancer cell death (new players of an old struggle). Biochim Biophys Acta., 1765(2): 101-25.
822. Tazuke S.I., Schulz C., Gilboa L., Fogarty M., Mahowald A.P., Guichet A., Ephrussi A., Wood C.G., Lehmann R., Fuller M.T. 2002. A germline-specific gap junction protein required for survival of differentiating early germ cells. Development, 129(10): 2529–39.
823. Temkin V., Huang Q., Liu H., Osada H., Pope R.M. 2006. Inhibition of ADP/ATP exchange in receptor-interacting protein-mediated necrosis. Mol Cell Biol., 26: 2215–2225
824. Tenev T., Zachariou A., Wilson R., Paul A., Meier P. 2002. Jafrac2 is an IAP antagonist that promotes cell death by liberating Dronc from DIAP1. EMBO J., 21: 5118–29.
825. erashima J., Takaki K., Sakurai S., Bownes M. 2005. Nutritional status affects 20-hydroxyecdysone concentration and progression of oogenesis in Drosophila melanogaster. J Endocrinol,, 187: 69–79.
826. Terashima J. and Bownes M. 2006. E75A and E75B have opposite effects on the apoptosis-development choice of the Drosophila egg chamber. Cell Death Differ., 13: 454–64.
827. Terman A., Kurz T., Gustafsson B., Brunk U.T. 2006. Lysosomal labilization. IUBMB Life, 58(9): 531-9. Review.
828. Testylier G., Tonduli L., Malabiau R., Debouzy J.C. 2002. Effects of exposure to low level radiofrequency fields on acetylcholine release in hippocampus of freely moving rats. Bioelectromagnetics, 23: 249-255.
829. Theriot J.A. and Mitchison T.J. 1993. The three faces of profilin. Cell, 75(5): 835-8. Review.
830. Thannickal V. J. and Fanburg B. L. 2000. Reactive oxygen species in cell signaling, American Journal of Physiology, vol. 279, no. 6, pp. L1005–L1028.
831. Theurkauf W.E., Smiley S., Wong M.L., Alberts B.M. 1992. Reorganization of the cytoskeleton during Drosophila oogenesis: implications for axis specification and intercellular transport. Development., 115(4): 923-36.
832. Theurkauf W.E. 1994. Microtubules and cytoplasm organization during Drosophila oogenesis. Dev. Biol., 165: 352-360.
833. Thornberry N.A. and Lazebnik Y. 1998. Caspases: enemies within. Science, 281: 1312-1316.
834. Thornburn A. 2008. Apoptosis and Autophagy: regulatory connections between two supposedly different processes, Apoptosis, 13: 1–9.
835. Thorpe G.W., Fong C.S., Alic N., Higgins V.J., Dawes I.W. 2004. Cells have distinct mechanisms to maintain protection against different reactive oxygen species: oxidative-stress-response genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 101: 6564–6569
836. Thummel C.S. 2001. Molecular mechanisms of developmental timing in C. elegans and Drosophila. Dev Cell., 1(4): 453-65.
837. Tilney L.G., Tilney M.S., Guild G.M. 1996. Formation of actin filament bundles in the ring canals of developing Drosophila follicles. J Cell Biol., 133(1): 61-74.
838. Tinsley R.B., Bye C.R., Parish C.L., Tziotis-Vais A., George S., Culvenor J.G., Li Q.X., Masters C.L., Finkelstein D.I., Horne M.K. 2009. Dopamine D2 receptor knockout mice develop features of Parkinson disease. Ann Neurol., 66: 472-84.
839. Tisal J. 1998. GSM Cellular Radio Telephony. J.Wiley & Sons, West Sussex, England.

840. Tolias P.P. and Kafatos F.C. 1990. Functional dissection of an early *Drosophila* chorion gene promoter: expression throughout the follicular epithelium is under spatially composite regulation. EMBO J., 9: 1457–1464.
841. Tolias P.P., Konsolaki M., Halfron M.S., Stroumbakis N.D., Kafatos F.C. 1993. Elements controlling follicular expression expression of the *s36* chorion gene during *Drosophila* oogenesis. Mol Cell Biol., 13: 5898–5906.
842. Toman J. and Fiskum G. 2011. Influence of aging on membrane permeability transition in brain mitochondria. J Bioenerg Biomembr., 43(1): 3-10.
843. Tombini M., Pellegrino G., Pasqualetti P., Assenza G., Benvenga A., Fabrizio E., Rossini P.M. 2012. Mobile phone emissions modulate brain excitability in patients with focal epilepsy. Brain Stimul. 2012 Aug 9. [Epub ahead of print].
844. Tomruk A., Guler G., Dincel A.S. 2010. The influence of 1800 MHz GSM-like signals on hepatic oxidative DNA and lipid damage in nonpregnant, pregnant, and newly born rabbits. Cell Biochem Biophys., 56(1): 39-47.
845. Torres I.L., Lopez-Schier H., St Johnston D. 2003. A Notch/Delta-dependent relay mechanism establishes anterior-posterior polarity in Drosophila. Dev Cell, 5(4): 547–58.
846. Tourmente S., Lecher P., Degroote F., Renaud M. 1990. Mitochondrial development during Drosophila oogenesis: distribution, density and in situ RNA hybridizations. Biol Cell., 68(2): 119-27.
847. Tower J. 2000. Transgenic methods for increasing Drosophila life span. Mechanisms of Ageing and Development 118: 1–14,
848. Trachootham D., Lu W., Ogasawara M.A., Nilsa R.D., Huang P. 2008. Redox regulation of cell survival. Antioxid Redox Signal. 10: 1343-74. Review.
849. Trosić I. and Pavicić I. 2009. Disturbance of cell proliferation in response to mobile phone frequency radiation. Arh Hig Rada Toksikol. 60(1): 109-15.
850. Trosić I., Pavicić I., Milković-Kraus S., Mladinić M., Zeljezić D. 2011. Effect of electromagnetic radiofrequency radiation on the rats' brain, liver and kidney cells measured by comet assay. Coll Antropol., 35(4): 1259-64.
851. Τρουγκάκος Ι.Π. 1997. Αξιοποίηση μορφολογικών και βιοχημικών κριτηρίων χοριογένεσης για την εξαγωγή φυλογενετικών σχέσεων σε είδη της οικογένειας Drosophilidae, με έμφαση στη Drosophila virilis. Διδακτορική διατριβή. Πανεπιστήμιο Αθηνών.
852. Trougakos I.P. and Margaritis L.H. 1998a. Immunolocalization of the temporally "early" secreted major structural chorion proteins, Dvs38 and Dvs36, in the eggshell layers and regions of Drosophila virilis. J Struct Biol., 123(2): 111-23.
853. Trougakos I.P. and Margaritis L.H. 1998b. The formation of the functional chorion structure of Drosophila virilis involves inercalation of the "middle" and "late" major chorion proteins: a general model for chorion assembly in Drosophilidae. J Struct Biol., 123(2): 97-110.
854. Trougakos I.P. and Margaritis L.H. 2002. Novel morphological and physiological aspects of insect eggs. In: Hilker M, Meiners T, editors. Chemoecology of insect eggs and egg deposition. Berlin: Blackwell Wissenschaftsverlag. p 3–36.
855. Tsujimoto Y. 1998. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? Genes Cells, 3: 697-707.
856. Tsujimoto Y. and Shimizu S. 2000. VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. Cell Death Differ., 7: 1174–1181
857. Tsuzuki T., Nakatsu Y., Nakabeppu Y. 2007. Significance of erroravoiding mechanisms for oxidative DNA damage in carcinogenesis. Cancer Sci., 98: 465–470
858. Tu M.P., Yin C.M., Tatar M. 2002. Impaired ovarian ecdysone synthesis of Drosophila melanogaster insulin receptor mutants. Aging Cell, 1: 158–60.
859. Turk V., Turk B., Turk D. 2001. Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. EMBO J., 20(17): 4629-33. Review.
860. Twombly V., Blackman R.K., Jin H., Graff J.M., Padgett R.W., Gelbart W.M. 1996. The TGF-beta signaling pathway is essential for Drosophila oogenesis. Development, 122: 1555–1565.
861. Tworoger M., Larkin M.K., Bryant Z., Ruohola-Baker H. 1999. Mosaic analysis in the drosophila ovary reveals a common hedgehog-inducible precursor stage for stalk and polar cells. Genetics, 151(2): 739–48.
862. Unterlechner M., Sauter C., Schmid G., Zeitlhofer J. 2008. No effect of an UMTS mobile phone-like electromagnetic field of 1.97 GHz on human attention and reaction time. Bioelectromagnetics, 29: 145-53
863. Ushio-Fukai M. 2006. Localizing NADH oxidase-derived ROS. Science STKE, RE8

864. Vakkila J. and Lotze M. 2004. Inflammation and necrosis promote tumour growth. Nat Rev Immunol., 4: 641–648
865. Vahsen N., Cande C., Briere J.J., Benit P., Joza N., Larochette N., Mastroberardino P.G., Pequignot M.O., Casares N., Lazar V., Feraud O., Debili N., Wissing S., Engelhardt S., Madeo F., Piacentini M., Penninger J.M., Schagger H., Rustin P., Kroemer G. 2004. AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. EMBO J., 23: 4679–4689
866. Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem Biol Interact., 160: 1–40
867. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M., Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol., 39: 44–84
868. Van Eeden F.J., Palacios I.M., Petronczki M., Weston M.J., St Johnston D. 2001. Barentsz is essential for the posterior localization of oskar mRNA and colocalizes with it to the posterior pole. J Cell Biol., 154(3): 511-23.
870. Varkey J., Chen P., Jemmerson R., Abrams J.M. 1999. Altered cytochrome c display precedes apoptotic cell death in Drosophila. J Cell Biol., 144: 701-710.
871. Vecchio F., Tombini M., Buffo P., Assenza G., Pellegrino G., Benvenga A., Babiloni C., Rossini P.M. 2012. Mobile phone emission increases inter-hemispheric functional coupling of electroencephalographic alpha rhythms in epileptic patients. Int J Psychophysiol. 84(2): 164-71.
872. Velentzas A.D., Nezis I.P., Stravopodis D.J., Papassideri I.S., Margaritis L.H. 2007. Apoptosis and autophagy function cooperatively for the efficacious execution of programmed nurse cell death during Drosophila virilis oogenesis. Autophagy, 3: 130–2.
873. Verachtert B., Amelinckx M., De Loof A. 1989. Potassium and chloride dependence of the membrane potential of vitellogenic follicles of Sarcophaga bullata (Diptera). Journal of Insect Physiology 35: 143–148.
874. Verachtert B. and De Loof A. 1989. Intra- and extracellular electrical fields of vitellogenic poloytrophic insect follicles. Biological Bulletin 176 (S), 91–95.
875. Verdier V., Johndrow J.E., Betson M., Chen G.C., Hughes D.A., Parkhurst S.M., Settleman J. 2006. Drosophila Rho-kinase (DRok) is required for tissue morphogenesis in diverse compartments of the egg chamber during oogenesis. Dev Biol., 297(2): 417-32.
876. Verschaeve L. 2005. Genetic effects of radiofrequency radiation (RFR). Toxicol Appl Pharmacol., 207(2 Suppl): 336-41. Review.
877. Vicencio J.M., Ortiz C., Criollo A., Jones A.W., Kepp O., Galluzzi L., Joza N., Vitale I., Morselli E., Tailler M., Castedo M., Maiuri M.C., Molgó J., Szabadkai G., Lavandero S., Kroemer G. 2009. The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor regulates autophagy through its interaction with Beclin 1. Cell Death Differ., 16(7): 1006-17
878. Vieira H.L., Belzacq A.S., Haouzi D., Bernassola F., Cohen I., Jacotot E., Ferri K.F., El Hamel C., Bartle L.M., Melino G., Brenner C., Goldmacher V., Kroemer G. 2001. The adenine nucleotide translocator: a target of nitric oxide, peroxynitrite, and 4-hydroxynonenal. Oncogene, 20: 4305-4316.
879. Vieira H. and Kroemer G. 2003. Mitochondria as targets of apoptosis regulation by nitric oxide. IUBMB Life, 55(10-11): 613-6. Review.
880. Vijayalaxmi, Leal B.Z., Szilagyi M., Prihoda T.J., Meltz M.L. 2000. Primary DNA Damage in Human Blood Lymphocytes Exposed In Vitro to 2450 MHz Radiofrequency Radiation, Radiat Res., 153: 479-486.
881. Voehringer D.W. and Meyn R.E. 2000. Redox aspects of Bcl-2 function. Antioxid Redox Signal, 2: 537–550
882. Volkow N.D., Tomasi D., Wang G.J., Vaska P., Fowler J.S., Telang F., Alexoff D., Logan J., Wong C. 2011. Effects of cell phone radiofrequency signal exposure on brain glucose metabolism JAMA, 305: 808-13.
883. Vousden K.H. and Lu X. 2002. Live or let die: the cell's response to p53. Nat Rev Cancer, 2: 594–604
884. Vucic D., Kaiser W.J., Harvey A.J., Miller L.K. 1997. Inhibition of reaper-induced apoptosis by interaction with inhibitor of apoptosis (IAPs). PNAS, 94: 10183-10188.
885. Wagner P., Roschke J., Mann K., Hiller W., Frank C. 1998. Human sleep under the influence of pulsed radiofrequency electromagnetic fields: a polysomnographic study using standardized conditions, Bioelectromagnetics, 19: 199–202.
886. Walleczek J., Liburdy R.P. 1990. Nonthermal 60 Hz sinusoidal magnetic-field exposure enhances 45Ca2+ uptake in rat thymocytes: dependence on mitogen activation. FEBS Lett., 271(1-2): 157-60.
887. Walsh C.M., Chvanov M., Haynes L.P., Petersen O.H., Tepikin A.V., Burgoyne R.D. 2009. Role of phosphoinositides in STIM1 dynamics and store-operated calcium entry. Biochem J., 425(1): 159-68.
888. Wandall H.H., Pedersen J.W., Park C., Levery S.B., Pizette S., Cohen S.M., Schwientek T., Clausen H. 2003. Drosophila egghead encodes a beta 1,4-mannosyltransferase predicted to form the immediate

precursor glycosphingolipid substrate for brainiac. J Biol Chem., 278(3): 1411–4.
889. Wang H., Pathan N., Ethell I.M., Krajewski S., Yamaguchi Y., Shibasaki F., McKeon F., Bobo T., Franke T.F., Reed J.C. 1999a. Ca^{+2}-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. Science, 284: 339-343.
890. Wang S.L., Hawkins C.J., Yoo S.J., Muller H.A., Hay B.A. 1999b. The Drosophila caspase inhibitor DIAP1 is essential for cell survival and is negatively regulated by HID. Cell, 98: 453-463.
891. Wang B. and Lai H. 2000. Acute exposure to pulsed 2450-MHz microwaves affects water-maze performance of rats. Bioelectromagnetics., 21: 52-6.
892. Wang X., Martindale J.L., Holbrook N.J. 2000. Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. J Biol Chem., 275: 39435-43.
893. Wang Z. 2004. Roles of K(+) channels in regulating tumour cell proliferation and apoptosis. Pflugers Arch., 448: 274–286
894. Wang J., Koyama S., Komatsubara Y., Suzuki Y., Taki M., Miyakoshi J. 2006a. Effects of a 2450 MHz high-frequency electromagnetic field with a wide range of SARs on the induction of heat-shock proteins in A172 cells. Bioelectromagnetics., 27: 479-86.
895. Wang G., Hong Y., Johnson M.K., Maier, R.J. 2006b. Lipid peroxidation as a source of oxidative damage in Helicobacter pylori: protective roles of peroxiredoxins. Biochim. Biophys. Acta, 1760: 1596–1603
896. Wang X., Adam J.C., Montell D. 2007a. Spatially localized Kuzbanian required for specific activation of Notch during border cell migration. Dev Biol., 301(2): 532–40.
897. Wang Z.H., Xu L., Duan Z.L., Zeng L.Q., Yan N.H., Peng Z.L. 2007b. Beclin 1-mediated macroautophagy involves regulation of caspase-9 expression in cervical cancer HeLa cells. Gynecol Oncol., 107: 107–113.
898. Wang W., Fang H., Groom L., Cheng A., Zhang W., Liu J., Wang X., Li K., Han P., Zheng M., Yin J., Mattson M.P., Kao J.P., Lakatta E.G., Sheu S.S., Ouyang K., Chen J., Dirksen R.T., Cheng H. 2008. Superoxide flashes in single mitochondria. Cell, 134: 279-290.
899. Wang X. 2009. The antiapoptotic activity of melatonin in neurodegenerative diseases. CNS Neurosci Ther., 15(4): 345-5. Review.
900. Wang T., Lao U., Edgar B.A. 2009. TOR-mediated autophagy regulates cell death in Drosophila neurodegenerative disease. J Cell Biol., 186(5): 703-11
901. Wang X., Su B., Lee H., Li X., Perry G., Smith M., Zhu X. 2009a. Impaired Balance of Mitochondria Fission and Fusion in Alzheimer Disease. J Neurosci., 29(28): 9090–9103
902. Ward E.J., Shcherbata H.R., Reynolds S.H., Fischer K.A., Hatfield S.D., Ruohola-Baker H. 2006. Stem cells signal to the niche through the Notch pathway in the Drosophila ovary. Curr Biol., 16(23): 2352–8.
903. Waring G.L. 2000. Morphogenesis of the eggshell in *Drosophila.* Int Rev Cytol., 198: 67–108
904. Warren J.T., Petryk A., Marqués G., Parvy J.P., Shinoda T., Itoyama K., Kobayashi J., Jarcho M., Li Y., O'Connor M.B., Dauphin-Villemant C., Gilbert L.I. 2004. Phantom encodes the 25-hydroxylase of Drosophila melanogaster and Bombyx mori: a P450 enzyme critical in ecdysone biosynthesis. Insect Biochem Mol Biol., 34(9): 991-1010.
905. Wartenberg M., Hescheler J., Sauer H. 1997. Electrical fields enhance growth of cancer spheroids by reactive oxygen species and intracellular Ca2+. Am J Physiol., 272(5 Pt 2): R1677-83.
906. Waskar M., Li Y., Tower J. 2005. Stem cell aging in the Drosophila ovary. Age, 27: 201-212
907. Wei L., Xiao A.Y., Jin C., Yang A., Lu Z.Y., Yu S.P. 2004. Effects of chloride and potassiumchannel blockers on apoptotic cell shrinkage and apoptosis in cortical neurons. Pflugers Arch., 448: 325–334
908. Weisbrot D., Lin H., Ye L., Blank M., Goodman R. 2003. Effects of mobile phone radiation on reproduction and development in Drosophila melanogaster. J Cell Biochem., 89: 48-55.
909. Wells R.C., Picton L.K., Williams S.C., Tan F.J., Hill R.B. 2007. Direct binding of the dynamin-like GTPase, Dnm1, to mitochondrial dynamics protein Fis1 is negatively regulated by the Fis1 N-terminal arm. J Biol Chem., 282(46): 33769-75
910. Wenczak B.A., Lynch J.B., Nanney L.B. 1992. Epidermal growth factor receptor distribution in burn wounds. Implications for growth factor-mediated repair. J Clin Invest., 90(6): 2392-401.
911. Weston C.R. and Davis RJ. 2007. The JNK signal transduction pathway. Curr Opin Cell Biol., 19(2): 142-9.
912. Wheatley S., Kulkarni S., Karess R. 1995. Drosophila nonmuscle myosin II is required for rapid cytoplasmic transport during oogenesis and for axial nuclear migration in early embryos. Development, 121(6): 1937-46
913. White C., Li C., Yang J., Petrenko N.B., Madesh M., Thompson C.B., Foskett J.K. 2005. The

