

ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μελέτη Οξειδωτικού και Αποπτωτικού Δυναμικού της Μη Ιονίζουσας Ηλεκτρομαγνητικής Ακτινοβολίας Σε Πρότυπα Βιολογικά Συστήματα

. . . .

1.1

......

Αρετή Κ. Μαντά Βιολόγος



Αθήνα 2015



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ Εθνικόν και Καποδιστριακόν Πανεπιστήμιον Αθηνών

Τμήμα Βιολογίας Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής

Μελέτη Οξειδωτικού και Αποπτωτικού Δυναμικού της Μη Ιονίζουσας Ηλεκτρομαγνητικής Ακτινοβολίας σε Πρότυπα Βιολογικά Συστήματα

Διδακτορική Διατριβή

Αρετή Κ. Μαντά, BSc, MSc

Βιολόγος

Αθήνα

Δεκέμβριος, 2015



Faculty of Biology Department of Cell Biology & Biophysics

Illuminating the Oxidative and Apoptotic Capacity of Non Ionizing Electromagnetic Radiation in Model Biological Systems

Doctorate (Ph.D.) Thesis

Areti K. Manta, BSc, MSc

Biologist

Athens

December, 2015

Επιβλέπων Καθηγητής

Δημήτριος Ι. Στραβοπόδης	Επίκουρος	Καθηγητής,	Τομέας	Βιολογίας	Κυττάρου	και
	Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ					

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Δημήτριος Ι. Στραβοπόδης	Επίκουρος Καθηγητής, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
Λουκάς Χ. Μαργαρίτης	Ομότιμος Καθηγητής, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
Ισιδώρα Σ. Παπασιδέρη	Καθηγήτρια και Διευθύντρια ΒΚκΒ, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Λουκάς Χ. Μαργαρίτης	Ομότιμος Καθηγητής, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
Αικατερίνη Γαϊτανάκη	Καθηγήτρια και Διευθύντρια ΦΖκΑ, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
Ισιδώρα Σ. Παπασιδέρη	Καθηγήτρια και Διευθύντρια ΒΚκΒ, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
Διδώ Βασιλακοπούλου	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τομέας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
Δημήτριος Ι. Στραβοπόδης	Επίκουρος Καθηγητής, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
Αικατερίνη Σ. Σκουρολιάκου	Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Ενεργειακής Τεχνολογίας, ΑΤΕΙ Αθηνών
Μαριάννα Χ. Αντωνέλου	Λέκτορας, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από το Τμήμα Βιολογίας, της Σχολής Θετικών Επιστημών (ΣΘΕ), του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ), δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα.

Ν. 5343/1932, άρθρο 202

Στους γονείς μου,

στον Βασίλη μου

και στους Καθηγητές μου

Л. Х. Маруарітη I. Я. I. Στραβοπόδη

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή εκπονήθηκε στον Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό τη συνεπίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή κ. Δημήτριου Ι. Στραβοπόδη και του Ομότιμου Καθηγητή κ. Λουκά Χ. Μαργαρίτη, κατά τα ακαδημαϊκά έτη 2011-2015. Κύριος στόχος της συγκεκριμένης μελέτης ήταν η κατανόηση των μηχανισμών επίδρασης της μη ιονίζουσας ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας ασύρματης τεχνολογίας στους ζωντανούς οργανισμούς.

Η κατάταξη της εν λόγω ακτινοβολίας, το 2011, από τη Διεθνή Επιτροπή Έρευνας για τον Καρκίνο (International Agency for Research on Cancer – IARC) του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization – WHO), ως πιθανό καρκινογόνο παράγοντα (κατηγορία 2B) δείχνει την αυξημένη ανησυχία τόσο της επιστημονικής κοινότητας όσο και της κοινωνίας για τις πιθανές επιβλαβείς επιπτώσεις της στην υγεία των ανθρώπων. Συνεπώς, οι προσπάθειες της έρευνας προς την κατεύθυνση της διαλεύκανσης αυτών των επιπτώσεων είναι μείζονος σημασίας, καθώς οι εφαρμογές της ασύρματης τεχνολογίας έχουν πολλαπλασιαστεί εκθετικά τα τελευταία χρόνια, ενώ ταυτόχρονα ο αριθμός των χρηστών, ανάμεσα τους και μικρότερες πλέον ηλικίες, έχει ανέλθει σε τρία και πλέον δισεκατομμύρια. Μέρος αυτής της προσπάθειας αποτέλεσε και η παρούσα μελέτη, η οποία ενορχηστρώθηκε από δύο λαμπρούς επιστήμονες και εξαίρετους Καθηγητές: τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Δημήτριο Ι. Στραβοπόδη και τον Ομότιμο Καθηγητή κ. Λουκά Χ. Μαργαρίτη, τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά για όλα όσα μου προσέφεραν αβίαστα και απλόχερα όλα αυτά τα χρόνια.

Η πρώτη μου συνεργασία με τον κ. Μαργαρίτη ήταν ως προπτυχιακή φοιτήτρια στα πλαίσια της προπτυχιακής μου εργασίας. Από το 2007 μέχρι και σήμερα στάθηκε δίπλα μου και με εμπιστεύτηκε, προσφέροντάς μου τη δυνατότητα να μαθητεύσω δίπλα του και να γίνω μέλος του εργαστηρίου του. Υπήρξε, επίσης, ο Επιβλέπων και Επιστημονικός Υπεύθυνος της Μεταπτυχιακής μου Διπλωματικής εργασίας, και φυσικά ήταν αυτός που με εμπιστεύτηκε ως υποψήφια Διδάκτωρ στα πλαίσια του προγράμματος ΘΑΛΗΣ MIS 375784, στο οποίο υπήρξε ο Συντονιστής και ο Επιστημονικός Υπεύθυνος. Μέσω του συγκεκριμένου προγράμματος εξασφάλισε για μένα οικονομική βοήθεια κατά τη διάρκεια εκπόνησης της Διδακτορικής Διατριβής μου. Αποτέλεσε τον βασικό αρχιτέκτονα της συγκεκριμένης μελέτης, καθώς σχεδίασε λεπτομερώς τα πειράματα που αφορούσαν στο οξειδωτικό στρες, στη βιωσιμότητα, στη γονιδιακή έκφραση, καθώς και στο ρόλο που διαδραματίζουν τα χαρακτηριστικά της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στις συγκεκριμένες παραμέτρους. Η καθοδήγηση και οι γνώσεις του πάνω στην Κυτταρική Βιολογία, στον ηλεκτρομαγνητισμό, στην ασύρματη τεχνολογία, στη Ραδιοβιολογία, στη δοσιμετρία, σε μοναδικές τεχνικές όπως το Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης, στη φυσιολογία της Drosophila melanogaster, καθώς και στη συγγραφή πρωτότυπων άρθρων, που μου προσέφερε απλόγερα και καθημερινά, με βοήθησαν να αγαπήσω το συγκεκριμένο ερευνητικό αντικείμενο αλλά και να εξελίσσομαι συνεχώς επιστημονικά. Επιπροσθέτως, μέσω του κ. Μαργαρίτη ήρθα σε επαφή με καταξιωμένους ερευνητές από εγχώρια ερευνητικά κέντρα, αλλά και από το εξωτερικό. Αυτό που όμως αξίζει να τονίσω, περισσότερο από κάθε επιστημονικό κύρος και υπόβαθρο, τα οποία βέβαια έχει επιδείξει τόσα χρόνια μέσα από τη δουλειά και την ακαδημαϊκή του προσφορά, είναι η εξαίρετη συνεργασία και η μεγάλη στήριξη που μου πρόσφερε όλα αυτά τα χρόνια σε προσωπικό επίπεδο. Για

όλους αυτούς τους λόγους δεν έχω παρά να του εκφράσω ένα πολύ μεγάλο από καρδιάς και ειλικρινές ευχαριστώ.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον Επίκουρο Καθηγητή κ. Δημήτριο Ι. Στραβοπόδη, για την τιμή που μου έκανε να είναι ο Επιβλέπων της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής. Με τον κ. Στραβοπόδη γνωρίστηκα το 2007, όταν προπτυχιακή φοιτήτρια, τότε, χτύπησα την πόρτα του γραφείου του για να ζητήσω τη βοήθεια του, την οποία φυσικά μου προσέφερε γωρίς δεύτερη σκέψη, όπως πράττει τόσα χρόνια με όλους τους φοιτητές του. Στη συνέχεια, υπήρξε καθηγητής μου στο Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης και μέλος της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής της Μεταπτυχιακής μου Διπλωματικής εργασίας. Στη συγκεκριμένη Διατριβή η προσφορά του ήταν βαρύνουσας σημασίας, καθώς οργάνωσε και σχεδίασε τα πειράματα που αφορούσαν στο μηχανιστικό κομμάτι της επίδρασης της ακτινοβολίας. Για τη μελέτη του ρόλο του μεταγραφικού παράγοντα p53 στο οξειδωτικό και αποπτωτικό δυναμικό, καθώς και τη μελέτη επαγωγής στρες του Ενδοπλασματικού Δικτύου προσέφερε, εκτός από τον σχεδιασμό και την ενορχήστρωση των πειραμάτων, και τα κατάλληλα διαγονιδιακά και μεταλλαγμένα στελέχη εντόμων Drosophila melanogaster. Το αστείρευτο επιστημονικό του υπόβαθρο και οι γνώσεις που μου προσέφερε πάνω στη Μοριακή Βιολογία, στη φυσιολογία της Drosophila melanogaster, σε σημαντικές εργαστηριακές τεχνικές και μεθόδους Μοριακής και Κυτταρικής Βιολογίας και στη συγγραφή πρωτότυπων άρθρων με ενέπνευσαν τόσα χρόνια και με βοήθησαν να εξελιχθώ επιστημονικά. Η επιστημονική προσφορά του και οι πειραματικές του συμβουλές αποτέλεσαν για μένα φάρο στη δύσκολη προσπάθεια εκπόνησης της συγκεκριμένης έρευνας. Κατά συνέπεια, νιώθω εκτός από ευγνωμοσύνη και απέραντη χαρά που είχα την τύχη να δεχτεί την επίβλεψη της συγκεκριμένης Διατριβής, καθώς μου προσέφερε τη δυνατότητα να τον γνωρίσω εκ βάθους και να συναναστραφώ με έναν ολοκληρωμένο επιστήμονα, αλλά και άνθρωπο.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω, επίσης, στην Καθηγήτρια και Διευθύντρια του Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής κ. Ισιδώρα Σ. Παπασιδέρη για την τιμή που μου έκανε να είναι το τρίτο μέλος της συμβουλευτικής μου επιτροπής. Την ευχαριστώ βαθύτατα για όλη τη βοήθεια που μου προσέφερε όλα αυτά τα χρόνια τόσο σε επιστημονικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο. Η πολυετής ερευνητική της ενασχόληση και εμπειρία, η οποία την καθιστά έναν από τους πλέον εξειδικευμένους επιστήμονες σε εθνικό και διεθνές επίπεδο στο χώρο της κυτταρικής φυσιολογίας της *Drosophila*, συνέβαλε απόλυτα και καθοριστικά στην επιτυχή διεκπεραίωση της παρούσας Διατριβής. Η πόρτα του γραφείου της υπήρξε πάντα ανοιχτή για μένα και οι συμβουλές της ως επιστήμονας και ως άνθρωπος ήταν πολύ σημαντικές.

Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω βαθύτατα όλα τα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής που με τίμησαν με την πρόθυμη επιλογή τους να συμμετάσχουν σε αυτήν.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ την Καθηγήτρια και Διευθύντρια του Τομέα Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου κ. Αικατερίνη Γαϊτανάκη και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Διδώ Βασιλακοπούλου, δύο εξαίρετες πανεπιστημιακές καθηγήτριες που είχα την τύχη να γνωρίσω ως φοιτήτρια και υπήρξαν από τους καθηγητές που με ενέπνευσαν κατά τη διάρκεια των σπουδών μου στη Βιολογία.

Ευχαριστώ, επίσης, θερμά την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Αικατερίνη Σκουρολιάκου, η οποία βοήθησε με τις γνώσεις της και το επιστημονικό της υπόβαθρο στην οργάνωση της ακτινοβόλησης των εντόμων και τον υπολογισμό της δοσιμετρίας, έναν παράγοντα πολύ σημαντικό στις μελέτες Ηλεκτρομαγνητικής Βιολογίας. Εκτός από την καταλυτική της συμμετοχή στο επιστημονικό κομμάτι, την ευχαριστώ θερμά για όλη τη βοήθεια που μου προσέφερε καθώς υπήρξε στήριγμα για εμένα σε πολλές δύσκολες στιγμές. Αποτελεί έναν εξαίρετο άνθρωπο και επιστήμονα τον οποίο είχα την τιμή να γνωρίσω.

Μεγάλη χαρά και τιμή νιώθω, επίσης, που βρίσκεται στην Επταμελή Εξεταστική μου Επιτροπή η Λέκτορας κ. Μαριάννα Χ. Αντωνέλου. Υπήρξε για μένα υπόδειγμα επιστημονικού ήθους και επιμονής. Την ευχαριστώ θερμά για όλες τις συμβουλές σε επιστημονικό επίπεδο, καθώς και τις πολλές δεξιοτεχνίες που μοιράστηκε μαζί μου σε εργαστηριακές τεχνικές και μεθόδους. Αποτελεί υπόδειγμα συνεργάτη και ανθρώπου, και οφείλω να αναγνωρίσω ότι παρά τις καθημερινές αντιξοότητες δεν αρνείται ποτέ το χαμόγελο και την οποιαδήποτε βοήθεια.

Από τον Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους μεταδιδακτορικούς ερευνητές κ. Αδαμαντία Φ. Φραγκοπούλου, Αθανάσιο Δ. Βελέντζα, Παναγιώτη Δ. Βελέντζα, καθώς και την Ευμορφία Γ. Κωνσταντάκου.

Ιδιαίτερη μνεία οφείλω στη φίλη και συνεργάτιδά μου Δρ. Αδαμαντία Φ. Φραγκοπούλου για όλα όσα μου πρόσφερε και όλα όσα μοιραστήκαμε όλα αυτά τα χρόνια. Νιώθω απέραντη ευγνωμοσύνη που τη γνώρισα, συνεργάστηκα και συναναστράφηκα μαζί της. Ανήκει ανάμεσα στα λίγα τόσο οργανωμένα και συγκροτημένα άτομα που έχω γνωρίσει. Επίσης, είναι εξαίρετη επιστήμονας και πολύ υπεύθυνη ως άνθρωπος. Την ευχαριστώ για όλη τη βοήθεια τόσο σε επιστημονικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο. Αποτέλεσε σημαντικό κομμάτι της εργαστηριακής και όχι μόνο ζωής μου τα τελευταία χρόνια. Την ευχαριστώ θερμά για τις ατέλειωτες ώρες που μοιραστήκαμε εντός και εκτός εργαστηρίου, καθώς και για τη στήριξη και την αγάπη που εισέπραξα από αυτήν.

Ευχαριστώ, επίσης, τον Δρ. Παναγιώτη Δ. Βελέντζα, ο οποίος με μύησε στην καλλιέργεια της Drosophila melanogaster και τον Δρ. Αθανάσιο Δ. Βελέντζα που, εκτός της οποιασδήποτε βοήθειας που χρειάστηκα, μου μετέδωσε και τις γνώσεις του πάνω στην ηλεκτρονική μικροσκοπία, στο συνεστιακό σαρωτικό μικροσκόπιο laser και στη φυσιολογία της Drosophila. Παράλληλα, ευχαριστώ τη Δρ. Ευμορφία Γ. Κωνσταντάκου γιατί όσες φορές χρειάστηκα τη βοήθειά της μου την προσέφερε απλόχερα.

Ιδιαίτερα ευγνώμων είμαι απέναντι στον Δρ. Βασίλειο Τζούνακα για όλη τη στήριξη, την υπομονή και την εμπιστοσύνη που έδειξε προς το πρόσωπό μου όλα αυτά τα χρόνια. Φυσικά τον ευχαριστώ και για το γεγονός ότι μου προσέφερε τις γνώσεις του πάνω στη στατιστική και με παρότρυνε πάντα να εξελίσσομαι επιστημονικά. Ωστόσο, πάνω από όλα τον ευχαριστώ γιατί υπήρξε ο σύντροφός μου στις όμορφες, αλλά και δύσκολες στιγμές αυτού του ταξιδιού και γιατί μου προσέφερε αμέριστα τη συμπαράσταση και την αγάπη του.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα εν ενεργεία και διατελέσαντα μέλη της ερευνητικής ομάδας Ηλεκτρομαγνητικής Βιολογίας του κ. Μαργαρίτη και συγκεκριμένα τις κυρίες: Ραλλού Σελίμου, Νίκη Σαγιόγλου, Μαριλέτα Πανταζοπούλου και Τζίνα Κιμούση για την ευχάριστη συνεργασία και την εκάστοτε βοήθειά τους. Ευχαριστώ τη Δρ. Μαρία Ντζούνη για τις δημιουργικές στιγμές που μοιραστήκαμε, αλλά και για τη στήριξή της κατά τα πρώτα χρόνια της Διατριβής μου, ενώ ευχαριστώ θερμά και τη φίλη και συνεργάτιδά μου Υποψήφια Διδάκτωρ κ. Αικατερίνα Στέφη, γιατί με το χαμόγελό της και την πρόσχαρη προσωπικότητά της ομόρφυνε αυτό το ταξίδι. Τον υποψήφιο Διδάκτωρ Ιωάννη Γιανναράκη ευχαριστώ για την ευγενική παραχώρηση της γεννήτριας ραδιοσυχνοτήτων και τον χρόνο που διέθεσε στην εκπαίδευσή μου πάνω στη λειτουργία της.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Επίσης, μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην ερευνητική ομάδα του κ. Στραβοπόδη και συγκεκριμένα στη μεταπτυχιακή φοιτήτρια κ. Σταματία Καταραχιά και στη φοιτήτρια κ. Σοφία Πασαδάκη για τις πολλές και όμορφες στιγμές που περάσαμε στη Σχολή καθώς και την οποιαδήποτε βοήθειά τους.

Τέλος, από τον Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής ευχαριστώ όλα τα μέλη του, καθώς και τις δύο γραμματείς: κυρίες Μαρίνα Αρχοντάκη και Δήμητρα Αναγωνστοπούλου για την όμορφη συνεργασία που είχαμε όλα αυτά τα χρόνια.

Φυσικά δε θα μπορούσα να παραλείψω τους εξωτερικούς συνεργάτες, οι οποίοι συνέβαλαν καθοριστικά για την ολοκλήρωση της συγκεκριμένης μελέτης. Ευχαριστώ θερμά τον Δρ. Δημήτρη Θάνο, αρχικά, για τη φιλοξενία του στο εργαστήριο του στο Τδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, για τη συνεισφορά του στα πειράματα της γονιδιακής έκφρασης, καθώς διέθεσε τον εξοπλισμό για την ανάλυση των μικροσυστοιχιών, καθώς και τις γνώσεις που μου προσέφερε σχετικά με τον τρόπο συγγραφής πρωτότυπης επιστημονικής δημοσίευσης. Ευχαριστώ τη Δρ. Δέσποινα Παπαδοπούλου, η οποία αποτέλεσε την κινητήρια δύναμη διεξαγωγής των συγκεκριμένων πειραμάτων, με μύησε στη συγκεκριμένη τεχνική και μου δίδαξε όσα γνωρίζει για τις μοριακές μεθόδους. Οι ώρες που συνεργάστηκα μαζί της υπήρξαν άκρως δημιουργικές και οι επιστημονικές τις συμβουλές ήταν πολύ σημαντικές για εμένα. Τέλος, ευχαριστώ θερμά τον Δρ. Αλέξανδρο Πολύζο, ο οποίος με βοήθησε στη βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων των μικροσυστοιχιών και είχε την υπομονή να προσπαθήσει να εξηγήσει σε ένα βιολόγο στατιστική και βιοπληροφορική.

Για την οικονομική υποστήριξη της Διατριβής μου ευχαριστώ το πρόγραμμα ΘΑΛΗΣ MIS 375784 «ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΜΗ ΙΟΝΙΖΟΥΣΩΝ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΩΝ: ΜΙΑ ΔΙΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ» και τον Συντονιστή κ. Λουκά Χ. Μαργαρίτη για την οικονομική στήριξη κατά τα έτη 2012-2015, καθώς και το Κληροδότημα Παπαδάκη για τη χορήγηση υποτροφίας κατά τα έτη 2012-2014.

Κλείνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου τους φίλους μου, αλλά πάνω από όλα δύο ξεχωριστούς ανθρώπους στη ζωή μου, τους γονείς μου: Ανδριανή και Κώστα, που υπήρξαν πρότυπα εργατικότητας και αφιέρωσαν τη ζωή τους σ' εμένα. Τους χρωστάω πολλά, καθώς με δίδαξαν να μην υποχωρώ, να παλεύω για αυτά που αξίζουν και με γεμίζουν, και να κοιτάω μπροστά, χωρίς φόβο για το μέλλον.

Αρετή Κ. Μαντά

Δεκέμβριος, 2015

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	
ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΕΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΟΡΩΝ	17
ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΟΡΩΝ	23
ПЕРІЛНѰН	24
ABSTRACT	29
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	34
1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΗΛΕΚΤΡΟΜΑΓΝΗΤΙΚΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ (ΗΜΑ).	34
1.2 ΗΛΕΚΤΡΟΜΑΓΝΗΤΙΚΟ ΦΑΣΜΑ	37
1.2.1 PAΔΙΟΚΥΜΑΤΑ (RADIOFREQUENCIES – RF) – MIKPOKYMATA (MICROWAVES – MW)	38
1.2.2 УПЕРУЮРА КУМАТА (INFRARED – IR)	38
1.2.3 ΟΡΑΤΟ ΦΩΣ	39
1.2.4 ΥΠΕΡΙΩΔΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ (UV)	39
1.2.5 ΑΚΤΙΝΕΣ Χ	39
1.2.6 ΑΚΤΙΝΕΣ γ	39
1.3 ΜΗ ΙΟΝΙΖΟΥΣΑ ΗΛΕΚΤΡΟΜΑΓΝΗΤΙΚΗ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ ΕΚΠΕΜΠΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΑΣΥΡΜΑΤΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ	40
1.3.1 KINHTO THΛΕΦΩΝΟ GSM (GLOBAL SYSTEM FOR MOBILE TELECOMMUNICATIONS)	42
1.3.2 ΒΑΣΗ ΑΣΥΡΜΑΤΟΥ ΤΗΛΕΦΩΝΟΥ ΤΥΠΟΥ DECT (DIGITAL ENHANC CORDLESS TELEPHONE)	2 ED 45
1.3.3 AΣYPMATO ΔΙΚΤΥΟ (WI-FI / WIRELESS FIDELITY)	48
1.4 ΡΥΘΜΟΣ ΕΙΔΙΚΗΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ (SAR)	49
1.5 ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ (Reactive Oxygen Species – ROS))50
1.6 ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΟ ΔΥΝΑΜΙΚΟ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	53
1.6.1 ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΜΑΚΡΟΜΟΡΙΩΝ ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ	53
1.6.1.1 Οξειδωτική βλάβη του DNA	53
1.6.1.2 Οξείδωση Πρωτεϊνών	53
1.6.1.3 Οξείδωση Λιπιδίων	54
1.6.2 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ	54
1.6.2.1 Αντιοξειδωτικά ένζυμα	54

1.6.2.2 Μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	55
1.7 ΗΛΕΚΤΡΟΜΑΓΝΗΤΙΚΗ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΟ Ανναμικό) 56
1.9 ΣΤΡΕΣ ΤΟΥ ΕΝΙΔΟΠ ΔΑΣΜΑΤΗΖΟΥ ΔΗΖΤΥΟΥ (ΕΝΙΔΟΒΙ ΔΩΜΙΟ	
RETICULUM STRESS – ER STRESS)	62
1.9 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΣΤΡΕΣ ΕΔ	65
1.10 ΠΡΟΤΥΠΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ DROSOPHILA MELANOGASTE	R 66
1.10.1 ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ	68
1.10.2 ΘΗΛΥΚΟ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	70
1.10.3 ΩΟΓΕΝΕΣΗ ΣΤΗ DROSOPHILA MELANOGASTER	71
1.10.3.1 Γερμάριο	73
1.10.3.2 Βιτελλάριο	76
1.10.3.3 Προβιτελλογενετικά στάδια	77
1.10.3.4 Βιτελλογενετικά στάδια	77
1.10.3.5 Χοριογενετικά στάδια	79
1.10.3.6 Κυτταρικός θάνατος κατά την ωογένεση	81
1.11 Ο ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ p53	86
1.12 ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΗΛΕΚΤΡΟΜΑΓΝΗΤΙΚΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΣΤΗ	
DROSOPHILA MELANOGASTER	88
1.13 ΣΚΟΠΟΣ	90
ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	93
2.1 УЛІКА	93
2.1.1 ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	93
2.1.2 OP Γ ANA – $\Sigma Y \Sigma K E Y E \Sigma$	95
2.1.2.1 Φασματικός Αναλυτής Πεδίου NARDA SRM3000	96
2.1.2.2 Φασματικός Αναλυτής Rohde και Schwarz FSL/6	97
2.1.3 ВІОЛОГІКО УЛІКО	98
2.1.3.1 Πειραματόζωα	98
2.1.3.2 Καλλιέργεια εντόμων	98
2.1.3.3 Τύποι θρεπτικών μέσων για την ανάπτυξη των εντόμων	99
2.1.3.4 Γενετικό σύστημα GAL4/UAS	99