endoplasmic reticulum gateway to apoptosis by Bcl-X(L) modulation of the InsP3R. Nat Cell Biol., 7: 1021–1028
914. Whitehead T.D., Moros E.G., Brownstein B.H., Roti Roti J.L. 2006. Gene expression does not change significantly in C3H 10T(1/2) cells after exposure to 847.74 CDMA or 835.62 FDMA radiofrequency radiation. Radiat Res., 165: 626-35.
915. Wieckowski M.R., Szabadkai G., Wasilewski M., Pinton P., Duszynski J., Rizzuto R. 2006. Overexpression of adenine nucleotide translocase reduces Ca2+ signal transmission between the ER and mitochondria. Biochem Biophys Res Commun., 348: 393–399
916. Wiholm C., Lowden A., Kuster N., Hillert L., Arnetz B.B., Akerstedt T., Moffat S.D. 2009. Mobile phone exposure and spatial memory, Bioelectromagnetics, 30: 59–65.
917. Wirawan E., Vande Walle L., Kersse K., Cornelis S., Claerhout S., Vanoverberghe I., Roelandt R., De Rycke R., Verspurten J., Declercq W., Agostinis P., Vanden Berghe T., Lippens S., Vandenabeele P. 2010. Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. Cell Death Dis., 1: e18.
918. Wojda U., Salinska E., Kuznicki J. 2008. Calcium ions in neuronal degeneration. IUBMB Life, 60(9): 575-90.
919. Wolter K.G., Hsu Y.T., Smith C.L., Nechushtan A., Xi X.G., Youle R.J. 1997. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. J Cell Biol., 139: 1281–1292
920. Wdowiak A., Wdowiak L., Wiktor H. 2007. Evaluation of the effect of using mobile phones on male fertility. Ann Agric Environ Med., 14(1): 169-72.
921. Woodruff R.I. 1989. Charge-dependent molecular movement through intercellular bridges in Drosophila follicles. Biological Bulletin, 176 (S): 71–78.
922. Woodruff R.I. and Telfer W.H., 1973. Polarized intercellular bridges in ovarian follicles of the cecropia moth. Journal of Cell Biology, 58: 172–188.
923. Woodruff R.I. and Telfer W.H. 1980. Electrophoresis of proteins in intercellular bridges. Nature, Lond. 286: 84-86.
924. Woodruff R.I., Telfer W.H. 1994. Steady-state gradient in calcium ion activity across the intercellular bridges connecting oocytes and nurse cells in Hyalophora cecropia. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 25: 9–20.
925. Woodruff R.I., Miller A.L., Jaffe L.F., 1991. Differences in free calcium concentration between oocytes and nurse cells revealed by corrected aequorin luminescence. Biological Bulletin, 181: 349–350.
926. Woodruff R.I., Kulp J.H., LaGaccia E.D., 1988. Electrically mediated protein movement in Drosophila follicles. Roux's Archives of Developmental Biology, 197: 231–238.
927. Woodruff R.I., Dittmann F., Telfer W.H. 1998. Ca2+ current from oocyte to nurse cells and suppression of uridine incorporation in the germinal vesicle of Hyalophora cecropia. Invertebrate Reproduction and Development, 34: 157–164.
928. Wu Y., Mehew J.W., Heckman C.A., Arcinas M., Boxer L.M. 2001. Negative regulation of bcl-2 expression by p53 in hematopoietic cells. Oncogene, 20: 240–251
929. Wu Q. and Brown M.R. 2006. Signaling and function of insulin-like peptides in insects. Annu Rev Entomol., 51: 1–24.
930. Wu X., Tanwar P.S., Raftery L.A. 2008. Drosophila follicle cells: morphogenesis in an eggshell. Semin Cell Dev Biol., 19(3): 271-82. Review
931. Wu Y., Zhuang Y., Han M., Xu T., Deng K. 2009. Ras promotes cell survival by antagonizing both JNK and Hid signals in the Drosophila eye. BMC Dev. Biol., 9: 53.
932. Wu J.N., Nguyen N., Aghazarian M., Sevrioukov E.A., Monserrate J.P., Tang W., Mabuchi M., Tan Y., White K., Brachmann C.B. 2010. grim promotes programmed cell death of Drosophila microchaete glial cells. Mech. Dev., 127: 407-417.
933. Wu S., Zhou F., Zhang Z., Xing D. 2011. Mitochondrial oxidative stress causes mitochondrial fragmentation via differential modulation of mitochondrial fission-fusion proteins. FEBS J., 278(6): 941-54.
934. Wyllie A.H., Kerr J.F.R., Currie A.R. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. Int Rev Cytol., 68: 251-306.
935. Wyllie A.H. 1993. Apoptosis. Br J Cancer, 67: 205-208
936. Xenos T.D. and Magras I.N. 2003. Low Power Density RF Radiation Effects on Experimental Animal Embryos and Foetuses, In: Stavroulakis P. (Ed.), Biological Effects of Electromagnetic Fields, Springer, 579-602.
937. Xia H., Zhang L., Chen G., Zhang T., Liu J., Jin M., Ma X., Ma D., Yuan J. 2010. Control of basal autophagy by calpain1 mediated cleavage of ATG5. Autophagy, 6(1): 61–66.

938. Xiao D., Zeng Y., Prakash L., Badmaev V., Majeed M., Singh S.V. 2010. ROS-dependent apoptosis by gugulipid extract of Ayurvedic medicine plant Commiphora mukul, in human prostate cancer cells is regulated by c-JUN N-terminal kinase. Mol Pharmacol., 79(3): 499-507.
939. Xi R., McGregor J.R., Harrison D.A. 2003. A gradient of JAK pathway activity patterns the anterior-posterior axis of the follicular epithelium. Dev Cell, 4(2): 167–77.
940. Xie T., Kawase E., Kirilly D., Wong M.D. 2005. Intimate relationships with their neighbors: tales of stem cells in Drosophila reproductive systems. Dev Dyn., 232(3): 775–90.
941. Xie L., jiang H., Sun W.J., Fu Y.T., Lu D.Q. 2006. [GSM 1,800 MHz radiofrequency electromagnetic fields induced clustering of membrane surface receptors and interference by noise magnetic fields]. Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi. 24(8): 461-4.
942. Xie T. and Li L. 2007. Stem cells and their niche: an inseparable relationship. Development, 134(11): 2001–6.
943. Xie T. and Spradling A.C. 2000. A niche maintaining germ line stem cells in the Drosophila ovary. Science, 290(5490): 328–30.
944. Xie T. and Spradling A.C. 1998. decapentaplegic is essential for the maintenance and division of germline stem cells in the Drosophila ovary. Cell, 94(2): 251–60.
945. Xu T., Caron L.A., Fehon R.G., Artavanis-Tsakonas S. 1992. The involvement of the Notch locus in Drosophila oogenesis. Development, 115(4): 913-22.
946. Xu S., Ning W., Xu Z., Zhou S., Chiang H., Luo J. 2006a. Chronic exposure to GSM 1800-MHz microwaves reduces excitatory synaptic activity in cultured hippocampal neurons. Neurosci Lett., 398: 253-257
947. Xu D., Li Y., Arcaro M., Lackey M., Bergmann A. 2005. The CARD-carrying caspase Dronc is essential for most, but not all, developmental cell death in Drosophila. Development, 132: 2125–2134.
948. Xu D., Wang Y., Willecke R., Chen Z., Ding T., Bergmann A. 2006. The effector caspases drICE and dcp-1 have partially overlapping functions in the apoptotic pathway in Drosophila. Cell Death Differ, 13: 1697–1706.
949. Xu S., Zhou Z., Zhang L., Yu Z., Zhang W., Wang Y., Wang X., Li M., Chen Y., Chen C., He M., Zhang G., Zhong M. 2009. Exposure to 1800 MHz radiofrequency radiation induces oxidative damage to mitochondrial DNA in primary cultured neurons. Brain Res., 1311: 189-96.
950. Yakovlev A.G. and Faden A.I. 2004. Mechanisms of neural cell death: implications for development of neuroprotective treatment strategies. NeuroRx., 1(1): 5-16.
951. Yamashima T., Saido T.C., Takita M., Miyazawa A., Yamano J., Miyakawa A., Nishijyo H., Yamashita J., Kawashima S., Ono T., Yoshioka T. 1996. Transient brain ischaemia provokes Ca2+, PIP2 and calpain responses prior to delayed neuronal death in monkeys. Eur J Neurosci., 8(9): 1932-44.
952. Yamashima T. 2000. Implication of cysteine proteases calpain, cathepsin and caspase in ischemic neuronal death of primates. Prog. Neurobiol., 62: 273–295.
953. Yamashima T. 2004. Ca2+-dependent proteases in ischemic neuronal death: a conserved 'calpain-cathepsin cascade' from nematodes to primates. Cell Calcium, 36: 285–293.
954. Yamashima T. and Oikawa S. 2009. The role of lysosomal rupture in neuronal death. Prog Neurobiol., 89(4): 343-58.
955. Yan J.G., Agresti M., Bruce T., Yan Y.H., Granlund A., Matloub H.S. 2007. Effects of cellular phone emissions on sperm motility in rats. Fertil Steril. 88(4): 957-64.
956. Yan J.G., Agresti M., Zhang L.L., Yan Y., Matloub H.S. 2008. Upregulation of specific mRNA levels in rat brain after cell phone exposure. Electromagn Biol Med., 27(2): 147-54.
957. Yan J.G., Agresti M., Zhang L.L., Yan Y., Matloub H.S. 2009. Qualitative effect on mRNAs of injury-associated proteins by cell phone like radiation in rat facial nerves. Electromagn Biol Med. 28(4): 383-90.
958. Yang L., Hao D., Wang M., Zeng Y., Wu S., Zeng Y. 2012. Cellular neoplastic transformation induced by 916 MHz microwave radiation. Cell Mol Neurobiol. 32(6): 1039-46.
959. Yao K., Wu W., Wang K., Ni S., Ye P., Yu Y., Ye J., Sun L. 2008. Electromagnetic noise inhibits radiofrequency radiation-induced DNA damage and reactive oxygen species increase in human lens epithelial cells. Mol Vis. 14: 964-9.
960. Yeung B.H., Huang D.C., Sinicrope F.A. 2006. PS-341 (bortezomib) induces lysosomal cathepsin B release and a caspase-2-dependent mitochondrial permeabilization and apoptosis in human pancreatic cancer cells. J Biol Chem., 281(17): 11923-32.
961. Yin K.J., Kim G.M., Lee J.M., He Y.Y., Xu J., Hsu C.Y. 2005. JNK activation contributes to DP5 induction and apoptosis following traumatic spinal cord injury. Neurobiol Dis., 20: 881–889

962. Yoneda T., Imaizumi K., Oono K., Yui D., Gomi F., Katayama T, Tohyama M. 2001. Activation of caspase-12, an endoplastic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2- dependent mechanism in response to the ER stress. J Biol Chem., 276: 13935–13940.
963. Yoo S.J., Huh J.R., Muro I., Yu H., Wang L., Wang S.L., Feldman R.M., Clem R.J., Müller H.A., Hay B.A. 2002. Hid, Rpr and Grim negatively regulate DIAP1 levels through distinct mechanisms. Nat Cell Biol., 4: 416-24.
964. Yu S.Y., Yoo S.J., Yang L., Zapata C., Srinivasan A., Hay B.A., Baker N.E. 2002. A pathway of signals regulating effector and initiator caspases in the developing Drosophila eye. Development, 129: 3269-3278.
965. Yu S.P. and Choi D.W. 2000. Ions, cell volume, and apoptosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97: 9360–9362
966. Yu S.Y., Yoo S.J., Yang L., Zapata C., Srinivasan A., Hay B.A., Baker N.E. 2002. A pathway of signals regulating effector and initiator caspases in the developing Drosophila eye. Development, 129: 3269–3278.
967. Yousefi S., Perozzo R., Schmid I., Ziemiecki A., Schaffner T., Scapozza L., Brunner T., Simon H.U. 2006. Calpain mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. Nat Cell Biol., 8(10): 1124-32.
968. Zaid H., Abu-Hamad S., Israelson A., Nathan I., Shoshan-Barmatz V. 2005. The voltage-dependent anion channel-1 modulates apoptotic cell death. Cell Death Differ., 12: 751–760
969. Zamzami N. and Kroemer G. 2005. p53 in apoptosis control: an introduction. Biochem Biophys Res Commun., 331: 685–687,
970. Zamzami N., Marchetti P., Castedo M., Hirsch T., Susin S.A., Masse B., Kroemer G. 1996. Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis. FEBS Lett., 384: 53–57
971. Zappia M.P., Brocco M.A., Billi S.C., Frasch A.C., Ceriani M.F. 2011. M6 membrane protein plays an essential role in Drosophila oogenesis. PLoS One., 6(5): e19715.
972. Zarnescu D.C. and Thomas G.H. 1999. Apical spectrin is essential for epithelial morphogenesis but not apicobasal polarity in Drosophila. J Cell Biol., 146(5): 1075–86.
973. Zartman J.J., Kanodia J.S., Yakoby N., Schafer X., Watson C., Schlichting K., Dahmann C., Shvartsman S.Y. 2009. Expression patterns of cadherin genes in Drosophila oogenesis. Gene Expr Patterns., 9(1): 31-6.
974. Zeni O., Romano M., Perrotta A., Lioi M.B., Barbieri R., d'Ambrosio G., Massa R., Scarfi M.R. 2005. Evaluation of genotoxic effects in human peripheral blood leukocytes following an acute in vitro exposure to 900 MHz radiofrequency fields, Bioelectromagnetics, 26: 258-265.
975. Zhan M., Yamaza H., Sun Y., Sinclair J., Li H., Zou S. 2007. Temporal and spatial transcriptional profiles of aging in Drosophila melanogaster. Genome Res., 17: 1236-1243.
976. Zhang H., Huang Q., Ke N., Matsuyama S., Hammock B., Godzik A., Reed J. 2000. Drosophila pro-apoptotic Bcl-2/Bax homologue reveals evolutionary conservation of cell death mechanisms. J Biol Chem., 275: 27303-27306.
977. Zhang Y. and Kalderon D. 2001. Hedgehog acts as a somatic stem cell factor in the Drosophila ovary. Nature, 410(6828): 599–604.
978. Zhang W., Wang Y., Long J., Girton J., Johansen J., Johansen K.M. 2003. A developmentally regulated splice variant from the complex lola locus encoding multiple different zinc finger domain proteins interacts with the chromosomal kinase JIL-1. J Biol Chem., 278: 11696–704.
979. Zhang D.Y., Xu Z.P., Chiang H., Lu D.Q., Zeng Q.L. 2006. Effects of GSM 1800 MHz radiofrequency electromagnetic fields on DNA damage in Chinese hamster lung cells. Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi., 40(3): 149-52.
980. Zhang S.Z., Yao G.D., Lu D.Q., Chiang H., Xu Z.P. 2008. Effect of 1.8 GHz radiofrequency electromagnetic fields on gene expression of rat neurons. Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi., 26(8): 449-52.
981. Zhang H., Kong X., Kang J., Su J., Li Y., Zhong J., Sun L. 2009. Oxidative Stress Induces Parallel Autophagy and Mitochondria Dysfunction in Human Glioma U251 Cells. Toxicol Sci., 110: 376-88.
982. Zhang H., Liu J., Li C.R., Momen B., Kohanski R.A., Pick L. 2009a. Deletion of Drosophila insulin-like peptides causes growth defects and metabolic abnormalities. Proc Natl Acad Sci U S A., 106: 19617–19622.
983. Zhao M., Forrester J.V., McCaig C.D. 1999. Physiological electric fields orient the axis of cell division. Proc Natl Acad Sci., 96: 4942–4946
984. Zhao Y., Wang Z.B., Xu J.X. 2003. Effect of cytochrome c on the generation and elimination of O2*- and H2O2 in mitochondria. J Biol Chem., 278: 2356–2360
985. Zhao T.Y., Zou S.P., Knapp P.E. 2007. Exposure to cell phone radiation up-regulates apoptosis genes in primary cultures of neurons and astrocytes. Neurosci Lett., 412(1): 34-8.
986. Zhao R., Xuan Y., Li X., Xi R. 2008. Age-related changes of germline stem cell activity, niche signaling activity and egg production in Drosophila. Aging Cell, 7(3): 344-54.

987. Zhou Y.P., Teng D., Dralyuk F., Ostrega D., Roe M.W., Philipson L., Polonsky K.S. 1998. Apoptosis in insulin-secreting cells. Evidence for the role of intracellular Ca2+ stores and arachidonic acid metabolism. J Clin Invest., 101: 1623-32.
988. Zhou L., Song Z., Tittel J., Steller H. 1999. HAC-1, a Drosophila homolog of APAF-1 CED-4 functions in developmental and radiation-induced apoptosis. Mol. Cell, 4: 745-755
989. Zimyanin, V.L., Belaya, K., Pecreaux, J., Gilchrist, M.J., Clark, A., Davis, I., St Johnston, D. 2008. In vivo imaging of oskar mRNA transport reveals the mechanism of posterior localization. Cell, 134(5): 843-853.
990. Zoratti M. and Szabo I. 1995. The mitochondrial permeability transition. Biochim Biophys Acta, 1241: 139–76.
991. Zou H., Li Y., Liu X., Wang X. 1999. An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. J. Biol. Chem., 274: 11549-11556

ΣΥΝΟΨΗ

Στη σύγχρονη εποχή της τεχνολογίας, ο άνθρωπος ζει μέσα σε ένα περιβάλλον βεβαρημένο από ποικίλες πηγές τεχνητών ηλεκτρομαγνητικών πεδίων (ΗΜΠ) ενός ευρέος φάσματος συχνοτήτων, 300MHz-3GHz. Ορισμένα παραδείγματα αποτελούν: οι φούρνοι μικροκυμάτων, οι κεραίες δορυφορικών επικοινωνιών και ραδιοτηλεόρασης, τα ασύρματα συστήματα δικτύου Wi-Fi, οι πομποί και δέκτες της κυψελωτής κινητής τηλεφωνίας, τα ασύρματα τηλέφωνα DECT κ.ά. Ειδικά η εκτεταμένη χρήση των κυψελωτών κινητών τηλεφώνων, τις δύο τελευταίες δεκαετίες, έχει προκαλέσει το ιδιαίτερο ενδιαφέρον, αλλά και την ανησυχία της επιστημονικής κοινότητας σχετικά με τους πιθανούς κινδύνους που μπορεί να κρύβει αυτή η παγιωμένη πλέον συνήθεια της καθημερινότητας του σύγχρονου ανθρώπου. Η μη ιονίζουσα ακτινοβολία των ραδιοσυχνοτήτων (RF), που χρησιμοποιεί η τεχνολογία των κινητών τηλεπικοινωνιών [συστήματα GSM-900 MHz (Global System for Mobile Telecommunications) και GSM/DCS-1800MHz (Digital Cellular System) με διαφορά στη φέρουσα συχνότητα] μεταδίδεται με παλμούς πολύ χαμηλών συχνοτήτων 217 Hz (ELF), ή περιλαμβάνει σήματα διαμόρφωσης σε συχνότητες ELF, για τη μεταφορά και μετάδοση της πληροφορίας. Ερευνητικές μελέτες, σε πλήθος βιολογικών συστημάτων και συνθηκών έκθεσης, διερευνούν τον τρόπο απόκρισης των κυττάρων/οργανισμών στα διάφορα είδη ηλεκτρομαγνητικών (Η/Μ) πεδίων. Η βιβλιογραφία περιλαμβάνει αντικρουόμενα αποτελέσματα σχετικά με τις μη-θερμικές και μη-γραμμικές επιδράσεις της RF ακτινοβολίας των κινητών τηλεφώνων στα μιτοχόνδρια, το αποπτωτικό μονοπάτι, τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ, το μεταβολισμό των ελευθέρων ριζών, τη γονιδιακή έκφραση, την κυτταρική διαφοροποίηση, το γενετικό υλικό, και τις πλασματικές μεμβράνες, ενώ δεδομένα έχουν προκύψει τόσο από επιδημιολογικές μελέτες όσο και από κλινικές δοκιμές. Ένας μεγάλος όγκος δεδομένων, όπως θα περίμενε κανείς, έχει συσσωρευθεί και αφορά στις ενδεχόμενες αλλοιώσεις της εγκεφαλικής λειτουργίας, συμπεριλαμβανομένων της διαπερατότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, της νευρωνικής ηλεκτρικής δραστηριότητας και της αυξημένης εκροής ιόντων ασβεστίου, της ισορροπίας των νευροδιαβιβαστών, της γνωστικής λειτουργίας, και των αυξημένων κρουσμάτων εγκεφαλικών όγκων. Πρόσφατες επίσης έρευνες κάνουν λόγο για την αυξημένη πιθανότητα υπογονιμότητας στον ανθρώπινο πληθυσμό εξαιτίας της βλάβης στο DNA και του επαγομένου από την ακτινοβολία οξειδωτικού στρες. Σε παρόμοια συμπεράσματα έχουν καταλήξει αντίστοιχες μελέτες σε άλλους οργανισμούς.

Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι, η ασυμφωνία πολλές φορές ανάμεσα στα ευρήματα των πειραματικών μελετών, στο συγκεριμένο ερευνητικό πεδίο, είναι αναμενόμενη και αναπόφευκτη, καθώς το παρατηρούμενο βιολογικό αποτέλεσμα μπορεί να επηρεαστεί από ένα πλήθος παραγόντων. Η βιολογική επίδραση εξαρτάται από το ποσό της ενέργειας που απορροφάται από τον κάθε οργανισμό, καθώς και από τον τρόπο που αυτή κατανέμεται στο χώρο και το χρόνο. Η συχνότητα, η ένταση, η διάρκεια έκθεσης και ο αριθμός δόσεων της ακτινοβολίας μπορούν να επηρεάσουν την κυτταρική απόκριση, ενώ ο συνδυασμός και η αλληλεπίδραση των παραπάνω παραγόντων διαμορφώνει το τελικό βιολογικό αποτέλεσμα.

Τα πειράματα της παρούσας διατριβής διεξήχθησαν σε νεοεκδυθέντα δίπτερα έντομα *Drosophila melanogaster*. Ο κύκλος ζωής του εντόμου είναι σύντομος και περιλαμβάνει τέσσερα διακριτά στάδια: το αυγό, την προνύμφη, τη χρυσαλίδα και το ενήλικο άτομο. Σύμφωνα με τα ευρήματα προηγουμένων μελετών του εργαστηρίου μας, η συνεχής ημερήσια έκθεση διάρκειας 6 λεπτών του εντόμου στη διαμορφωμένη, από την ανθρώπινη ομιλία, ακτινοβολία του συστήματος GSM-900MHz, κατά τη διάρκεια των

πρώτων 5 ημερών της ενήλικης ζωής του, προκαλεί σημαντική μη-θερμική μείωση της αναπαραγωγικής του ικανότητας/μέσης ωοτοκίας, όπως αυτή προσδιορίζεται από τον αριθμό χρυσαλίδων της πρώτης θυγατρικής γενιάς.

Η παρούσα διατριβή επικεντρώθηκε στη διερεύνηση, σε κυτταρικό επίπεδο, της αιτίας, που ευθύνεται για την παρατηρούμενη μείωση της αναπαραγωγικής ικανότητας των εντόμων. Για το σκοπό αυτό, εξετάστηκαν: 1) ωοθυλάκια όλων των αναπτυξιακών σταδίων προερχόμενα από ωοθήκες εκτεθειμένων εντόμων (*in vivo* έκθεση) και 2) ωοθυλάκια εκτεθειμένα κατά την *in vitro* ανάπτυξή τους, στα GSM πεδία κοινών κινητών τηλεφώνων. Η έκθεση των εντόμων πραγματοποιήθηκε σε τιμές έντασης εντός των θεσπισμένων ορίων από τη διεθνή επιτροπή για την προστασία από τη μη-ιονίζουσα ακτινοβολία (ICNIRP, 1998), Παράλληλα, μελετήθηκαν ορισμένες παράμετροι της ακτινοβολίας (αριθμός δόσεων, διάρκεια και ένταση) ως προς τον τρόπο που αυτές καθορίζουν το τελικό βιολογικό αποτέλεσμα.

Η κάθε ωοθήκη του εντόμου αποτελείται από 18-20 ωοθηκάρια, παράλληλες δηλαδή σειρές ωοθυλακίων διαφόρων αναπτυξιακών σταδίων. Τα ωοθυλάκια είναι γενετικές/βλαστικές κύστεις, 16 κυττάρων που περιβάλλονται από περίπου 1000 σωματικής προέλευσης θυλακοκύτταρα. Στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης του ωοθυλακίου, που διεξάγονται στην περιοχή του γερμαρίου (την πλέον πρόσθια περιοχή του ωοθηκαρίου), ένα από τα βλαστικά κύτταρα διαφοροποιείται σε ωοκύτταρο, ενώ τα υπόλοιπα 15 αναπτύσσονται και συνιστούν τα πολυπλοειδικά τροφοκύτταρα. Τα τελευταία τροφοδοτούν το ωοκύτταρο με θρεπτικά συστατικά, οργανίδια, mRNAs, πρωτεΐνες, που απαιτούνται για τη διεξαγωγή της ωογένεσης, αλλά και την ανάπτυξη του εμβρύου. Ο πληθυσμός των σωματικών θυλακοκυττάρων, που υπόκειται σε μιτωτικές διαιρέσεις μέχρι και το αναπτυξιακό στάδιο 6, απαιτείται για την εγκαθίδρυση των αξόνων πολικότητας στο ωοκύτταρο, για τη σύνθεση της λεκίθου, της βιτελλινής μεμβράνης και του χορίου. Τα ωοθυλάκια καθώς εξέρχονται από το γερμάριο, και εισέρχονται στο βιτελλάριο, αναπτύσσονται μέσα από μία σειρά 14 διακριτών σταδίων (πρώιμης ωογένεσης στ. 1-7, μέσης στ.8-10, όψιμης στ. 11-14), με το ωοκύτταρο του σταδίου 14 να είναι ώριμο για γονιμοποίηση και απόθεση.

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (ΠΚΘ) είναι ιδιαίτερα μελετημένος και παρατηρείται ως απόκριση τόσο σε ενδογενή (αναπτυξιακά) όσο και σε εξωγενή (από το περιβάλλον) ερεθίσματα ακολουθώντας δύο διαφορετικά πρότυπα με καθοριστικό ρόλο στη φυσιολογική ανάπτυξη των ωοθυλακίων.

Σύμφωνα με το αναπτυξιακά ρυθμιζόμενο και ασύγχρονο πρότυπο, ο φυσιολογικός, με ορισμένα χαρακτηριστικά απόπτωσης, θάνατος, αρχίζει στο στάδιο 11 στα τροφοκύτταρα του κάθε αναπτυσσομένου ωοθυλακίου με την χαρακτηριστική αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης πέριξ των πυρήνων και το σχηματισμό των δεσμών ακτίνης, που απαιτούνται για τη διεξαγωγή της διαδικασίας αδειάσματος του τροφοκυτταρικού υλικού στο ωοκύτταρο. Στο στάδιο 12, η πυρηνική χρωματίνη συμπυκνώνεται, ενώ ακολουθεί ο θρυμματισμός του DNA κατά το στάδιο 13. Τα υπολείμματα των τροφοκυττάρων εγκολπώνονται και απομακρύνονται από τα γειτονικά θυλακοκύτταρα, τα οποία επίσης υφίστανται κυτταρικό θάνατο στο στάδιο 14. Το δεύτερο πρότυπο παρατηρείται σποραδικά στα στάδια 7-8 (πριν την βιτελλογένεση της μέσης ωογένεσης) και στο στάδιο του γερμαρίου και συνιστά απόκριση απέναντι σε διάφορα στρεσογόνα ερεθίσματα, ενώ χαρακτηρίζεται από την ταυτόχρονη ανίχνευση των συμπυκνωμένων και θρυμματισμένων πυρήνων των τροφοκυττάρων και των θυλακοκυττάρων, όπως και από το αποδιοργανωμένο δίκτυο ακτίνης στα ανώμαλα ωοθυλάκια. Το γερμάριο και τα στάδια 7-8 θεωρούνται τα δύο σημεία ελέγχου της ωογένεσης και δρουν ως ένα είδος προστατευτικού μηχανισμού της αναπτυξιακής διαδικασίας για τον περιορισμό της απώλειας ενέργειας και θρεπτικών υλικών σε ωοθυλάκια ανίκανα να αναπτυχθούν σε φυσιολογικά ώριμα αυγά.

Σύμφωνα με τα πειραματικά μας πρωτόκολλα, νεοεκδυθέντα έντομα που συλλέχθησαν εντός 4 ωρών, τοποθετούνται σε σωλήνες με τροφή, χωριστά τα αρσενικά από τα θηλυκά, όπου και παραμένουν για τις επόμενες 2 μέρες. Με την ολοκλήρωση του 2ου 24ωρου τα έντομα είναι σεξουαλικά ώριμα και τοποθετούνται σε νέους κοινούς σωλήνες έτοιμα για διασταύρωση. Σε αυτούς παραμένουν για 3 ακόμη 24ωρα κατά τη διάρκεια των οποίων τα θηλυκά παρουσιάζουν το μέγιστο της ωοτοκίας τους.

Η έκθεση των εντόμων έλαβε χώρα κατά τη διάρκεια των παραπάνω 5 24ώρων σύμφωνα με τα πρωτόκολλα έκθεσης της κάθε πειραματικής ενότητας. Το 6^{ο} 24ωρο πραγματοποιείται μία επιπλέον έκθεση και 2-3 ώρες αργότερα τα πατρικά έντομα απομακρύνονται από τους σωλήνες, οι οποίοι φυλάσσονται σε θάλαμο σταθερών συνθηκών για τα επόμενα 6-8 24ωρα, μέχρι δηλαδή την ανάπτυξη των θυγατρικών χρυσαλίδων. Στις ωοθήκες των θηλυκών εντόμων, που απομακρύνθηκαν από τους σωλήνες, κάνουμε ανατομία σε ισότονο με την αιμολέμφο των εντόμων διάλυμα Ringer's προκειμένου να λάβουμε τα ωοθυλάκιά τους. Τα διαχωρισμένα ωοθυλάκια επωάζονται στη συνέχεια με την κατάλληλη χρώση για την ανίχνευση των ακόλουθων χαρακτηριστικών κυτταρικού θανάτου: αποδόμηση DNA, αποδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, συμπύκνωση της πυρηνικής χρωματίνης και ενεργοποίησης κασπασών. Η εξέταση των δειγμάτων γίνεται σε μικροσκόπιο φθορισμού ή συνεστιακό μικροσκόπιο laser (CLSM). Ορισμένα δείγματα εξετάστηκαν και μετά από έγκλειση, τομές και χρώση στο φωτονικό μικροσκόπιο και ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης.

Στην περίπτωση της *in vitro* μελέτης, εξετάστηκε η οργάνωση και κατανομή του κυτταροσκελετού της ακτίνης σε απομονωμένα ωοθυλάκια, που προήλθαν από την *in vitro* ανάπτυξή τους για 3h σε θρεπτικό μέσο Schneider's και την ταυτόχρονη έκθεσή τους στην GSM ακτινοβολία.

Οι πειραματικές ενότητες που εξετάστηκαν είναι οι ακόλουθες:

1) Επίδραση της GSM ακτινοβολίας στο DNA και τον κυτταροσκελετό της ακτίνης-σύγκριση βιολογικής επίδρασης συνεχούς και διακοπτόμενης έκθεσης,

2) Επαγωγή χαρακτηριστικών αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου στα ωοθυλάκια της πρώιμης και μέσης ωογένεσης από την GSM ακτινοβολία

3) Επίδραση της GSM-ακτινοβολίας στα ωοθυλάκια της όψιμης ωογένεσης

4) Επίδραση της GSM-ακτινοβολίας στην *in vitro* ανάπτυξη των ωοθυλακίων

καταδεικνύοντας τα εξής:

1) Τα αυξημένα ποσοστά ανίχνευσης αποδομημένου DNA και τις αλλοιώσεις στον κυτταροσκελετό της ακτίνης (έως 46% και 44% αντιστοίχως) από όλους τους τύπους έκθεσης στα κύτταρα ωοθυλακίων της πρώιμης και μέσης ωογένεσης (στ. 1-10) λόγω της έκθεσης στην GSM ακτινοβολία (6min/day). Και τα δύο χαρακτηριστικά κυτταρικού θανάτου βρέθηκαν να συμπίπτουν στα ίδια κύτταρα των εκφυλισμένων ωοθυλακίων. Παράλληλα, διαπιστώθηκε η σημαντική μείωση της μέσης ωοτοκίας μέχρι το ποσοστό του 43%. Οι διακοπτόμενοι τύποι με τα σύντομα διαλείμματα (10 λεπτών) μεταξύ των δόσεων της ακτινοβολίας αποδείχθηκαν στον ίδιο σχεδόν βαθμό δραστικοί με τον συνεχή τρόπο έκθεσης ίδιας συνολικής διάρκειας, παρέχοντας μία ένδειξη αθροιστικής επίδρασης της συγκεκριμένης ακτινοβολίας. Αντιθέτως, τα μεγαλύτερα διαστήματα διακοπής (6 ωρών) επέτρεψαν στα έντομα να ανακάμψουν από το στρες της έκθεσης

ενδεχομένως λόγω ενεργοποίησης κάποιου μηχανισμού κυτταρικής επιβίωσης αντί θανάτου.