2.2 N	ΜΕΘΟΔΟΙ	101
2.2.1	ΔΟΣΙΜΕΤΡΙΑ – ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΕΚΘΕΣΗΣ ΣΤΗΝ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ	101
2.2.2	ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΣΗΣ	103
2.2.2.1	Πηγές καθημερινής χρήσης	104
2.2.2.1.1	Βάση ασύρματου τηλεφώνου	104
2.2.2.1.2	Ασύρματο δίκτυο Wi-Fi	105
2.2.2.1.3	Κινητό τηλέφωνο	106
2.2.2.1.4	Γεννήτρια ραδιοσυχνοτήτων	107
2.2.3 ENTON	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΑΚΡΟΒΙΟΤΗΤΑΣ ΑΡΣΕΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΘΗΛΥΚΩΝ ΙΩΝ	<u>N</u> 108
2.2.4	ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΘΗΛΥΚΩΝ ΕΝΤΟΜΩΝ – ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΩΟΘΥΛΑΚΙΩΝ	108
2.2.5	ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΟΞΥΓΟΝΟΥ (ROS)	109
2.2.6	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	109
2.2.7	ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ – ΜΕΘΟΔΟΣ BRADFORD	 110
2.2.8	ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ (ΟΧΥΒΙΟΤ)	110
2.2.9	SDS – PAGE ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΤΑ LAEMMLI	111
2.2.9.1	Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδης – ηλεκτροφόρηση	111
2.2.9.2	Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης	113
2.2.9.3	Δέσμευση μη-ειδικών θέσεων – Ανοσο-στύπωμα Western	113
2.2.9.4	Ποσοτική εκτίμηση πρωτεϊνικών ζωνών	115
2.2.10	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΩΝ ΑΙΠΙΔΙΩΝ	115
2.2.11 ΜΕΘΟΔ	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ – ΔΟΣ ΑΝΑΓΩΓΗΣ ΣΙΔΗΡΟΥ (FRAP)	117
2.2.12	ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ	118
2.2.12.1	Φωτονική μικροσκοπία	118
2.2.12.2	Μικροσκόπιο φθορισμού	118
2.2.12.2.1	Ανίχνευση αποπτωτικών ωοθυλακίων – Χρώση με πορτοκαλί της ακριδίνης	118
2.2.12.3	Συνεστιακό σαρωτικό μικροσκόπιο laser	119
2.2.12.3.1 laser	Ανίχνευση δραστικών μορφών οξυγόνου μέσω Συνεστιακού σαρωτικού μικροσκοπ	:íov 121
2.2.12.4	Ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης	121

2.2.12.4.1	Ανίχνευση μορφολογικών αλλοιώσεων λεπτής δομής – Έγκλειση σε εποξεικές ρη	η <mark>τίνες</mark> 122
2.2.12.4.2	2 Τομές από block εποξεικών ρητινών	123
2.2.12.4.3	3 Χρώση τομών	124
2.2.12.4.4	4 Παρατήρηση σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης	124
2.2.13	ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΩΝ	124
2.2.13.1	Απομόνωση ολικού RNA	125
2.2.13.2	Σύνθεση cRNA και υβριδοποίηση	126
2.2.13.3	Βιοπληροφορική ανάλυση	128
2.2.14 ПРАГМ	ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΣΕ IATIKO XPONO (Quantitative real-time polymerase chain reaction / qRT-PC	5 R)
2.2.14.1 transcrip	Σύνθεση cDNA με τη μέθοδο της PCR αντίστροφης μεταγραφάσης (Revers ption polymerase chain reaction / RT-PCR)	e 130
2.2.14.2	Κινητική της αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real time PC	CR) 130
2.2.14.3	Σύστημα ανίχνευσης	131
2.2.14.4	qReal time PCR – Πειραματικό μέρος	132
2.2.14.5	Ανάλυση – Ποσοτικοποίηση αποτελεσμάτων	134
2.2.15	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	135
АПОТІ	ΈΛΕΣΜΑΤΑ	137
3.1 E МОРФ 9	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΩΝ ΟΞΥΓΟΝΟΥ (ROS)	137
3.1.1 ΣΤΑ ΣΩ	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΒΑΣΗΣ ΑΣΥΡΜΑΤΟΥ ΤΗΛΕΦΩΝΟΥ DEC 2ΜΑΤΑ ΝΕΑΡΩΝ ΑΡΣΕΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΘΗΛΥΚΩΝ ΦΥΣΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ	CT
ENTOM		137
3.1.2 КЕФАЛ	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΒΑΣΗΣ ΑΣΥΡΜΑΤΟΥ ΤΗΛΕΦΩΝΟΥ ΣΤΑ ΜΑ ΝΕΑΡΩΝ ΑΡΣΕΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΘΗΛΥΚΩΝ ΦΥΣΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ΕΝΤΟΜΩ	2N 141
3.1.3 КЕФАЛ	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΑΣΥΡΜΑΤΟΥ ΔΙΚΤΥΟΥ WI-FI ΣΤΑ ΔΙΑ ΝΕΑΡΩΝ ΘΗΛΥΚΩΝ ΦΥΣΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ΕΝΤΟΜΩΝ	143
3.1.4	ΕΠΙΠΕΔΑ ROS ΣΤΟΥΣ ΣΩΜΑΤΙΚΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ ΝΕΑΡΩΝ ΑΡΣΕΝΙΚΩΝ	KAI
ӨНЛҮК AKTINC	ΚΩΝ ΕΝΤΟΜΩΝ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΑ ΣΤΙΓΜΙΟΤΥΠΑ ΜΕΤΑ ΤΟ ΠΕΡΑΣ ΤΗΣ ΟΒΟΛΗΣΗΣ	144

3.1.5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΒΑΣΗΣ ΑΣΥΡΜΑΤΟΥ ΤΗΛΕΦΩΝΟΥ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ROS ΤΩΝ ΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΙΣΤΩΝ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΤΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ
3.1.6 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΒΑΣΗΣ ΑΣΥΡΜΑΤΟΥ ΤΗΛΕΦΩΝΟΥ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ROS ΤΟΥ ΩΟΘΗΚΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ
3.1.7 ΕΠΙΠΕΔΑ ROS ΣΤΟΝ ΩΟΘΗΚΙΚΟ ΙΣΤΟ ΝΕΑΡΩΝ ΦΥΣΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ΘΗΛΥΚΩΝ ΕΝΤΟΜΩΝ 4 ΩΡΕΣ ΜΕΤΑ ΤΟ ΠΕΡΑΣ ΤΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΣΗΣ151
3.1.8 ΕΠΙΠΕΔΑ ROS ΩΟΘΥΛΑΚΙΩΝ ΦΥΣΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ, ΠΡΙΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑ ΤΟ ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΟ ΣΤΑΔΙΟ 10 ΤΗΣ ΩΟΓΕΝΕΣΗΣ, ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ ΚΙΝΗΤΟ ΤΗΛΕΦΩΝΟ
3.1.9 ΕΠΙΠΕΔΑ ROS ΩΟΘΥΛΑΚΙΩΝ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ <i>Dm</i> p53 ^{-/-} , ΠΡΙΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑ ΤΟ ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΟ ΣΤΑΔΙΟ 10 ΤΗΣ ΩΟΓΕΝΕΣΗΣ, ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ ΚΙΝΗΤΟ ΤΗΛΕΦΩΝΟ
3.1.10 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ROS ΣΤΑ ΩΟΘΥΛΑΚΙΑ ΤΟΥ ΕΝΤΟΜΟΥ <i>DROSOPHILA</i> ΜΕΤΑ ΑΠΟ <i>IN VITRO</i> ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΣΗ
3.1.11 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΤΗΣ ΜΗ ΙΟΝΙΖΟΥΣΑΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΣΤΟΝ ΩΟΘΗΚΙΚΟ ΙΣΤΟ ΦΥΣΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ΕΝΤΟΜΩΝ158
3.1.11.1 Επίδραση της ακτινοβολίας συχνότητας 1800 MHz, με η χωρίς διαμόρφωση, στα επίπεδα ROS του ωοθηκικού ιστού
3.1.11.2 Επίδραση ακτινοβολίας χωρίς διαμόρφωση (CW) στα επίπεδα ROS του ωοθηκικού ιστού συναρτήσει της συχνότητας160
3.1.11.3 Επίδραση ακτινοβολίας κυμάτων με διαμόρφωση FM στα επίπεδα ROS του ωοθηκικού ιστού συναρτήσει της συχνότητας161
3.1.11.4 Επίδραση ακτινοβολίας στον ωοθηκικό ιστό συναρτήσει της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου της ακτινοβολίας κυμάτων CW και συχνότητας 900 MHz163
3.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΣΤΗΝ ΚΑΡΒΟΝΥΛΙΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΟΥΣ ΣΩΜΑΤΙΚΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ ΑΡΣΕΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΘΗΛΥΚΩΝ ΦΥΣΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ΕΝΤΟΜΩΝ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΤΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ
3.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΙΣΤΩΝ ΑΡΣΕΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΘΗΛΥΚΩΝ ΦΥΣΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ΕΝΤΟΜΩΝ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΤΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ
3.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΣΤΗΝ ΟΛΙΚΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΙΣΤΩΝ ΑΡΣΕΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΘΗΛΥΚΩΝ ΦΥΣΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ΕΝΤΟΜΩΝ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΤΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ
3.5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΣΗΣ ΕΝΗΛΙΚΩΝ ΕΝΤΟΜΩΝ, ΣΤΗΝ ΕΠΑΓΩΓΗ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΩΟΓΕΝΕΣΗ

3.5.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΤΗΣ ΜΗ ΙΟΝΙΖΟΥΣΑΣ
$\begin{array}{c} ARTINOBOATA2 2 THN ATTOTT 1322H RATA THN 320TENE2H$
3.5.1.1 Επιδραση στην αποπτωση συναρτησει του πρωτοκολλου εκθεσης ακτινοβολιας 900 MHz χωρίς διαμόρφωση
3.5.1.2 Επίδραση στην απόπτωση συναρτήσει της διαμόρφωσης της ακτινοβολίας συχνότητας 1800 MHz
3.5.1.3 Επίδραση στην απόπτωση συναρτήσει της συχνότητας της ακτινοβολίας με κύματα CW
3.5.1.4 Επίδραση στην απόπτωση συναρτήσει της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου της ακτινοβολίας κυμάτων CW και συχνότητας 900 MHz
3.5.2 ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ p53 ΣΤΗΝ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ, ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΑΛΜΙΚΗ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ, ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΩΟΓΕΝΕΣΗ
3.6 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΣΤΡΕΣ ΕΝΔΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟΥ ΔΙΚΤΥΟΥ (ER STRESS)
3.7 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΗΜΑ ΣΤΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΩΟΓΕΝΕΣΗ
3.7.1 ΑΛΛΑΓΗ ΣΤΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΩΟΓΕΝΕΣΗ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ ΚΙΝΗΤΟ ΤΗΛΕΦΩΝΟ
3.7.2 ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΤΑ ΟΠΟΙΑ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΘΗΚΕ Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ ΚΙΝΗΤΟΥ ΤΗΛΕΦΩΝΟΥ
3.7.3 ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΦΑΝΗΚΕ ΝΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΟΣΟΝ ΑΦΟΡΑ ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥΣ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕ ΚΙΝΗΤΟ ΤΗΛΕΦΩΝΟ
3.7.4 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΟΣΥΝΘΕΤΙΚΗ, ΜΕΤΑΦΟΡΙΚΗ ΚΑΙ ΕΚΚΡΙΤΙΚΗ ΜΗΧΑΝΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ
3.7.5 ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΟΡΘΟΛΟΓΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΤΗΣ DROSOPHILA MELANOGASTER ΚΑΙ ΤΟΥ HOMO SAPIENS
3.7.6 ΕΠΑΛΗΘΕΥΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΩΝ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ qPCR
3.8 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΣΤΗ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΕΝΤΟΜΟΥ DROSOPHILA MELANOGASTER
3.8.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΒΑΣΗΣ ΑΣΥΡΜΑΤΟΥ ΤΗΛΕΦΩΝΟΥ ΣΤΟ ΠΡΟΣΔΟΚΙΜΟ ΖΩΗΣ

3.8.1.1 Επίδραση στο προσδόκιμο ζωής φυσικού τύπου εντόμων μετά από συνεχή και διακοπτόμενη ακτινοβόληση βάσης ασύρματου τηλεφώνου208
3.8.1.2 Επίδραση στο προσδόκιμο ζωής <i>Dm</i> p53 ^{-/-} εντόμων μετά από συνεχή και διακοπτόμενη ακτινοβόληση βάσης ασύρματου τηλεφώνου
3.8.1.3 Επίδραση στο προσδόκιμο ζωής του διαγονιδιακού στελέχους που υπερεκφράζει το ένζυμο καταλάση
3.8.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΑΣΥΡΜΑΤΟΥ ΔΙΚΤΥΟΥ ΣΤΟ ΠΡΟΣΔΟΚΙΜΟ ΖΩΗΣ
3.9 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΛΛΟΙΩΣΕΩΝ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΩΝ ΩΟΘΥΛΑΚΙΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ
ΣΥΖΗΤΗΣΗ
4.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΟΞΥΓΟΝΟΥ (ROS)
4.1.1 ΧΡΟΝΟ- ΚΑΙ ΦΥΛΟ-ΕΙΔΙΚΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΑΛΜΙΚΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΒΑΣΗΣ ΑΣΥΡΜΑΤΟΥ ΤΗΛΕΦΩΝΟΥ DECT ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ROS ΤΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΝΕΑΡΩΝ ΑΡΣΕΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΘΗΛΥΚΩΝ ΦΥΣΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ΕΝΤΟΜΩΝ
4.1.2 ΙΣΤΟ-ΕΙΔΙΚΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΑΛΜΙΚΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ROS ΤΩΝ ΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΙΣΤΩΝ ΝΕΑΡΩΝ ΑΡΣΕΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΘΗΛΥΚΩΝ ΦΥΣΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ΕΝΤΟΜΩΝ
4.1.3 ΜΕΓΑΛΥΤΕΡΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΤΟΥ ΩΟΘΗΚΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ ΕΝΑΝΤΙ ΤΗΣ ΠΑΛΜΙΚΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΒΑΣΗΣ ΑΣΥΡΜΑΤΟΥ ΤΗΛΕΦΩΝΟΥ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ROS
4.1.4 ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΑΝΑΚΑΜΨΗΣ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ROS ΜΕΤΑ ΤΟ ΠΕΡΑΣ ΤΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΣΗΣ ΣΤΟΥΣ ΣΩΜΑΤΙΚΟΥΣ ΚΑΙ ΓΑΜΕΤΙΚΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ ΦΥΣΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ΕΝΤΟΜΩΝ
4.1.5 ΗΛΙΚΙΟ-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΑΛΜΙΚΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΒΑΣΗΣ ΑΣΥΡΜΑΤΟΥ ΤΗΛΕΦΩΝΟΥ ΣΤΟ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΟ ΔΥΝΑΜΙΚΟ ΤΩΝ ΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΙΣΤΩΝ – ΣΥΣΧΕΤΙΣΜΟΣ ΜΕ ΤΟ ΠΡΟΣΔΟΚΙΜΟ ΖΩΗΣ
 4.1.6 ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ p53 ΣΤΗΝ ΑΚΤΙΝΟ-ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΥΞΗΣΗ ΤΩΝ ROS225 4.1.7 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΟ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΔΥΝΑΜΙΚΟ ΤΟΥ ΩΟΘΗΚΙΚΟΥ
ΙΣΤΟΥ ΕΞΑΡΤΑΤΑΙ ΑΠΟ ΤΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΟΠΩΣ Η ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ, Η ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΚΑΙ Η ΕΝΤΑΣΗ

4.2	Η <i>ΙΝ VITRO</i> ΕΚΘΕΣΗ ΣΤΗΝ ΠΑΛΜΙΚΗ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ ΚΙΝΗΤΟΥ	
ΤΗΛΙ	ΕΦΩΝΟΥ ΕΠΑΓΕΙ ΤΟ ΣΤΡΕΣ ΤΟΥ ΕΝΔΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟΥ ΔΙΚΤΥΟΥ	
(ΕΔ Σ	TPEΣ – ER STRESS)	227
4.3	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΣΗΣ ΕΝΗΛΙΚΩΝ ΕΝΤΟΜΩΝ ΣΤΗΝ	
ЕПАІ	ΓΩΓΗ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΩΟΓΕΝΕΣΗ	227
4.3.1 ЕΞАР ЛІАМ	Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΟ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟ ΔΥΝΑΜΙΚΟ ΤΟΥ ΩΟΘΗΚΙΚΟΥ ΙΣΤΟ ΤΑΤΑΙ ΑΠΟ ΤΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ, ΟΠΩΣ Η ΟΡΦΩΣΗ, Η ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ, Η ΕΝΤΑΣΗ ΚΑΙ Η ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ	ЭY
AKTI	ΝΟΒΟΛΗΣΗΣ	228
4.3.2	Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ p53 ΣΤΗΝ ΑΚΤΙΝΟ-ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΠΟΠΤΩΣΗ	229
4.4	ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ	
ΩΟΓΙ	ενεΣΗ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ ΠΑΛΜΙΚΗ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ ΚΙΝΗΤΟ	ΟY
ΤΗΛΙ	ΕΦΩΝΟΥ	229
4.5	ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	232
BIBA	ΙΟΓΡΑΦΙΑ	238
5.1	ΔΙΕΘΝΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	238
5.2	ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	260
5.3	ΔΙΑΔΙΚΤΥΑΚΕΣ ΠΗΓΕΣ	261
ПАР	АРТНМА	263

8-oxo-dG = 8-Oxo-2'-deoxyguanosine

- **ALDH** = Aldehyde Dehydrogenase
- $\mathbf{A}\mathbf{M} = \mathbf{A}\mathbf{m}\mathbf{p}\mathbf{l}\mathbf{i}\mathbf{u}\mathbf{d}\mathbf{e}$ Modulation
- **ANOVA** = One Way Analysis of Variance
- **APS** = Ammonium Persulfate
- **ATF** = Activated Transcription Factor
- Atg = Autophagy-related
- **ATP** = Adenosine Triphosphate
- **BHT** = Butylated hydroxytoluene
- **BSA** = Bovine Serum Albumin
- **BTS** = Base Transceiver Station
- **CAD** = Caspase-activated DNase
- **CAT** = Catalase
- **CDMA** = Code Division Multiple Access
- **Chk2** = Checkpoint kinase 2
- **CLSM** = Confocal Laser Scanning Microscopy
- CM-H₂DCFDA = 5-6-Chloromethyl-2',7' -Dichlorodihydrofluorescein Diacetate, Acetyl Ester
- $\mathbf{CTRL} = \mathbf{Control}$
- **CW** = Continuous Waves
- **DCS** = Digital Cellular System
- **DECT** = Digital Enhanced Cordless Telephone
- **DNA** = Deoxyribonucleic Acid

- **DNPH** = 2,4-Dinitrophenylhydrazine
- **dNTP** = Deoxynucleotide
- **DSS** = Digital Spread Spectrum
- **DSSS** = Direct Sequence Spread Spectrum
- **DTX** = Discontinuous Transmission
- **ECL** = Enhanced Chemiluminescence
- **EDTA** = Ethylenediaminetetraacetic Acid
- **EGFR** = Epidermal Growth Factor Receptor
- **EGTA** = Ethylene Glycol Tetraacetic Acid
- eIF2 = Eukaryotic Initiation Factor 2
- **ELF** = Extremely Low Frequencies
- **ER** = Endoplasmic Reticulum
- **ERAD** = Endoplasmic Reticulum Assosiated Degradation
- **ERK** = Extracellular-signal Regulated Kinase
- **Ero1** = Endoplasmic Reticulum Oxidoreductase 1
- **ERSE** = ER-stress response element
- **EXP** = Exposed
- FC = Follicle Cell
- FCC = Federal Communication Commission
- **FDMA** = Frequency Division Multiple Access
- **FM** = Frequency Modulation
- **FMCW** = Frequency-modulated Continuous Wave
- **FRAP** = Ferric Reducing Antioxidant Power
- **GO** = Gene Ontology
- **GPx** = Glutathione Peroxidase

- $\mathbf{GR} = \mathbf{Glutathione} \ \mathbf{Reductase}$
- **Grp** = Glucose-regulated protein
- **GSH** = Glutathione
- **GSM** = Global System for Mobile Telecommunications
- **GSMK** = Gaussian Filtered Minimum Shift Keying
- GST = Glutathione S-transferase
- **HID** = Head Involution Defective
- **HRP** = Horseradish Peroxidase
- **Hsp** = Heat Stress Protein
- **IAPs** = Inhibitor of Apoptosis Proteins
- **ICL** = Innermost Chorionic Layer
- **ICNIRP** = International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection
- IE = Inner Endochorion
- IgG = Immunoglobulin G
- **IP**₃**Rs** = Inositol 1,4,5-trisphosphate Receptors
- **IR** = Infrared
- **IRE1** = Inositol-requiring Enzyme 1
- **JNK** = c-Jun N-terminal Kinase
- **KEGG** = Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
- **MAMs** = Mitochondria-Associated ER Membrane(s)
- **MAPK** = Mitogen-activated Protein Kinase
- MDA = Malondialdehyde
- MS = Mobile Station
- MTOC = Microtubules-organizing Center
- **MW** = Microwave(s)

<u>ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ</u>

- **MW** = Molecular Weight
- **NADH** = Nicotinamide Adenine Dinucleotide
- **NADPH** = Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
- **OC** = Oocyte
- OE = Outer Endochorion
- **OFDM** = Orthogonal Frequency Division Multiplexing
- **PAGE** = Poly-acrylamide Gel Electrophoresis
- **PANTHER** = Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationship(s)
- **PBS** = Phosphate-buffered Saline
- **PCR** = Polymerase Chain Reaction
- **PDIs** = Protein Disulfide Isomerases
- **PERK** = Pancreatic ER kinase (PKR)-like ER Kinase
- **PMSF** = Phenylmethanesulfonyl Fluoride
- **Prx** = Peroxiredoxin
- **PTEN** = Phosphatase and Tensin Homolog
- **PTP1b** = Protein-tyrosine Phosphatase 1b
- **qRT-PCR** = Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction
- **RF** = Radiofrequency
- **RFR** = Radiofrequency Radiation
- **RHG** = Reaper-Hid-Grim
- **RIDD** = IRE1-dependent Decay
- **RNA** = Ribonucleic acid
- **ROS** = Reactive Oxygen Species
- **rpr** = Reaper
- **RT-PCR** = Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

<u>ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ</u>

- **RyR** = Ryanodine Receptors
- **SAM** = Specific Anthropomorphic Mannequin
- **SAR** = Specific Absorption Rate
- **SDS** = Sodium Dodecyl Sulfate
- **SERCA** = Sarcoendoplasmic Reticulum Ca^{2+} Transport ATPase
- **SOD** = Superoxide Dismutase
- **SEM** = Scanning Electron Microscope
- **TAC** = Total Antioxidant Capacity
- **Taq** = Thermus Aquaticus
- **TBA** = 2-Thiobarbituric Acid
- **TBS** = Tris-buffered Saline
- **TCA** = Tricarboxylic Acid
- **TDMA** = Time Division Multiple Access
- **TEM** = Transmission Electron Microscope
- **TGF** = Transforming Growth Factor
- TIGAR = TP53-induced Glycolysis and Apoptosis Regulator
- **TNF** = Tumor Necrosis Factor
- **TNFR** = Tumor Necrosis Factor Receptor
- **TOR**= Target of Rapamycin
- **TOS** = Total Oxidative Status
- **TPTZ** = 2,4,6-Tripyridyl-s-Triazine
- $\mathbf{TPx} = \text{Theoredoxin-Peroxyredoxin}$
- **TPx** = Thioredoxin Peroxidase
- **TRAF** = TNF Receptor-associated Factor
- **UPR** = Unfolded Protein Response

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

- $\mathbf{U}\mathbf{V} = \mathbf{U}\mathbf{l}\mathbf{t}\mathbf{r}\mathbf{a}\mathbf{v}\mathbf{i}\mathbf{o}\mathbf{l}\mathbf{e}\mathbf{t}$
- **VM** = Vitelline Membrane
- **VPs** = Vitellin Proteins
- WCDMA = Wideband Code Division Multiple Access
- Wi-Fi = Wireless Fidelity
- **WL** = Wax Layer
- **Xbp-1** = X-box binding protein 1
- **XO** = Xanthine Oxidase

Yps = Yolk proteins

ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΟΡΩΝ

- **BM** = Βιτελλινική Μεμβράνη
- $\mathbf{B} \boldsymbol{\Sigma} = \mathbf{B}$ ιτελλινικά Σωμάτια
- ΕΔ = Ενδοπλασματικό Δίκτυο
- ΕΜΥ = Ενδοκύτωση με Μεσολάβηση Υποδοχέων
- ΗΜΑ = Ηλεκτρομαγνητική Ακτινοβολία
- $HM\Pi$ = Ηλεκτρομαγνητικό(α) Πεδίο(α)
- $\Theta \mathbf{K} = \Theta$ υλακοκύτταρο(α)
- ΜΗ = Μέσης Ηλικίας
- TK = Tροφοκύτταρο(α)
- ΩK = Ωοκύτταρο(α)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το αντικείμενο της παρούσας μελέτης ήταν οι βιολογικές επιδράσεις της μη ιονίζουσας ακτινοβολίας και κυρίως του φάσματος ασύρματης επικοινωνίας στο πρότυπο βιολογικό σύστημα *Drosophila melanogaster*. Αποτέλεσε, επίσης, παραδοτέο του έργου ΘΑΛΗΣ MIS 375784 με συντονιστή τον Ομότιμο Καθηγητή Λουκά Χ. Μαργαρίτη και διεξήχθη κατά τη διάρκεια των ετών 2011-2015 στον Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής του Τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ.

Η καθημερινή χρήση των συσκευών ασύρματης επικοινωνίας έχει αυξηθεί εκθετικά την τελευταία δεκαετία, δημιουργώντας ανησυχίες για πιθανές επιπτώσεις στην υγεία των χρηστών. Μεταξύ των συχνοτήτων που χρησιμοποιούνται, κυρίαρχες είναι εκείνες που περιλαμβάνονται στο φάσμα ραδιοσυχνοτήτων και μικροκυμάτων, και κυρίως στην περιοχή των 500 με 2.500 MHz. Οι συχνότητες αυτές αξιοποιούνται από την τεχνολογία της κινητής τηλεφωνίας, του ασύρματου δικτύου, τρεις συσκευές που χρησιμοποιούνται ευρέως στο σπίτι και την εργασία, τόσο από ενήλικα όσο και από νεαρά άτομα.

Αν και έχουν προταθεί, από το 1998, «όρια ασφαλείας», σχετικά με την αποδεκτή ένταση της ακτινοβολίας που εκπέμπεται από τις συσκευές ασύρματης τεχνολογίας, εντούτοις πρόσφατες ερευνητικές μελέτες, στις οποίες ανήκει και η συγκεκριμένη Διδακτορική Διατριβή, έχουν παράσχει στοιχεία που θέτουν υπό αμφισβήτηση τα συγκεκριμένα όρια, τα οποία έχουν θεσπιστεί με βάση τις θερμικές επιδράσεις. Παράλληλα, η πλειονότητα των μελετών παγκοσμίως χρησιμοποιούν γεννήτριες παραγωγής ραδιοσυχνοτήτων, οι οποίες απλώς προσπαθούν να προσομοιάσουν την ακτινοβολία που εκπέμπεται από συσκευές καθημερινής χρήσης. Παράλληλα, οι αναφορές εστιάζονται κυρίως σε *in vitro* μοντέλα και οι συνθήκες έκθεσης, δηλαδή η επιλεγμένη συχνότητα, η ένταση, η διάρκεια και η διαμόρφωση, ποικίλουν σημαντικά, με συνέπεια τα αποτελέσματα των μελετών να παραμένουν αντικρουόμενα.