2) Την ανίχνευση επιπροσθέτων χαρακτηριστικών κυτταρικού θανάτου, όπως η ενεργοποίηση των κασπασών στο κυτταρόπλασμα των τροφοκυττάρων και η συμπύκνωση της πυρηνικής χρωματίνης, στα κύτταρα ωοθυλακίων της πρώιμης και μέσης ωογένεσης (στ. 1-10), σε ποσοστά της τάξεως του 30%. Σημειώνεται ότι, η συμπυκνωμένη πυρηνική χρωματίνη βρέθηκε να συνυπάρχει με το θρυμματισμένο DNA στους ίδιους τροφοκυτταρικούς πυρήνες. Η διαφορά που καταγράφηκε στα ποσοστά της παρούσας σε σύγκριση με τα ποσοστά της προηγούμενης ενότητας μπορεί να αποδοθεί στη χαμηλότερη τιμή έντασης της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας από το κινητό τηλέφωνο στην οποία έλαβε χώρα η έκθεση των εντόμων.

3) Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ενότητας αυτής, η έκθεση των εντόμων στην GSM ακτινοβολία (6min/day) δεν προκάλεσε μεταβολές: 1) στον ΠΚΘ των τροφοκυττάρων (στ. 12-13) και τη διαδικασία αδειάσματος του τροφοκυτταρικού υλικού στο ωοκύτταρο (στ. 11) και 2) στην ενδογενή ενεργότητα της υπεροξειδάσης του κελύφους (στ. 14). Ωστόσο, δύο τύπου αλλοιώσεις διαπιστώθηκαν μετά την έκθεση των εντόμων μεγαλύτερης ημερήσιας διάρκειας (30min/day). Στην περίπτωση αυτή υπήρξαν ενδείξεις ότι η GSM έκθεση επηρεάζει την ακεραιότητα του επιθηλίου των θυλακοκυττάρων (στ. 12-13) με την παρουσία ασυνεχειών σε αυτό, ενώ μεταβολές διαπιστώθηκαν και στο σχήμα του ωοκυττάρου (συρρίκνωση) (στ. 14).

4) Τέλος, η GSM έκθεση [3h (45min on/15min off)] απομονωμένων ωοθυλακίων σταδίου 11 σε *in vitro* συνθήκες, επιφέρει μεταβολές στην οργάνωση και την κατανομή του δικτύου ακτίνης στα τροφοκύτταρα και τα θυλακοκύτταρα και κατ'επέκταση στη διαδικασία αδειάσματος του τροφοκυτταρικού υλικού στο ωοκύτταρο (dumping).

Σύμφωνα με τα παραπάνω ευρήματα, η απόπτωση είναι ένα τουλάχιστον είδος κυτταρικού θανάτου που επάγεται, από την έκθεση των εντόμων στην GSM ακτινοβολία (6min/day) των κινητών τηλεφώνων, στα κύτταρα των ωοθυλακίων όλων των σταδίων της πρώιμης και μέσης ωογένεσης. Ωστόσο, η πιθανότητα η ακτινοβολία να επηρεάζει και μηχανισμούς άλλων τύπων κυτταρικού θανάτου, όπως της νέκρωσης, δεν θα μπορούσε να αποκλειστεί. Μεγαλύτερη ευαισθησία όπως ήταν αναμενόμενο, επέδειξαν τα ωοθυλάκια στα δύο σημεία ελέγχου της ωογένεσης, στο γερμάριο και τα στάδια 7-8 με τα τροφοκύτταρα να είναι αυτά στα οποία κυρίως ανιχνεύονται τα χαρακτηριστικά του επαγομένου κυτταρικού θανάτου. Επιπλέον, σημαντική υπήρξε η διαπίστωση ότι τα ποσοστά που προήλθαν από την εφαρμογή και των δύο πειραματικών πρωτοκόλλων (αναπαραγωγικής ικανότητας και ανίχνευσης κυτταρικού θανάτου) στις ίδιες ομάδες εντόμων σχεδόν ταυτίζονται, και άρα συνάγεται το συμπέρασμα ότι, ο επαγόμενος κυτταρικός θάνατος των τροφοκυττάρων/θυλακοκυττάρων, που καταλήγει στον εκφυλισμό των ωοθυλακίων, είναι ο κυρίως υπεύθυνος για την παρατηρούμενη μείωση της μέσης ωοτοκίας του εντόμου. Άλλωστε, στο συμπέρασμα αυτό μπορούμε να καταλήξουμε και από το γεγονός ότι, τα ωοθυλάκια των σταδίων 11-13 παρουσίασαν φυσιολογική ανάπτυξη (6min/day). Αντιθέτως, οι ασυνέχειες στο επιθήλιο των θυλακοκυττάρων, που διαπιστώθηκαν στην περίπτωση της έκθεσης μεγαλύτερης χρονικής διάρκειας (30min/day), θα μπορούσαν να αποδοθούν στον επαγόμενο θάνατο των θυλακοκυττάρων, σε μεταβολές κατά τις διαδικασίες των μιτωτικών τους διαιρέσεων (στάδια 1-6), είτε τέλος σε μεταβολές των συνιστωσών κυτταρικής πρόσφυσης. Τέλος, τα δεδομένα αλλοίωσης του δικτύου ακτίνης *in vitro* είναι δυνατόν να οφείλονται στην οξείδωση της ακτίνης ή την αλλαγή ενεργότητας πρωτεϊνικών μορίων που σχετίζονται με αυτή, λόγω οξείδωσης ή μεταβολών στις ιοντικές συγκεντρώσεις ασβεστίου. Αντίστοιχη ερμηνεία μπορεί να δοθεί και στην περίπτωση συρρίκνωσης του ωοκυττάρου.

Σε επίπεδο κυττάρου, οι παρατηρούμενες βιολογικές επιδράσεις μπορούν να αποδοθούν στην αλληλεπίδραση των Η/Μ πεδίων με τις κυτταρικές μεμβράνες, σύμφωνα με τον προταθέντα βιοφυσικό μηχανισμό του εργαστηρίου μας. Πιο συγκεκριμένα, το αντικανονικό άνοιγμα/κλείσιμο των ηλεκτροευαίσθητων διαμεμβρανικών ιοντικών καναλιών (π.χ. κανάλια Ca^{+2}), λόγω της εξαναγκασμένης ταλάντωσης, που υφίστανται τα ελεύθερα ιόντα που βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις εκατέρωθεν των μεμβρανών, από τις ELF συνιστώσες των σημάτων των κινητών τηλεφώνων, μπορεί να ανατρέψει την ηλεκτροχημική ισορροπία του κυττάρου και κατ'επέκταση να προκαλέσει δυσλειτουργία στα μιτοχόνδρια ή τα λυσοσώματα, καθώς και υπερπαραγωγή ενεργών ενώσεων οξυγόνου (ROS), μεταβολές ικανές να επηρεάσουν τους μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου των τροφοκυττάρων και των θυλακοκυττάρων των ωοθυλακίων.

Ωστόσο, η σύνδεση ανάμεσα στη δράση των RF Η/Μ πεδίων και τις επερχόμενες αλλαγές των ενδοκυτταρικών ιοντικών συγκεντρώσεων, το οξειδωτικό στρες και τις μεταβολές της κυτταρικής λειτουργίας χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΑΓΓΛΙΚΗ (SUMMARY)

Electromagnetic waves (EMWs) ranging in frequency from 300 MHz to 300 GHz, are increasingly present in our daily environment, for example, in microwave ovens, satellite and radio/TV transmission, Wi-Fi, cellular-phone transmitters/receivers, cordless DECT telephones, etc. Especially the intensive use of cellular mobile phones in the last 20 years has aroused concern about possible health problems that may be caused by this kind of radiation. Non ionizing Radiofrequency (RF) microwave radiations used in mobile telecommunications [systems: GSM-900MHz (Global System for Mobile Telecommunications) and GSM/DCS-1800MHz (Digital Cellular System), which differ in the carrier frequency] are always transmitted within pulses of extremely low frequency (ELF), or include ELF modulating signals in order to be able to carry and transmit information. The response of cells to different types of electromagnetic fields (EMFs) has been demonstrated in various systems and conditions. The literature contains controversial reports on the non thermal and non linear effects of RF-EMW on, mitochondria, apoptosis pathway, heat shock proteins, free radical metabolism, gene expression, cell differentiation, DNA damage and the plasma membrane. Epidemiological and clinical studies have also expanded our knowledge. Among the effect of RF-EMW on various body organs, possible effects on the brain is the most researched area and various effects of MWs from mobile phones on the central nervous system, including permeability of the blood–brain barrier (BBB), neuronal electrical activity and increase in calcium ion efflux, neurotransmitter balance, cognitive function, increased incidence of brain tumors, have recently been reviewed. Recent studies suggest that RF-EMW emitted from cell phones may be responsible for the induced increased infertility to humans, due to DNA damage and oxidative stress. Similar findings have emerged from studies in other organisms.

It is worth mentioning that, differences in experimental outcomes are expected, since many factors could influence the outcome of experiments in the EMF research. Any effect of EMF has to depend on the energy absorbed by a biological organism and on how the energy is delivered in space and time. Frequency, intensity, exposure duration,

and the number of exposure episodes can affect the response, and these factors can interact with each other to produce different effects.

The experiments of the present thesis were conducted on newly emerged adult dipteran flies, *Drosophila melanogaster*. The life cycle of the insect is short and concludes four stages: egg, larva, pupa, and adult. According to previous experiments of our laboratory, a 6-min daily continuous exposure of the insects to GSM-900MHz (Global System for Mobile Telecommunications) signals under real exposure conditions, i.e. modulated by human voice, during the first 5 days of their adult life, brings about a significant and non-thermal decrease in their reproductive capacity, as defined by the number of F1 pupae.

In the present study we attempted to discover the cause of the observed reduction in the reproductive capacity by examining 1) the cells of the egg chambers of all developmental stages taken from the ovaries of the exposed insects to GSM fields of commercial cellular mobile phones (*in vivo* exposure) and 2) egg chambers, which were exposed to GSM fields during their *in vitro* development. The intensity values used in the exposure systems were typical for digital mobile telephony handsets and they were all within the established exposure criteria [International Commission for Non-Ionizing Radiation Protection (ICNIRP) 1998]. Moreover, we studied the influence of the above mentioned parameters of radiation exposure (intensity/power density, number of episodes, duration) on the biological outcome.

Each *Drosophila* ovary is composed of approximately fifteen ovarioles, chains of developing egg chambers or follicles. Egg chambers are sixteen-cell germline cysts surrounded by up to a thousand somatic follicle cells. Early in egg chamber development within the region of germarium (the most anterior region of the ovariole) one of the germline cells is specified to differentiate as an oocyte, and the remaining fifteen cells develop as polyploid nurse cells. The nurse cells supply the oocyte with nutrients, organelles, mRNAs, and proteins needed throughout oogenesis and early embryonic development. The somatic follicle cells, which proliferate until stage 6, are required for proper axis specification of the oocyte and synthesis of yolk, vitelline membrane and chorion. Egg chambers move out of the germarium progressing through fourteen defined stages of oogenesis (early oogenesis st. 1-7, mid-oogenesis st. 8-10, late st. 11-14), where a stage-14 oocyte is mature to be fertilized and oviposited.

Programmed cell death (PCD) in the *Drosophila* ovary has been extensively studied and occurs in response to both developmental and environmental stimuli, following two different patterns, playing an integral role in the normal development of every oocyte.

According to the first developmentally regulated and asynchronous pattern, physiological cell death commences at stage 11 in the nurse cells of every normally developing follicle, with the rearrangement of the peri-nuclear actin-cytoskeleton and the formation of actin cables required for the process of dumping. At stage 12, chromatin condensation proceeds and ends with the DNA fragmentation of the nurse-cell nuclei at stage 13. The cell remnants are engulfed by the adjacent follicle cells that also die physiologically at stage 14. The second pattern, which is sporadically observed at stages 7–8 (before vitellogenesis) and in region 2 in the germarium, is induced in response to different stress stimuli and it is marked simultaneously by the condensed, fragmented nurse-cell and follicle-cell nuclei and the disorganized actin network of the abnormal follicles. Stages 7–8 and the region 2 within the germarium are the two checkpoints that provide a protective mechanism in the process of oogenesis: they remove defective egg chambers that are unable to develop into fertile eggs, thus preventing the waste of precious nutrients.

According to the experimental protocols we placed flies that emerged within 4 h, males and females separately, in cylindrical glass vials containing standard fly food. The insects were kept there for 2 days. The third day, when both female and male insects are sexually mature, they were transferred into a common vial with fresh food, one vial for each group, where they were kept for another 3 days, a period in which female insects provide the maximum of their oviposition.

The exposure of the flies took place during the above mentioned 5 days according to the exposure system and protocol of each section. On the sixth day there was an additional last exposure and 3 h later the parent flies were removed from the vials. The vials with the developing embryos were kept in the culture room for another 6–8 days, in order to count the number of F1 pupae developed in each vial. Removed maternal flies obtained from the above procedure were then anaesthetized and their ovaries were dissected and separated into single follicles in Ringer's solution. The follicles were then incubated and treated with the appropriate staining for the detection of the following cell death features: DNA fragmentation, actin-cytoskeleton disorganization, chromatin condensation and caspase activation. Specimens were then examined under fluorescence/CLSM microscope. Samples were also prepared for observation under transmission electron microscope.

In the case of the *in vitro* study, we examined the actin cytoskeleton organization and distribution in the egg chamber cells after their *in vitro* development in Schneider's medium and the simultaneously exposure to the GSM field.

The experimental sections are the following:

1) The effect of GSM exposure on DNA and actin cytoskeleton-Comparison between the continuous and the four different patterns of intermittent exposure

2) The induced apoptotic cell death by GSM exposure on the egg chamber cells of the early and mid-oogenesis

3) The effect of GSM exposure on the egg chambers of the late stages of oogenesis

4) The effect of GSM exposure on the egg chambers during their *in vitro* development.

which demonstrated:

1) That all types of exposure resulted in a significant decrease of the reproductive capacity, up to 43%, and induction of DNA fragmentation and actin cytoskeleton alterations (up to 46% and 44% respectively) in the egg chamber cells of the early and mid-oogenesis (st. 1-10). Both cell death features were found to coincide in the same cells of the defective follicles. Intermittent exposures with 10-min intervals between exposure sessions proved to be almost equally effective as continuous exposure of the same total duration, an evidence for cumulative effects of radiation. On the contrary, longer intervals (6h) between different doses allowed insects to recover from the stress of exposure to radiation, providing some evidence for the activation of a cell survival response.

2) The detection of additional signs of cell death, cytoplasmic caspase activation and chromatin condensation, in the egg chamber cells of the early and mid-oogenesis, in the order of 30%. Nurse cell nuclei were found both fragmented and condensed. The difference between the percentages recorded in this section in comparison to the preceding one can be attributed to the lower power density of the applied field.

3) That the 6min/day GSM exposure has no effect on the programmed cell death of

the nurse cells (st.12-13), the dumping process (st. 11), and the endogenous peroxidase activity (st. 14). However, examining egg chambers after the 30min/day exposure of the insects, again during the first 6 days of their adult life, we observed that GSM exposure affected the integrity of the follicular epithelium (st. 12-13) as well as the shape of the oocyte (st. 14).

4) Finally, our results indicated that 3h (45min on/15min off) GSM exposure of the egg chambers during their *in vitro* development causes significant defects in the actin cytoskeleton organization and distribution in their nurse and follicle cells and affects the dumping process.

The above observations strongly suggest that, at least apoptosis is one kind of cell death induced by mobile phone radiation (6min/day x 6 days) in the present biological system, being responsible for the degeneration of the egg chambers detected at all developmental stages of the early and mid-oogenesis. However, the induction of other types of cell death, for example necrotic, can not be excluded. The egg chambers of the two checkpoints showed the highest sensitivity against this kind of stress with the apoptotic features mainly provided by their nurse cells. Moreover, the percentages of the degenerative follicles were similar to those of the reduction in the reproductive capacity; therefore we assume that the induced cell death in the egg chamber cells is the main cause for the decreased number of F1 pupae.

The origin of the follicular discontinuities, associated with GSM exposure, may be attributed to the failure of sufficient follicle cell division or the induced follicle cell death. An alternate explanation could be the GSM effect on the adhesive properties of the cells. Finally, the effect of GSM exposure on the actin cytoskeleton and the dumping process in the *in vitro* study could be attributed to the oxidation of actin or changes in the protein activity, which interact with the actin cytoskeleton, due to oxidation or changes in the intracellular Ca^{+2} concentration. The same explanation can be given for the observed change in the shape of the oocyte.

At the cellular level, the interaction between EMFs and cell membranes is a possible interpretation of the observed biological effects, according to the Ion Forced-Vibration Theory proposed by our laboratory. More specifically, the irregular gating of electrosensitive membrane ion channels (for example Ca^{+2} channels) due to their interaction with the ELF components of mobile phone signals may lead, to disruption of the cell's electrochemical balance and consequently to mitochondrial/lysosomal dysfunction and ROS overproduction, able to affect many aspects of the nurse/follicle cell death mechanism.

However, the link between RF-EMF exposure and changes in intracellular ion concentration, oxidative stress, and alterations in the cell function merits further investigation.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι (ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ)

2000: Αποφοίτηση από το 2ο Λύκειο Καισαριανής με βαθμό 19.6

Ανώτατες Σπουδές

2000-2005: Πτυχίο Βιολογίας Πανεπιστημίου Αθηνών
Διάρκεια φοίτησης 4 ½ έτη, Βαθμός πτυχίου **7.49**
2003-2004: **Διπλωματική εργασία: "**Βιολογικές Επιδράσεις του ηλεκτρικού πεδίου και της ακτινοβολίας των κινητών τηλεφώνων στην αναπαραγωγική ικανότητα του εντόμου *Drosophila melanogaster*"-
Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Ε.Κ.Π.Α.
Επιβλέπων: Καθηγητής Λουκάς Χ. Μαργαρίτης

2005- 2012: Εκπόνηση **Διδακτορικής Διατριβής** με τίτλο:
«Επιδράσεις Ηλεκτρομαγνητικών πεδίων σε βιολογικά συστήματα»
Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.
Επιβλέπων: Καθηγητής Λουκάς Χ. Μαργαρίτης (Ομότιμος από 1-9-10)

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Λουκάς Χ. Μαργαρίτης	Ομ. Καθηγητής Πανεπιστημίου Αθηνών
Σταύρος Κουσουλάκος	Αν. Καθηγητής Πανεπιστημίου Αθηνών
Ισιδώρα Παπασιδέρη	Αν. Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Αθηνών

Υποτροφία

2006-2009: Υποτροφία Ιδρύματος Κρατικών Υποτροφιών (Ι.Κ.Υ.) για την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής

Ξένες Γλώσσες

Αγγλικά (άριστη γνώση), Γερμανικά (πολύ καλή γνώση)
Αραβικά (πολύ καλή γνώση)

Δραστηριότητες

2005-2010: Συμμετοχή σε μετρήσεις έντασης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας από σταθμούς βάσης κινητής τηλεφωνίας, καθώς και παρουσιάσεις σε ημερίδες σχετικά με την επικινδυνότητα της ακτινοβολίας
2006-2010: Συμμετοχή σε εργαστηριακές ασκήσεις Κυτταρικής Βιολογίας και Βιοφυσικής Ακτινοβολιών προπτυχιακών φοιτητών του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών, καθώς και σε διπλωματικές εργασίες της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου Ηλεκτρομαγνητικής Βιολογίας
2005-2010: Παράδοση μαθημάτων Βιολογίας, Φυσικής και Χημείας σε μαθητές Γυμνασίου και Λυκείου
2010-2012: Παράδοση μαθημάτων σε πτυχιούχους-υποψηφίους κατατακτηρίων εξετάσεων για εισαγωγή σε Ανώτατες Σχολές

<u>Συνέδρια</u>

Παρακολούθηση και παρουσιάσεις σε συνέδρια της Ελληνικής Εταιρίας Βιολογικών Επιστημών (ΕΕΒΕ): Ερέτρια 2002, Μυτιλήνη 2003, Βόλος 2004, Ναύπλιο 2005, Ιωάννινα 2006, Καβάλα 2007, Θεσσαλονίκη 2008, Πάτρα 2009, Καρπενήσι 2010.
Συμμετοχή στο 1^{ο} Πανελλήνιο Συνέδριο *Επιπτώσεων της Ηλεκτρομαγνητικής Ακτινοβολίας στην Υγεία,* Θεσσαλονίκη 2008

Ἄχ ὄμορφιὰ
κι ἄν δὲν μοῦ παραδώθηκες ὅλόκληρη ποτὲ
κάτι κατάφερα νὰ σοῦ ὑποκλέψω

Οδυσσέας Ελύτης
(ΑΚΙΝΔΥΝΟΥ, ΕΛΠΙΔΟΦΟΡΟΥ, ΑΝΕΜΠΟΔΙΣΤΟΥ
Τα ελεγεία της Οξώπετρας)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ-(ΕΠΙΣΥΝΑΨΗ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗΣ)

Chavdoula E.D., Panagopoulos D.J., Margaritis L.H. 2010. Comparison of biological effects between continuous and intermittent exposure to GSM-900 MHz mobile phone radiation. Detection of apoptotic cell death features*,* Mutation Research, 700: 51-61.

Mutation Research 700 (2010) 51–61

Contents lists available at ScienceDirect

Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/gentox
Community address: www.elsevier.com/locate/mutres

Comparison of biological effects between continuous and intermittent exposure to GSM-900-MHz mobile phone radiation: Detection of apoptotic cell-death features

Evangelia D. Chavdoula, Dimitris J. Panagopoulos, Lukas H. Margaritis*

Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, 15784 Athens, Greece

A R T I C L E I N F O

Article history:
Received 4 August 2009
Received in revised form 27 March 2010
Accepted 28 April 2010
Available online 21 May 2010

Keywords:
DNA fragmentation
Actin disorganization
Apoptosis
Drosophila

A B S T R A C T

In the present study we used a 6-min daily exposure of dipteran flies, *Drosophila melanogaster*, to GSM-900 MHz (Global System for Mobile Telecommunications) mobile phone electromagnetic radiation (EMR), to compare the effects between the continuous and four different intermittent exposures of 6 min total duration, and also to test whether intermittent exposure provides any cumulative effects on the insect's reproductive capacity as well as on the induction of apoptotic cell death. According to our previous experiments, a 6-min continuous exposure per day for 5 days to GSM-900 MHz and DCS-1800 MHz (Digital Cellular System) mobile phone radiation, brought about a large decrease in the insect's reproductive capacity, as defined by the number of F_1 pupae. This decrease was found to be non-thermal and correlated with an increased percentage of induced fragmented DNA in the egg chambers' cells at early- and mid-oogenesis. In the present experiments we show that intermittent exposure also decreases the reproductive capacity and alters the actin-cytoskeleton network of the egg chambers, another known aspect of cell death that was not investigated in previous experiments, and that the effect is also due to DNA fragmentation. Intermittent exposures with 10-min intervals between exposure sessions proved to be almost equally effective as continuous exposure of the same total duration, whereas longer intervals between the exposures seemed to allow the organism the time required to recover and partly overcome the above-mentioned effects of the GSM exposure.

1. Introduction

Mobile phones are widely used and during the past few years we have witnessed a continuous accumulation of information concerning the possible health hazards from exposure to the electromagnetic radiation associated with mobile telephony. Many studies have been performed during the last years investigating a variety of biological effects, including epidemiological/clinical studies in humans and experimental work on rodents, flies, or cell cultures.

Assessing the possible link between exposure to electromagnetic fields (EMF) and genotoxic effects, a number of studies have reported DNA or cell damage, such as DNA breaks, cell malformations, cell death, changes in chromatin conformation and micronucleus formation in different cell types or organisms [1–9]. In other studies, no genotoxic effects of exposure to EMF were observed [10–22].

Mobile phone radiation has been also found able to cause broad changes in gene and protein expression in certain cell types [17,23–25]. According to other studies, there is evidence that molecular damage caused by Radio Frequency (RF)-microwave fields activates the stress response of the cells, which then acts as a natural defense mechanism against this kind of stimuli. Such a response may be detected through an increase in reactive oxygen species (ROS) or as increased levels of stress proteins [26–28]. A number of *in vivo* studies have also been carried out on possible effects of EMF at the level of the whole organism [28–33]. On the other hand, other authors reported no change in gene expression in *in vitro* studies [34], no change in mutation frequencies and no behavioural or morphological effects in *in vivo* studies after exposure to RF fields [35,36].

With regards to the comparative biological effects between intermittent and continuous exposure, Diem et al. [6], reported that intermittent exposure to RF with 10-min intervals between doses (1800 MHz, SAR = 2 W/Kg), had stronger effects than a single, continuous exposure of the same total duration on human diploid fibroblasts and on rat granulosa cells, producing higher levels of DNA single and double strand breaks. In earlier experiments, the same group compared the effects of an extremely low

* Corresponding author. Tel.: +30 210 7274542; fax: +30 210 7274742.
E-mail address: lmargar@biol.uoa.gr (L.H. Margaritis).

1383-5718/$ – see front matter © 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.mrgentox.2010.05.008

frequency (ELF) field (50 Hz, 10 G), on human diploid fibroblasts using different intervals between exposures, demonstrating the crucial role of the combination between the duration of exposure and its intermittence. They found that the type of intermittent exposure producing the highest degree of DNA damage was the one with 5-min exposures and 10-min intermittence between them, while longer intervals between exposures reduced the extent of the effects [37]. Attempts were made to reproduce these experiments in other laboratories with the same RF or ELF exposure conditions and the same cells, but the results were not confirmed [19,20]. Also, according to other studies, intermittent RF exposure did not affect mutation frequencies in the *lacZ* gene in pregnant mice [35] or gene expression in human-derived cell lines [34].

Based on the current data, it appears that the duration of the exposure, the exposure pattern, the intensity of radiation, as well as the type and sensitivity of the biological system used, all play an important role in the observed biological effects of EMF [24,25,38–42].

The insect *Drosophila melanogaster* has been proven to be extremely useful in studies of EMF effects, due to the wealth of available genetic information in combination with the thoroughly studied developmental biology of oogenesis.

The *Drosophila* ovary is divided into discrete units called ovarioles. Each ovary consists of 18–20 discrete tubular ovarioles, each containing 6–7 independent, developmentally ordered follicles or egg-chambers. Each egg chamber consists of 1 oocyte, 15 nurse cells and approximately 1.000 follicle cells surrounding the oocyte [43]. These cell types are formed in the germarium at the anterior end of the ovary. Egg chambers leave the germarium as stage-1 egg and the entire process of oogenesis involves 14 stages [44] where a stage-14 oocyte is mature to be fertilized and oviposited. The different stages have been fully characterized using morphological, biochemical and molecular criteria [45,46]. Egg chambers develop sequentially within the ovarioles, and thus a single ovary contains egg chambers of all stages of oogenesis [47].

Programmed cell death in the *Drosophila* ovary has been extensively studied and occurs in response to both developmental and environmental stimuli, following two different patterns, playing an integral role in the normal development of every oocyte [48–50]. According to the first developmentally regulated and asynchronous pattern, physiological apoptotic cell death commences at stage 11 in the nurse cells of every normally developing follicle, with the rearrangement of the peri-nuclear actin-cytoskeleton. At stage 12, chromatin condensation proceeds and ends with the DNA fragmentation of the nurse-cell nuclei at stage 13. The cell remnants are engulfed by the neighbouring follicle cells that also die physiologically at stage 14 [51–53]. The second pattern, which is sporadically observed at stages 7–8 and in region 2 in the germarium, is induced in response to different stress stimuli and it is marked simultaneously by the condensed, fragmented nurse-cell and follicle-cell nuclei and the disorganized actin network of the abnormal follicles. It is now clear that the stages 7–8 and the region 2 within the germarium are the two checkpoints that provide a protective mechanism in the process of oogenesis: they remove defective egg chambers that are unable to develop into fertile eggs, thus preventing the waste of precious nutrients [51,54].

In our previous experiments it was shown that a short daily exposure of newly emerged adult flies of *D. melanogaster* to mobile phone radiation, decreases significantly and non-thermally their reproductive capacity, as defined by the number of F_1 pupae [32,33]. We have also shown that in response to the stress from exposure of the insects to this radiation, fragmented DNA was detected in all the developmental stages of early- and mid-oogenesis (*i.e.* from the germarium stage up to stage 10) and in all three different types of egg-chamber cell. The above-mentioned checkpoints, germarium and stage 7–8, were shown to be the most sensitive developmental stages also to this kind of electromagnetic insult [9]. The observed DNA fragmentation and the induced cell death explain the above-mentioned decrease in the reproductive capacity [32,33]. Other recent findings of our group have indicated that the effect on the reproductive capacity increases almost linearly with increasing daily exposure duration from 1 to 21 min to GSM-900 and 1800-MHz EMF and that the effect is non-thermal [38].

The aim of the present study was to compare the influence of different types of intermittent exposure with different intervals, with the effects of continuous exposure of the same total duration of GSM radiation on the reproductive capacity of *D. melanogaster*. Consequently, the study aimed to examine whether the various intervals of intermittent exposures would indicate the possible existence of repair mechanisms operating in the biological system tested. Furthermore, our aim was to test – in addition to the confirmation of DNA fragmentation – whether GSM radiation has any effect on the actin-cytoskeleton network, the disorganization of which is another characteristic aspect of cell death in the egg chambers that was not investigated in our previous experiments [9,40]. The possible effect on the actin-cytoskeleton is examined in the present experiments, as was done previously for cell-death induction [9], during the developmental stages of early- and mid-oogenesis, *i.e.* from germarium up to stage 10, where physiological cell death does not occur.

2. Materials and methods

Our experiments were performed with *D. melanogaster*, Oregon R, wild type flies maintained under standard methods as previously described [9,32,33].

2.1. Number of F_1 pupae as a measure of reproductive capacity

According to the protocol reported previously [32,33] we placed flies that emerged within 4 h, males and females separately, in cylindrical glass vials of 2.5-cm diameter and 10-cm height, containing standard fly food. They were kept there for 2 days. The third day, when both female and male insects are sexually mature, they were transferred into a common vial with fresh food, one vial for each group, where they were kept for another 3 days, a period in which female insects provide the maximum of their oviposition [32].

The flies were exposed by the different patterns of 6-min total daily exposure to the GSM field during the first 5 days of each experiment. On the sixth day there was an additional last exposure of 6-min total duration, according to the exposure patterns described below, and 2–3 h later the parent flies were removed from the vials. The vials with the developing embryos were kept in the culture room for another 6–8 days, in order to count the number of F_1 pupae developed in each vial.

Removed maternal flies obtained from the above procedure were then anaesthetized and dissected and their egg chambers from germarium to stage 10 were prepared for acridine-orange staining and the TUNEL assay (terminal transferase-mediated dUTP nick-end labelling) in order to detect DNA fragmentation. Egg chambers of stages 11–14 were excluded as before [9], since cell death takes place physiologically anyway in the nurse and follicle cells during these stages. Rhodamine-conjugated phalloidin staining was used to test whether GSM radiation under these exposure conditions also affects the actin-cytoskeleton organization of the cells. Finally, we examined whether follicles with TUNEL-positive signal in their nurse cells also had alterations in their actin-cytoskeleton. For this purpose we used double-staining with rhodamine-conjugated phalloidin and the TUNEL assay on the same sample. Samples were examined and photographed with a Nikon Eclipse TE 2000-S fluorescence microscope and a Nikon EZ-C1 confocal laser-scanning microscope (CLSM) (Nikon Instruments, Japan).

2.2. Exposure system

A digital mobile phone handset connected to GSM-900-MHz network was used (SAR value for human head given by the manufacturer, 0.64 W/kg), in order to analyze the effects of real exposure conditions. This was the reason why we did not expose the insects under a constant power density or SAR. Real GSM signals emitted by common mobile phone handsets are never constant since there are continuous changes in their intensity and frequency [9,32,33,38–41].

The flies were exposed always at the same place for 6 min daily to mobile phone radiation modulated by human voice (speaking emission, with the same voice reading always the same text). The device was fully charged and the antenna of the mobile phone was in contact with the glass vials, parallel to the vial axis. The exposures were done following one continuous and four different types of intermittent pattern, as shown in Table 1. Each group was exposed separately, by the same mobile

Table 1
Continuous and intermittent exposure protocols.

Group	Type of exposure	Number of exposures	Duration of each exposure (min)	Duration of interval
C	Continuous	1	6	No interval
I_1	Intermittent	6	1	10 min
I_2	Intermittent	3	2	10 min
I_3	Intermittent	2	3	10 min
I_4	Intermittent	2	3	6 h
SE	Continuous	1	6	No interval

phone handset. The flies were not anaesthetized during the exposures. As reported previously [9], the 6-min total duration of daily exposure was chosen in order to have comparable conditions with the current exposure criteria [55]. In addition, our previous work has shown that a few minutes of daily exposure for only a few days is enough to produce a significant effect on insect reproduction [9,32,33].

The following types of exposure were used:

The continuous (C) type of exposure was one 6-min continuous exposure (1×6 min). The intermittent (I_1, I_2, I_3) exposure types employed 6 exposures of 1 min each (6×1 min), 3 exposures of 2 min each (3×2 min), and 2 exposures of 3 min each (2×3 min), respectively. The interval duration between the different exposure sessions was 10 min. Finally, the exposure type I_4 comprised 2 exposures of 3 min each (2×3 min) with a 6-h interval (Table 1).