Για τους λόγους αυτούς, η συγκεκριμένη Διατριβή είχε ως στόχους να διαλευκάνει in vivo το μηχανιστικό μοντέλο επίδρασης της μη ιονίζουσας ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας ραδιοσυχνοτήτων σε πραγματικές συνθήκες έκθεσης, υπό το πρίσμα της επαγωγής στρες (οξειδωτικό στρες και στρες Ενδοπλασματικού Δικτύου – ER stress), απόπτωσης, καθώς και αναπρογραμματισμού της γονιδιακής έκφρασης, και να αποσαφηνίσει τη συμβολή των χαρακτηριστικών της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, όπως η συχνότητα, η διαμόρφωση και η ένταση, στην οποιαδήποτε ανιχνεύσιμη επίδραση. Για την έκθεση των εντόμων χρησιμοποιήθηκαν συσκευές καθημερινής χρήσης, όπως:

- το κινητό τηλέφωνο, GSM 900 MHz, DCS 1800 MHz
- το ασύρματο τηλέφωνο, 1880 1900 MHz
- το ασύρματο δίκτυο, 2400 2500 MHz

σε σύγκριση με γεννήτρια παραγωγής ραδιοκυμάτων 100, 900 και 1800 MHz, με ή χωρίς διαμόρφωση συχνότητας. Ο χρόνος έκθεσης κυμαινόταν από 6 λεπτά μέχρι και 3 μήνες, ενώ η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου της ακτινοβολίας που χρησιμοποιήθηκε μετρήθηκε από ειδικούς

φασματικούς αναλυτές (από 0,3 μέχρι 17 V/m) και ήταν εντός των θεσμικών «ορίων ασφαλείας».

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων, όσον αφορά στην σποραδικά επαγόμενη απόπτωση κατά την ωογένεση, έδειξε ότι αυξάνεται, μετά από επίδραση της ακτινοβολίας, και στα δύο σημεία ελέγχου, δηλαδή στα στάδια ωοθυλακίων 2β (γερμάριο) και 7 – 9, με κύρια αύξηση στο στάδιο 2β.

Όσον αφορά στα χαρακτηριστικά της ακτινοβολίας, υπήρξε σαφής συσχέτιση μεταξύ συχνότητας, διαμόρφωσης και επαγόμενης απόπτωσης, καθώς οι συχνότητες 900 και 1800 MHz εκπεμπόμενες από γεννήτρια ραδιοσυχνοτήτων, αλλά και η παλμική διαμόρφωση εκπεμπόμενη από τη βάση ασύρματου τηλεφώνου, επέφεραν τη μεγαλύτερη επαγωγή αποπτωτικού φαινοτύπου. Παράλληλα, εντοπίστηκε συνέργια μεταξύ της διαμόρφωσης και της συχνότητας, καθώς υπήρξε διαφορική επίδραση όταν διαφορετικές συχνότητες συνδυάστηκαν με διαφορετικές διαμορφώσεις. Η μέγιστη επίδραση εντοπίστηκε στην περίπτωση των συνεχών κυμάτων 900 MHz και των διαμορφωμένων 1800 MHz. Επίσης, αναδείχθηκε ο μη αναμενόμενος ρόλος της έντασης της ακτινοβολίας, καθώς παρατηρήθηκε ότι ακόμα και πολύ χαμηλή ένταση (0,3 V/m) είναι ικανή να προάγει την απόπτωση, ενώ φάνηκε επίσης ότι η επαγωγή αυτή δεν είναι ευθέως ανάλογη της αυξανόμενης έντασης.

Όσον αφορά στη μελέτη της ρύθμισης του μηχανισμού της απόπτωσης, που παρατηρείται με την επίδραση της ακτινοβολίας, τα αποτελέσματα έδειξαν, με τη χρήση μεταλλαγμένων στελεχών εντόμων, στα οποία δεν εκφράζεται ο μεταγραφικός παράγοντας Dmp53, αυξημένο αριθμό αποπτωτικών ωοθυλακίων στα στάδια 7-9 της μέσης ωογένεσης, αλλά όχι στο στάδιο του γερμαρίου (2β), γεγονός που καθιστά εμφανή το διαφορικό, ρυθμιστικό ρόλο του μεταγραφικού παράγοντα Dmp53 στην ακτινο-επαγόμενη απόπτωση.

Η επαγωγή στρες μελετήθηκε εκτενώς ως πιθανή απόκριση στη μη ιονίζουσα ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Τα αποτελέσματα έδειξαν: (**A**) χρονο-, φυλο-, ιστο- και ηλικιοειδική διαφορική απόκριση της *D. melanogaster*, όσον αφορά στην αύξηση των ενεργών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species – ROS), (**B**) επαγωγή οξειδωτικού στρες και μείωση βιωσιμότητας, (**Γ**) το σημαντικό ρόλο των αντιοξειδωτικών ενζύμων και (**Δ**) επαγωγή ER stress.

Για τη μελέτη της χρονο-εξαρτώμενης διαφορικής απόκρισης, χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικής διάρκειας διαστήματα συνεχούς έκθεσης (0,5, 1, 6, 24, 96, και 120 ώρες). Αύξηση των ROS παρατηρήθηκε στους σωματικούς ιστούς αρσενικών και θηλυκών εντόμων σε διαστήματα μεγαλύτερα των 6 ωρών. Στα αρσενικά, τα επίπεδα σταθεροποιήθηκαν στα μεγαλύτερα διαστήματα των 24, 96 και 120 ωρών, ενώ στα θηλυκά η συγκέντρωση των δραστικών μορφών οξυγόνου συνέχισε να αυξάνεται προϊόντος του αυξανόμενου χρόνου έκθεσης. Ωστόσο, στατιστική επεξεργασία μεταξύ των διαστημάτων έκθεσης έδειξε ότι οι 24, 96 και 120 ώρες δεν είχαν κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Παρόλα αυτά, η φυλο-ειδική, πλειοτροπική απόκριση ήταν εμφανής, καθώς η αύξηση που σημειώθηκε σε αυτά ήταν μεγαλύτερη, συγκριτικά με τα αρσενικά έντομα. Κατά συνέπεια, τα θηλυκά έντομα φάνηκαν περισσότερο ευαίσθητα έναντι της παλμικής ακτινοβολίας. Τα επίπεδα των ROS, 24 ώρες μετά από απουσία ακτινοβολίας, επανήλθαν στα φυσιολογικά επίπεδα, γεγονός που αναδεικνύει τη σημαντική συμβολή των αντιοξειδωτικών μηχανισμών στην ομοιόσταση του οργανισμού.

Η ιστο-ειδική απόκριση στην ακτινοβολία αποκαλύφθηκε μέσω περαιτέρω διαχωρισμού των σωματικών ιστών και των γονάδων. Τα κεφάλια εξετάσθηκαν ξεχωριστά από τους υπόλοιπους σωματικούς ιστούς και τα όργανα, γεγονός που αποκάλυψε τη μεγαλύτερη ευαισθησία αυτών έναντι της ακτινοβολίας, τόσο στα θηλυκά όσο και στα αρσενικά έντομα.

Επίσης, ξεχωριστά εξετάσθηκαν και οι ωοθήκες, οι οποίες, σε αντίθεση με τους σωματικούς ιστούς, εμφάνισαν διαταραχή στο οξειδοαναγωγικό προφίλ τους ακόμα και μετά από σύντομη ακτινοβόληση 30 λεπτών. Συγκεκριμένα, στις ωοθήκες η μέγιστη επίδραση σημειώθηκε στη μία ώρα ακτινοβόλησης, γεγονός που δείχνει ότι οι γαμετικοί ιστοί είναι περισσότερο ευάλωτοι σε εξωγενείς στρεσογόνους παράγοντες.

Προκειμένου να αναλυθεί περαιτέρω η αύξηση των ROS στις ωοθήκες, εξετάσθηκαν χωριστά τα ωοθυλάκια πριν και μετά το αναπτυξιακό στάδιο 10. Στατιστικά σημαντική αύξηση των ROS ανιχνεύθηκε μόνο στα προ-χοριογενετικά στάδια και τα κύτταρα συγκεκριμένα στα οποία αυξήθηκε το οξειδωτικό φορτίο ήταν τα τροφοκύτταρα. Παράλληλα, εξετάσθηκε και ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα p53 κατά την ακτινο-επαγόμενη πρόκληση οξειδωτικού στρες στην ωογένεση. Στο στέλεχος όπου απουσίαζε ο παράγοντας p53 δεν ανιχνεύθηκε αύξηση των ROS, αναδεικνύοντας τον καθοριστικό, ρυθμιστικό ρόλο του συγκεκριμένου παράγοντα στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό των κυττάρων.

Λόγω της ευαισθησίας που κατέδειξαν οι ωοθήκες έναντι της ακτινοβολίας, επιλέχθηκαν αυτές ειδικά για την περαιτέρω διερεύνηση της συμβολής των χαρακτηριστικών της μη ιονίζουσας ακτινοβολίας στο οξειδωτικό στρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα διαμορφωμένα κύματα είναι περισσότερο βιοδραστικά από τα συνεχή. Επίσης, φάνηκε ότι αρκετά χαμηλή ένταση (1 V/m) είναι ικανή να προκαλέσει οξειδωτικό στρες και, τέλος, ότι η επίδραση εξαρτάται από τη συχνότητα, καθώς οι συχνότητες 100 και 900 MHz προκάλεσαν μεγαλύτερη αύξηση στις ROS από τη συχνότητα των 1800 MHz.

Επιπλέον, η επίδραση της ακτινοβολίας φάνηκε να είναι και ηλικιο-εξαρτώμενη. Η έκθεση νεαρών, μέσης ηλικίας και γηρασμένων αρσενικών εντόμων οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση των ROS μόνο στους νεαρούς και γηρασμένους σωματικούς ιστούς. Στα θηλυκά, η αντίστοιχη αύξηση ήταν στατιστικά σημαντική σε όλες τις ηλικιακές κλάσεις, γεγονός που υπογραμμίζει για μία ακόμα φορά τη φυλο-ειδική απόκριση. Κατά συνέπεια, επίδραση της HMA σε διαφορετικές ηλικιακές κλάσεις κατέδειξε ότι τα γηρασμένα έντομα είναι περισσότερο δεκτικά και ευάλωτα όσον αφορά στην αύξηση των ROS.

Σε σχέση με την ανίχνευση ακτινο-επαγόμενου οξειδωτικού στρες, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι, συνδυαστικά με την αύξηση των ROS, υπήρξε και διαταραχή του οξειδοαναγωγικού δυναμικού στα γηρασμένα έντομα. Στη συγκεκριμένη ηλικιακή κλάση, ανιχνεύτηκε συσσώρευση οξειδωμένων λιπιδίων και πρωτεϊνών, καθώς και μείωση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των ακτινοβολημένων εντόμων. Το φαινόμενο της μεγαλύτερης ευαισθησίας των γηρασμένων εντόμων οφείλεται στη μείωση της αποδοτικότητας των αντιοξειδωτικών μηχανισμών, στη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, καθώς και στην παρατηρούμενη κατά τη γήρανση συσσώρευση ελευθέρων ριζών και οξειδωμένων προϊόντων. Η αύξηση του οξειδωτικού φορτίου που παρατηρήθηκε κατά την *in vivo* γήρανση μελετήθηκε και σε συνάρτηση με τη βιωσιμότητα των εντόμων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η δια βίου έκθεση σε παλμική ακτινοβολία οδηγεί σε μείωση του προσδόκιμου ζωής τόσο των θηλυκών όσο και των αρσενικών εντόμων. Απουσία του παράγοντα p53 φάνηκε να αναστρέφει την επιβάρυνση της ακτινοβολίας και να αυξάνει τη βιωσιμότητα των ακτινοβολημένων εντόμων, καταδεικνύοντας το σημαντικό ρόλο του συγκεκριμένου μεταγραφικού παράγοντα στη ρύθμιση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού των οργανισμών.

Ο ρόλος των αντιοξειδωτικών ενζύμων μελετήθηκε μέσω καθολικής υπερέκφρασης του ενζύμου καταλάση στα σωματικά κύτταρα, με χρήση του δυαδικού γενετικού συστήματος GAL4/UAS. Η υπερέκφραση οδήγησε σε αναστροφή του φαινοτύπου της μειωμένης βιωσιμότητας μόνο στα αρσενικά, γεγονός που πιθανά οφείλεται στο ότι τα θηλυκά υπόκεινται σε αυξημένη μεταβολική και ορμονική επιβάρυνση λόγω της συνεχούς και ενεργοβόρας διαδικασίας της ωογένεσης πέραν του οξειδωτικού φορτίου προερχόμενο από την ακτινοβολία.

Με σκοπό τη μελέτη πιθανής διαταραχής της ομοιόστασης και επαγωγής ER stress, υπερεκφράστηκε γενετικά ο μεταγραφικός παράγοντας Xbp-1 (καθοριστικός διαμεσολαβητής του ER stress, με κύρια επαγόμενη εντόπιση στον πυρήνα), σε όλα τα σωματικά κύτταρα και ιστούς, ο οποίος και εντοπίστηκε στον πυρήνα κυττάρων σιελογόνων αδένων προνύμφης διαγονιδιακών εντόμων μετά από *in vitro* ακτινοβόληση αυτών.

Τέλος, τέθηκε το ερώτημα αν η ακτινοβολία μπορεί να τροποποιήσει το πρότυπο της γονιδιακής έκφρασης κατά τη διαδικασία της ωογένεσης. Ανάλυση με DNA μικροσυστοιχίες (microarrays) αποκάλυψε αλλαγή στο πρότυπο της γονιδιακής έκφρασης μετά από ακτινοβόληση 30 λεπτών με κινητό τηλέφωνο και 2 ώρες αναμονή. Συνολικά βρέθηκε πως σε 168 γονίδια έχει διαφοροποιηθεί στατιστικά σημαντικά η έκφρασή τους, με 15 εξ αυτών να υποεκφράζονται και 153 να υπερεκφράζονται. Περαιτέρω βιοπληροφορική ανάλυση έδειξε ότι τα γονίδια αυτά συμμετέχουν σε σημαντικές βιολογικές διεργασίες, από τις οποίες χαρακτηριστικά αναφέρονται ο μεταβολισμός (κυρίως καταβολισμός – πρωτεόλυση), η φαγοκύτωση και η βιογένεση υπερμοριακών δομών, όπως το ριβόσωμα, γεγονός που επιβεβαιώνει την πολυπλοκότητα και την πολύ-επίπεδη και πολλαπλών στόχων επίδραση αυτού του τύπου της ακτινοβολίας. Παράλληλα, περαιτέρω ανάλυση της λειτουργίας των συγκεκριμένων γονιδίων με το οξειδωτικό στρες και την απόπτωση, καθώς το 10% εξ' αυτών σχετίζονται με το στρες και το 6% με τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο και πιο ειδικά με τον αυτοφαγικό κυτταρικό θάνατο.

Συνοψίζοντας, στη συγκεκριμένη Διδακτορική Διατριβή αναδείχθηκε η πολύ-διάστατη και πολύ-επίπεδη επίδραση της μη ιονίζουσας ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας ραδιοσυχνοτήτων χαμηλής ενέργειας, εντός των επιτρεπόμενων από την κείμενη νομοθεσία ορίων, τόσο σε επίπεδο ολόκληρου οργανισμού όσο και σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο. Ο πιθανός μηχανισμός δράσης που προτείνεται στηρίζεται στην αύξηση των ROS και την επακόλουθη πρόκληση οξειδωτικού στρες, καθώς και την παράλληλη επαγωγή ER stress, τα οποία διαταράσσουν την ομοιόσταση και διαφοροποιούν το πρότυπο γονιδιακής έκφρασης, με σκοπό

την αντιμετώπιση της συγκεκριμένης διαταραχής. Τελικός φαινότυπος των κυττάρων που δεν μπορούν να αντιμετωπίσουν αυτή τη διαταραχή είναι ο κυτταρικός θάνατος, ενώ σε επίπεδο οργανισμού η μείωση του προσδόκιμου ζωής των εντόμων.

ABSTRACT

This study deals with the biological effects of non ionizing radiation and especially of the wireless communication spectrum on the model biological system of *Drosophila* melanogaster. It is also a deliverable of the THALIS project MIS 375784 co-ordinated by Emeritus Professor Lukas H. Margaritis and was performed during the years 2011-2015.

The daily use by people of wireless communication devices has increased exponentially the last decade, creating concerns about possible health hazards. Among the frequencies used, predominant are those included in the range of radiofrequencies and microwaves, mainly in the range of 500 through 2.500 MHz, which are used by mobile telephony, as well as cordless phones, and Wi-Fi routers. All three devices are used extensively at home, and at work, both by adults and by young people.

Even though "safety limits" have been proposed in the year 1998 concerning the acceptable intensity of the radiation produced by these devices, recent research has provided data questioning these thermally-based safety limits. Strenuous research efforts have been made recently and this Doctorate Thesis is part of them. However, the majority of the worldwide studies use radiofrequency generators that are just trying to simulate the radiation characteristics emitted by everyday appliances, whilst are mainly focused on *in vitro* models. Finally, exposure conditions, i.e. the selected frequency, intensity, duration and waveform, vary greatly, resulting, so far, in conflicting results.

For these reasons, this PhD Thesis, aimed to elucidate the *in vivo* mechanistic model of radiofrequencies radiation's (RFR) impact on selected biological systems, and to clarify the contribution of its characteristics, such as frequency, modulation and intensity, on the induced cytopathy, focusing on stress induction (oxidative stress and ER stress), activation of apoptosis, as well as altered gene expression by using actual daily-exposure conditions, and as a model biological system the Dipteran *Drosophila melanogaster* insect.

The wireless devices used for the exposure of the flies were the followings:

- Mobile phone, GSM 900 MHz, DCS 1800 MHz
- DECT cordless phone, 1880 1900 MHz
- Wi-Fi router, 2400 2500 MHz

These devices were used in comparison with a radiofrequency signal generator emitting continuous waves, or frequency modulated at tuned frequencies of 100, 900 and 1800 MHz. Several exposure protocols were designed and the exposure duration ranged from 6 min to 3 months. In parallel, the intensity of the electrical field applied was under the limits determined by the legislation (0.3 to 17 V/m) as measured by spectrum analyzers.

Results showed that sporadically occurring egg chamber apoptosis was induced in both check points of oogenesis, i.e. germarium and stages 7 - 9. With regards to the characteristics of the radiation, there was a correlation between modulation and induced apoptosis. Pulsed modulated signals, emitted by mobile phone and DECT base, resulted in greater increase in the number of

apoptotic follicles, compared to the signal generator non pulsed signal exposure. Dependency was also observed between the degree of apoptosis and the frequency, since 900 and 1800 MHz emitted by the generator led to a more severe phenotype. In addition, differential impact was observed, when different frequencies and modulations were combined. The greater number of apoptotic follicles was detected after exposure to CW 900 MHz and FM 1800 MHz. This result showed a type of synergism between modulation and frequency. Unexpectedly, it was revealed that even very low intensity (0.3 V/m) is capable of promoting apoptosis, and also proven that the induction is not linearly proportional to the increasing intensity. In order to study more extensively the regulation of RFR-induced apoptosis, null strains for the transcriptional factor Dmp53 were exposed to mobile-phone radiation. The mutant flies showed increased number of apoptotic follicles at stages 7 - 9, but not at the stage of germarium (2b), highlighting the differential, regulatory role of the transcription factor p53 in the externally induced apoptosis during oogenesis, in this case of radiation exposure of the flies.

Stress induction by radiation exposure was examined, since it is a factor that may be implicated in cellular cytopathic response to radiation exposure. It was found: (A) time-, sex-, tissue- and age-specific differential response of D. melanogaster to radiofrequency radiation (RFR) in increasing the levels of Reactive Oxygen Species (ROS), (B) RFR-induced oxidative stress and reduced viability, (C) the important role of antioxidant enzymes and (D) RFR-directed activation of ER stress. More specifically, regarding the time-dependent differential response, continuous exposure protocols with various durations (0.5, 1, 6, 24, 96, and 120 hours) were applied. ROS increase was detected in the body tissues of both males and females at intervals greater than six hours. In male bodies ROS reached maximum levels after 24 hours of exposure and after this time-point they were presented with a plateau, while in female bodies the maximum levels were detected after 120 hours. However, although ROS seemed to increase in parallel with the increase in the duration exposure, the multiple statistical comparisons between 24, 96 and 120 hours showed no statistically significant difference between them, concerning the increased levels of ROS. Nonetheless, there was sex-pleiotropic response unveiled to pulsed radiation, as the observed increase in the female bodies was greater compared to males. This difference is due to a more pronounced metabolic stress that females face, due to the large energy consumption during oogenesis.

Tissue-dependent response to radiation was clearly detected when heads and ovaries were studied separately after being dissected from flies' bodies. Heads had greater increase in ROS compared to fly bodies, whereas ovaries showed the greatest sensitivity against DECT base-radiation. In the latter, elevated ROS levels were identified after only 30 minutes of exposure and the maximum levels were reached after 1 hour of irradiation. This tissue-specific response may depend on the differentially expressed antioxidant potential among tissues.

In order to further analyze ROS elevation in the ovaries, we separated their follicles before and after stage 10. Statistically significant increase in ROS was detected only at the pre-choriogenic stages, while the cells of the egg chamber that respond in this way towards the stress factor of radiation were mainly the nurse cells. The role of p53 transcription factor was also assessed.

Data showed that p53-null flies had no alteration in the ROS levels upon mobile-phone radiation exposure.

The contribution of characteristics of non ionizing radiation on oxidative stress was studied at the most sensitive tissue / organ of the fly: the ovary. Results showed that modulated waves are more bioeffective than continuous ones, while low intensity (1 V/m) is sufficient to cause oxidative stress and finally the impact dependents on the frequency applied. More specifically, 100 and 900 MHz had a more profound effect compared to 1800 MHz.

Induction of oxidative stress was also age-dependent. Exposure of young, middle-aged and elder males to DECT base-radiation had statistically significant increase in ROS only in young and elder body tissues, whereas in the females ROS contents were elevated in all three age groups, highlighting, once more, the sex-dependent response to radiation. Finally, post-exposure time course experiments, regarding ROS levels, revealed a full recovery after 24 hours.

During *in vivo* aging, statistically significant elevation was also found in carbonylated proteins and lipid peroxidation of the elder, RFR-exposed male and female flies. In parallel, there was a reduction in the non enzymatic total antioxidant capacity of the exposed flies. These results showed that RFR-exposure led to a disturbance in the redox status of *Drosophila*. The sensitivity of the elder flies may be due to increased antioxidant mechanisms impairments, mitochondrial dysfunction, accumulation of free radicals and oxidized products, all observed during aging.

Lifetime exposure to DECT base-radiation decreased lifespan of both male and female flies. These results are in line with the oxidative stress data observed during aging. p53-null flies were also irradiated through their lives. Interestingly, the absence of p53 seemed to reverse the negative effect of radiation, revealing the principal regulatory role of this particular transcription factor in redox homeostasis.

The role of antioxidant enzymes was studied, through ubiquitous overexpression of the enzyme catalase in the somatic cells of both male and female flies, using the binary genetic system GAL4/UAS. Catalase overexpression revered the observed, reduced viability of males, whilst had no effect on exposed females' lifespan. This result is probably due to the fact that, besides oxidative stress originating from radiation exposure, females are also subjected to increased metabolic and hormonal loads by the continuous and intensive process of oogenesis.

Moreover, in order to further illuminating the mechanisms that orchestrate RFR's detrimental activity in the fly we genetically overexpressed the transcription factor Xbp-1 (a key mediator of Endoplasmic Reticulum Stress, which is mainly localized in the nucleus upon ER Stress activation), fused with EGFP, and observed its cellular localization upon *in vitro* exposure of salivary glands to RFR. At the exposed glands, fluorescence was detected in the nucleus of their cells, showing that ER stress was engaged upon mobile-phone radiation.

Finally, we addressed the question whether radiation is capable of altering the ovarian-gene expression transcriptional profiling. Genome-wide microarray analysis (microarrays) revealed 2h post-exposure alterations in the gene expression pattern of oogenesis, after *in vivo* irradiation of adult flies for 30 minutes with a commercial mobile phone. Overall, 168 genes were found differentially expressed upon RFR exposure. Among them, 15 were downregulated and 153

overexpressed. Further Bioinformatics analysis revealed that these genes are involved in important biological processes, such as metabolism (mainly catabolism – proteolysis), phagocytosis and biogenesis of super-molecular structures, such as ribosomes, which confirms the complexity and the multi-targeted character of this type of radiation. Further analysis of the altered genes showed a significant correlation between them and propensity to both oxidative stress and apoptosis. Indeed, 10 % of these genes are associated with stress and 6% with programmed cell death and especially apoptosis and autophagic self-eating. These observations may illuminate a novel mechanism of apoptosis that is specifically triggered upon non ionizing radiation.

In conclusion, this PhD thesis points out the multi-dimensional and multi-leveled effects of non ionizing electromagnetic radiation derived from low-power radiofrequencies, at organism, cellular and molecular level. The possible mechanism of action that is proposed to operate *in vivo* is based on the increase in ROS contents, which can disturb the redox homeostasis and lead to the subsequent induction of both oxidative and ER stress, eventually resulting to gene expression modifications in order to activate defence mechanisms, against the external stress-stimulus of radiation. At the cellular level, when cells cannot successfully cope further with the induced impairments caused by radiation, they activate apoptotic mechanisms, while at the organism level persistent oxidative stress leads to reduced lifespan.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΗΛΕΚΤΡΟΜΑΓΝΗΤΙΚΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ (ΗΜΑ)

Γενικά, ως ακτινοβολία ορίζεται η διαδικασία μέσω της οποίας η ενέργεια μεταφέρεται στο χώρο και στο χρόνο με τη μορφή ενεργητικών σωματιδίων (σωματίδια α, β) ή κυμάτων. Ανάλογα με την ενέργεια που μεταφέρεται, η ακτινοβολία χωρίζεται σε ιονίζουσα, η οποία προκαλεί ιονισμό στην ύλη και μη ιονίζουσα, που δεν προκαλεί ιονισμό. Ιονισμός καλείται το φαινόμενο κατά το οποίο ένα ηλεκτρόνιο δέχεται τόση ενέργεια όση απαιτείται για να ξεπεράσει το ηλεκτρικό δυναμικό φράγμα του μορίου ή ατόμου στο οποίο είναι δεσμευμένο με αποτέλεσμα την απελευθέρωσή του και τη δημιουργία ενός θετικά φορτισμένου ιόντος. Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία παράγεται από το συνδυασμό ηλεκτρικού και μαγνητικού πεδίου.