In each experiment the insects were divided into six groups. The first (named C) was exposed by the C-type of exposure. The second (named I_1) was exposed by the I_1 type of exposure, etc, the fifth (named I_4) was exposed by the I_4 type of exposure and the sixth was the sham-exposed (SE) group. The SE groups were treated exactly as the exposed ones but the mobile phone was turned off during the 6-min “exposures”. The daily “exposures” of the SE groups were continuous during 6 min, since preliminary experiments had already shown that there is no statistically important difference in reproductive capacity between SE groups of different sham-exposure patterns (data not shown). Each group consisted of nine male and nine female newly eclosed insects, as described before [9,32,33].

The mean power density measured for the 6-min speaking emission with the mobile phone antenna being in contact with the glass wall was 0.35 ± 0.07 mW/cm^2. The above-mentioned measurements were made with the RF Radiation Survey Meter, NARDA 8718, with its probe inside a glass vial similar to the ones we used in our earlier studies [32]. The intensities of the ELF electric and magnetic fields, due to the pulse-repetition frequency of 217 Hz, were 18.6 ± 2.7 V/m and 0.75 ± 0.17 mG, respectively, using the HOLADAY HI-3604 ELF Survey Meter. The above-measured values are the average of eight separate measurements of each kind ± standard deviation (S.D.). These values are within the current exposure criteria [55]. As explained previously [9,32,33,38–41], we have chosen to refer to the radiation in terms of its intensity, which can be objectively measured, rather than in terms of SAR, which can never be accurately estimated, especially for small insects [38].

2.3. Acridine-orange staining

Ovaries were dissected in Ringer’s solution and separated into individual follicles. The follicles were incubated in 1.6 μM acridine-orange (Invitrogen, USA, A3568) in Ringer’s solution for 5 min in the dark. The follicles were then washed three times for 5 min in Ringer’s solution in the dark and immediately mounted on vidal glass slides in fresh Ringer’s solution. The whole process from dissection to the end of the viewing did not last more than 20 min.

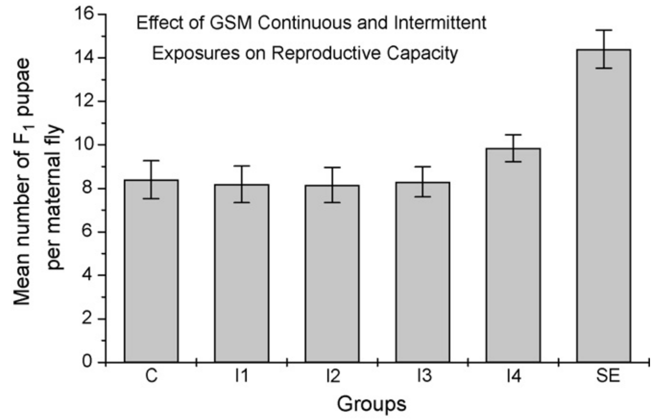


Fig. 1. Mean numbers of F_1 pupae of continuously and intermittently exposed groups and sham-exposed groups.

2.4. TUNEL assay

The TUNEL assay was performed as previously described [9].

2.5. Rhodamine-conjugated phalloidin staining

Ovaries were dissected in Ringer’s solution, fixed in PBS (Invitrogen, USA, 70013-016) containing 4% formaldehyde (Polysciences, Inc., Warrington, PA, 18814) for 20 min, and permeabilized for 35 min in PBS containing 4% formaldehyde plus 0.1% Triton X-100. The follicles were then stained for 2 h in PBS containing 1 mg/ml rhodamine-conjugated phalloidin (Invitrogen, USA, R415) and washed three times (5 min each) in PBS. Finally, the samples were mounted in 90% glycerol containing 1,4-diazabicyclo (2,2,2) octane (Sigma Chemical Co., Germany) to avoid fading (anti-fading mounting medium).

2.6. Double-staining with rhodamine-conjugated phalloidin and TUNEL

Ovaries were dissected in Ringer’s solution, fixed in PBS containing 4% formaldehyde for 20 min, and permeabilized for 35 min in PBS containing 4% formaldehyde plus 0.1% Triton X-100. The follicles were then stained for 2 h in PBS containing 1 mg/ml rhodamine-conjugated phalloidin (Invitrogen, USA, R415) and washed three times (5 min each) in PBS. Follicles were then incubated with PBS containing 20 μg/ml proteinase-K for 10 min. The detection of fragmented genomic DNA was performed with the *in situ* cell-death detection kit (Roche, Mannheim, Germany, 11684795910) by use of fluorescein-labeled dUTP for 3 h at 37 °C in the dark. After

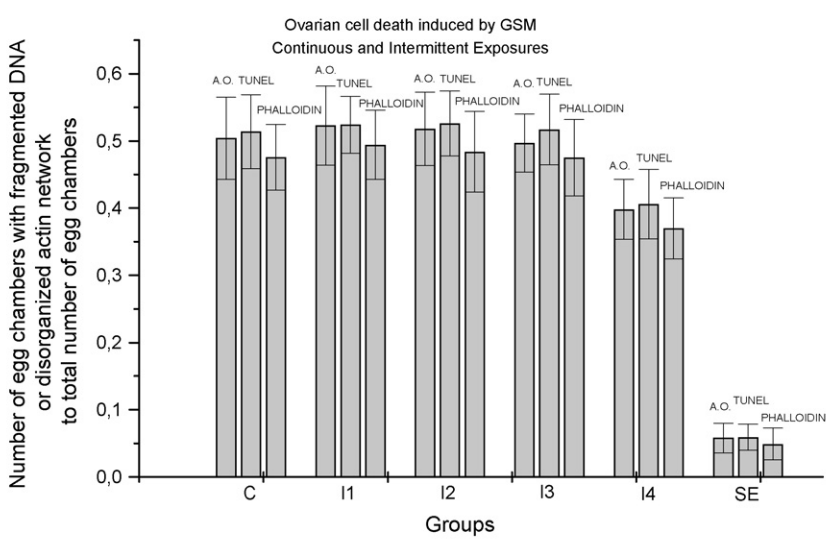


Fig. 2. Mean ratio of ovarian cell death in C, I_1, I_2, I_3, I_4 (exposed) and SE (sham-exposed) groups ± S.D., after acridine-orange (AO) Staining, TUNEL assay and phalloidin staining (number of egg chambers with fragmented DNA or disorganized actin network *vs* total number of egg chambers).

Table 2
Effect of the different GSM-900-MHz intermittent and continuous exposures on the reproductive capacity of the insect *Drosophila melanogaster*.

Experiment no.	Groups	Mean number of F1 pupae per maternal insect	% Deviation from sham-exposed group
1	C (1 × 6 min)	7.49	−42.56
	I_1 (6 × 1 min)	7.25	−44.40
	I_2 (3 × 2 min)	7.43	−43.02
	I_3 (2 × 3 min)	7.44	−42.94
	I_4 (2 × 3 min)	9.12	−30.06
	SE (control)	13.04	
2	C (1 × 6 min)	9.54	−37.85
	I_1 (6 × 1 min)	9.24	−39.80
	I_2 (3 × 2 min)	8.42	−45.15
	I_3 (2 × 3 min)	9.12	−40.59
	I_4 (2 × 3 min)	10.29	−32.96
	SE (control)	15.35	
3	C (1 × 6 min)	8.55	−39.19
	I_1 (6 × 1 min)	8.75	−37.77
	I_2 (3 × 2 min)	9.13	−35.06
	I_3 (2 × 3 min)	8.79	−37.48
	I_4 (2 × 3 min)	9.85	−29.94
	SE (control)	14.06	
4	C (1 × 6 min)	7.43	−44.59
	I_1 (6 × 1 min)	7.22	−46.16
	I_2 (3 × 2 min)	8.14	−39.30
	I_3 (2 × 3 min)	7.88	−41.24
	I_4 (2 × 3 min)	10.00	−25.43
	SE (control)	13.41	
5	C (1 × 6 min)	7.47	−49.63
	I_1 (6 × 1 min)	8.14	−45.11
	I_2 (3 × 2 min)	7.36	−50.37
	I_3 (2 × 3 min)	8.12	−45.25
	I_4 (2 × 3 min)	9.45	−36.28
	SE (control)	14.83	
6	C (1 × 6 min)	8.54	−44.26
	I_1 (6 × 1 min)	7.42	−51.57
	I_2 (3 × 2 min)	7.33	−52.15
	I_3 (2 × 3 min)	7.54	−50.78
	I_4 (2 × 3 min)	9.28	−39.43
	SE (control)	15.32	
7	C (1 × 6 min)	9.51	−36.81
	I_1 (6 × 1 min)	9.23	−38.67
	I_2 (3 × 2 min)	9.43	−37.34
	I_3 (2 × 3 min)	9.26	−38.47
	I_4 (2 × 3 min)	11.03	−26.71
	SE (control)	15.05	
8	C (1 × 6 min)	8.63	−38.45
	I_1 (6 × 1 min)	8.19	−41.58
	I_2 (3 × 2 min)	7.94	−43.37
	I_3 (2 × 3 min)	8.26	−41.08
	I_4 (2 × 3 min)	9.67	−31.03
	SE (control)	14.02	
Average ± S.D.	C (1 × 6 min)	8.40 ± 0.87	−41.63
	I_1 (6 × 1 min)	8.18 ± 0.84	−43.15
	I_2 (3 × 2 min)	8.15 ± 0.81	−43.36
	I_3 (2 × 3 min)	8.30 ± 0.69	−42.32
	I_4 (2 × 3 min)	9.84 ± 0.62	−31.62
	SE (control)	14.39 ± 0.88	

this procedure, the follicles were washed six times in PBS over the course of 90 min in the dark and mounted in anti-fading mounting medium.

The temperature during the exposures was measured as described before [9,32,33,38–41]. Statistical analysis was performed by single-factor analysis of variance test.

3. Results

The effects of continuous and intermittent exposure on the reproductive capacity of the insects, as defined by the number of F_1 pupae, and on the percentage of DNA fragmentation and actin disorganization in the egg-chamber cells are shown in Tables 2–5 and in Figs. 1–4.

3.1. Effects of continuous and intermittent exposures to GSM on the reproductive capacity

Table 2 shows the mean number of F_1 pupae of the exposed and sham-exposed insect groups from eight separate experiments. Each exposure protocol significantly decreased the number of F_1 pupae of the exposed insects compared with that of the sham-exposed groups. The C and I_1, I_2, I_3 types of exposure produced very similar decreases of the mean number of F_1 pupae (41.6%, 43.2%, 43.4%, 42.3%, respectively), whereas the I_4 procedure, with long intervals between the exposures, produced the smallest decrease in the insects' reproductive capacity (31.6%). Differences observed between C and I_1, I_2, I_3 exposed groups were within the standard

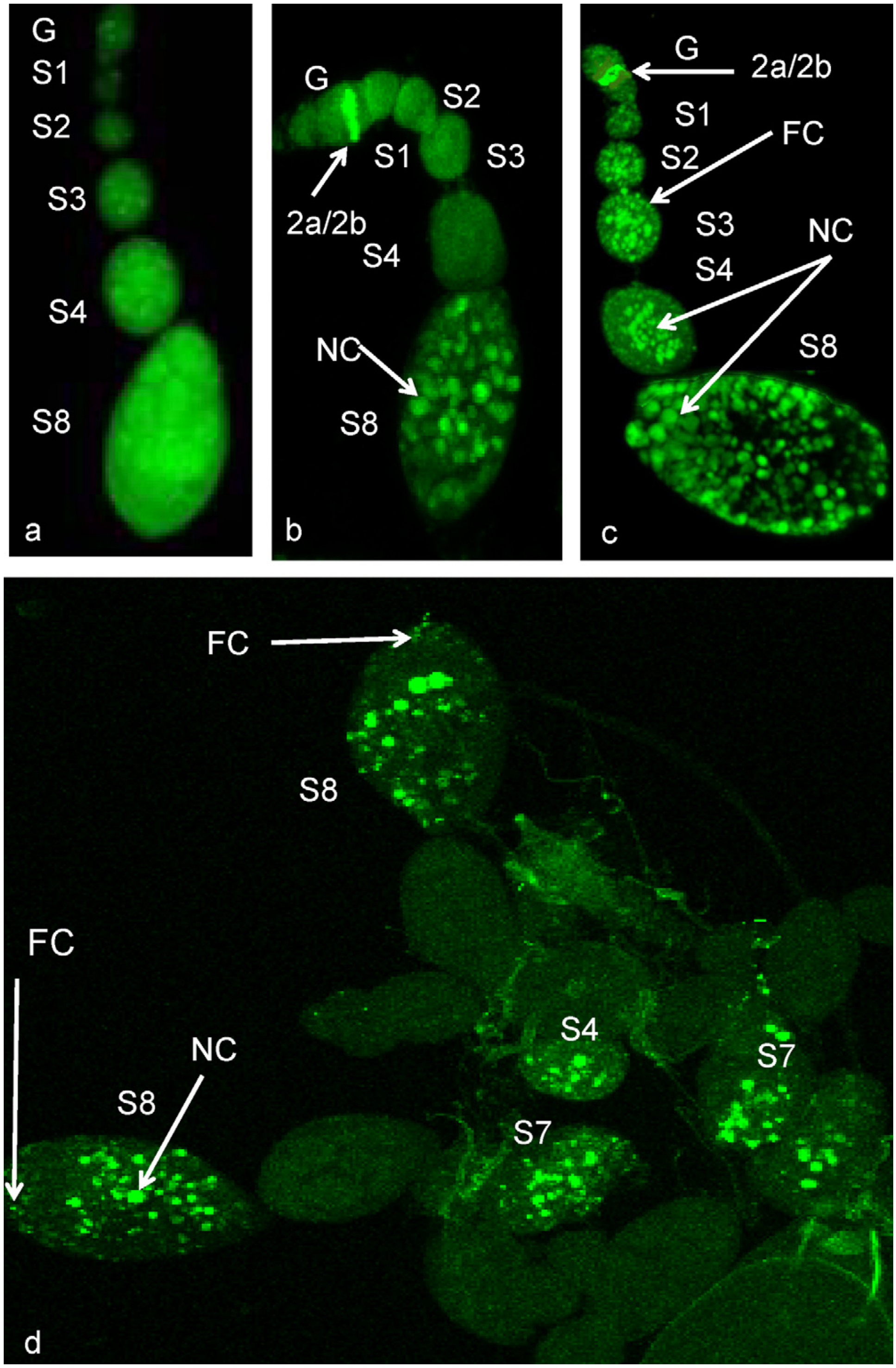


Fig. 3. Confocal micrographs of acridine-orange- and TUNEL-labeled *Drosophila melanogaster* follicles demonstrating DNA fragmentation: (a) typical ovariole of a sham-exposed insect with acridine-orange-negative signals in all the egg chambers from germarium to stage 8. (b) Ovariole of an exposed female insect (I_4 group) with acridine-orange-positive signal in the nurse cells (NC) of the two checkpoints (germarium (G) and stage 8 (S8)) and not in the intermediate stages. (c) Acridine-orange-positive signal in the nurse (NC) and follicle cells (FC) of all stages from germarium to stage-8 egg chambers from an exposed insect (I_1 group). (d) Characteristic view of egg chambers from an exposed insect (C group) with TUNEL-positive signal in the nurse and follicle-cell nuclei of stages 4–8 egg chambers and TUNEL-negative signal in other egg chambers of different stages.

deviation, but the I_1- and I_2-exposure types produced slightly larger decreases in the reproductive capacity than did I_3 and C (Table 2 and Fig. 1).

The statistical analysis showed that the probability that the C, I_1, I_2, and I_3 exposed groups differ in their reproductive capacity due to random variation is very large ($P > 0.92$). In contrast, the probability that each one of the exposed groups differs from the SE group because of random variation is in all cases negligible ($P < 10^{-8}$). Finally, the probability that each of the I_1, I_2, I_3 groups differs from the I_4 group because of random variation corresponds with a P-value of $< 10^{-3}$, whereas the corresponding probability between C and I_4 is $P < 2 \times 10^{-3}$.

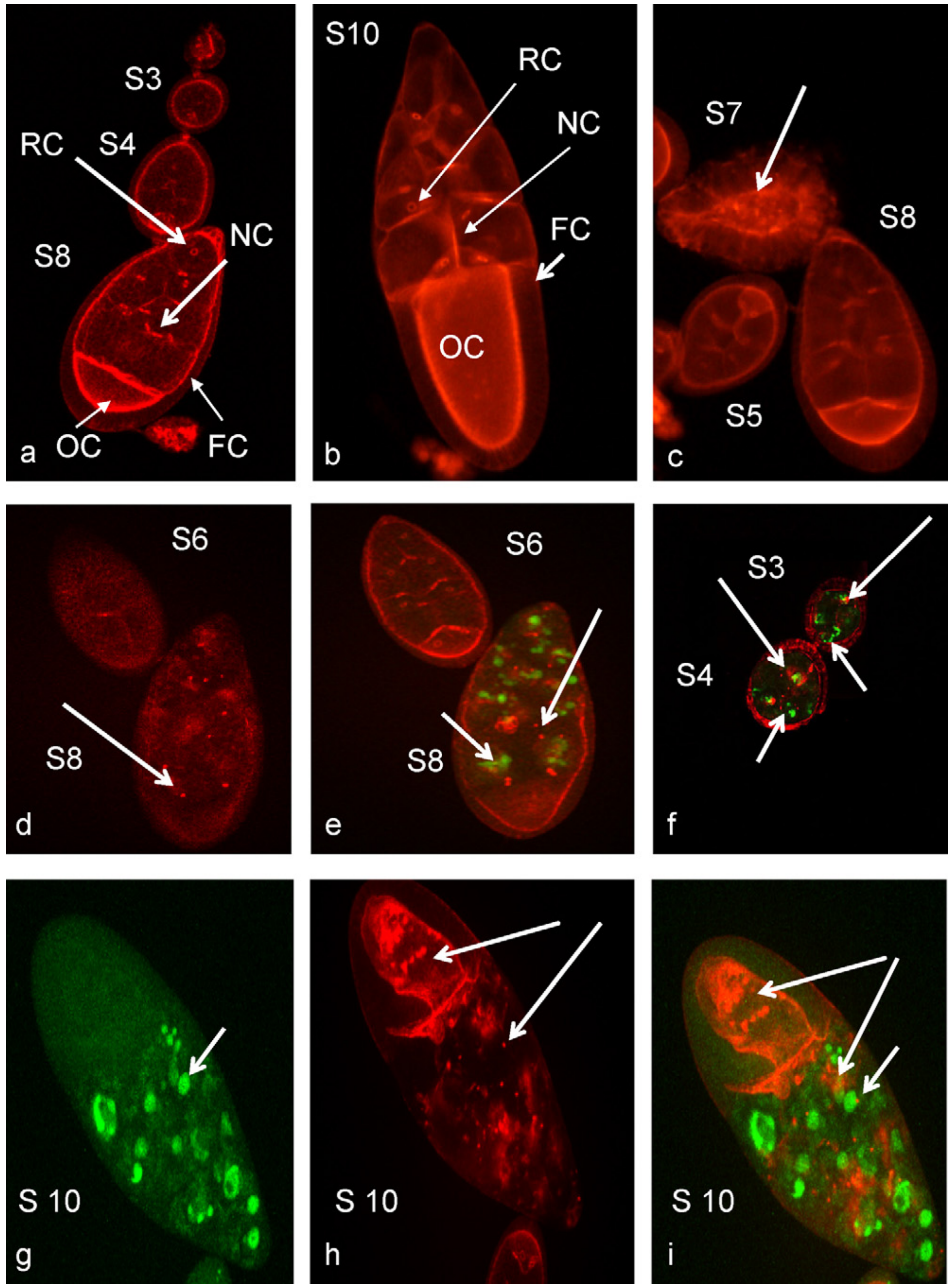


Fig. 4. Confocal micrographs of rhodamine-conjugated phalloidin-stained follicles, demonstrating the actin-cytoskeleton distribution in normal and defective egg chambers of different stages, as well as double-stained follicles with TUNEL (for DNA fragmentation) and rhodamine-conjugated phalloidin (for the actin-cytoskeleton organization). (a and b) Typical pictures of the normal actin-cytoskeleton distribution in the nurse cells (NC), oocytes (OC) and follicle cells (FC), in the egg chambers of an ovariole and a stage-10 egg chamber from a sham-exposed insect. Note the presence of the numerous ring canals (RC). (c) Characteristic picture of the actin network in a stage-7 abnormal egg chamber with disorganized actin-rich structures (arrow) and the disappearance of the ring canals obtained from an exposed female insect (I_2 group). The other two egg chambers of stages 5 and 8 show normal organization of the actin-cytoskeleton network. (d and e) Stage-8 defective egg chamber (I_2 group) with phalloidin-alone signal exhibiting disorganized actin network (d) and phalloidin-TUNEL double signal showing DNA fragmentation (short arrow) and actin disorganization (long arrow) (e). Also shown is a stage-6 normal egg chamber. (f) two egg chambers of stages 3 and 4 of an exposed insect (I_3 group) with TUNEL assay (short arrows) and phalloidin staining (long arrows) double signal for DNA fragmentation and actin disorganization, respectively. (g–i) pictures of the same stage-10 defective egg chamber (C group) with fragmented DNA (TUNEL-positive signal, short arrows) in the nurse-cell nuclei (g and i) accompanied by a completely disorganized actin network (long arrows) (h and i).

3.2. Ovarian cell death induced by continuous and intermittent exposures to GSM

The results from the acridine-orange (AO) staining, TUNEL assay, rhodamine-conjugated phalloidin staining and double-staining with rhodamine-conjugated phalloidin and TUNEL, applied to egg chambers of the C, I_1, I_2, I_3, I_4 and SE groups, are presented in Tables 3–5 and in Figs. 2–4. In each table the summarized data from four separate experiments with each assay are given. All types of exposure were found to induce cell death at all stages of the early- and mid-oogenesis (*i.e.* from germarium to stage 10), but mainly at the two checkpoints, germarium and stages 7–8.

Table 3 shows the percentages of fragmented DNA in the egg-chamber cells by AO-staining. The overall ratios of the number of egg chambers with a positive signal *vs* the total number of egg chambers at all stages (from germarium to stage 10) ± S.D. in the exposed C, I_1, I_2, I_3, and I_4 groups were 0.50 ± 0.06, 0.52 ± 0.06, 0.52 ± 0.05, 0.50 ± 0.04 and 0.40 ± 0.04, respectively.

Table 3
Influence of GSM-900-MHz intermittent and continuous exposures on DNA fragmentation visualized by acridine-orange staining.

Groups	Developmental stages	Ratio of acridine-orange-positive to total number of egg chambers of each stage	Sum ratio of acridine-orange-positive to total number of egg chambers of all stages	Percentage of acridine-orange-positive egg chambers (%)	Deviation from SE groups (%)
C	Germarium	78/92	623/1236	50.40	+44.59
	1–6	315/714			
	7–8	181/286			
	9–10	49/144			
I_1	Germarium	82/93	637/1219	52.26	+46.45
	1–6	320/702			
	7–8	190/279			
	9–10	45/145			
I_2	Germarium	80/98	624/1205	51.78	+45.97
	1–6	333/722			
	7–8	171/265			
	9–10	40/120			
I_3	Germarium	78/91	596/1199	49.71	+43.90
	1–6	303/735			
	7–8	161/242			
	9–10	54/131			
I_4	Germarium	70/90	480/1206	39.80	+33.99
	1–6	213/692			
	7–8	158/295			
	9–10	39/129			
SE	Germarium	11/92	71/1221	5.81	
	1–6	19/729			
	7–8	36/274			
	9–10	5/126			

In the SE group the corresponding ratio was 0.06 ± 0.02. The probabilities that the differences between each exposed group and the SE group are due to random variation were in all cases $P < 10^{-4}$.

TUNEL labelling (Table 4) revealed the percentage of DNA fragmentation in the ovarian cells. In the C, I_1, I_2, I_3, and I_4 exposure protocols the overall ratios of the number of egg chambers with DNA fragmentation *vs* the total number of egg chambers $\pm$ S.D., were 0.51 ± 0.05, 0.52 ± 0.04, 0.53 ± 0.05, 0.52 ± 0.05 and 0.41 ± 0.05, respectively, whereas in the SE group the corresponding percentage was 0.06 ± 0.02. The probabilities that the differences between each exposed group and the SE group are due to random variations were found again in all cases $P < 10^{-4}$.

The percentage of the egg chambers with a disorganized actin network was determined with rhodamine-conjugated phalloidin staining and is shown in Table 5. For the C, I_1, I_2, I_3, and I_4 groups the overall ratios were 0.48 ± 0.05, 0.49 ± 0.05, 0.48 ± 0.06, 0.47 ± 0.06 and 0.37 ± 0.05, respectively, while for the SE group the corre-

Table 4
Influence of GSM-900-MHz intermittent and continuous exposures on DNA fragmentation, determined by use of the TUNEL assay.

Groups	Developmental stages	Ratio of TUNEL-positive to total number of egg chambers of each stage	Sum ratio of TUNEL-positive to total number of egg chambers of all stages	Percentage of TUNEL-positive egg chambers (%)	Deviation from SE groups (%)
C	Germarium	79/90	643/1251	51.40	+45.53
	1–6	329/718			
	7–8	181/302			
	9–10	54/141			
I_1	Germarium	80/94	647/1234	52.43	+46.56
	1–6	330/724			
	7–8	188/282			
	9–10	49/134			
I_2	Germarium	85/98	637/1212	52.56	+46.69
	1–6	322/695			
	7–8	183/275			
	9–10	47/144			
I_3	Germarium	79/97	655/1267	51.70	+45.83
	1–6	345/722			
	7–8	178/295			
	9–10	53/153			
I_4	Germarium	68/91	492/1213	40.56	+34.69
	1–6	221/696			
	7–8	162/288			
	9–10	41/138			
SE	Germarium	12/94	73/1243	5.87	
	1–6	16/723			
	7–8	37/285			
	9–10	8/141			

Table 5
Influence of GSM-900-MHz intermittent and continuous exposures on actin-cytoskeleton disorganization after rhodamine-conjugated phalloidin staining.

Groups	Developmental stages	Ratio of egg chambers with disorganized actin network to total number of egg chambers of each stage	Sum ratio of egg chambers with disorganized actin network to total number of egg chambers of all stages	Percentage of egg chambers with disorganized actin network (%)	Deviation from SE groups (%)
C	1–6	321/743	565/1186	47.64	+42.71
	7–8	193/288			
	9–10	51/155			
I_1	1–6	328/739	572/1157	49.44	+44.51
	7–8	189/274			
	9–10	55/144			
I_2	1–6	312/756	569/1175	48.43	+43.50
	7–8	194/294			
	9–10	63/125			
I_3	1–6	316/759	574/1208	47.52	+42.59
	7–8	199/291			
	9–10	59/158			
I_4	1–6	233/729	436/1178	37.01	+32.08
	7–8	154/307			
	9–10	49/142			
SE	1–6	17/734	58/1177	4.93	
	7–8	32/292			
	9–10	9/151			

sponding ratio was 0.05 ± 0.02. In the case of phalloidin staining (Table 5) there are no percentages given for the germarium, since it is not possible to detect the actin network within. This is the reason why the percentages of actin disorganization (Table 5) are smaller than the corresponding percentages of DNA fragmentation (Tables 3 and 4 and Fig. 2). The probabilities that the differences between each exposed group and the SE group are due to random variation are in all cases again $P < 10^{-4}$.

A typical image of an ovariole of a sham-exposed insect (SE group) with an AO-negative signal in all the egg chambers from germarium to stage 8, is shown in Fig. 3a. Corresponding images with TUNEL-negative signal showed similar characteristics (data not shown).

Fig. 3b shows an ovariole of an exposed insect from the I_4 group with and AO-positive signal in the nurse cells of the two check-points, region 2a/2b of the germarium and stage 8. This was a common picture for the majority of the ovarioles of female insects from all the exposed groups. Corresponding images with TUNEL-positive signal had similar characteristics (data not shown) [9].

Fig. 3c shows an ovariole of an exposed insect (I_1 group) containing egg chambers from germarium to stage 8, with AO-positive signals in the nurse and follicle cells of all stages. Corresponding pictures obtained with the TUNEL assay had similar characteristics (data not shown).

Fig. 3d shows six egg chambers of stages 4–8 from exposed insects (C group) with TUNEL-positive signals in their nurse-cell and follicle-cell nuclei among a number of egg chambers with TUNEL-negative signals. This is a representative picture for the ratio of the number of egg chambers with induced cell death *vs* the total number of egg chambers of the female insects of the exposed groups.

Fig. 4a–c shows confocal micrographs taken after rhodamine-conjugated phalloidin staining of the follicles, which show normal and defective ovarioles and egg chambers of stages 3–10. Fig. 4a and b shows a representative ovariole and a stage-10 egg chamber from sham-exposed insects, with a normal distribution of the actin-cytoskeleton network in the nurse cells, oocytes and follicle cells, as well as the presence of the numerous ring canals (SE group).

Fig. 4c shows egg chambers of exposed insects (I_2 group). Two normal egg chambers of stages 5 and 8 are visible, and one defective egg chamber of stage 7, in which the disorganized actin-rich structures are accompanied by the disappearance of the ring canals.

Further analysis of the characteristics of the egg chambers of the exposed groups, by double-staining with TUNEL and rhodamine-conjugated phalloidin revealed that DNA fragmentation and actin-cytoskeleton disorganization coincide in the defective egg chambers, as shown in Fig. 4d–i. Confocal micrographs in Fig. 4d and e show the same two egg chambers, one normal (stage 6) and one abnormal (stage 8), with a completely disorganized actin pattern (disorganized actin-rich structures, absence of ring canals – Fig. 4d and e) – associated with fragmented nurse-cell nuclei (TUNEL-positive signal – Fig. 4e). Similar results can be seen in the confocal micrographs in Fig. 4f–i. In Fig. 4f two egg chambers are seen of stages 3 and 4 with TUNEL- and phalloidin-positive signals. In Fig. 4g–i the same is observed: a stage-10 egg chamber with TUNEL-only positive signal (Fig. 4g), phalloidin-alone signal for actin disorganization (Fig. 4h), and both signals combined (Fig. 4i).

No temperature increases were detected during the exposures, as expected according to our previous experiments [9,32,33,38–41].

4. Discussion

The results of this study correlate with our previous findings that acute exposure to GSM signals brings about DNA fragmentation in the ovarian cells and consequently a large reduction in the reproductive capacity of the insects [9,32,33,38–41]. Except for the effect of mobile phone radiation on DNA, our results show that this type of radiation also affects the actin-cytoskeleton of the egg chambers, the disorganization of which is another characteristic aspect of cell death. The induced DNA fragmentation and the induced alterations in the actin-cytoskeleton seemed to coincide in the affected follicles. The effects were again non-thermal, in agreement with our previous results [9,32,33,38–41].

In addition to our recent results [38] that the biological activity of mobile phone radiation depends on the exposure duration, the findings of the present study indicate that the influence of a certain daily dose of GSM radiation on *Drosophila*'s reproductive system depends on the exposure protocol, the intervals between the exposures, and on the corresponding time given for recovery. The exposure protocols used in this study show that C and I_1, I_2, I_3 exposures were almost equally active (Tables 2–5), since they produced similar levels of fragmented DNA and disorganized actin networks in the egg-chamber cells of the early- and mid-oogenesis, as well as a consequent decrease in the number of F_1 pupae. This result possibly suggests that the effects depend on the total amount of daily dose regardless of the intervals. I_4 exposure was found to be less bioactive than the other exposure protocols, due to its longer intervals between the exposure sessions (Tables 2–5 and Figs. 1 and 2), suggesting that recovery mechanisms are possibly initiated between exposures, similar to the situation where living organisms are exposed to fractionated, small doses of ionizing radiation [56,57].

In the case of ionizing radiation, it is well known that the longer the intervals between doses, the more successful the DNA repair [56,57]. With regard to non-ionizing radiation, Nikolova et al. [42] reported that the observed effects of EMF (changes in the transcript level) on neural progenitor cells were mitigated through activation of compensatory mechanisms.

In the present experiments, the effects were possibly mitigated in the I_4 groups by a putative compensatory mechanism that replaces the defective egg chambers by new ones. This may be the reason why the decrease in reproductive capacity (Table 2) is slightly smaller than the corresponding effect of the induced cell death (Tables 3–5). Ovaries from the C, I_1, I_2, and I_3 groups were dissected 2–3 h after the last exposure of 6-min total duration. During this period the largest numbers of defective egg chambers can be detected, whereas a few hours later the damaged egg chambers have been phagocytosed by neighbouring follicle cells and new non-defective egg chambers have been produced. In the I_4 group the ovaries were dissected 2–3 h after the last (3-min) exposure. This means that a number of defective egg chambers from the first (3-min) exposure of the same day, which took place 6 h before the last one, could not be detected. This is possibly the reason why the percentage of egg chambers showing induced cell death in this group is smaller than the corresponding values for the other exposed groups (Tables 3–5).

Apart from its effect on oogenesis, exposure to GSM also decreases the reproductive capacity of the male insects [32]. We can therefore hypothesize that the observed effects depend on the efficacy of possible compensatory mechanism in the male insects as well.

As expected, in all cases with all types of exposure, the germarium and the stages 7–8 proved to be the most sensitive stages in their response to the GSM exposure [9,40,51,54,58].

Furthermore, there is some evidence that the I_1 and I_2 intermittent exposures were possibly slightly more effective than I_3 and C, as shown by the slightly stronger effect on the reproductive capacity and on the induced cell death (Tables 2–5), although the differences were within the standard deviation. This possibly indicates that an increased number of repetitive exposures were probably more stressful for the organisms than the I_3 intermittent and the C continuous exposure patterns of the same total duration. It is also possible that in this case the increased number of repetitive stresses (more complicated exposure pattern) did not allow the organisms to initiate adaptive responses.

Based on previous similar findings with the same biological system, our laboratory has proposed a biophysical mechanism to explain the influence of EMFs on cells. According to this theory, the ELF components of GSM fields are able to alter cell function through their interaction with cell membranes. More specifically, the ELF components of the GSM fields are able to affect the regular gating of the membrane ion channels, and consequently bring about broad changes in many aspects of the cell function as well as in the process of oogenesis and reproductive capacity of the insects [59–61].

The results of the present study are in agreement with findings of several other research groups, demonstrating EMF effects related to DNA damage, alterations of the actin network, or induced apoptotic cell death in various biological systems [6,24,28,62]. Our results are also in agreement with findings of other studies that tested the comparative effects between intermittent and continuous RF or ELF exposure [6,37]. However, as already mentioned, other research groups did not report effects of these exposures [19–22].