Τα ηλεκτρικά πεδία δημιουργούνται λόγω διαφοράς δυναμικού. Όσο πιο μεγάλη είναι η διαφορά, τόσο πιο δυνατό θα είναι το ηλεκτρικό πεδίο που προκύπτει. Η μονάδα μέτρησης των ηλεκτρικών πεδίων είναι το βολτ ανά μέτρο (V/m).

Τα μαγνητικά πεδία δημιουργούνται όταν υπάρχει ροή ηλεκτρικού ρεύματος. Όσο πιο υψηλή είναι η ένταση του ρεύματος τόσο πιο δυνατό θα είναι το μαγνητικό πεδίο. Όταν διακοπεί το ηλεκτρικό ρεύμα, το μαγνητικό πεδίο μηδενίζεται. Μία συσκευή, όπως για παράδειγμα ο στεγνωτήρας μαλλιών, παράγει μαγνητικό πεδίο μόνο όταν το ηλεκτρικό ρεύμα τη θέσει σε λειτουργία. Η διακοπή του ρεύματος εξαφανίζει άμεσα το μαγνητικό πεδίο. Η μονάδα μέτρησης των μαγνητικών πεδίων είναι το αμπέρ ανά μέτρο (A/m). Συνήθως για τη μέτρηση των μαγνητικών πεδίων είναι το αμπέρ ανά μέτρηση, η πυκνότητα ροής (tesla – Τ στο σύστημα S.I. ή Gauss στο σύστημα cgs). Ισχύει η αντιστοιχία 1microtesla (μT) = 10 milliGauss (mG). Τα μαγνητικά πεδία διαπερνούν τα περισσότερα φυσικά εμπόδια όπως τους τοίχους, ενώ τα ηλεκτρικά πεδία σταματούν μπροστά σε τοίχους ή άλλα φυσικά εμπόδια. Τα πρώτα μειώνονται σημαντικά όταν αυξάνεται η απόσταση από την πηγή εκπομπής τους.

Τα ηλεκτρομαγνητικά πεδία (ΗΜΠ) είναι σύνθετα πεδία που προκύπτουν από την ταυτόχρονη παρουσία στον χώρο ενός ηλεκτρικού και ενός μαγνητικού πεδίου. Τα πεδία αυτά υπάρχουν παντού στο περιβάλλον μας και μπορεί να είναι φυσικής προέλευσης όπως το ορατό φως ή μπορεί να έχουν δημιουργηθεί από τον άνθρωπο όπως για παράδειγμα το ηλεκτρικό ρεύμα, το οποίο δημιουργεί ΗΜΠ πολύ χαμηλής συχνότητας 50-60 Hz.

Πειράματα των Michael Faraday και Joseph Henry απέδειξαν ότι μεταβαλλόμενα μαγνητικά πεδία επάγουν ηλεκτρικά ρεύματα (Νόμος επαγωγής του Faraday). Ο Maxwell ήταν εκείνος που συμπλήρωσε τη συγκεκριμένη θεωρία και προέβλεψε ότι όπως ένα μαγνητικό πεδίο που μεταβάλλεται ως προς τον χρόνο παράγει ηλεκτρικό πεδίο, έτσι και ένα ηλεκτρικό πεδίο που μεταβάλλεται ως προς τον χρόνο παράγει μαγνητικό πεδίο. Με βάση αυτή τη θεωρία έγινε η σύνδεση των ηλεκτρικών και μαγνητικών πεδίων και δημιουργήθηκε η έννοια του ηλεκτρομαγνητισμού. Η θεωρία του Maxwell προέβλεψε την ύπαρξη ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων που διαδίδονται στο κενό (σε αντίθεση προς τα μηχανικά κύματα) με την ταχύτητα του φωτός (c = 3 x 10⁸ m/s). Η θεωρία αυτή, που διατυπώθηκε μέσα από 4 εξισώσεις, ξεπέρασε ακόμα και τις προσδοκίες του ίδιου και βρίσκεται σε συμφωνία με την Ειδική Θεωρία της Σχετικότητας που απέδειξε ο Einstein το 1905. Οι εξισώσεις του Maxwell είναι οι ακόλουθες:

- 1. $\nabla \cdot E = divE = \rho/\epsilon_0$
- 2. ∇ . B = divB = 0
- 3. $\nabla X E = curlE = -\partial B/\partial t$
- 4. $\nabla X B = curl B = \mu_0 (J + \epsilon_0 \partial E / \partial t)$

Η εξίσωση (1) είναι ο νόμος του Gauss που ορίζει ότι η ολική ροή ηλεκτρικού πεδίου, που διαπερνά μία κλειστή επιφάνεια, ισούται με το πηλίκο του ολικού φορτίου το οποίο είναι εγκλωβισμένο από την επιφάνεια δια της διαπερατότητας του κενού: περιγράφει δηλαδή το ηλεκτρικό πεδίο που δημιουργείται από ηλεκτρικό φορτίο.

Η εξίσωση (2) την οποία θεωρούμε ως νόμο του Gauss για το μαγνητισμό, ορίζει ότι η ολική μαγνητική ροή που διέρχεται από μία κλειστή επιφάνεια είναι μηδενική. Με άλλα λόγια, ο αριθμός των γραμμών μαγνητικού πεδίου που εισέρχονται σε μια κλειστή επιφάνεια ισούται με τον αριθμό των γραμμών μαγνητικού πεδίου που εξέρχονται από αυτήν: περιγράφει δηλαδή το μαγνητικό πεδίο που δημιουργείται από μαγνήτη.

Η εξίσωση (3) είναι ο νόμος επαγωγής του Faraday και περιγράφει τη σχέση ανάμεσα σε ένα μεταβαλλόμενο ως προς τον χρόνο μαγνητικό πεδίο και το ηλεκτρικό πεδίο το οποίο επάγει (ηλεκτρικό πεδίο που δημιουργείται από μεταβαλλόμενο μαγνητικό πεδίο).

Η εξίσωση (4) είναι γενικευμένη περίπτωση του νόμου του Ampère (νόμος Ampère-Maxwell) και περιγράφει τη σχέση ανάμεσα στα ηλεκτρικά ρεύματα και στα μαγνητικά και ηλεκτρικά πεδία. Περιγράφει το μαγνητικό πεδίο που δημιουργείται είτε από ηλεκτρικό ρεύμα (ρεύμα αγωγιμότητας) είτε από μεταβαλλόμενη ηλεκτρική ροή (ρεύμα μετατόπισης).

Συνδυάζοντας κατάλληλα τις εξισώσεις του Maxwell καταλήγουμε στη δημιουργία κυμάτων ηλεκτρομαγνητικής φύσης. Αυτές οι κυματικές εξισώσεις που παίρνουμε για το ηλεκτρικό και μαγνητικό πεδίο καταδεικνύουν ότι τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα έχουν ταχύτητα ίση με αυτήν της ταχύτητας του φωτός. Αυτό ήταν και το πρώτο πράγμα που μας έκανε να πιστέψουμε ότι το φως είναι ηλεκτρομαγνητικό κύμα (για το ότι ήταν και κύμα υπήρχαν ήδη στοιχεία).

Ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία καλείται η ενέργεια που μεταφέρεται στο χώρο με τη μορφή ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων. Σύμφωνα με τον Maxwell τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα είναι συγχρονισμένα ηλεκτρικά και μαγνητικά πεδία, τα οποία ταλαντώνονται κάθετα μεταξύ τους και προς τη διεύθυνση διάδοσής τους (Εικόνα 1.1). Σε ένα επίπεδο κύμα, ο λόγος των εντάσεων του ηλεκτρικού και του μαγνητικού πεδίου είναι σταθερός και καλείται εμπέδηση (Z), όπου $Z = E/H = \mu/\epsilon$. Στον ελεύθερο χώρο, $Z = 120 \pi$, δηλαδή περίπου 377 Ω, ενώ σε άλλα υλικά η τιμή της εμπέδησης εξαρτάται από την ηλεκτρική αγωγιμότητα (ε) και τη μαγνητική διαπερατότητα (μ). Η μονάδα μέτρησης της ισχύος ενός ηλεκτρομαγνητικού κύματος, που συνήθως εμπεριέχει τόσο ηλεκτρικό πεδίο όσο και μαγνητικό πεδίο, με τις ιδιότητες που περιγράφηκαν πιο πάνω, είναι η «πυκνότητα ισχύος» (power density) και μετράται σε ισχύ (Watts) ανά μονάδα επιφανείας (m²), δηλαδή W/m².


Εικόνα 1.1: Σχηματική απεικόνιση της διάδοσης ενός ηλεκτρομαγνητικού κύματος. Όπως φαίνεται στην εικόνα το ηλεκτρικό και το μαγνητικό πεδίο παραμένουν συνδεδεμένα κατά τη διάδοση του κύματος. Τροποποίηση από https://www.ualberta.ca/~pogosyan/teaching/ASTRO_122/ lect3/lecture3.html.

Κατά συνέπεια, με βάση τα παραπάνω, τα βασικά χαρακτηριστικά της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας είναι η ενέργεια Ε, η συχνότητα f και το μήκος κύματος λ. Η ταχύτητα είναι σταθερή και ίση με την ταχύτητα του φωτός 3 x 10^8 m/sec. Σήμερα είναι πλέον γνωστό ότι το φως μπορεί να συμπεριφερθεί είτε ως σωματίδιο είτε ως κύμα. Στις περιπτώσεις της περίθλασης και διάθλασης εμφανίζεται η κυματική του φύση. Ο Max Planck διατύπωσε τη μαθηματική σχέση: E = h x f, όπου h η σταθερά του Planck (J/s) και f η συχνότητα. Η σχέση αυτή συνδέει τις δύο φύσεις του φωτός, δηλαδή τη σχέση μεταξύ της ενέργειας ενός φωτονίου και του ηλεκτρομαγνητικού κύματος που το συνοδεύει.

Μέσα όμως στα υλικά, η κυματική ταχύτητα και το μήκος κύματος εξαρτώνται από τις ηλεκτρομαγνητικές ιδιότητες του υλικού, δηλαδή την ηλεκτρική αγωγιμότητα (ε) και τη μαγνητική διαπερατότητα (μ). Η ηλεκτρική αγωγιμότητα καθορίζει τις αλληλεπιδράσεις του υλικού με το ηλεκτρικό πεδίο και η μαγνητική διαπερατότητα τις αλληλεπιδράσεις του υλικού με το μαγνητικό πεδίο. Τα βιολογικά υλικά έχουν μία ηλεκτρική αγωγιμότητα η οποία διαφέρει κατά πολύ από εκείνη του ελεύθερου χώρου, μπορεί και μεταβάλλεται κατά πολλές τάξεις μεγέθους ανάλογα με τη συχνότητα στην περιοχή αυτή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος και εξαρτάται από το είδος του βιολογικού ιστού. Η μαγνητική διαπερατότητα όμως των βιολογικών υλικών είναι ίση με αυτή του ελεύθερου χώρου.

Με κριτήριο την ενέργεια, όπως αυτή προκύπτει από την παραπάνω εξίσωση και που σχετίζεται με τη συχνότητα και το μήκος κύματος λ, αφού $f = c/\lambda$, όπου c η ταχύτητα του φωτός, έχουμε το διαχωρισμό των ακτινοβολιών σε ιονίζουσες και μη ιονίζουσες. Το μήκος κύματος διαχωρισμού είναι τα 100 nm και η συχνότητα 3 x 10¹⁵ Hz, ενώ η ενέργεια που αντιστοιχεί σε αυτό το μήκος κύματος είναι 12,4 eV και καλείται κατώφλι ιονισμού. Η ιονίζουσα ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία περιλαμβάνει τις υπεριώδεις ηλιακές ακτίνες (π.χ. UVB και

UVC), την κοσμική ακτινοβολία, και τις ακτίνες X και γάμμα (ραδιενέργεια). Η ακτινοβολία αυτή είναι ιδιαίτερα επικίνδυνη, διότι μπορεί να προκαλέσει θραύσεις στο DNA και σε άλλα μακρομόρια (*Niu et al. 2013*). Η μη ιονίζουσα ακτινοβολία περιλαμβάνει τις εξαιρετικά χαμηλές συχνότητες (Extremely Low Frequencies – ELF), τις ραδιοσυχνότητες (Radiofrequencies – RF) (μικροκύματα και ραδιοκύματα), την υπέρυθρη ακτινοβολία, τις ορατές συχνότητες και ένα τμήμα της υπεριώδους ακτινοβολίας (UVA).

Το μήκος κύματος είναι αλληλένδετο με τη συχνότητα. Όσο πιο μικρό είναι το μήκος κύματος, τόσο πιο υψηλή είναι η συχνότητα. Με βάση τις συχνότητες οι ηλεκτρομαγνητικές ακτινοβολίες καλύπτουν ένα μεγάλο εύρος που καλείται ηλεκτρομαγνητικό φάσμα.

1.2 ΗΛΕΚΤΡΟΜΑΓΝΗΤΙΚΟ ΦΑΣΜΑ

Τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα μεταφέρουν ενέργεια, στροφορμή και ορμή και καλύπτουν ένα τεράστιο φάσμα συχνοτήτων. Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα καλείται το εύρος συχνοτήτων που καλύπτουν τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα. Θεωρητικά μπορεί να λάβει τιμές από 0 μέχρι άπειρο (**Εικόνα 1.2**). Με βάση τις συχνότητες η ακτινοβολία διακρίνεται σε ραδιοκύματα (0 – 300 MHz), μικροκύματα (300 MHz – 300 GHz), υπέρυθρη ακτινοβολία (300 GHz – 400 THz), ορατή ακτινοβολία (400 – 800 THz), υπεριώδης ακτινοβολία (800 THz – 3 x 10¹⁷ Hz), ακτίνες χ (3 x 10¹⁷ Hz – 5 x 10¹⁹ Hz), ακτίνες γ (5 x 10¹⁹ Hz – 3 x 10²² Hz) και κοσμικές ακτινοβολίες (3 x 10²² Hz έως άπειρο).



Εικόνα 1.2: Σχηματική απεικόνιση του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, όπου φαίνονται και μερικές από τις εφαρμογές της κάθε ακτινοβολίας. Τα ραδιοκύματα έχουν χρησιμοποιηθεί κυρίως για τη μετάδοση ραδιοφωνικών και τηλεοπτικών εκπομπών. Τα μικροκύματα χρησιμοποιούνται για

την ασύρματη τηλεπικοινωνία μέσω των κινητών και ασύρματων τηλεφώνων, του ασύρματου δικτύου κ.λπ. Η υπέρυθρη ακτινοβολία χρησιμοποιείται από τα πάνελ για την παραγωγή θερμότητας, οι ακτίνες Χ για κρυσταλλογραφία και ακτινογραφίες, και η ραδιενέργεια για την ακτινοθεραπεία του καρκίνου. Τροποποίηση από: http://www.ces.fau.edu/nasa/module-2/radiation-sun.php.

1.2.1 PAΔIOKYMATA (RADIOFREQUENCIES – RF) – MIKPOKYMATA (MICROWAVES – MW)

Στα ραδιοκύματα ανήκουν οι συχνότητες από 30 kHz έως 3 GHz, με μήκη κύματος, αντίστοιχα, 10 km έως 10 cm. Σύμφωνα με την εξίσωση του Plank τα ραδιοκύματα μεταφέρουν ενέργεια με τιμές μεταξύ 124,3 peV και 12,43 μeV. Τα ραδιοκύματα μπορούν να διαδοθούν στο κενό, στην ατμόσφαιρα, καθώς και σε μεγάλα βάθη μέσα στις θάλασσες. Χρησιμοποιούνται, ως επί το πλείστον, στη ραδιοφωνία και την τηλεόραση, για να μεταδώσουν ήχο, εικόνα ή και τα δύο μαζί. Η ακτινοβολία RF μπορεί να απορροφηθεί από όλο το σώμα.

Στα μικροκύματα περιλαμβάνονται τα βραχέα ραδιοκύματα, τα οποία παράγονται από ηλεκτρονικά κυκλώματα. Οι πηγές της συγκεκριμένης ακτινοβολίας είναι τα κινητά τηλέφωνα, το ασύρματο τηλέφωνο, το ασύρματο δίκτυο και τα ραντάρ. Το μήκος κύματός τους εκτείνεται από τα 30 cm έως το 1 mm περίπου. Τα μικροκύματα μεταφέρουν πιο υψηλές ενέργειες. Όταν διαπερνούν κάτι που περιέχει νερό, προκαλούν δονήσεις των μορίων του νερού και έτσι παράγουν θερμότητα ανάλογα με την ένταση της ακτινοβολίας. Είναι αυτή η θερμαντική ιδιότητα των μικροκυμάτων που χρησιμοποιείται στους φούρνους μικροκυμάτων για το ζέσταμα ή το ψήσιμο των φαγητών.

Οι υποπεριοχές των ραδιοκυμάτων και μικροκυμάτων έχει καθιερωθεί να αντιστοιχούν στην ευρύτερη περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων, και για το λόγο αυτό ο αγγλικός όρος «Radiofrequencies» περιλαμβάνει και τις δύο υποπεριοχές του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος.

1.2.2 YIIEPY@PA KYMATA (INFRARED – IR)

Καλύπτουν το φάσμα από 1 mm έως το μεγαλύτερο μήκος κύματος του ορατού φωτός (7 x 10⁻⁷ m). Τα κύματα αυτά εκπέμπονται από διάφορα θερμά σώματα και μόρια. Απορροφώνται πολύ εύκολα από τα περισσότερα υλικά. Τα υπέρυθρα κύματα που απορροφώνται από την ύλη επανεμφανίζονται ως θερμότητα, διότι αυξάνουν τις ταλαντώσεις και τις κινήσεις των ατόμων του υλικού από το οποίο απορροφώνται, αυξάνοντας έτσι τη θερμοκρασία του. Η υπέρυθρη ακτινοβολία χρησιμοποιείται σε πολλές επιστημονικές και πρακτικές εφαρμογές, όπως η φυσιοθεραπεία και η υπέρυθρη φωτογραφία. Πηγές υπέρυθρης ακτινοβολίας IR είναι οι φούρνοι, οι λαμπτήρες θερμότητας, και τα λέιζερ IR.

1.2.3 ΟΡΑΤΟ ΦΩΣ

Είναι η πιο γνωστή μορφή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας και ορίζεται ως το μέρος εκείνο του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος το οποίο ανιχνεύει ο ανθρώπινος οφθαλμός. Το ορατό φως παράγεται από την ανακατανομή των ηλεκτρονίων στα άτομα και στα μόρια. Οι διάφορες περιοχές μηκών κύματος του ορατού φωτός ονομάζονται χρώματα, από το ιώδες ($\lambda \sim 4 \ge 10^{-7}$ m) έως το ερυθρό ($\lambda \sim 7 \ge 10^{-7}$ m). Η ευαισθησία του ανθρώπινου οφθαλμού δεν είναι σταθερή, αλλά εξαρτάται από το μήκος κύματος και είναι μέγιστη στα μήκη κύματος γύρω στα 5,6 $\ge 10^{-7}$ m (κίτρινο – πράσινο).

1.2.4 ΥΠΕΡΙΩΔΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ (UV)

Η ακτινοβολία αυτή καλύπτει τα μήκη κύματος από 3,8 x 10⁻⁷ m (380 nm) περίπου έως τα 6 x 10⁻⁸ m (60 nm). Αυξανόμενης της ενέργειας χωρίζεται σε τρεις επιμέρους κατηγορίες στην UVA, UVB και UVC. Τα φωτόνια της υπεριώδους ακτινοβολίας έχουν υψηλή ενέργεια και η υπερβολική έκθεση έχει θεωρηθεί βασικό αίτιο ανάπτυξης καρκίνου του δέρματος (μελάνωμα). Οι πηγές της UV ακτινοβολίας περιλαμβάνουν τον ήλιο, την οξυγονοκόλληση και τα UV λέιζερ. Ο ήλιος είναι ισχυρή πηγή υπεριώδους ακτινοβολίας, ωστόσο το μεγαλύτερο μέρος απορροφάται από τα άτομα και τα μόρια των ανώτερων στρωμάτων της ατμόσφαιρας (στρατόσφαιρα). Η υπεριώδης ακτινοβολία αντιδρά με το οξυγόνο της στρατόσφαιρας και έτσι παράγεται το μόριο του όζοντος (O₃). Το στρώμα του όζοντος μετατρέπει την επικίνδυνη υπεριώδη ακτινοβολία σε θερμότητα αυξάνοντας έτσι τη θερμοκρασία της στρατόσφαιρας.

1.2.5 ΑΚΤΙΝΕΣ Χ

Αποτελούν τις ακτίνες Röntgen και είναι η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία μήκους κύματος από 10^{-8} m (10 nm) έως 10^{-13} m (10^{-4} nm). Η πιο κοινή πηγή παραγωγής ακτίνων X είναι η επιβράδυνση των ταχέων ηλεκτρονίων, καθώς αυτά προσκρούουν σε ένα μεταλλικό στόχο. Οι ακτίνες X χρησιμοποιούνται στην ιατρική για διαγνώσεις και για καταπολέμηση ορισμένων καρκινικών όγκων. Το μήκος κύματος των ακτίνων X είναι όσο περίπου η απόσταση (~ 0,1 nm) ανάμεσα στα άτομα των στερεών σωμάτων και για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται στη μελέτη των διαφόρων κρυσταλλικών δομών.

1.2.6 ΑΚΤΙΝΕΣ γ

Αποτελούν την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία που εκπέμπεται από ορισμένους ραδιενεργούς πυρήνες, όπως του ισοτόπου του κοβαλτίου Co^{60} , και σε αντιδράσεις πυρήνων και στοιχειωδών σωματιδίων ή ακόμη και μετά από διάσπαση στοιχειωδών σωματιδίων, όπως για παράδειγμα του μεσονίου π⁰. Τα μήκη κύματός τους αρχίζουν από 10^{-10} m και φτάνουν ως τα 10^{-14} m και λιγότερο. Είναι πολύ διεισδυτικές και προκαλούν βλάβες στους οργανισμούς που τις απορροφούν.

1.3 ΜΗ ΙΟΝΙΖΟΥΣΑ ΗΛΕΚΤΡΟΜΑΓΝΗΤΙΚΗ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ ΕΚΠΕΜΠΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΑΣΥΡΜΑΤΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Όπως ήδη αναφέρθηκε στην ενότητα 1.1 η μη ιονίζουσα ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία είναι αυτή που μεταφέρει ενέργεια όχι αρκετή για να προκαλέσει ιονισμό της ύλης και έχει μεγάλο μήκος κύματος (λ > 100 nm).

Ως μη ιονίζουσα ακτινοβολία πρακτικά νοείται κυρίως η ακτινοβολία από τα τεχνητά ηλεκτρομαγνητικά πεδία της ανθρώπινης τεχνολογίας, δηλαδή πεδία παραγόμενα από ηλεκτρικά κυκλώματα, τύπου Thomson, με συχνότητες 0 έως 3 x 10¹¹ Hz περίπου, που είναι το κατώτερο όριο της υπέρυθρης ακτινοβολίας. Γενικά, η μη ιονίζουσα ακτινοβολία περιλαμβάνει τις υπεριώδεις ακτίνες UVA, το ορατό φως, την υπέρυθρη ακτινοβολία (IR), τα μικροκύματα (MW), τις ραδιοσυχνότητες (RF) και τέλος τις εξαιρετικά χαμηλές συχνότητες (ELF).

Οι ραδιοσυχνότητες και τα μικροκύματα έχουν πολυάριθμες εφαρμογές στην καθημερινότητά μας. Η βασική εφαρμογή των κυμάτων αυτών είναι η μεταφορά πληροφορίας όπως ο ήχος και η εικόνα σε μεγάλες αποστάσεις. Για να επιτευχθεί αυτό, εκτός από τη φέρουσα κεντρική συχνότητα στα κύματα αυτά χρησιμοποιούνται διαμορφώσεις όπως η διαμόρφωση συχνότητας (Frequency Modulation) (Εικόνα 1.3Α) και η διαμόρφωση πλάτους (Amplitude Modulation) ή παλμοί (Εικόνα 1.3B). Κατά συνέπεια, ένα επίσης σημαντικό χαρακτηριστικό της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας που εκπέμπεται από συσκευές ασύρματης τεχνολογίας είναι εκτός από τη συχνότητα, την ενέργεια και το μήκος κύματος, και η διαμόρφωση. Τα κύματα χωρίς διαμόρφωση ονομάζονται συνεχή κύματα (Continuous Waves) (Εικόνα 1.3Γ).

Τα υπάρχοντα όρια «ασφαλούς έκθεσης» καθιερώθηκαν το 1998 μετά από πρόταση της ICNIRP, η οποία βασίστηκε στην αξιολόγηση μόνο των θερμικών επιπτώσεων της μη ιονίζουσας ακτινοβολίας. Στη συνέχεια, εγκρίθηκε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας και τελικά προτάθηκε σε όλα τα κράτη της υφηλίου. Τα περισσότερα κράτη υιοθέτησαν τα όρια αυτά, με κάποιες εξαιρέσεις, μέσα σε αυτές και η Ελλάδα. Ο νόμος 3431/2006 «Περί Ηλεκτρονικών Επικοινωνιών και Άλλες Διατάξεις» και συγκεκριμένα, το άρθρο 31 «Ρυθμίσεις σχετικά με την εγκατάσταση κεραιών» (3431, ΦΕΚ 13/Α/3-2-2006), θέτουν τα όρια για την έκθεση του κοινού στο 70% των ορίων της Ε.Ε. για όσους σταθμούς κεραιών βρίσκονται σε απόσταση μεγαλύτερη των 300 μέτρων από την περίμετρο των κτιριακών εγκαταστάσεων σχολείων, βρεφονηπιακών σταθμών, νοσοκομείων και γηροκομείων, και στο 60% των ορίων της Ε.Ε. για όσους βρίσκονται σε απόσταση μικρότερη των 300 μέτρων από τις εγκαταστάσεως σταθμούς και την εγκαταστάσεω σταθμών, οσοκομείων και γηροκομείων, και στο 60% των ορίων της Ε.Ε. για όσους βρίσκονται σε απόσταση μικρότερη των 300 μέτρων από τα για την 300 μέτρων από τον 300 μέτρων από τις εγκαταστάσεων σχολείων, βρεφονηπιακών σταθμών, σταθμών και γηροκομείων και 300 μέτρων από τις εγκαταστάσεις αυτές. Συνεπώς, σύμφωνα με τη νομοθεσία τα «όρια αποδεκτής έκθεσης» στην ακτινοβολία από σταθμούς βάσης κινητής τηλεφωνίας στην Ελλάδα είναι 49 και 35 V/m για τα 900 και 1800 MHz αντίστοιχα.