The results of the present work demonstrate the induction of two cell-death features, DNA fragmentation and actin-cytoskeleton disorganization in the egg-chamber cells of the early- and mid-oogenesis, and subsequently a decrease in the number of F_1 pupae due to continuous or intermittent exposure to GSM-900 MHz radiation. It is worth mentioning that both features were found to coincide in the defective follicles. The disorganization of the actin network is considered to be a characteristic feature of apoptotic cell death in a large variety of cell types, as reported by others [63,64] and by our lab [51], but the possibility of necrosis cannot be excluded.

In order to confirm the interference of exposure to EMF with apoptosis, more aspects of apoptotic cell death in ovarian cells, such as caspase activation and chromatin condensation, need to be studied. Except for the induction of apoptosis, the possible link of EMF exposure with necrosis is still under investigation.

Conflict of interest

None.

Acknowledgements

We are thankful to all our colleagues in Professor Margaritis' laboratory and especially to Dr. A. Velentza and Ph.D. candidate P. Velentza for their assistance. E. Chavdoula is a scholarship recipient of the Hellenic State Scholarship Foundation (I.K.Y.) (Ph.D. fellowship). This work has been supported by the Special Account of Research Grants from the National and Kapodistrian University of Athens to Professor L.H. Margaritis.

References

[1] H. Lai, N.P. Singh, Acute low-intensity microwave exposure increases DNA single-strand breaks in rat brain cells, Bioelectromagnetics 16 (1995) 207–210.

[2] H. Lai, N.P. Singh, Single- and double-strand DNA breaks in rat brain cells after acute exposure to radiofrequency electromagnetic radiation, Int. J. Radiat. Biol. 69 (1996) 513–521.

[3] B.Z. Vijayalaxmi, M. Leal, T.J. Szilagyi, M.L. Prihoda, Meltz, Primary DNA damage in human blood lymphocytes exposed in vitro to 2450 MHz radiofrequency radiation, Radiat. Res. 153 (4) (2000) 479–486.

[4] L.G. Salford, A.E. Brun, J.L. Eberhardt, L. Marmgren, B.R. Persson, Nerve cell damage in mammalian brain after exposure to microwaves from GSM mobile phones, Environ. Health Perspect. 111 (2003) 881–883.

[5] M. Caraglia, M. Marra, F. Mancinelli, G. D'Ambrosio, R. Massa, A. Giordano, A. Budillon, A. Abbruzzese, E. Bismuto, Electromagnetic fields at mobile phone frequency induce apoptosis and inactivation of the multi-chaperone complex in human epidermoid cancer cells, J. Cell. Physiol. 204 (2005) 539–548.

[6] E. Diem, C. Schwarz, F. Adlkofer, O. Jahn, H. Rudiger, Non-thermal DNA breakage by mobile-phone radiation (1800 MHz) in human fibroblasts and in transformed GFSH-R17 rat granulosa cells in vitro, Mutat. Res. 583 (2005) 178–183.

[7] I.Y. Belyaev, L. Hillert, M. Protopopova, C. Tamm, L.O. Malmgren, B.R. Persson, G. Selivanova, M. Harms-Ringdahl, 915 MHz microwaves and 50 Hz magnetic field affect chromatin conformation and 53BP1 foci in human lymphocytes from hypersensitive and healthy persons, Bioelectromagnetics 26 (2005) 173–184.

[8] S. Lixia, K. Yao, W. Kaijun, L. Deqiang, H. Huajun, G. Xiangwei, W. Baohong, Z. Wei, L. Jianling, W. Wei, Effects of 1.8 GHz radiofrequency field on DNA damage and expression of heat shock protein 70 in human lens epithelial cells, Mutat. Res. 602 (2006) 135–142.

[9] D.J. Panagopoulos, E.D. Chavdoula, I.P. Nezis, L.H. Margaritis, Cell death induced by GSM 900 MHz and DCS 1800 MHz mobile telephony radiation, Mutat. Res. 626 (2007) 69–78.

[10] R.S. Malyapa, E.W. Ahern, W.L. Straube, E.G. Moros, W.F. Pickard, J.L. Roti Roti, Measurement of DNA damage after exposure to 2450 MHz electromagnetic radiation, Radiat. Res. 148 (1997) 608–617.

[11] R.S. Malyapa, E.W. Ahern, W.L. Straube, E.G. Moros, W.F. Pickard, J.L. Roti Roti, Measurement of DNA damage after exposure to electromagnetic radiation in the cellular phone communication frequency band (835.62 and 847.74 MHz), Radiat. Res. 148 (1997) 618–627.

[12] R.S. Malyapa, E.W. Ahern, C. Bi, W.L. Straube, M. LaRegina, W.F. Pickard, J.L. Roti Roti, DNA damage in rat brain cells after in vivo exposure to 2450 MHz electromagnetic radiation and various methods of euthanasia, Radiat. Res. 149 (1998) 637–645.

[13] M. Capri, E. Scarcella, E. Bianchi, C. Fumelli, P. Mesirca, C. Agostini, D. Remondini, J. Schuderer, N. Kuster, C. Franceschi, F. Bersani, 1800 MHz radiofrequency (mobile phones, different Global System for Mobile communication modulations) does not affect apoptosis and heat shock protein 70 level in peripheral blood mononuclear cells from young and old donors, Int. J. Radiat. Biol. 80 (2004) 389–397.

[14] M. Capri, E. Scarcella, C. Fumelli, E. Bianchi, S. Salvioli, P. Mesirca, C. Agostini, A. Antolini, A. Schiavoni, G. Castellani, F. Bersani, C. Franceschi, In vitro exposure of human lymphocytes to 900 MHz CW and GSM modulated radiofrequency: studies of proliferation, apoptosis and mitochondrial membrane potential, Radiat. Res. 162 (2004) 211–218.

[15] G.J. Hook, P. Zhang, I. Lagroye, L. Li, R. Higashikubo, E.G. Moros, W.L. Straube, W.F. Pickard, J.D. Baty, J.L. Roti Roti, Measurement of DNA damage and apoptosis in molt-4 cells after in vitro exposure to radiofrequency radiation, Radiat. Res. 161 (2004) 193–200.

[16] O. Zeni, M. Romano, A. Perrotta, M.B. Lioi, R. Barbieri, G. d'Ambrosio, R. Massa, M.R. Scarfi, Evaluation of genotoxic effects in human peripheral blood leukocytes following an acute in vitro exposure to 900 MHz radiofrequency fields, Bioelectromagnetics 26 (2005) 258–265.

[17] I.Y. Belyaev, C.B. Koch, O. Terenius, K. Roxstrom-Lindquist, L.O. Malmgren, H. Sommer, L.G. Salford, B.R. Persson, Exposure of rat brain to 915 MHz GSM microwaves induces changes in gene expression but not double stranded DNA breaks or effects on chromatin conformation, Bioelectromagnetics 27 (2006) 295–306.

[18] L. Verschaeve, Genetic effects of radiofrequency radiation (RFR), Toxicol. Appl. Pharmacol. 207 (2005) 336–341, Review.

[19] G. Speit, P. Schütz, H. Hoffmann, Genotoxic effects of exposure to radiofrequency electromagnetic fields (RF-EMF) in cultured mammalian cells are not independently reproducible, Mutat. Res. 626 (2007) 42–47.

[20] M.R. Scarfi, A. Sannino, A. Perrotta, M. Sarti, P. Mesirca, F. Bersani, Evaluation of genotoxic effects in human fibroblasts after intermittent exposure to 50 Hz electromagnetic fields: a confirmatory study, Radiat. Res. 164 (2005) 270–276.

[21] V. Joubert, P. Leveque, M. Cueille, S. Bourthoumieu, C. Yardin, No apoptosis is induced in rat cortical neurons exposed to GSM phone fields, Bioelectromagnetics 28 (2007) 115–121.

[22] C. Ziemann, H. Brockmeyer, S.B. Reddy, T.J. Vijayalaxmi, N. Prihoda, T. Kuster, C. Tillmann, Dasenbrock, Absence of genotoxic potential of 902 MHz (GSM) and 1747 MHz (DCS) wireless communication signals: in vivo two-year bioassay in B6C3F1 mice, Int. J. Radiat. Biol. 85 (2009) 454–464.

[23] S. Pacini, M. Ruggiero, I. Sardi, S. Aterini, F. Gulisano, M. Gulisano, Exposure to global system for mobile communication (GSM) cellular phone radiofrequency alters gene expression, proliferation, and morphology of human skin fibroblasts, Oncol. Res. 13 (2002) 19–24.

[24] R. Nylund, D. Leszczynski, Proteomics analysis of human endothelial cell line EA.hy926 after exposure to GSM 900 radiation, Proteomics 4 (2004) 1359–1365.

[25] R. Nylund, D. Leszczynski, Mobile phone radiation causes changes in gene and protein expression in human endothelial cell lines and the response seems to be genome- and proteome-dependent, Proteomics 6 (2006) 4769–4780.

[26] S. Kwee, P. Raskmark, S. Velizarov, Changes in cellular proteins due to environmental non-ionizing radiation. I. Heat-shock proteins, Electro. Magnetobiol. 20 (2001) 141–152.

[27] J.M. Shallom, A.L. DiCarlo, D. Ko, L.M. Penafiel, A. Nakai, Microwave exposure induces hsp70 and confers protection against hypoxia in chick embryos, J. Cell. Biochem. 86 (2002) 490–496.

[28] K.S. Lee, J.S. Choi, S.Y. Hong, T.H. Son, K. Yu, Mobile phone electromagnetic radiation activates MAPK signaling and regulates viability in *Drosophila*, Bioelectromagnetics 29 (2008) 371–379.

[29] IuG. Grigor'ev, Biological effects of mobile phone electromagnetic field on chick embryo (risk assessment using the mortality rate), Radiats. Biol. Radioecol. 43 (2003) 541–543.

[30] I.N. Magras, T.D. Xenos, RF radiation-induced changes in the prenatal development of mice, Bioelectromagnetics 18 (1997) 455–461.

[31] D. Weisbrot, H. Lin, L. Ye, M. Blank, R. Goodman, Effects of mobile phone radiation on reproduction and development in *Drosophila melanogaster*, J. Cell. Biochem. 89 (2003) 48–55.

[32] D.J. Panagopoulos, A. Karabarbounis, L.H. Margaritis, Effect of GSM 900-MHz mobile phone radiation on the reproductive capacity of *Drosophila melanogaster*, Electromagn. Biol. Med. 23 (2004) 29–43.

[33] D.J. Panagopoulos, E.D. Chavdoula, A. Karabarbounis, L.H. Margaritis, Comparison of bioactivity between GSM 900 MHz and DCS 1800 MHz mobile telephony radiation, Electromagn. Biol. Med. 26 (2007) 33–44.

[34] V. Chauhan, S.S. Qutob, S. Lui, A. Mariampillai, P.V. Bellier, C.L. Yauk, G.R. Douglas, A. Williams, J.P. McNamee, Analysis of gene expression in two human-derived cell lines exposed in vitro to a 1.9 GHz pulse modulated radiofrequency field, Proteomics 7 (2007) 3896–3905.

[35] T. Ono, Y. Saito, J. Komura, H. Ikehata, Y. Yarusawa, T. Nojima, K. Goukon, Y. Ohba, J. Wang, O. Fujiwara, R. Sato, Absence of mutagenic effects of 2.45 GHz radiofrequency exposure in spleen, liver, brain and testis of lacZ-transgenic mouse exposed in utero, Tohoku J. Exp. Med. 202 (2004) 93–103.

[36] T. Kumlin, H. Iivonen, P. Miettinen, A. Juvonen, T. Van Groen, L. Puranen, R. Pitkäaho, J. Juutilainen, H. Tanila, Mobile phone radiation and the developing brain: behavioral and morphological effects in juvenile rats, Radiat. Res. 168 (2007) 471–479.

[37] S. Ivancsits, E. Diem, A. Pilger, H.W. Rudiger, O. Jahn, Induction of DNA strand breaks by intermittent exposure to extremely-low-frequency electromagnetic fields in human diploid fibroblasts, Mutat. Res. 519 (2002) 1–13.

[38] D.J. Panagopoulos, L.H. Margaritis, The effect of exposure duration on the biological activity of mobile telephony radiation, Mut. Res. 699 (2010) 17–22.

[39] D.J. Panagopoulos, L.H. Margaritis, Mobile telephony radiation effects on living organisms, in: A.C. Harper, R.V. Burees (Eds.), Mobile Telephones, Network Applications and Performance, Nova Science Publishers Inc., 2008, pp. 107–149, Review.

[40] D.J. Panagopoulos, E.D. Chavdoula, L.H. Margaritis, Bioeffects of mobile telephony radiation in relation to its intensity or distance from the antenna, Int. J. Radiat. Biol. 86 (5) (2010) 345–357.

[41] D.J. Panagopoulos, L.H. Margaritis, The identification of an intensity "Window" on the bioeffects of mobile telephony radiation, Int. J. Radiat. Biol. 86 (5) (2010) 358–366.

[42] T. Nikolova, J. Czyz, A. Rolletschek, P. Blyszczuk, J. Fuchs, G. Jovtchev, J. Schuderer, N. Kuster, A.M. Wobus, Electromagnetic fields affect transcript levels of apoptosis-related genes in embryonic stem cell-derived neural progenitor cells, ASEB J. 19 (2005) 1686–1688.

[43] R.C. King, Origin and development of the egg chamber within the adult ovarioles, in: R.C. King (Ed.), Ovarian Development in *Drosophila melanogaster*, Academic Press, New York London, 1970, pp. 38–54.

[44] L.H. Margaritis, Structure and physiology of the eggshell, in: L.I. Gilbert, G.A. Kerkut (Eds.), Comprehensive Insect Biochemistry, Physiology and Pharmacology, vol. 1, Pergammon, Oxford New York, 1985, pp. 151–230.

[45] L.H. Margaritis, The eggshell of *Drosophila melanogaster*. New staging characteristics and fine structural analysis of choriogenesis, Can. J. Zool. 64 (1986) 2152–2175.

[46] A.C. Spradling, Developmental genetics of oogenesis, in: M. Bate, A. Martinez-Arias (Eds.), The Development of *Drosophila melanogaster*, vol. I, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1993, pp. 1–70.

[47] D.N. Robinson, K. Kant, L. Cooley, Morphogenesis of *Drosophila* ovarian ring canals, Development 120 (1994) 2015–2025.

[48] V. Cavaliere, C. Taddei, G. Gargiulo, Apoptosis of nurse cells at the late stages of oogenesis of *Drosophila melanogaster*, Dev. Genes Evol. 208 (1998) 106–112.

[49] K. Foley, L. Cooley, Apoptosis in late stage *Drosophila* nurse cells does not require genes within the H99 deficiency, Development 125 (1998) 1075–1082.

[50] K. McCall, H. Steller, Requirement for DCP-1 caspase during *Drosophila* oogenesis, Science 279 (1998) 230–234.

[51] I.P. Nezis, D.J. Stravopodis, I. Papassideri, M. Robert-Nicoud, L.H. Margaritis, Stage-specific apoptotic patterns during *Drosophila* oogenesis, Eur. J. Cell. Biol. 79 (2000) 610–620.

[52] I.P. Nezis, D.J. Stravopodis, I. Papassideri, L.H. Margaritis, Actin cytoskeleton reorganization of the apoptotic nurse cells during the late developmental stages of oogenesis in *Dacus oleae*, Cell. Motil. Cytoskeleton 48 (2001) 224–233.

[53] I.P. Nezis, D.J. Stravopodis, I. Papassideri, M. Robert-Nicoud, L.H. Margaritis, The dynamics of apoptosis in the ovarian follicle cells during the late stages of *Drosophila* oogenesis, Cell Tissue Res. 307 (2002) 401–409.
[54] K. McCall, Eggs over easy: cell death in the *Drosophila* ovary, Dev. Biol. 274 (2004) 3–14.
[55] ICNIRP, Guide lines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic and electromagnetic fields (up to 300 GHz), Health Phys. 74 (1998) 494–522.
[56] A.H.W. Nias, An Introduction to Radiobiology, 2nd ed., J. Wiley & sons, 1998.
[57] E.J. Hall, A.J. Giaccia, Radiobiology for the Radiologist, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2006.
[58] D. Drummond-Barbosa, A.C. Spradling, Stem cells and their progeny respond to nutritional changes during *Drosophila* oogenesis, Dev. Biol. 23 (2001) 265–278.
[59] D.J. Panagopoulos, N. Messini, A. Karabarbounis, A.L. Filippetis, L.H. Margaritis, A mechanism for action of oscillating electric fields on cells, Biochem. Biophys. Res. Commun. 272 (2000) 634–640.
[60] D.J. Panagopoulos, A. Karabarbounis, L.H. Margaritis, Mechanism for action of electromagnetic fields on cells, Biochem. Biophys. Res. Commun. 298 (2002) 95–102.
[61] D.J. Panagopoulos, L.H. Margaritis, Theoretical considerations for the biological effects of electromagnetic fields, in: P. Stavroulakis (Ed.), Biological Effects of Electromagnetic Fields, Springer, 2003, pp. 5–33.
[62] V. Joubert, S. Bourthoumieu, P. Leveque, C. Yardin, Apoptosis is induced by radiofrequency fields through the caspase-independent mitochondrial pathway in cortical neurons, Radiat. Res. 169 (2008) 38–45.
[63] J.F.R. Kerr, A.H. Wyllie, A.R. Currie, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, Br. J. Cancer 26 (1972) 239–257.
[64] J.C. Mills, N.L. Stone, R.N. Pittman, Extranuclear apoptosis. The role of the cytoplasm in the execution phase, J. Cell. Biol. 146 (1999) 703–708.