Εικόνα 1.3: Α. Απεικόνιση συνεχούς κύματος συχνότητας 395 MHz. Β. Απεικόνιση κύματος με φέρουσα συχνότητα 395 MHz και διαμόρφωση συχνότητας 50 KHz. Γ. Αποτύπωση των παλμών εκπομπής της βάσης ασύρματου τηλεφώνου συναρτήσει του χρόνου. Οι παλμοί απεικονίζονται ως διακεκομμένες γραμμές. Η απεικόνιση έγινε με το φασματικό αναλυτή Rohde & Swartz FSH 4-8. Καταγραφή από Λ.Χ. Μαργαρίτη.

Τα ραδιοκύματα εκπέμπονται από κεραίες και σε κάθε εκπομπή διακρίνονται δύο περιοχές: 1) το εγγύς πεδίο, το οποίο αποτελεί την περιοχή κοντά στην κεραία, που εκτείνεται σε απόσταση λ/2π και 2) το μακρινό πεδίο, το οποίο αποτελεί περιοχή πιο σχετικά μακρυά από την κεραία.

Το εγγύς πεδίο είναι δύσκολο να μετρηθεί, καθώς ο ανιχνευτής του πεδιομέτρου επηρεάζει τη μέτρηση, και για το λόγο αυτό χρειάζονται ειδικοί ανιχνευτές. Στο εγγύς πεδίο το ηλεκτρικό και μαγνητικό κύμα συνήθως βρίσκονται σε διαφορά φάσης π/2 rad: δηλαδή όταν το ένα πεδίο είναι μέγιστο τότε το άλλο πεδίο είναι μηδέν. Τα δύο κύματα δεν είναι κάθετα μεταξύ τους, ούτε συνδέονται δημιουργώντας τη χαρακτηριστική μορφή των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων. Δε διαδίδονται, αλλά σχηματίζουν τα λεγόμενα στάσιμα κύματα και ονομάζονται κροσσωτά πεδία ή επαγωγικά πεδία, στα οποία η ενέργεια δε ρέει αλλά αποθηκεύεται. Το μακρινό πεδίο απέχει μόλις μερικά μήκη κύματος από την κεραία, είναι πολωμένο και μπορεί να μετρηθεί με πεδιόμετρο. Εκτείνεται σε όση απόσταση εξασφαλίζεται από την ισχύ εκπομπής της ακτινοβολίας και τις διάφορες παραμέτρους που επηρεάζουν τη διάδοση, όπως για παράδειγμα τυχόν ανακλάσεις, απορροφήσεις, κ.λπ. Στο μακρινό πεδίο τα δύο κύματα είναι αλληλένδετα και αλληλοκάθετα αλλά μόνο για συχνότητες μεγαλύτερες από περίπου 3 MHz.

1.3.1 KINHTO THAE $\Phi\Omega$ NO GSM (GLOBAL SYSTEM FOR MOBILE TELECOMMUNICATIONS)

Η ιστορία της κινητής τηλεφωνίας αρχίζει το 1898, όταν ο Marconi εγκατέστησε το πρώτο σύστημα στην υπηρεσία της Βασίλισσας Βικτώριας της Αγγλίας. Κατά τη διάρκεια του μεσοπολέμου, η χρήση της επεκτάθηκε στην Αστυνομία και κατά τη διάρκεια του Β΄ Παγκοσμίου Πολέμου επεκτάθηκε και στο στρατό, με τις πρώτες προσπάθειες να ανήκουν στους Σουηδούς, τους Φιλανδούς και τους Αμερικάνους. Ωστόσο, η γέννηση της κινητής τηλεφωνίας όπως νοείται σήμερα πραγματοποιήθηκε την 3^η Απριλίου 1973, όταν ο Δρ Μάρτιν Κούπερ της Motorola, περπάτησε σε ένα δρόμο της Νέας Υόρκης κρατώντας την πρώτη φορητή ασύρματη συσκευή επικοινωνίας, η οποία είχε ύψος 25 εκατοστά και βάρος 900 γραμμάρια. Ήταν το πρώτο σύγχρονο κινητό τηλέφωνο και ο κωδικός του ήταν MotorolaDynaTAC. Στη συνέχεια, το πρώτο δίκτυο κινητής τηλεφωνίας κατασκευάστηκε από την εταιρεία Bell το 1978, ενώ το πρώτο αυτοματοποιημένο δίκτυο κινητής τηλεφωνίας λειτούργησε στις αρχές της δεκαετίας του '80 στη Σκανδιναβία. Μέχρι τα τέλη αυτής της δεκαετίας, τα κινητά τηλέφωνα ήταν ογκώδη και δεν μπορούσαν να μεταφερθούν λόγω του βάρους τους και για το λόγο αυτό ήταν τοποθετημένα κυρίως σε αυτοκίνητα. Πέραν του μεγάλου βάρους τους, τα κινητά εκείνα ήταν και αρκετά ακριβά. Το πρώτο κινητό τηλέφωνο που έλαβε άδεια έγκρισης ήταν το μοντέλο DynaTAC8000X της Motorola, το οποίο και αποτέλεσε το πρωταρχικό μοντέλο της 1^{ης} (1G) γενιάς της κινητής τηλεφωνίας.

Στην αρχή της δεκαετίας του '90 άρχισε η ραγδαία εξέλιξη των κινητών τηλεφώνων, μετά την ψηφιοποίηση του δικτύου (GSM) και των συσκευών. Τα κινητά έγιναν μικρότερα και ελαφρύτερα (100 – 200 γραμμάρια), ενώ ταυτόχρονα το ψηφιακό δίκτυο 2^{ης} γενιάς (2G) GSM χρησιμοποιήθηκε για να αντικαταστήσει τα αναλογικά δίκτυα κινητών επικοινωνιών 1^{ης} γενιάς (1G). Στο σύστημα GSM, η περιοχή συχνοτήτων της κινητής τηλεφωνίας υποδιαιρείται σε περισσότερες υποπεριοχές συχνοτήτων εύρους 200 kHz. Κάθε σταθμός βάσης επικοινωνεί με τα κινητά τηλέφωνα που βρίσκονται στην περιοχή κάλυψής της, συνήθως με 6 έως 12 κανάλια συχνοτήτων. Τα κανάλια αυτά διαφοροποιούνται μεταξύ γειτονικών κυψελών, ώστε να μην μπλέκονται μεταξύ τους και να ξεχωρίζουν. Επειδή όμως ο αριθμός των καναλιών είναι περιορισμένος, τα ίδια κανάλια ξαναχρησιμοποιούνται σε διαφορετικές κυψέλες, οι οποίες βρίσκονται όσο το δυνατόν μακρύτερα η μία από την άλλη ώστε να αποφεύγονται τυχόν παρεμβολές. Τα κινητά τηλέφωνα επικοινωνούν συνεχώς με τον πλησιέστερο σταθμό βάσης και μετρούν το επίπεδο του σήματος που λαμβάνουν από αυτόν. Σε περίπτωση που το σήμα από έναν άλλο σταθμό βάσης γίνει καλύτερο από το σήμα του σταθμού που χρησιμοποιείται ήδη, τότε το δίκτυο κινητής τηλεφωνίας μεταβιβάζει το κινητό στην κυψέλη του σταθμού με το ισχυρότερο σήμα, χωρίς η μεταβίβαση να γίνεται αισθητή από το χρήστη.

Το πρότυπο GSM ακολουθεί την κυψελωτή λογική δικτύου. Κάθε κυψέλη διαθέτει ένα σταθερό σταθμό βάσης με κατάλληλη κεραία που καλύπτει όλη την έκτασή της. Η περιοχή κάλυψης του δικτύου χωρίζεται σε κελιά εντός των οποίων κινούνται οι κινητοί χρήστες (MS, Mobile Station) επικοινωνώντας με το σταθμό βάσης (BTS, Base Transceiver Station). Ο σταθμός βάσης συνδέεται ασύρματα με τις κινητές συσκευές και ενσύρματα με το κέντρο μεταγωγής του συστήματος (**Εικόνα 1.4**).



Εικόνα 1.4: Ενδεικτικό σχεδιάγραμμα που απεικονίζει τη δομή λειτουργίας ενός δικτύου GSM.

Το κανάλι επικοινωνίας που χρησιμοποιείται κάθε φορά από ένα κινητό ορίζεται από το σταθμό βάσης. Ο τελευταίος μπορεί να χειρίζεται ταυτόχρονα μεγάλο αριθμό καναλιών με χρήση του συστήματος FDMA (Frequency Division Multiple Access). Σε κάθε κανάλι επικοινωνίας μπορούν να μιλούν ταυτόχρονα και να χρησιμοποιούν διαδοχικά τα κανάλια για λίγο χρόνο μέχρι οκτώ κινητά με χρήση του συστήματος TDMA (Time Division Multiple Access) (*Margaritis et al. 2014*). Οι δύο αυτές τεχνολογίες χρησιμοποιούνται κυρίως από τις εταιρείες κινητής τηλεφωνίας στην Ελλάδα, οι οποίες χρησιμοποιούν το σύστημα GSM. Για να μπορέσει να μοιραστεί η ίδια συχνότητα σε 8 χρήστες ταυτόχρονα, η επικοινωνία διακόπτεται 217 φορές το δευτερόλεπτο (διάρκεια διακοπής 4,6 msec) σε κάθε χρήστη, αφήνοντας τη συχνότητα ανοιχτή για τον αντίστοιχο χρόνο σε άλλον. Έτσι το κινητό τηλέφωνο εκπέμπει έναν

παλμό εξαιρετικά χαμηλής συχνότητας, 217 Ηz, πέραν των παλμών που εκπέμπει στις ζώνες συχνοτήτων 900 MHz και 1800 MHz. Επιπλέον, υπάρχει και η τεχνολογία CDMA (Code Division Multiple Access), στην οποία η κάθε κλήση αποκτά ένα μοναδικό κώδικα και διασπείρεται σε όλες τις διαθέσιμες συχνότητες. Αναλυτικότερα, στο FDMA σύστημα η διαφορετική πρόσβαση επιτυγχάνεται γιατί οι χρηστές χρησιμοποιούν διαφορετικές συχνότητες – «χώρους » για να συνομιλήσουν, ενώ στο TDMA σύστημα συνομιλούν σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα, τα οποία όμως είναι τόσο μικρά ώστε δε γίνονται αντιληπτά ως διακοπή της συνομιλίας. Αντίθετα στο CDMA σύστημα, οι χρήστες χρησιμοποιούν διαφορετική γλώσσα (κώδικα), και τις υπόλοιπες γλώσσες τις αντιλαμβάνονται ως θόρυβο και τις απορρίπτουν. Κατά συνέπεια, στο τελευταίο σύστημα επικοινωνίας, μόνο οι χρήστες που μιλούν την ίδια γλώσσα μπορούν να επικοινωνήσουν τελικά (Monks et al., 2001; Gupta and Kumar, 2000).

Στην αρχική του εκδοχή, το GSM 900 MHz δίκτυο λειτούργησε στα 890 – 915 MHz (uplink) και στα 935 – 960 MHz (downlink). Στη συνέχεια, επεκτάθηκε: α) με μια προσθήκη 10 MHz στο GSM 900, και β) στα 1800 MHz (DCS – Digital Cellular System 1800: 1710 – 1785/uplink και 1805 – 1880/downlink) (Πίνακας 1.1).

Πίνακας 1.1: Παρουσιάζονται οι εκχωρηθείσες από την πολιτεία ζώνες (bands) συχνοτήτων για τις τρεις εταιρείας κινητής τηλεφωνίας που λειτουργούν στην Ελλάδα. Στη στήλη downlink καταγράφονται οι συχνότητες στις οποίες εκπέμπουν οι κεραίες βάσης και στη στήλη uplink οι συχνότητες στις οποίες ο σταθμός βάσης λειτουργεί για τη λήψη σήματος

ΣΥΧΝΟΤΗΤΕΣ	ΠΑΡΟΧΟΣ	ΦΑΣΜΑ Downlink (MHz)	ΦΑΣΜΑ Uplink(MHz)
	COSMOTE	811 - 821	852 - 862
800 MHZ	VODAFONE	801 - 811	842 - 852
	WIND	791 - 801	832 - 842
	COSMOTE	925 - 930	880 - 885
	COSMOTE	930 - 935	885 - 890
900 MHZ	WIND	935 - 945	890 - 900
	VODAFONE	950 – 960	905 – 915
	VODAFONE	945 - 950	900 - 905
	WIND	1805 - 1810	1710 - 1715
1800 MHz	WIND	1810 - 1820	1715 - 1725
	VODAFONE	1820 - 1830	1725 – 1735
	VODAFONE	1830 - 1835	1735 - 1740

	COSMOTE	1855 - 1880	1760 - 1785
	COSMOTE	1845 - 1855	1750 - 1760
2100 MHz		2110,3 - 130,3	1920,3 - 1940,3
	VODAFONE	1915,1 – 1920,1 (TD	– 1920,1 (TDD)
	WIND	2130,3 - 2140,3	1940,3 - 1950,3
	WIND	1910,1 – 1915,1 (TDD)	
	COSMOTE	2140,3 - 2155,3	1950,3 - 1965,3
		1905,1 – 1910,1 (TD	D)

Ο αριθμός των κινητών τηλεφώνων και των λοιπών φορητών συνδεδεμένων στο διαδίκτυο συσκευών για πρώτη φορά φέτος αναμένεται να ξεπεράσει τον αριθμό των ανθρώπων στη Γη, σύμφωνα με τις τελευταίες εκτιμήσεις της αμερικανικής εταιρείας τεχνολογίας Cisco. Εκτιμάται ότι έως το 2016 οι συσκευές κινητών στον κόσμο θα φθάσουν τα 10 δισεκατομμύρια έναντι εκτιμώμενου παγκόσμιου πληθυσμού 7,3 δισεκατομμυρίων. Το ίδιο έτος, σύμφωνα με το BBC, τα δίκτυα κινητής τηλεφωνίας θα διακινούν 130 exabytes δεδομένων ετησίως, ποσότητα πληροφοριών ισοδύναμη με 33 δισεκατομμύρια DVD. Μεταξύ 2011 και 2016 η κίνηση διαδικτυακών δεδομένων μέσω κινητών και φορητών συσκευών θα αυξηθεί κατά 18 φορές, φθάνοντας τα 10,8 exabytes το μήνα. Η κίνηση μέσω κινητών θα είναι τριπλάσια σε σχέση με τη διακίνηση δεδομένων στο διαδίκτυο από σταθερά μέσα επικοινωνίας. Η διακίνηση δεδομένων (data) μέσω κινητών το 2011 ήταν οκταπλάσια σε σχέση με το μέγεθος του παγκόσμιου διαδικτύου το 2000, σύμφωνα με την έκθεση της εταιρείας. Η συνεχής αύξηση των διακινούμενων πληροφοριών αναμένεται να προκαλέσει περισσότερα προβλήματα στις εταιρείες κινητής τηλεφωνίας, που ήδη δυσκολεύονται να ανταποκριθούν στην αυξανόμενη ζήτηση. Όσο οι χρήστες βλέπουν όλο και περισσότερο βίντεο στις κινητές συσκευές τους, τόσο θα εκτινάσεται στα ύψη η «κυκλοφορία» δεδομένων στο διαδίκτυο.

1.3.2 ΒΑΣΗ ΑΣΥΡΜΑΤΟΥ ΤΗΛΕΦΩΝΟΥ ΤΥΠΟΥ DECT (DIGITAL ENHANCED CORDLESS TELEPHONE)

Τα ασύρματα τηλέφωνα πρωτοεμφανίστηκαν γύρω στα 1980 και λειτουργούσαν στη συχνότητα των 27 MHz. Μερικά από τα προβλήματα που αντιμετώπιζαν ήταν: α) Περιορισμένη εμβέλεια, β) Μικρή ποιότητα ήχου και τέλος γ) Μικρή ασφάλεια, λόγω του περιορισμένου αριθμού καναλιών. Από τότε, ο FCC (Federal Communication Commission) παραχώρησε περισσότερες συχνότητες, όπως 47 – 49 MHz και 900 MHz, μέχρι το 1994, που έκαναν την εμφάνισή τους τα ψηφιακά ασύρματα τηλέφωνα, τα οποία λειτουργούσαν στη ζώνη 900 MHz, συχνότητα που παρείχε καλύτερη ποιότητα ήχου και μεγαλύτερη εμβέλεια. Τα ψηφιακά σήματα έδωσαν και τη δυνατότητα μεγαλύτερης ασφάλειας στις τηλεπικοινωνίες. Το 1995 εισήχθη η τεχνολογία DSS (Digital Spread Spectrum), η οποία επέτρεψε στην ψηφιακή πληροφορία να διαδίδεται σε διάφορες συχνότητες ανάμεσα στο δέκτη και τη βάση καθιστώντας δυνατή την

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

υποκλοπή. Το 1998 παραχωρήθηκε η συχνότητα των 2,4 GHz, συχνότητα που μετέφερε το ασύρματο εκτός εμβέλειας των περισσοτέρων radio scanners και τελικά αύξησε την ασφάλεια χρήσης του. Πλέον, η τεχνολογία που χρησιμοποιείται στην πλειονότητα των ευρωπαϊκών μοντέλων είναι η τεχνολογία DECT (Digital Enchanced (European) Cordless Telephones), η οποία χρησιμοποιεί την περιοχή συχνοτήτων 1880 – 1900 MHz που ονομάζεται Unlicensed Personal Communicatioons Services και απασχολεί 10 κανάλια τα οποία διαιρούνται κάθε 2 MHz (Εικόνα 1.5Α). Η εκπομπή ακτινοβολίας είναι συνεχής με ρυθμό επανάληψης τα 100 Hz (Εικόνα 1.5B) και 10 ms χρονικό διάστημα μεταξύ των σαρώσεων. Η διάρκεια των παλμών όταν η βάση δεν είναι συζευγμένη με το ακουστικό είναι 0,08 msec (Εικόνα 1.5Γ), ενώ όταν υπάρχει σύζευξη με το ακουστικό, κατά τη διάρκεια που πραγματοποιείται μία κλήση, εκπέμπει και παλμούς διάρκειας 0,38 msec (Margaritis et al. 2014).



Εικόνα 1.5: Α. Γράφημα απεικόνισης του φάσματος εκπομπής της βάσης ασύρματου τηλεφώνου. Διακρίνονται τα 10 κανάλια – δίαυλοι επικοινωνίας στη ζώνη 1880 – 1900 MHz, όπως καταγράφηκαν με τον αναλυτή NARDA SRM3000. **Β.** Φάσμα εκπομπής της βάσης ασύρματου τηλεφώνου DECT στο οποίο φαίνεται η επανάληψη των 100 Hz (οι 40 κορυφές στα 400 msec αντιστοιχούν σε 10 msec ρυθμό επανάληψης, άρα σε 100 Hz). Το φάσμα εκπομπής καταγράφηκε με τον αναλυτή Rohde & Schwarz FSH8 σε μηδενικό εύρος συχνοτήτων (zero span) και διάρκεια σάρωσης 400 msec (sweep rate). **Γ.** Απεικόνιση των παλμών της βάσης του ασύρματου τηλεφώνου DECT, όταν δεν είναι συζευγμένη με το

ακουστικό (άσπρο βέλος) και σε σύζευζη με αυτό (κίτρινο βέλος). Η απεικόνιση πραγματοποιήθηκε σε συγκεκριμένη περιοχή συχνοτήτων και διάρκεια σάρωσης 4 msec με τον αναλυτή Rohde & Schwarz FSL6. Ανατύπωση από Margaritis et al. 2014.

Το ασύρματο τηλέφωνο αποτελεί συνδυασμό τηλεφώνου και ραδιοφωνικού πομπού/δέκτη. Η βάση είναι συνδεδεμένη με ένα ρευματοδότη μέσω ενός τυπικού καλωδίου σύνδεσης, ενώ με το ακουστικό συνδέεται μέσω μιας ράδιο-σύνδεσης, η οποία αντικαθιστά το καλώδιο μεταξύ της βάσης και του ακουστικού. Δέχεται την κλήση μέσω της τηλεφωνικής γραμμής, τη μετασχηματίζει σε ραδιοφωνικό σήμα και στη συνέχεια την εκπέμπει. Το ακουστικό δέχεται το ραδιοφωνικό σήμα από τη βάση, το μετασχηματίζει σε ηλεκτρικό παλμικό και μετατρέπεται σε ήχο. Κατά τη διάρκεια συνομιλίας, το ακουστικό και μεταφέρεται μέσω του καλωδίου στον συνομιλητή. Αυτό το πρότυπο επικοινωνίας, κατά το οποίο ακούμε και μιλάμε ταυτόχρονα, ονομάζεται duplex frequency (**Εικόνα 1.6**).



Εικόνα 1.6: Σχηματική απεικόνιση του τρόπου επικοινωνίας μεταξύ βάσης και ακουστικού. Πηγή: http://conocimientosiptelephony.blogspot.com/2010_07_01_archive.html.

1.3.3 A Σ YPMATO Δ IKTYO (WI-FI / WIRELESS FIDELITY)

Η λέξη Wi-Fi χρησιμοποιείται για να περιγράψει κάθε ασύρματη σύνδεση (Wireless Local Area Network – WLAN) η οποία στηρίζεται στο πρωτόκολλο IEEE 802.11. Το ασύρματο δίκτυο Wi-Fi λειτουργεί γενικά στις συχνότητες 2,4, 3,6 και 5 GHz, ωστόσο το πιο συχνό εύρος συχνοτήτων είναι κοντά στα 2,4 GHz. Λόγω του γεγονότος ότι στο συγκεκριμένο εύρος συχνοτήτων δουλεύουν επίσης οι φούρνοι μικροκυμάτων και το Bluetooth, η τεχνολογία Wi-Fi χρησιμοποιεί ένα σύνολο σηματοδοτικών μεθόδων ώστε να υπερπηδήσει τη συγκεκριμένη ταύτιση συχνοτήτων. Το πρωτόκολλο τεχνολογίας 802.11b βασίστηκε στο εκτεταμένο φάσμα άμεσης ακολουθίας (Direct-Sequence Spread Spectrum – DSSS) με πλάτος καναλιών 22 MHz, ενώ το πρωτόκολλο 802.11g βασίστηκε στην τεχνολογία διαίρεσης συχνότητας με ορθογώνιους παλμούς (Orthogonal Frequency-Division Multiplexing - OFDM) με πλάτος καναλιών 20 MHz (**Εικόνα 1.7**) (*Margaritis et al., 2014*).



Εικόνα 1.7: Α. Σχηματική απεικόνιση των πρωτοκόλλων που χρησιμοποιούνται από τις ασύρματες συσκευές: Wi-Fi, Bluetooth, φούρνοι μικροκυμάτων στο εύρος συχνοτήτων 2,4 – 2,5 GHz. Το

ασύρματο δίκτυο στις περισσότερες ευρωπαϊκές χώρες χρησιμοποιεί 13 κανάλια σε αντίθεση με την Αμερική όπου χρησιμοποιεί 11. Ανατύπωση από Margaritis et al. 2014. **B.** Εικόνα από τον αναλυτή Rohde and Schwarz FSL/6, στην οποία φαίνονται οι παλμοί του ασύρματου δικτύου Wi-Fi. Καταγραφή Λ.Χ. Μαργαρίτης.

1.4 ΡΥΘΜΟΣ ΕΙΔΙΚΗΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ (SAR)

Ο Ρυθμός Ειδικής Απορρόφησης (Specific Absorption Rate), αποτελεί το σημαντικότερο μέγεθος για την ποσοτικοποίηση των βιολογικών αποτελεσμάτων της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Ο SAR προσδιορίζεται από τη σχέση: SAR = σ x E^2/ρ (μονάδες μετρήσεις W/kg) όπου, σ: η ειδική ηλεκτρική αγωγιμότητα του βιολογικού ιστού (Si/m) σε συγκεκριμένη συχνότητα, ρ: η πυκνότητα του βιολογικού ιστού (kg/m³) και Ε: η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου μέσα στον ιστό (V/m) (κάτι το οποίο δεν μπορεί να μετρηθεί).

Επομένως ο SAR ορίζεται σαν το ποσό της ενέργειας της ΗΜΑ που απορροφά η μονάδα μάζας ενός ιστού στη μονάδα του χρόνου, δηλαδή είναι το ποσό της ισχύος που απορροφά η μονάδα μάζας ενός ιστού, και γι' αυτό εκφράζεται σε W/kg.

Η τιμή του SAR, δηλαδή η απορροφούμενη ισχύς από το ανθρώπινο σώμα και η κατανομή της μέσα σ' αυτό, εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά της ακτινοβολίας: α) Συχνότητα, β) Ένταση, και γ) Πόλωση (διαφορετικός προσανατολισμός του σώματος σε σχέση με τη διεύθυνση του ηλεκτρικού και μαγνητικού πεδίου του κύματος).

Για τον υπολογισμό του SAR η μόνη μέθοδος που εξασφαλίζει επαρκή ακρίβεια και επαναληψιμότητα είναι η τεχνική του Electrical-Field Probe, η οποία είναι μία πλήρως αυτοματοποιημένη διαδικασία. Με τη μέθοδο αυτή, ομογενές ανθρώπινο ομοίωμα κεφαλιού (phantom) με βάση συγκεκριμένες προδιαγραφές εκτίθεται σε HMA από το κινητό τηλέφωνο και η κατανομή της έντασης του εσωτερικά αναπτυσσόμενου ηλεκτρικού πεδίου καταγράφεται με ένα μικροσκοπικό αισθητήρα (probe). Από αυτά τα δεδομένα η κατανομή του SAR προσδιορίζεται και εξάγεται η μέγιστη τοπικά αναπτυσσόμενη τιμή του. Το ομοίωμα κεφαλής είναι ένα ανθρωπομορφικό μοντέλο (Specific Anthropomorphic Mannequin – SAM) γεμάτο με υγρό (**Εικόνα 1.8**), το οποίο περιβάλλεται από κέλυφος, που είναι κατασκευασμένο από υλικό χαμηλών απωλειών και χαμηλής διαπερατότητας στο εσωτερικό του οποίου περιέχεται υγρό με συγκεκριμένες διηλεκτρικές ιδιότητες για κάθε συχνότητα.



Εικόνα 1.8: Α. Αυτοματοποιημένα συστήματα μέτρησης SAR. Το ομοίωμα κεφαλιού είναι ένα ανθρωπομορφικό μοντέλο (SAM) γεμάτο με υγρό, το οποίο περιβάλλεται από κέλυφος, που είναι κατασκευασμένο από υλικό χαμηλών απωλειών και χαμηλής διαπερατότητας. Στο εσωτερικό του περιέχεται υγρό με συγκεκριμένες διηλεκτρικές ιδιότητες για κάθε συγνότητα. http://www.ce-mag.com/archive/03/01/images/0301CE31.jpg. $\Pi n\gamma \dot{n}$: **B**. Χρωματική απεικόνιση της διαβάθμισης της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου, όπως αυτή καταγράφεται εντός του ομοιώματος ανθρώπινου εγκεφάλου. Το κόκκινο χρώμα αντιστοιχεί σε αυζημένη ένταση και το μπλε σε πολύ χαμηλή. Πηγή: http://www.ansys.com/staticassets/ANSYS/staticassets/resourcelibrary/techbrief/abmodeling-specific-absorption -rate-smartphone.pdf.

Σήμερα, διατίθενται πλήρως αυτοματοποιημένα συστήματα μέτρησης SAR. Οι δοκιμές πραγματοποιούνται χρησιμοποιώντας επιστημονικά αποδεδειγμένες μεθοδολογίες και υπερεκτιμούν ελαφρώς το μέγιστο τοπικό SAR στο πραγματικό ανθρώπινο σώμα. Οι γενικές απαιτήσεις των μετρήσεων περιλαμβάνουν θερμοκρασία περιβάλλοντος μεταξύ 15°C και 30°C και απαιτούν μηδενική αλληλεπίδραση του ασύρματου τερματικού με τα δίκτυα, και αποφυγή επίδρασης στις μετρήσεις από εξωτερικές ΗΜ πηγές και ανακλάσεις του χώρου.

1.5 ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ (Reactive Oxygen Species – ROS)

Η παρουσία των δραστικών μορφών οξυγόνου στα βιολογικά συστήματα περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1954 από τον Commoner *et al.* Οι ROS, όπως η ρίζα υδροξυλίου (·O₂), αποτελούν φυσικά παραπροϊόντα του μεταβολισμού των αερόβιων οργανισμών και παράγονται κυρίως κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση (*Squier, 2001*). *In vitro* πειράματα έχουν δείξει ότι, περίπου, το 1-3% του οξυγόνου που χρησιμοποιείται από τα μιτοχόνδρια μετατρέπεται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) (*Sastre et al., 2000*). Η οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι μία διαδικασία που λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια και είναι η κύρια πηγή παραγωγής ATP στους αερόβιους οργανισμούς. Στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, τα ηλεκτρόνια διέρχονται μεταξύ πρωτεϊνικών συμπλόκων με τη βοήθεια ελεύθερων διαχεόμενων μορίων (ουβικινόνη και κυτόχρωμα c), με τελικό στόχο το μοριακό οξυγόνο και σχηματισμό ATP (**Εικόνα 1.9**). Κατά τη διαδικασία αυτή, από τα σύμπλοκα I και III διαφεύγουν μικρές ποσότητες μονήρους οξυγόνου (O₂, singlet oxygen) και ανιόντων υπεροξειδίου (O₂⁻) (*Balaban et al., 2005*), τα οποία όμως εξουδετερώνονται από τοπικά αντιοξείδωτικά συστήματα που υπάρχουν στη θεμέλια ουσία: τη μιτοχονδριακή υπεροξειδική δισμουτάση (Mn-Superoxide Dismutase / SOD), η οποία μετατρέπει τη ρίζα υπεροξυλίου σε H₂O₂, το σύστημα θεορεδοξίνης-υπεροξυρεδοξίνης (theoredoxin-peroxyredoxin/TPx) 3 και την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), τα οποία μετατρέπουν το ανιόν υπεροξειδίου σε H₂O (*Maier and Chan, 2002*) (**Εικόνα 1.9**). Παρά την ύπαρξη των μιτοχονδριακών ενζύμων, τα μιτοχόνδρια παράγουν το 90% των ROS και αποτελούν την μεγαλύτερη πηγή τους στα κύτταρα (*Balaban et al., 2005*). Οι ROS παράγονται όμως και στο κυτταρόπλασμα. Οι κύριες πηγές είναι η κυτταροπλασματική δισμουτάση (MnSOD) που παράγει H₂O₂ και η αντίδραση Fenton, όπου ιόντα Fe²⁺, Cu²⁺ καθώς και άλλα μεταβατικά μέταλλα, λειτουργούν ως αναγωγικοί παράγοντες και ανάγουν το H₂O₂ σε ρίζα υδροξυλίου 'OH (*West and Marnett 2006*) (**Εικόνα 1.9**).

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου μπορεί να είναι ιόντα όπως το υποχλωριώδες ανιόν (ClO⁻), ελεύθερες ρίζες όπως η ρίζα υδροξυλίου ('OH), συνδυασμός των δύο όπως το ανιόν υπεροξειδίου ('O₂⁻) ή μόρια όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂). Ως φυσικά παραπροϊόντα του μεταβολισμού έχουν διττό ρόλο, ο οποίος εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους. Σε χαμηλές έως μέτριες συγκεντρώσεις εμπλέκονται σε σηματοδοτικά μονοπάτια αυξητικών παραγόντων, στην απόκριση σε συνθήκες υποξίας, στη φλεγμονή και στην ανοσολογική απόκριση (*Görlach et al., 2015*). Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις οι οποίες ξεπερνούν την αντιοξειδωτική ικανότητα των κυττάρων προκαλούν οξειδωτικές βλάβες σε διάφορα κυτταρικά συστατικά και κυρίως στα βιολογικά μακρομόρια όπως είναι τα νουκλεϊκά οξέα, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια. Διαταραχή στην ισορροπία μεταξύ της συγκέντρωσης των ROS (αυξημένη παραγωγή των οξειδωτικών συστατικών) και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών οδηγεί τα κύτταρα σε κατάσταση η οποία καλείται οξειδωτικό στρες (*Sies, 1985; 2015*).



Εικόνα 1.9: Απεικόνιση της αναπνευστικής αλυσίδας, η οποία αποτελεί την κυριότερη πηγή ROS για τους αερόβιους οργανισμούς. Εκτός από τα μιτοχόνδρια, οι ROS παράγονται και από ένζυμα, όπως η COX που βρίσκονται σε διαφορετικά διαμερίσματα του κυττάρου. Οι ROS δημιουργούνται επίσης και από την αντίδραση του H₂O₂ με διάφορα μέταλλα όπως ο σίδηρος. Πηγή: http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem_ATP.htm.

1.6 ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΟ ΔΥΝΑΜΙΚΟ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

1.6.1 ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΜΑΚΡΟΜΟΡΙΩΝ ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Μόλις παραχθούν οι δραστικές μορφές οξυγόνου μπορούν να αντιδράσουν και να οξειδώσουν σχεδόν οποιοδήποτε βιολογικό μακρομόριο. Το γεγονός ότι υπάρχουν πολυάριθμοι κυτταρικοί μηχανισμοί για τον περιορισμό της συσσώρευσης των ROS (π.χ. τα ένζυμα SOD, GPx και CAT) υποδηλώνει ότι η εκτεταμένη οξειδωτική βλάβη είναι ανεπιθύμητη και τοξική.

1.6.1.1 Οξειδωτική βλάβη του DNA

Η υδροξυλική ρίζα μπορεί να προστεθεί στους διπλούς δεσμούς των βάσεων του DNA ή να αφαιρέσει άτομα υδρογόνου από τις μεθυλικές ομάδες ή τα κατάλοιπα δεοξυριβόζης (*Chatgilialoglu and O'Neill, 2001*). Η συγκεκριμένη ρίζα προστίθεται στον C7 και C8 διπλό δεσμό των πουρινών και παράγει την 8-υδροξυγουανοσίνη (8-oxo-dG) και την 8υδροξυαδενοσίνη (8-oxo-dA). Τέλος, η υδροξυλική ρίζα προστίθεται στον C5 και C6 διπλό δεσμό των πυριμιδίνων για την παραγωγή γλυκολών πυριμιδίνης (*Wagner et al., 1992*). Εναλλακτικά, αφαίρεση υδρογόνου από την 5΄-μεθυλ-ομάδα θυμίνης μπορεί να παράγει μία ρίζα με επίκεντρο τον άνθρακα που αντιδρά με το μοριακό οξυγόνο για να σχηματίσει ένα νέο υπεροξείδιο, το οποίο μπορεί να αναχθεί τελικά προς υδροξυ-μεθυλ-ουρακίλη. Αφαίρεση ενός ατόμου υδρογόνου από μία δεοξυριβόζη μπορεί να οδηγήσει σε μονό σπάσιμο της αλυσίδας με ταυτόχρονο σχηματισμό μίας νέας βάσης-ρίζας, η οποία μπορεί να αντιδράσει με πυρηνόφιλες θέσεις αλλού στο DNA (*Marnett et al., 2003*).

1.6.1.2 Οξείδωση Πρωτεϊνών

Η βλάβη των πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια του οξειδωτικού στρες μπορεί να προκληθεί από τροποποίηση είτε του σκελετού των πεπτιδίων είτε σε πυρηνόφιλες ή οξειδοαναγωγικά ευαίσθητες πλευρικές ομάδες. Οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται κατά τη διάρκεια του οξειδωτικού στρες μπορούν να βλάψουν το σκελετό των πεπτιδίων μέσω καρβονυλίωσής του. Η διαδικασία αρχίζει με την αφαίρεση υδρογόνου από τον α-άνθρακα της πεπτιδικής αλυσίδας. Αν δύο πρωτεϊνικά ανιόντα βρεθούν κοντά τότε συνδέονται και δημιουργούν μία συζευγμένη ρίζα (*Dean et al., 1997*). Εναλλακτικά, μπορεί το ενεργό O₂ να επιτεθεί στον α-άνθρακα από τον οποίο έχει αφαιρεθεί το υδρογόνο και να σχηματίσει ενδιάμεσα υπεροξειδίου, οδηγώντας σε αναδιάταξη του πεπτιδίου και στην επακόλουθη διάσπαση του πεπτιδικού δεσμού προς τελικό σχηματισμό πεπτιδίου που περιέχει καρβονύλιο (*Dean et al., 1997*). Καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες μπορούν επίσης να παραχθούν και από την οξείδωση των διαφόρων αμινοξέων των πλευρικών αλυσίδων (π.χ. λυσίνη, αργινίνη και προλίνη) (*Levine and Stadtman, 2001*). Ειδικά τα κατάλοιπα κυστεΐνης είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην οξείδωση, λόγω της θειόλης (-SH). Η οξείδωση των πρωτεϊνών μπορεί να τροποποιήσει τη λειτουργία τους και να επηρεάσει το μονοπάτι στο οποίο συμμετέχουν. Οι φωσφατάσες, όπως οι PTP1b και PTEN, φαίνεται να ρυθμίζονται από ROS, καθώς διαθέτουν κυστεΐνη στο ενεργό τους κέντρο και η οξείδωσή της οδηγεί σε απενεργοποίησή τους (Sena and Chandel, 2012).

Η συγκέντρωση των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών αποτελεί ένα δυνητικά χρήσιμο δείκτη της ενδοκυτταρικής κατάστασης οξειδοαναγωγής και μπορεί να εκτιμηθεί μέσω της αντίδρασης της 2,4-δινιτροφαινυλυδραζίνης με τις οξειδωμένες πρωτεΐνες προς σχηματισμό υδραζόνης (Levine and Stadtman, 2001).

1.6.1.3 Οξείδωση Λιπιδίων

Ιδιαίτερα ευάλωτα στην επίδραση των δραστικών ριζών οξυγόνου είναι τα κατάλοιπα πολυακόρεστων λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων, τα οποία χαρακτηρίζονται από μεγάλη ευαισθησία στην οξείδωση. Μόλις σχηματιστούν, οι ρίζες υπεροξειδίου μπορούν να μετατραπούν μέσω διεργασίας κυκλοποίησης σε ενδο-υπεροξείδια (πρόδρομες μορφές της μαλονδιαλδεΰδης), ενώ τελικό προϊόν της υπεροξείδωσης αποτελεί η μαλονδιαλδεΰδη (MDA) (*Marnett, 1999*). Η MDA έχει μεταλλαξογόνο δράση στα κύτταρα των βακτηρίων και των θηλαστικών, ενώ είναι καρκινογόνος ουσία για τους επίμυες (*Fink et al., 1997; Fedtke et al., 1990*).

1.6.2 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ

Ως αντιοξειδωτικό μπορεί να χαρακτηριστεί οποιαδήποτε ουσία, η οποία, όταν είναι παρούσα σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με εκείνες των υποστρωμάτων που πρόκειται να οξειδωθούν, καθυστερεί ή αναστέλλει την οξείδωση αυτών των υποστρωμάτων. Ο φυσιολογικός ρόλος των αντιοξειδωτικών, όπως προκύπτει από τον ορισμό, είναι η αποφυγή της βλάβης των κυτταρικών συστατικών, ως συνέπεια των χημικών αντιδράσεων από τις οποίες προκύπτουν ελεύθερες ρίζες και η διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης. Τα αντιοξειδωτικά διακρίνονται σε τρεις κύριες κατηγορίες: α) τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, β) τα αντιοξειδωτικά που διασπούν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις και γ) τις πρωτεΐνες που δεσμεύουν τα μεταβατικά μέταλλα.

1.6.2.1 Αντιοξειδωτικά ένζυμα

Στα αντιοξειδωτικά ένζυμα κατατάσσονται η δισμουτάση του υπεροξειδίου (Superoxide Dismutase – SOD), η καταλάση (Catalase – CAT), οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (Glutathione Peroxidases – GPxs) και θειορεδοξύνης (Thioredoxin Peroxidase – TPx) καθώς και η αναγωγάση της γλουταθειόνης (Glutathione Reductase – GR).

Η δισμουτάση του υπεροξειδίου, η οποία καταλύει τη μετατροπή ανιόντων υπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου $(2O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2)$, αποτελεί ένα από τα πιο αποτελεσματικά ενδοκυττάρια ενζυμικά συστήματα. Στον άνθρωπο, συναντάται σε τρεις ισομορφές: την κυτταροπλασματική (Cu-SOD), τη μιτοχονδριακή (Mn-SOD) και την εξωκυττάρια (Zn-SOD) (*Maier and Chan, 2002*).

Η καταλάση απαντά στα αερόβια βακτήρια, στους μύκητες, στα κύτταρα των φυτών και των ζώων. Εντοπίζεται κυρίως στα υπεροξεισώματα, αν και έχει βρεθεί ενεργό ένζυμο και στο κυτταρόπλασμα. Στους αρουραίους, στα κύτταρα της καρδιάς ανιχνεύεται και στα μιτοχόνδρια, ενώ σε καρκινικά κύτταρα έχει εντοπιστεί και στην κυτταρική μεμβράνη (*Glorieux et al.,2015*). Καταλύει τη μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο σε δύο στάδια $(2H_2O_2 \rightarrow ... \rightarrow O_2 + 2H_2O)$. Ένα μόριο καταλάσης μπορεί να καταβολίσει ένα εκατομμύριο μόρια υπεροξειδίου του υδρογόνου κάθε λεπτό.

Στον άνθρωπο υπάρχουν δύο μορφές του ενζύμου υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. Η μία μορφή εξαρτάται από το σελήνιο (GPxs), ενώ η άλλη είναι ανεξάρτητη του σεληνίου (Glutathione S-Transferase – GST). Αυτές οι δύο μορφές διαφέρουν ως προς τον αριθμό των υπομονάδων, τη φύση του δεσμού με το σελήνιο στο ενεργό κέντρο, καθώς και ως προς τους μηχανισμούς κατάλυσης. Οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης καταλύουν την αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου ή των υδροϋπεροξειδίων των λιπιδίων, χρησιμοποιώντας ως αναγωγική ουσία τη γλουταθειόνη (2GSH + $H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2H_2O$). Αν και η αναγωγή του H_2O_2 γίνεται και από την καταλάση, τα σχετικά επίπεδα GPxs και καταλάσης διαφέρουν από ιστό σε ιστό. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι ο εγκέφαλος έχει πολύ χαμηλά επίπεδα δραστικότητας GPxs, ενώ το ήπαρ έχει υψηλά επίπεδα και των δύο ενζύμων (Dringen et al., 2014).

Η υπεροξειδάση της θειορεδοξίνης ανάγει τόσο το H_2O_2 όσο και τα αλκυλυδροϋπεροξείδια σε συνδυασμό με την αναγωγάση της θειορεδοξίνης, τη θειορεδοξίνη και τη NADPH οξειδάση (*Lu and Holmgren, 2014*).

1.6.2.2 Μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Όταν μία δραστική ρίζα αντιδρά με ένα μόριο παράγονται δευτερογενείς ρίζες, οι οποίες στη συνέχεια μπορούν να αντιδράσουν με άλλους στόχους προς παραγωγή ακόμη περισσοτέρων ριζών. Κλασικό παράδειγμα αποτελεί η αλυσιδωτή αντίδραση υπεροξείδωσης των λιπιδίων. Τα λιποδιαλυτά και τα υδατοδιαλυτά μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά που διακόπτουν την αλυσιδωτή αντίδραση είναι μικρά μόρια, π.χ. γλουταθειόνη, βιταμίνη Ε, που μπορούν να λάβουν ηλεκτρόνιο προς σχηματισμό σταθερών παραπροϊόντων.

Η γλουταθειόνη, ένα τριπεπτίδιο (L-γλουταμικό, L-κυστεΐνη και L-γλυκίνη) με αναγωγικές και νουκλεόφιλες ιδιότητες, αποτελεί την κύρια αντιοξειδωτική θειόλη και το θεμελιώδη ρυθμιστή της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης (Masella et al., 2005). Το πεπτίδιο αυτό βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε όλα τα κύτταρα (1-10 mM) και ενδοκυττάρια εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, στα μιτοχόνδρια και στον πυρήνα (Espinosa-Diez et al., 2015). Στον πυρήνα διατηρεί την οξειδοαναγωγική κατάσταση των πρωτεϊνών που φέρουν σουλφυδρυλικές ομάδες και είναι απαραίτητες για την επιδιόρθωση και έκφραση του DNA. Συμμετέχει άμεσα στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις μέσω της αναστρέψιμης οξείδωσης της ενεργού θειόλης της, αλλά ταυτόχρονα ρυθμίζει και έμμεσα το οξειδοαναγωγικό κυτταρικό προφίλ, είτε μέσω αναγωγής άλλων οξειδωμένων αντιοξειδωτικών, όπως οι βιταμίνες, είτε ως συνένζυμο αντιοξειδωτικών ενζύμων (*Espinosa-Diez et al., 2015*). Ο λόγος GSH/GSSG αποτελεί αξιόπιστο μέτρο του οξειδωτικού φορτίου ενός οργανισμού.

Η βιταμίνη Ε είναι λιποδιαλυτή και απαντά σε οκτώ διαφορετικές μορφές. Η ατοκοφερόλη είναι η πλέον δραστική μορφή της βιταμίνης Ε στους ανθρώπους και αποτελεί ισχυρή αντιοξειδωτική ουσία. Η κύρια αντιοξειδωτική της δράση αφορά στην προστασία κατά της υπεροξείδωσης των λιπιδίων (Singh and Krishnan, 2015).

Η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ) είναι υδατοδιαλυτή και και αποτελεί συμπαράγοντα πολλών ενζύμων του ενδοπλασματικού δικτύου. Συμμετέχει στην αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού είτε άμεσα με την αναγωγή οξειδωμένων προϊόντων (8-oxo-dG) είτε διατηρώντας στην ανηγμένη τους μορφή άλλα αντιοξειδωτικά μόρια όπως η γλουταθειόνη (*Griffiths and Lunec, 2001*). Έχει την ικανότητα να ανάγει ιόντα χαλκού και σιδήρου, ενώ συμβάλλει και στην αναγέννηση της βιταμίνης Ε (*Bahadorani et al., 2008*).

Τα καροτενοειδή αποτελούν χρωστικές που απαντούν στα φυτά και σε μικροοργανισμούς, αλλά δε συντίθενται από τα ζώα. Ευθύνονται για το ερυθρό, το κίτρινο και το πορτοκαλί χρώμα των φρούτων και των λαχανικών. Στη φύση απαντούν περίπου 600 καροτενοειδή και ταξινομούνται στα καροτένια, τα ξανθόφιλα (περιέχουν οξυγόνο) και το λυκοπένιο (*Edge et al., 1997*). Διαθέτουν αντιοξειδωτική δράση. Για παράδειγμα, το βκαροτένιο αντιδρά με τη ρίζα υπεροξυλίου δημιουργώντας μία πιο σταθερή ρίζα με κεντρικό άτομο τον άνθρακα σταματώντας την αλυσιδωτή αντίδραση για την παραγωγή νέων δραστικών ριζών (*Fang et al., 2002*).

1.7 ΗΛΕΚΤΡΟΜΑΓΝΗΤΙΚΗ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΟ ΔΥΝΑΜΙΚΟ

Οπως ήδη αναφέρθηκε, οι ROS αποτελούν φυσικά παραπροϊόντα του μεταβολισμού, ωστόσο δημιουργούνται και μετά από επίδραση εξωγενών παραγόντων, όπως η υψηλή θερμοκρασία, η υπεριώδης ακτινοβολία (UV), η ιονίζουσα ακτινοβολία, το κάπνισμα, διάφορα φάρμακα κ.λπ. (*Kikusato et al., 2015; Kim and Johnson, 2014; Azzam et al., 2012;Kim et al., 2014*). Τα τελευταία χρόνια έχει ενοχοποιηθεί και η μη ιονίζουσα ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία (HMA) για την αύξηση των δραστικών μορφών οξυγόνου και πολλές μελέτες διεθνώς έχουν εστιάσει σε αυτό, καθώς και στη διαταραχή του οξειδοαναγωγικού δυναμικού των κυττάρων μετά από επίδραση της εν λόγω ακτινοβολίας. Όπως ήδη αναφέρθηκε, οι πηγές των ROS μέσα στα κύτταρα είναι διάσπαρτες στα κυτταρικά διαμερίσματα (π.χ. μιτοχόνδρια, κυτοσόλιο και κυτταρική μεμβράνη). Η μεμβρανική οξειδάση του NADH έχει προταθεί ότι αποτελεί τον πρωταρχικό μεσολαβητή των ραδιοσυχνοτήτων ως προς τη σύνθεση ROS στους ζώντες οργανισμούς (*Friedman et al., 2007*). Χρησιμοποιώντας την κυτταρική σειρά HeLa η συγκεκριμένη ερευνητική ομάδα έδειξε ότι μετά από έκθεση σε γεννήτρια παραγωγής ραδιοσυχνοτήτων συχνότητας 875 MHz (200 mW/cm²) για 5 ή 10 λεπτά αυξήθηκε, σχεδόν 3 φορές, η δραστηριότητα της NADH οξειδάσης με αποτέλεσμα την παραγωγή ROS.

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν την κύρια πηγή δημιουργίας ROS μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας. Έρευνα σε σπερματοζωάρια αποκάλυψε ότι η έκθεσή τους σε ραδιοσυχνότητες

μπορεί να προκαλέσει την αύξηση των ROS των μιτοχονδρίων τους (De Iuliis et al., 2009). Μάλιστα, στατιστικά σημαντική αύξηση των ROS στα μιτοχόνδρια των σπερματοζωαρίων προκλήθηκε μετά από έκθεση με SAR (Specific Absorption Rate) 1 W/kg, τιμή χαμηλότερη των ορίων ασφαλείας που έχουν θεσπιστεί διεθνώς. Μεταγενέστερη μελέτη, σε ωάρια ορτυκιών, έδειξε συγκρίσιμη αύξηση στη συγκέντρωση των υπεροξειδίων και των οξειδίων του αζώτου στα μιτοχόνδρια κατά τα πρώτα στάδια της εμβρυογένεσης και μετά από in ovo έκθεση των ωαρίων σε κύματα συχνότητας GSM 900 MHz (0,25 mW/cm²) (Burlaka et al., 2013). Ωστόσο, παραμένει ακόμα άγνωστο το σημείο της αναπνευστικής αλυσίδας που αλληλεπιδρά με τις ραδιοσυγνότητες. Τρία είναι τα υποψήφια σύμπλοκα: το σύμπλοκο Ι (Inoue et al., 2003), το σύμπλοκο II (Liu et al., 2002) και το σύμπλοκο III (Guzy and Schumacker, 2006). Σε αντιδιαστολή με τις μελέτες αυτές υπάργουν και έρευνες που δεν καταδεικνύουν κάποια επίδραση της μη ιονίζουσας ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στο οξειδωτικό δυναμικό των οργανισμών. Χαρακτηριστικά αναφέρονται οι in vitro μελέτες των Poulletier et al. (2011), καθώς και των Brescia et al. (2009) σε διάφορους κυτταρικούς τύπους του νευρικού και ανοσοποιητικού συστήματος, οι οποίες δεν παρατήρησαν κάποια αύξηση στα επίπεδα των ROS μετά από ραδιοσυγνότητες που είγαν παραγθεί από γεννήτριες.

Ένα επιπλέον σημαντικό σημείο ρύθμισης της ομοιόστασης των κυττάρων είναι το μεμβρανικό δυναμικό των μιτοχονδρίων, το οποίο έχει αναφερθεί να σχετίζεται με τη διαταραχή στη συγκέντρωση των ROS (*Wang et al., 2003*). Διαταραχή του μεμβρανικού δυναμικού των μιτοχονδρίων και ταυτόχρονη αύξηση των ROS έχει δειχθεί μετά από επίδραση ραδιοσυχνοτήτων, συχνότητας 900 MHz, στην καρκινική κυτταρική σειρά MDA-MB-231 (καρκίνος μαστού) (*Kahya et al., 2014*), ενώ αντίθετα *in vitro* έκθεση σπερματοζωαρίων σε μεγάλο SAR (5,7 W/kg) δεν επέφερε κάποια αλλαγή στο μιτοχονδριακό μεμβρανικό δυναμικό (*Falzone et al., 2008*).

Η αύξηση των ROS έχει περιγραφεί κυρίως σε *in vitro* μελέτες (Πίνακας 1.2) και λιγότερο σε *in vivo*. Σημαντικό συμπέρασμα που προκύπτει από την ανάγνωση του συγκεντρωτικού πίνακα για τις *in vitro* μελέτες είναι η σημαντική έλλειψη πραγματικών πηγών καθημερινής χρήσης για τη διερεύνηση των επιπτώσεων που τυχόν προκύπτουν από την έκθεση του πληθυσμού σε αυτές τις συσκευές.

Συγγραφείς	Βιολογικό Σύστημα	Πηγή ακτινοβόλησης	Επιδράσεις
Zmyslony et al. 2004	Πρωτογενής καλλιέργεια λεμφοκυττάρων επίμυων	Γεννήτρια 930 MHz CW, SAR = 1,5 W/kg	Καμία αλλαγή στα επίπεδα των ROS
Hook et al., 2004	J774.16 κυτταρική σειρά	Γεννήτρια 835,62 MHz (frequency- modulated continuous-wave, FMCW), 847,74 MHz (CDMA)	Καμία αλλαγή στα αντιοξειδωτικά ένζυμα SOD και CAT καθώς και στη γλουταθειόνη

Πίνακας 1.2: In vitro μελέτες που αφορούν στην επίδραση της ΗΜΑ στο οζειδωτικό στρες

Lantow et al., 2006a	Μονοκύτταρα ομφάλιου λώρου	Γεννήτρια Συνεχές κύμα (CW) / ραδιοσυχνότητα με GSM σήμα, SAR = 2 W/kg	Διαφορική αύξηση των ROS μετά από έκθεση σε συνεχές και διαμορφωμένο κύμα.
Lantow et al., 2006a	Λεμφοκύτταρα ομφάλιου λώρου	Γεννήτρια Συνεχές κύμα (CW) / ραδιοσυχνότητα με GSM σήμα, SAR = 2 W/kg	Καμία αλλαγή στα επίπεδα των ROS
Lantow et al., 2006b	Mono Mac 6 και K562 κυτταρικές σειρές	Γεννήτρια CW, GSM σε ομιλούσα κατάσταση μόνο, GSM σε κατάσταση ακοής, GSM σε κατάσταση συνομιλίας, SAR = 0,5 – 2 W/kg	Μόνο η διαμόρφωση GSM-DTX προκάλεσε αύξηση των ROS στα 2 W/kg
Friedman et al., 2007	Κυτταρική σειρά HeLa	Γεννήτρια 875 MHz, 200 mW/cm², για 5 και 10 λεπτά	Αύξηση ROS και ενεργότητας της NADH οξειδάσης
Agarwal et al., 2009	Ανθρώπινα σπερματοζωάρια	Κινητό τηλέφωνο σε ομιλούσα κατάσταση	Αύξηση των ROS, μείωση της κινητικότητας και της επιβίωσης
Del Vecchio et al., 2009	SN56 κυτταρική σειρά Πρωτογενής καλλιέργια νευρώνων του φλοιού από επίμυες	Γεννήτρια 900 MHz, SAR = 1 W/kg	Ενίσχυση νευροτοξικότητας του Η2Ο2 μόνο στα SN56 κύτταρα
De Iuliis et al., 2009	Ανθρώπινα σπερματοζωάρια	Γεννήτρια 1,8 GHz, SAR = 0,4 – 27,5 W/Kg	Αύξηση ROS
Luukkonen et al., 2009	SH-SY5Y κυτταρική σειρά	Γεννήτρια CW και GSM 872 MHz, SAR = 5 W/kg	Ενίσχυση του οξειδωτικού στρες επαγόμενου από μεναδιονίνη στην CW έκθεση
Campisi et al., 2010	Πρωτογενής καλλίεργεια αστρογλιακών κυττάρων επίμυων	Γεννήτρια Σήμα συχνότητας 900 MHz (CW ή διαμορφωμένο), Ένταση ηλεκτρικού πεδίου 10 V/m	Αύξηση ROS και εμφάνιση θρυματισμένου DNA
Luukkonen et al., 2010	SH-SY5Y κυτταρική σειρά	Γεννήτρια CW και GSM 872 MHz, SAR = 5 W/kg	Καμία περαιτέρω ενίσχυση του οξειδωτικού στρες επαγόμενου από χλωριούχο σίδηρο (FeCl2)
Xu et al., 2010	Πρωτογενής	Γεννήτρια	Αύξηση στην οξειδωτική βλάβη του

	καλλιέργεια νευρικών	1800 MHz, pulsed, SAR = 2 W/Kg	DNA (8-oxo-dG)
Pilla, 2012	Νευρώνες και ινοβλάστες	Γεννήτρια 27,12 MHz, pulsed, E = 41 V/m	Αύξηση στη συγκέντρωση των οξειδίων του αζώτου
Naziroglu et al., 2012	HL-60 κυτταρική σειρά	Γεννήτρια Παλμικό κύμα 2450 MHz, SAR = 0,1 – 2,5 W/Kg,	Επαγωγή της υπεροξείδωσης των λιπιδίων
Lu et al., 2012	Ανθρώπινα περιφερικά μονοπύρηνα	Γεννήτρια 900 MHz, SAR = 0,4 W/kg	Αύξηση των ROS και επαγωγή απόπτωσης μέσω ενεργοποίησης της κασπάσης 3
Liu et al., 2013	GC-2 κυτταρική σειρά	Γεννήτρια 1800 MHz, SAR = 1 και 2 W/kg	Αύξηση των ROS στα 2 W/kg
Ni et al., 2013	HLE B3 κυτταρική σειρά	Γεννήτρια 1800 MHz, SAR = 2, 3 και 4 W/kg	Αύξηση των ROS και της συγκέντρωσης MDA
Sefidbakht et al., 2014	ΗΕΚ293Τ κυτιαρική σειρά	Γεννήτρια 940 MHz, SAR = 0,09 W/kg	Αύξηση των επιπέδων ROS και στις ενεργότητες της καταλάσης και δισμουτάσης
Marjanovic et al., 2014	V79 κυτταρική σειρά	Γεννήτρια 1800 MHz, SAR = 1,6 W/kg	Αύξηση των ROS στα 10 λεπτά έκθεσης και μείωση των επιπέδων τους στα 30 λεπτά έκθεσης
Kang et al., 2014	ΝΙΗ3Τ3, U87, PC12 και SH-SY5Y κυπαρικές σειρές	Γεννήτρια 837 MHz CDMA, SAR = 2 W/kg 1950 MHz WCDMA, SAR = 2 W/kg	Καμία αλλαγή στα επίπεδα ROS
Kahya et al., 2014	Καρκινικές σειρές	Γεννήτρια 900 MHz RF, SAR = 0,36 W/kg	Απόπτωση μέσω οξειδωτικού στρες
Hou et al., 2015	Εμβρυικοί ινοβλάστες μυών (NIH/3T3)	Γεννήτρια 1800 MHz GSM-Talk, SAR = 2 W/kg	Αύξηση της συγκέντρωσης των ROS

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τρεις in vivo μελέτες, της ίδιας ερευνητικής ομάδας που έχουν αποκαλύψει αύξηση των ROS μετά από έκθεση στην HMA ραδιοσυγνοτήτων, μπόρεσαν να εντοπιστούν βιβλιογραφικά. Συγκεκριμένα, αύξηση ROS έχει ανιχνευθεί στον εγκέφαλο επίμυων μετά από in vivo ολόσωμη, καθημερινή, 2ωρη ακτινοβόληση με παλμικό κύμα συχνότητας 900 MHz (SAR = 0,9 W/kg) για συνολικά 45 ημέρες. Στην έρευνα αυτή σημειώθηκε επίσης μείωση στην ενεργότητα των SOD και GPx (Kesari et al., 2011). Ίδιες συνθήκες έκθεσης σε 2450 MHz (SAR = 0,14 W/kg) προκάλεσαν αύξηση των ROS στους όρχεις αρουραίων (Meena et al., 2014). Οι Shahin et al. (2013) ανέφεραν ότι το ίδιο πρωτόκολλο έκθεσης προκάλεσε αύξηση των ROS και σε μύες, και μάλιστα σε διαφορετικά όργανα (π.γ. ήπαρ, νεφρό και ωοθήκη). Ταυτόχρονα, στην ίδια μελέτη καταγράφηκε και μείωση της ενεργότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων SOD, CAT και GPx στα ίδια όργανα. Σε όλες αυτές τις μελέτες χρησιμοποιήθηκαν γεννήτριες που είχαν ρυθμιστεί να Οι ραδιοσυγνότητες αυτές παράγουν ραδιοσυγνότητες. απλά προσομοιάζουν την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία που εκπέμπεται από τις συσκευές καθημερινής χρήσης.

Οι in vivo μελέτες εστιάζουν κυρίως στη μέτρηση των αντιοξειδωτικών ενζύμων και μορίων όπως η δισμουτάση, η καταλάση και η γλουταθειόνη, αλλά και στα οξειδωμένα προϊόντα όπως λιπίδια και πρωτεΐνες. Ο αριθμός τους είναι μεγάλος, ωστόσο και σε αυτή την περίπτωση οι περισσότερες χρησιμοποιούν γεννήτριες και όχι εμπορικές συσκευές ασύρματης τεχνολογίας. Από τις in vivo μελέτες με πραγματικές πηγές η πλειονότητα αφορά επίμυες στους οποίους έχουν καταγραφεί διαταραχές στα οξειδοαναγωγικά συστατικά σε διάφορους ιστούς όπως στον κερατοειδή και στο φακό (Balci et al., 2007), στον εγκέφαλο (Ilhan et al., 2004; Sokolovic et al., 2008; Jing et al., 2012; Saikhedkar et al., 2014; Motawi et al., 2014), στα σπερματοζωάρια (Mailankot et al., 2009), καθώς και στον ορό και τους όρχεις (Al-Damegh, 2012) (Πίνακας 1.3).

Παράλληλα με τις μελέτες που περιγράφουν επαγωγή οξειδωτικού στρες από την ΗΜΑ, υπάρχουν και άλλες που δε δείχνουν κάποια επίδραση στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό των οργανισμών. Για παράδειγμα, *in vivo* καθημερινή, 20λεπτη ολόσωμη έκθεση, για συνολικά ένα μήνα, με κινητό τηλέφωνο δεν προκάλεσε αλλαγή στα επίπεδα MDA των σπερματοζωαρίων επίμυων (*Dasdag et al., 2003*). Νεότερη μελέτη, στην οποία η έκθεση των επίμυων σε κινητό τηλέφωνο 3^{ης} γενιάς ήταν 40 λεπτά καθημερινά, για 20 ημέρες δεν έδειξε κάποια αλλαγή στην ενεργότητα των GPx και CAT στους οφθαλμικούς ιστούς, αλλά ούτε και στη συγκέντρωση της μαλονδιαλδεΰδης και γλουταθειόνης στο αίμα (*Demirel et al., 2012*) (**Πίνακας 1.3**). Κατά συνέπεια τα αποτελέσματα παραμένουν αντικρουόμενα, παρά το μεγάλο αριθμό δημοσιεύσεων.

Πίνακας 1.3: In vivo μελέτες που έχουν χρησιμοποιήσει πραγματικά κινητά τηλέφωνα σε διάφορα βιολογικά συστήματα

Συγγραφείς	Βιολογικό Σύστημα Μελέτης	Πρωτόκολλο ακτινοβόλησης	Επιδράσεις
Dasdaa et al	Σπεοιματοζωάσια και όσχεις	20 λεπτά / ημέρα 1 μήνα	Καιμα αλλανή στα επίπεδα
2003	επίμυων	20 Λείτα / Τμερα, Τ μηνα,	MDA
		SAR = 0.52 W/kg	
			Αύξηση στη συγκέντρωση

Ilhan et al., 2004	Εγκέφαλος επίμυων	1 ώρα/ημέρα, 7 ημέρες, SAR = 2 W/kg	MDA, οξειδίων του αζώτου και στην ενεργότητα της οξειδάσης της ξανθίνης (Xanthine Oxidase – XO)
			Μείωση της ενεργότητας των SOD και GPx
Ferreira et al., 2006a	Μετωπιαίος φλοιός και ιππόκαμπος επίμυων	7½ ώρες/ημέρα, 6 ημέρες, SAR = 0,36 – 0,98 W/kg	Καμία αλλαγή στα οξειδωμένα λιπίδια και τις πρωτεΐνες, καθώς και στη μη ενζυμική αντιοξειδωτική ικανότητα
Ferreira et al., 2006b	Ήπαρ, πλάσμα και ερυθροκύτταρα νεογέννητων επίμυων	8,5 ώρες/ ημέρα, διάρκεια εγκυμοσύνης, SAR = 0,55 – 1,23 W/kg	Καμία αλλαγή στα αντιοξειδωτικά ένζυμα SOD, CAT, GPx, στη γλουταθειόνη, στα οξειδωμένα λιπίδια και τις πρωτεΐνες
Sokolovic et al., 2008	Εγκέφαλος επίμυων	4 ώρες / ημέρα, 20, 40 και 60 ημέρες, SAR = 0,043 – 0,135 W/kg	Αύξηση στη συγκέντρωση MDA και καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών. Μείωση στην ενεργότητα των CAT και ΧΟ
Mailankot et al., 2009	Όρχεις και επιδιδυμίδα επίμυων	1 ώρα / ημέρα, 28 ημέρες	Αύξηση οξειδωμένων λιπιδίων. Μείωση GSH
Jing et al., 2012	Εγκέφαλος νεογέννητων επίμυων	30 και 60 λεπτά / 3 φορές τη μέρα κατά τη διάρκεια της κύησης	Αύξηση της MDA και μείωση της ενεργότητας των GPx και SOD
Al-Damegh, 2012	Όρχεις επίμυων	15, 30, 60 λεπτά / ημέρα, 14 ημέρες, SAR = 0,9 W/kg	Αύξηση στα οξειδωμένα λιπίδια και στην CAT. Μείωση στη γλουταθειόνη και GPx
Demirel et al., 2012	Οφθαλμικοί ιστοί και αίμα επίμυων	40 λεπτά / ημέρα, 20 ημέρες	Καμία αλλαγή στις ενεργότητες των GPx και CAT
Saikhedkar et al.,2014	Εγκέφαλος και ήπαρ επίμυων	4 ώρες / ημέρα, 15 ημέρες, SAR = 0,99 W/kg	Μειωμένη SOD στον εγκέφαλο. Μειωμένη CAT και στα δύο όργανα. Μείωση GSH στον εγκέφαλο, αλλά μικρή αύξηση στο ήπαρ
Khalil et al., 2014	Ανθρώπινη σίελος	15 και 30 λεπτά	Καμία αλλαγή στη συγκέντρωση 8-οχο-dG και MDA. Καμία αλλαγή στην αντιοξειδωτική ικανότητα
Motawi et al., 2014	Εγκέφαλος επίμυων	2 ώρες / ημέρα, 60 ημέρες, SAR = 1,13 W/kg	Αύξηση στο συνολικό οξειδωτικό προφίλ (Total Oxidative Status – TOS) και στη συγκέντρωση των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών. Μείωση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας

Προσεκτική μελέτη της βιβλιογραφίας αποκαλύπτει ότι τα αντικρουόμενα αυτά αποτελέσματα πιθανά οφείλονται στη χρήση διαφορετικών μοντέλων μελέτης. Για παράδειγμα, ανθρώπινα μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα, απομονωμένα από ομφάλιο λώρο, εκτέθηκαν σε κύμα με διαμόρφωση GSM-DTX (Discontinuous Transmission). Αύξηση των ROS παρατηρήθηκε μόνο στα μονοκύτταρα και όχι στα λεμφοκύτταρα (Lantow et al., 2006a). Σήμερα είναι γνωστό ότι η απόκριση των κυττάρων στα εξωγενή ερεθίσματα, όπως για παράδειγμα στην ιονίζουσα ακτινοβολία, εξαρτάται από τον τύπο των κυττάρων, αλλά και τη φάση του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκονται (Warmerdam et al., 2009).

Ένα ακόμη στοιχείο που καθιστά τα αποτελέσματα των ερευνών αυτών αντικρουόμενα είναι η πληθώρα των διαφορετικών πρωτοκόλλων ακτινοβόλησης των πρότυπων βιολογικών μοντέλων. Η διάρκεια της ακτινοβόλησης έχει προταθεί ότι μπορεί να είναι μία παράμετρος το ίδιο κρίσιμα σημαντική, αν όχι και περισσότερο, από την τιμή SAR (*Belyaev*, 2010).

Επίσης, καθοριστική σημασία στη διαφορετικότητα των αποτελεσμάτων φαίνεται να διαδραματίζει η διαμόρφωση των κυμάτων με τα οποία γίνεται η έκθεση των οργανισμών. Συγκριτικές μελέτες μεταξύ συνεχών και παλμικών κυμάτων δείχνουν διαφορές στην επίδραση των δύο, με τα συνεχή να εμφανίζονται αλλού περισσότερο βιοδραστικά σε σχέση με τα παλμικά (Luukonen et al., 2009) και αλλού λιγότερο (Diem et al., 2005).

1.8 ΣΤΡΕΣ ΤΟΥ ΕΝΔΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟΥ ΔΙΚΤΥΟΥ (ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS – ER STRESS)

Ένα σημαντικό οργανίδιο των ευκαρυωτικών κυττάρων είναι το ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ). Το ΕΔ αποτελεί όχι μόνο την κυριότερη ενδοκυτταρική αποθήκη ασβεστίου, αλλά και το μέρος όπου οι πρωτεΐνες που προορίζονται για έκκριση συντίθενται, αναδιπλώνονται, τροποποιούνται μετα-μεταφραστικά και τελικά μεταφέρονται στον προορισμό τους (*Back et al., 2005*). Διαθέτει ένα οξειδωτικό περιβάλλον και χαμηλή αντιοξειδωτική ικανότητα (μεγαλύτερη συγκέντρωση GSSG από ότι GSH) καθώς προωθεί τη σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών (π.χ. δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών). Λόγω του ρόλου του στην αναδίπλωση και μεταφορά των πρωτεϊνών, το ΕΔ είναι πλούσιο σε πρωτεΐνες, μοριακές συνοδούς όπως η Grp78/BIP (78 kDa glucose-regulated protein / immunoglobulin heavy chian-binding protein), η Grp94 (94 kDa glucose-regulated protein) και η Calreticulin που έχουν μεγάλη συγγένεια με το ασβέστιο και σταθεροποιούν τα παράγωγα των ενδιάμεσων σταδίων της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών (*Csala et al., 2010; Kaufman and Malhota 2014*).

Διαταραχή των φυσιολογικών λειτουργιών του ΕΔ οδηγεί στην παρεμπόδιση της ορθής αναδίπλωσης των πρωτεϊνών και της εκκριτικής ικανότητάς τους, καθώς επίσης και στην συσσώρευση μη – ορθά αναδιπλούμενων πρωτεϊνών μέσα στον αυλό του, με αποτέλεσμα να δημιουργείται μία κατάσταση που είναι γνωστή ως στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (Endoplasmic Reticulum stress – ER stress). Το ΕΔ διαθέτει μηχανισμούς για την επαναφορά της φυσιολογικής ομοιόστασής του. Η αδυναμία επαναφοράς της ομοιόστασης και των λειτουργιών του οργανιδίου επάγει τελικά τον κυτταρικό θάνατο (*Fu and Ghao, 2014*). Το στρες του ΕΔ μπορεί να πυροδοτηθεί από ποικίλες ενδοκυττάριες αλλά και εξωκυττάριες διαταραχές. Αυτές περιλαμβάνουν: α) στέρηση γλυκόζης, που επιδρά κυρίως στην Ν-συνδεόμενη γλυκοζυλίωση και στα επίπεδα του ATP, β) αλλαγές στο οξειδοαναγωγικό ισοζύγιο και γ) μείωση των αποθεμάτων ασβεστίου στις αποθήκες του ΕΔ. Όλες οι διαταραχές της ομοιόστασης προκαλούν την ενεργοποίηση ενός εξελικτικά συντηρημένου μηχανισμού απόκρισης που συλλογικά ονομάζεται «απόκριση των μη ορθώς αναδιπλούμενων πρωτεϊνών – Unfolded Protein Response – UPR», και αποτελεί ένα πολύπλοκο και πολύπλευρο ενδοκυτταρικό μηχανισμό σηματοδότησης. Η UPR είναι πρωταρχικώς μία απόκριση επιβίωσης με σκοπό την επαναφορά της φυσιολογικής ομοιόστασης του ΕΔ (Shen at al., 2004).

Η UPR αποτελείται από τρία κύρια μονοπάτια απόκρισης: 1) αναστολή της μεταφραστικής μηχανής του κυττάρου για να περιοριστεί το βιοσυνθετικό φορτίο μέσα στο ΕΔ, 2) μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες συνοδούς του ΕΔ με σκοπό την αύξηση της ικανότητας αναδίπλωσής τους και 3) αύξηση του ρυθμού απομάκρυνσης των συσσωρευμένων μη ορθώς αναδιπλούμενων πρωτεϊνών μέσω του πρωτεασώματος και του μηχανισμού ERAD (Endoplasmic Reticulum Assosiated Degradation).

Σε μοριακό επίπεδο, η UPR χαρακτηρίζεται από την ενεργοποίηση τριών διαμεμβρανικών υποδοχέων του ΕΔ: την κινάση PERK (Pancreatic ER Kinase (PKR)-Like ER Kinase), το ένζυμο IRE1 (Inositol-Requiring Enzyme 1) και το μεταγραφικό παράγοντα ATF6 (Activated Transcription Factor 6) (Εικόνα 1.10). Οι πρωτεΐνες αυτές βρίσκονται στη μεμβράνη του ΕΔ και κατά τη φυσιολογική λειτουργία του οργανιδίου είναι προσδεδεμένη σε αυτές μία μοριακή συνοδός, η οποία ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (Heat Shock Protein 70 – Hsp70) η GRP78/BIP. Η πρόσδεση αυτή ρυθμίζει κατασταλτικά τους συγκεκριμένους υποδοχείς (*Zhang and Kaufman, 2006*). Σε περίπτωση διαταραχής της λειτουργίας του ΕΔ, τα μονομερή της BIP απελευθερώνονται και προσδένονται σε μη ορθά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες μέσα στον αυλό με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των τριών διαμεμβρανικών υποδοχέων και την έναρξη του πολύπλοκου μεταγραφικού και μεταφραστικού προγράμματος που ορίζεται ως UPR (*Zhang and Kaufman, 2006*).



Εικόνα 1.10: Σε φυσιολογικές συνθήκες μία πρωτεΐνη εισέρχεται στο ΕΔ για να συντεθεί και να δεχτεί τις απαραίτητες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Όταν η αναδίπλωση της πρωτεΐνης δεν επιτυγχάνεται, τότε αυτή οδηγείται προς αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα (ERAD μηχανισμός). Σε συνθήκες στρες, όπου υπάρχει συσσώρευση μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών εντός του αυλού του ΕΔ, η μοριακή συνοδός BIP αποδεσμεύεται από τις πρωτεΐνες ATF6, IRE1 και PERK της μεμβράνης του ΕΔ και μεταβαίνει στον αυλό. Η αποδέσμευση οδηγεί σε ενεργοποίηση των πρωτεϊνών αυτών και έναρζη του μηχανισμού UPR. Πηγή: http://www.bioscientist.com.

Το καλύτερα μελετημένο και περισσότερο συντηρημένο μονοπάτι είναι αυτό της IRE1, που πρωτοανακαλύφθηκε στο ζυμομύκητα Saccharomyces cerevisiae. Η πρωτεΐνη IRE1 διαθέτει τόσο ενεργότητα κινάσης σερίνης/θρεονίνης όσο και ενεργότητα ριβονουκλεάσης. Ενεργοποίηση της UPR προκαλεί διμερισμό και trans – αυτοφωσφορυλίωση αυτής, η οποία τελικά οδηγεί σε ενεργοποίηση της κυτταροπλασματικής ενεργότητας ριβονουκλεάσης που διαθέτει. Η ριβονουκλεάση αφαιρεί 26 βάσεις από το mRNA του μεταγραφικού παράγοντα Xbp-1 (X-box Binding Protein 1) καθιστώντας τον ικανό για μετάφραση και παραγωγή του συγκεκριμένου παράγοντα (Kupsco and Schlenk, 2015). Ο Xbp-1, με τη σειρά του, μεταβαίνει στον πυρήνα και ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων της UPR, τα περισσότερα από τα οποία διαθέτουν το μοτίβο "CCAAT(N9)CCACG" (ER Stress Response Element (ERSE) στον υποκινητή τους (*Zhang and Kaufman, 2006*). Η IRE1 αποικοδομεί και κάποια mRNA που βρίσκονται στο ΕΔ μέσω της RIDD (IRE1-Dependent Decay) διαδικασίας.

Η PERK είναι μία κινάση σερίνης/θρεονίνης η οποία μετά την ενεργοποίηση της UPR ολιγομερίζεται και φωσφορυλιώνει τον eIF2 αναστέλοντας έτσι την πρωτεϊνοσύνθεση ώστε να μη συσσωρευτούν και άλλες πρωτεΐνες στο ΕΔ. Με τη φωσφορυλίωση του eIF2, κάποια mRNA ευνοούνται, όπως αυτό της πρωτεΐνης ATF4 (Activated Transcription Factor 4) που ελέγχει γονίδια για τη φάση προσαρμογής της UPR (*Kupsco and Schlenk, 2015*).

Τέλος, στη φάση προσαρμογής, η πρωτεΐνη ΑΤF6 απελευθερώνεται από το ΕΔ στο Golgi όπου πρωτεολύεται μετα-μεταφραστικά από τις πρωτεάσες Site-1 και Site-2 και ενεργοποιείται ως μεταγραφικός παράγοντας που μπορεί και ελέγχει την έκφραση γονιδίων, μεταξύ των οποίων γονίδια που συμμετέχουν στην καταστροφή πρωτεϊνών μέσω της διαδικασίας ERAD, μοριακές συνοδούς του ΕΔ και τον μεταγραφικό παράγοντα Xbp-1 (*Kupsco and Schlenk, 2015*).

1.9 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΣΤΡΕΣ ΕΔ

Μέσα στο ΕΔ δημιουργούνται οι γέφυρες θείου μεταξύ συγκεκριμένων καταλοίπων κυστεΐνης των πλευρικών ομάδων των πρωτεϊνών. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται οξειδωτική αναδίπλωση (oxidative folding) και επιτυγχάνεται με αναγωγή των ισομερασών (PDIs) του ΕΔ (ER-Resident Protein Disulfide Isomerases). Η οξείδωση των συγκεκριμένων ενζύμων γίνεται κυρίως από τις οξειδοαναγωγάσες του ΕΔ Ero1a και Ero1b (Endoplasmic Reticulum Oxidoreductase) με ταυτόχρονη παραγωγή H₂O₂. Για την αντιμετώπιση των ROS το ΕΔ δίκτυο διαθέτει αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς τόσο ενζυμικούς όσο και μη. Συγκεκριμένα, υπάρχει αρκετή συγκέντρωση γλουταθειόνης καθώς και υπεροξειδοξίνης IV (PrxIV ή Prx4), η οποία αντιμετωπίζει κυρίως την παραγωγή H₂O₂ από τη δημιουργία των δισουλφιδικών δεσμών (*Eletto et al., 2014*).

Παρά το γεγονός ότι το ΕΔ δίκτυο παράγει ROS, λόγω της λειτουργίας του, η εξωγενής αύξησή τους εντός του κυττάρου μπορεί να προκαλέσει προ-αποπτωτική ενεργοποίηση του στρες του ΕΔ (*Eletto et al., 2014*).

Ενεργοποίηση του στρες του ΕΔ μπορεί να προκληθεί και από διαταραχή στη συγκέντρωση του ασβεστίου εσωτερικά του αυλού. Η εισαγωγή του ασβεστίου γίνεται με κατανάλωση ενέργειας από ειδικούς μεταφορείς SERCA (Sarcoendoplasmic Reticulum Ca²⁺ Transport ATPase). Η εξαγωγή ελέγχεται μέσω των υποδοχέων IP₃Rs (Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors) στον εγκέφαλο, ενώ στους μυς ελέγχεται κυρίως από τους υποδοχείς ρυανοδίνης (Ryanodine Receptors – RyR), αλλά και από πόρους ενεργητικής / παθητικής διάχυσης (*Eletto et al., 2014*). Οι υποδοχείς αυτοί υπόκεινται σε οξειδοαναγωγική ρύθμιση. Συγκεκριμένα, οξείδωση της σουλφυδρυλικής ομάδας της κυστεΐνης στη θέση 674 των SERCA, μετά από αύξηση των ROS, αναστέλλει την αντλία ασβεστίου. Με αυτό τον τρόπο οι ROS μπορούν να προκαλέσουν μείωση στα επίπεδα ασβεστίου εντός του αυλού και άρα απενεργοποίηση των ασβεστοεξαρτώμενων μοριακών συνοδών καρλετικουλίνη και καλνεξίνη

(calnexin), προκαλώντας τελικά συσσώρευση μη σωστά αναδιπλούμενων πρωτεϊνών (Eletto et al., 2014).

Μετά την ενεργοποίηση του στρες στο ΕΔ ακολουθεί μία σειρά γεγονότων στο κύτταρο όπως η απελευθέρωση ασβεστίου από το ΕΔ. Το ΕΔ συνδέεται με τα μιτοχόνδρια μέσω μεμβρανών (Mitochondria-Associated ER Membranes - MAMs) με τη βοήθεια των οποίων διευκολύνεται η μεταφορά του ασβεστίου (Cao and Kaufman, 2014). Κατά τη διάρκεια της φάσης προσαρμογής της UPR πραγματοποιείται μεταφορά ασβεστίου προς τα μιτογόνδρια και η είσοδος αυτή επάγει το μεταβολισμό των οργανιδίων μέσω αύξησης της ενεργότητας της ασβεστο-ρυθμιζόμενης δι
¨
δρογενάσης (Ca²⁺-Regulated Dehydrogenase) που συμμετέχει στον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος (Tricarboxylic Acid – TCA). Η αυξημένη ενεργότητα αυτών των ενζύμων προάγει την οξειδωτική φωσφορυλίωση, οδηγώντας τελικά στη μεγαλύτερη παραγωγή ATP. Με αυτό τον τρόπο παρέγεται περισσότερη ενέργεια στο κύτταρο για να αντιμετωπίσει τη στρεσογόνο κατάσταση (Rainbolt et al., 2014). Σε περίπτωση που το στρες του ΕΔ δεν αντιμετωπιστεί επιτυχώς, η συνεχής κατανάλωση του ΑΤΡ από τη μοριακή συνοδό BIP και από τους μεταφορείς SERCA οδηγεί σε αύξηση των ROS στα μιτοχόνδρια μέσω της συνεχούς ενεργοποίησης της αναπνευστικής αλυσίδας. Οι ROS προκαλούν άνοιγμα των καναλιών IP₃Rs και μεγαλύτερη εκροή ασβεστίου από το ΕΔ δημιουργώντας έτσι έναν κύκλο θετικής ανατροφοδότησης του φαινομένου (Cao and Kaufman, 2014).

1.10 ΠΡΟΤΥΠΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ DROSOPHILA MELANOGASTER

Το πρότυπο βιολογικό σύστημα Drosophila melanogaster ταξινομικά ανήκει στη Συνομοταξία Αρθρόποδα (Arthropoda), στην Ομοταξία Έντομα (Insecta), στην Υφομοταξία Πτερυγωτά (Pterygota), στην Τάξη Δίπτερα (Diptera), στην Υποτάξη Βραχύκερα (Brachycera), στην Οικογένεια Δροσοφιλίδες (Drosophilidae), στην Υποοικογένεια Δροσοφιλίνες (Drosophilinae), στο Γένος Δροσόφιλος (Drosophila) και στο Είδος Δροσόφιλος η μελανογάστωρ (Drosophila melanogaster).

Υπάρχει φυλετικός διμορφισμός μεταξύ θηλυκών και αρσενικών εντόμων. Τα θηλυκά έντομα είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος και διαθέτουν άσπρη κοιλιά, ενώ τα αρσενικά έχουν σκουρόχρωμη κοιλιά και φέρουν δύο σειρές από σκουρόχρωμα χτένια σε κάθε πρόσθιο ταρσό, τα οποία βοηθούν κατά τη σύζευξη. (Εικόνα 1.11).



Εικόνα 1.11: Φωτογραφίες στερεοσκοπίου στις οποίες απεικονίζονται ένα ενήλικο αρσενικό (Αριστερά) και ένα θηλυκό έντομο (Δεξιά). Το μαύρο βέλος δείχνει το χτένι του αρσενικού εντόμου. Ράβδος μεγέθυνσης = 0,25 mm.

Προτάθηκε ως πρότυπο βιολογικό σύστημα από τον Charles W. Woodworth στις αργές του 18ου αιώνα και έκτοτε αποτελεί ένα από τα βασικά μοντέλα μελέτης της Αναπτυξιακής Βιολογίας και της Γενετικής, καθώς τα πλεονεκτήματα που προσφέρει είναι πολλά και πολύεπίπεδα. Μερικά από τα πλεονεκτήματα της D.melanogaster είναι: 1) ο μικρός κύκλος ζωής που περιλαμβάνει τέσσερα αυστηρά καθορισμένα αναπτυξιακά στάδια, 2) ο μεγάλος αριθμός απογόνων, 3) ο μεγάλος αριθμός συντηρημένων διαδικασιών με τα σπονδυλωτά, όπως για παράδειγμα ο καταρράκτης των JNK (c-Jun N-Terminal Kinases) κινασών (Stronach and Perrimon, 1999), 4) το γεγονός ότι το 70% των γονιδίων που εμπλέκονται σε ασθένειες του ανθρώπου έχουν λειτουργικά ορθόλογα γονίδια στη Drosophila (Reiter et al., 2001) και 5) το μικρό κόστος συντήρησης. Επίσης, διαθέτει μόλις 4 πλήρως χαρτογραφημένα (Adams et al., 2000) ζεύγη χρωμοσωμάτων: το ζεύγος των φυλετικών (ΧΧ για τα θηλυκά και ΧΥ για τα αρσενικά έντομα), και τα 2, 3 και 4 αυτοσωμικά χρωμοσώματα. Το φυλετικό Υ και το αυτοσωμικό 4 χρωμόσωμα αποτελούνται κυρίως από ετεροχρωματίνη και σε συνδυασμό με το μικρό μέγεθός τους δε μελετώνται. Έτσι, μελετώνται κυρίως τα χρωμοσώματα Χ, 2 και 3. Η γαρτογράφηση του γονιδιώματος έχει ολοκληρωθεί και έχουν εντοπιστεί περίπου 13.900 γονίδια, για πολλά από τα οποία έχουν δημιουργηθεί στελέγη που φέρουν μεταλλαγμένες μορφές αυτών. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την ικανότητα διατήρησης αυτών των αλλαγών στο γονιδίωμα, μέσω της χρήσης ισοζυγισμένων χρωμοσωμάτων (balancer chromosomes), τα οποία δεν επιτρέπουν τον ανασυνδυασμό μεταξύ ομόλογων χρωμοσωμάτων κατά τη μείωση, συνιστούν τη Drosophila ένα πολύ σημαντικό μοντέλο in vivo γενετικών μελετών.

1.10.1 ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ

Όπως προαναφέρθηκε, ο κύκλος ζωής της *D. melanogaster* διακρίνεται σε 4 αναπτυξιακά στάδια. Τα στάδια αυτά είναι: 1) το στάδιο του εμβρύου (εμβρυογένεση), 2) το στάδιο της προνύμφης (larvae), 3) το στάδιο της νύμφης (pupae) και 4) το στάδιο του ενήλικου εντόμου (**Εικόνα 1.12**).



Εικόνα 1.12: Σχηματική απεικόνιση των αναπτυξιακών σταδίων του εντόμου D. melanogaster.

Το πρώτο στάδιο ανάπτυξης είναι αυτό του γονιμοποιημένου αυγού, του οποίου η εναπόθεση (oviposition) γίνεται από τα θηλυκά έντομα σε κατάλληλο υπόστρωμα (Schwartz et al., 2012). Τα θηλυκά εναποθέτουν ανά 5 τα αυγά τους, τα οποία έχουν μήκος περίπου 0,5 mm. Η γονιμοποίηση γίνεται μέσα στην ωοθήκη. Το σπέρμα περνά από τον εμπρόσθιο πόλο του ωοθυλακίου μέσω της μικροπύλης. Η εμβρυογένεση διαρκεί λιγότερο από 24 ώρες και διακρίνεται σε τρία στάδια. Αρχικά το έμβρυο αποτελεί ένα συγκύτιο (cyncytium) στο οποίο οι πυρηνικές διαιρέσεις συμβαίνουν στο κέντρο του αυγού, ενώ ταυτόχρονα δεν υπάρχει κυτταρική διαίρεση και οι πυρήνες μοιράζονται το ίδιο κυτταρόπλασμα. Μετά από 9 μιτώσεις οι περισσότεροι πυρήνες κινούνται προς την περίμετρο του αυγού δημιουργώντας το βλαστοδερμικό συγκύτιο (syncytial blastoderm). Τρεις ώρες μετά από τη στιγμή της ωοτοκίας, και 13 μιτωτικές διαιρέσεις μετά, 6.000 πυρήνες (5.000 surface cells, 1.000 yolk nuclei) έχουν μεταφερθεί στην περίμετρο του εμβρύου και έχουν περιβληθεί από κυτταρικές μεμβράνες δημιουργώντας το κυτταρικό βλαστόδερμα (cellular blastoderm). Στη συνέχεια ακολουθεί η γαστριδίωση και ο ορισμός των 3 κύριων βλαστικών γραμμών (primary germ layers) από τις οποίες θα προκύψουν τα όργανα του εντόμου. Τέλος, σχηματίζονται τα μεταμερή του εμβρύου

(*Slack, 2009*). Τα έμβρυα καταναλώνουν τη λέκιθο (yolk proteins) που έχει συσσωρευτεί στο ώριμο αυγό κατά τη διαδικασία της ωογένεσης.

Η Drosophila είναι ολομετάβολο έντομο, γεγονός που σημαίνει ότι υφίσταται πλήρη μεταμόρφωση και το αυγό εκκολάπτεται σε μία προνύμφη που είναι αρκετά διαφορετική σε δομή από το ενήλικο έντομο. Η προνύμφη περνά από τρεις αναπτυξιακές φάσεις πριν γίνει νύμφη, ένα στάδιο ηρεμίας στο οποίο το σώμα αναδομείται και μεταμορφώνεται σε ενήλικο τέλειο έντομο (Slack, 2009). Οι νεοεκκολαπτόμενες προνύμφες έρπονται και διαθέτουν στοματικά εξαρτήματα για την πρόσληψη τροφής. Δεν έχουν πόδια, το κεφάλι είναι κρυμμένο εσωτερικά του πρόσθιου τμήματος και διαθέτουν 3 θωρακικά και 8 κοιλιακά μεταμερή (Slack, 2009). Διακρίνονται σε τρία προνυμφιακά στάδια ανάπτυξης (instars) με βάση το μέγεθος και την κινητική τους συμπεριφορά. Αμέσως μετά την εκκόλαψη της προνύμφης και την έξοδό της από το αυγό, ξεκινά το πρώτο προνυμφικό στάδιο (L1), κατά το οποίο η λάρβα τρέφεται αποκλειστικά από την επιφάνεια της τροφής. Μετά από περίπου 25 ώρες, μεταμορφώνεται σε προνύμφη δευτέρου σταδίου (L2), δημιουργεί τρύπες στην επιφάνεια της τροφής και ξεκινά να τρέφεται από το εσωτερικό της. Μετά από 24 ώρες μετατρέπεται στο τρίτο στάδιο (L3) και εξακολουθεί να τρέφεται από το εσωτερικό της τροφής, για τις επόμενες 48 ώρες περίπου. Τέλος, η προνύμφη εξέρχεται από την τροφή, δημιουργεί ένα στερεό στρώμα – κουκούλι και μεταμορφώνεται σε νύμφη μέσα σε διάστημα 30 ωρών (Campos-Ortega and Hartenstein, 1985).

Η μεταμόρφωση σε τέλειο έντομο από νύμφη διαρκεί 3 – 4 ημέρες μετά από τις οποίες εκδύεται το ενήλικο έντομο. Μετά την έκδυση του ενήλικου τέλειου εντόμου, μέσα σε διάστημα κάποιων ωρών, και τα αρσενικά αλλά και τα θηλυκά έντομα καθίστανται σεξουαλικά ώριμα και ενεργά. Τα ενήλικα έντομα, με κάποιες εξαιρέσεις στις γονάδες και στους αδένες, αποτελούνται εξ' ολοκλήρου από μετα-μιτωτικά κύτταρα, δηλαδή κύτταρα που δε διαιρούνται (*Helfand and Rogina, 2003*). Κατά συνέπεια, αποτελεί ιδανικό πρότυπο βιολογικό σύστημα για τη μελέτη των διαφοροποιήσεων που υπόκεινται τα κύτταρα, και τις αλλοιώσεις που συσσωρεύουν με την πάροδο του χρόνου και έχουν ως τελικό αποτέλεσμα τη διαταραχή της ομοιόστασης και τη γήρανση. Επίσης, φαίνεται να μοιράζεται συντηρημένους μηχανισμούς όσον αφορά στη διαδικασία της γήρανσης, πράγμα που την καθιστά ένα πολύ καλό σύστημα μελέτης του οξειδωτικού στρες και της γήρανσης (*He and Jasper, 2014*).

Τα αρσενικά έντομα γίνονται σεξουαλικά ώριμα μέσα σε λίγες ώρες από τη στιγμή της έκδυσής (eclosion) τους (Εικόνα 1.13), ενώ τα θηλυκά 8-12 ώρες μετά. Η δεκτικότητα των θηλυκών προς αναπαραγωγή επιτυγχάνεται από τα αρσενικά με «κορτάρισμα» (courtship), κατά το οποίο εκτείνουν οριζόντια τα φτερά τους και δημιουργούν δονήσεις κοντά στο θηλυκό έντομο. Οι δονήσεις αυτές παράγουν έναν ήχο που είναι γνωστός ως «courtship song» (*Yamamoto and Koganezawa, 2013*). Μετά την εισαγωγή του σπέρματος τα θηλυκά σταματούν να είναι δεκτικά σε νέα σύζευξη και διατηρούν το σπέρμα εντός της κοιλιακής τους χώρας σε ειδικά όργανα, τις σπερματοθήκες και τα σπερματικά δοχεία (*Lefevre and Jonsson, 1962*). Η δημιουργία ώριμων αυγών ικανών προς γονιμοποίηση πραγματοποιείται μέσω της διαδικασίας της ωογένεσης.



Εικόνα 1.13: Φωτογραφίες στερεοσκοπίου που απεικονίζουν νεοεκδυθέν αρσενικό έντομο, λίγα δευτερόλεπτα μετά την έκδυση. Αριστερά είναι η ραχιαία όψη του εντόμου και δεζιά η κοιλιακή. Διακρίνονται τα διπλωμένα ακόμη φτερά, τα οποία θα ανοίζουν μέσα σε 3 ώρες από τη στιγμή της έκδυσης. Ράβδος μεγέθυνσης = 0,20 mm.

1.10.2 ΘΗΛΥΚΟ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Τα θηλυκά έντομα διαθέτουν μεροϊστικές, πολυτροπικές ωοθήκες, η καθεμία εκ των οποίων αποτελείται από 15-18 ωοθηκάρια (ovarioles) (*King, 1970*). Τα ωοθηκάρια αποτελούνται από ωοθυλάκια, τοποθετημένα σε γραμμική διάταξη ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο στο οποίο ανήκουν. Τα αναπτυξιακά στάδια είναι 14 κύρια (*King, 1970*), τα οποία υποκατηγοριοποιούνται σε 20 (*Margaritis, 1985; 1986*). Οι ωοθήκες ενώνονται με τους ωαγωγούς, οι οποίοι τελικά συνδέονται σε έναν κοινό ωαγωγό από τον οποίο διέρχεται το ώριμο, προς γονιμοποίηση, αυγό οδηγούμενο προς τη μήτρα (**Εικόνα 1.14**). Το αυγό ενεργοποιείται στον ωοαγωγό, κατά τη μεταφορά του προς τη μήτρα. Στη μήτρα γονιμοποιείται από το σπέρμα που απελευθερώνεται από τα όργανα στα οποία είναι αποθηκευμένο (*Kapelnikov et al., 2008*).



Εικόνα 1.14: Σχηματική απεικόνιση του αναπαραγωγικού συστήματος των θηλυκών εντόμων. Εκτός από τη σχηματική αναπαράσταση το βέλος δείχνει φωτογραφία ωοθήκης. Η λήψη της φωτογραφίας έγινε μετά από παρατήρηση σε στερεοσκόπιο. ΣΔ = Σπερματικά Δοχεία, ΣΘ = Σπερματοθήκες, Ράβδος μεγέθυνσης = 0,2 mm. Τροποποίηση από Kapelnikov et al., 2008.

1.10.3 $\Omega O \Gamma E N E \Sigma H \Sigma T H D ROS O PHILA MELANOGASTER$

Στη D. melanogaster, σύμφωνα με τους Bastock and St Johnston (2008), το μεγαλύτερο όργανο είναι η ωοθήκη και το μεγαλύτερο κύτταρο το ωοκύτταρο. Η ωοθήκη του συγκεκριμένου εντόμου έχει συμβάλλει στη μελέτη βασικών διεργασιών Αναπτυξιακής Βιολογίας, καθώς και στη μελέτη της αλληλεπίδρασης σωματικών κυττάρων και κυττάρων της γαμετικής σειράς, τα οποία συνυπάρχουν στον ωοθηκικό ιστό του εντόμου (*Rubin and Huynh 2015*).

Η βασική δομική μονάδα της ωοθήκης είναι το ωοθυλάκιο, το οποίο αποτελείται από τρεις τύπους κυττάρων: 1) τα θυλακοκύτταρα, τα οποία είναι σωματικά κύτταρα και σχηματίζουν μία μονοστιβάδα στην επιφάνεια του αυγού, 2) το ωοκύτταρο, που προέρχεται από γαμετικά κύτταρα και 3) τα τροφοκύτταρα που επίσης προέρχονται από τη διαίρεση του ίδιου κυττάρου γαμετικής σειράς και έχουν ως ρόλο να τροφοδοτούν το ωοκύτταρο με mRNA και κυτταροπλασματικά συστατικά απαραίτητα για την ανάπτυξή του και τη μετέπειτα διαδικασία της εμβρυογένεσης (Εικόνα 1.15Α).

Τα θυλακοκύτταρα προέρχονται από δύο σωματικά βλαστοκύτταρα και χωρίζονται σε τρεις τύπους: τα πολικά (pollar cells), τα επιθηλιακά (epithelial cells) και τα συνοδά ή συνοριακά (border cells). Τα πολικά κύτταρα εντοπίζονται στο εμπρόσθιο και οπίσθιο πόλο του αυγού και συμμετέχουν στον καθορισμό του άξονα κεφάλι-κοιλιά. Τα επιθηλιακά κύτταρα περιβάλλουν όλο το αυγό και συμμετέχουν στη σύνθεση του χορίου. Τέλος, τα συνοριακά κύτταρα αποτελούν 6-8 κύτταρα τα οποία αποδεσμεύονται από τα γειτονικά τους θυλακοκύτταρα και μεταναστεύουν ανάμεσα από τα τροφοκύτταρα και το ωοκύτταρο
(McLaughlin and Bratu, 2015). Τα κύτταρα αυτά θα δημιουργήσουν μεταγενέστερα τη μικροπύλη (βλ. Εικόνα 1.22).

Όπως ήδη αναφέρθηκε, οι υπόλοιποι κυτταρικοί τύποι του ωοθυλακίου προέρχονται από τη γαμετική σειρά. Στη συγκεκριμένη περίπτωση που τα τροφοκύτταρα τροφοδοτούν το ωοκύτταρο με τα συστατικά που αυτό χρειάζεται για να αναπτυχθεί, η ωογένεση καλείται μεροϊστική. Στη Drosophila συγκεκριμένα, που τα τροφοκύτταρα βρίσκονται σε κάθε ωοθυλάκιο και συνοδεύουν το ωοκύτταρο, η ωογένεση χαρακτηρίζεται περαιτέρω ως πολυτροφική. Η πολυτροφική μεροϊστική ωογένεση συναντάται στα περισσότερα ολομετάβολα έντομα, τα οποία έχουν μεγάλης διάρκειας εμβρυογένεση (Lynch and Roth, 2011). Υπάρχουν δύο ακόμα τύποι ωογένεσης: η τελοτροφική και η πανοϊστική ωογένεση. Στον πρώτο τύπο, τα τροφοκύτταρα βρίσκονται στην αργή του ωοθηκάριου και τροφοδοτούν με mRNA και κυτταροπλασματικά συστατικά όλα τα ωοθυλάκια, ενώ δεν έχουν κλωνική σχέση με το ωοκύτταρο (Εικόνα 1.15Β). Συναντάται τόσο σε ημιμετάβολα όσο και σε ολομετάβολα έντομα, και υποστηρίζει κυρίως μικρής διάρκειας εμβρυογένεση (Lynch and Roth, 2011). Ο δεύτερος τύπος είναι ο αρχαιότερος από όλους και στηρίζει αποκλειστικά μικρής διάρκειας εμβρυογένεση. Στην πανοϊστική ωογένεση όλα τα κύτταρα της γαμετικής σειράς γίνονται ωοκύτταρα, και η σύνθεση των mRNAs και των συστατικών που γρειάζεται το ωοκύτταρο συντίθενται από το ίδιο (Εικόνα 1.15Γ). Σε όλους τους τύπους της ωογένεσης τα ωοθυλάκια περιβάλλονται από τη μονοστιβάδα των θυλακοκυττάρων (Lynch and Roth, 2011).



Εικόνα 1.15: Ωοθηκάρια που περιέχουν ωοθυλάκια των τριών τύπων ωογένεσης. Α. Πολυτροφικά ωοθυλάκια. Β. Τελοτροφικά ωοθυλάκια. Γ. Πανοϊστικά ωοθυλάκια. ΤΚ = τροφοκύτταρα, ΘK = θυλακοκύτταρα, ΩK = ωοκύτταρο. Τροποποίηση από Lynch and Roth, 2011.

Κατά τη διάρκεια της ωογένεσης, τα ωοθυλάκια σχηματίζονται στην εμπρόσθια περιοχή της ωοθήκης και όπως αναπτύσσονται προχωρούν προς το οπίσθιο μέρος της, το οποίο και

<u>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u>

αποτελεί την έξοδο του ωοθηκαρίου και το οποίο ενώνεται με τον ωαγωγό. Το ωοθηκάριο, το οποίο τροφοδοτείται από την αιμολέμφο και το λιπαρό σώμα του εντόμου (fat body), χωρίζεται σε δύο περιοχές ανάλογα με τα αναπτυξιακά στάδια των ωοθυλακίων. Το ένα μέρος αποτελεί το γερμάριο (υποστάδια 1, 2α, 2β και 3) και το άλλο το βιτελλάριο (στάδια 2-14) (Εικόνα 1.16).



Εικόνα 1.16: Σχηματική αναπαράσταση των τμημάτων ενός ωοθηκαρίου (γερμάριο και βιτελλάριο). Το γερμάριο αποτελείται από τις περιοχές 1, 2α, 2β και 3. Η περιοχή 1 περιλαμβάνει τα διαιρούμενα βλαστοκύτταρα. Τα βλαστοκύτταρα βρίσκονται στην αρχή του γερμαρίου και περιβάλλονται από τα κύτταρα του τελικού νηματίου και τα κύτταρα του εσωτερικού ωοθηκάριου. Μετά από ασύμμετρη διαίρεση δημιουργούν τις βλαστοκύστες που μετά από 4 συγχρονισμένες διαιρέσεις αποτελούνται από 16 κύτταρα της γαμετικής σειράς. Στην περιοχή 2 η ανταλλαγή mRNAs, πρωτεϊνών και οργανιδίων οδηγεί στη διαφοροποιημένα 16 κύτταρα της γαμετικής σειράς περιβάλλονται από μία στοιβάδα διαφοροποιημένων θυλακοκυττάρων και αποτελούν πλέον το ωοθυλάκιο. Τροποποίηση και σύνθεση από α) Zhukova and Kiseleva, 2012 και β) Becalska and Gavis, 2009.

1.10.3.1 Γερμάριο

Η όλη διαδικασία της ωογένεσης ξεκινά στο στάδιο του γερμαρίου, όταν ένα βλαστοκύτταρο της γαμετικής σειράς υπόκειται ασύμμετρη διαίρεση και δημιουργεί μία βλαστοκύστη και ένα θυγατρικό βλαστοκύτταρο. Η βλαστοκύστη υπόκειται 4 ασύμμετρες διαιρέσεις, χωρίς ολοκληρωμένη κυτοκίνηση, ώστε τελικά να δημιουργηθεί μία βλαστοκύστη 16 κυττάρων, τα οποία επικοινωνούν μεταξύ τους με γέφυρες από ινίδια ακτίνης που ονομάζονται δακτυλιοειδείς δίαυλοι (ring canals) (*Deng and Lin., 2001*). Κατά τη διάρκεια αυτών των διαιρέσεων ένα εξειδικευμένο οργανίδιο των βλαστοκυττάρων, το οποίο ονομάζεται συναπτόσωμα (fusome) και προέρχεται από το κεντροσωμάτιο και απομεινάρια του κυτταροσκελετού, αγκιστρώνεται στον έναν πόλο κάθε μιτωτικής ατράκτου και εξασφαλίζει ότι τα κύτταρα θα υποστούν ένα καθορισμένο και αμετάβλητο πρότυπο διαίρεσης ώστε να δημιουργηθεί μία συμμετρική κύστη (**Εικόνα 1.17**). Η κύστη αυτή αποτελείται από δύο κύτταρα με τέσσερις διαύλους, δύο με τρεις, τέσσερα με δύο και οχτώ κύτταρα με ένα δίαυλο (*Huynh and St Johnston, 2004*). Το μοτίβο αυτό είναι σημαντικό καθώς το ωοκύτταρο θα προκύψει από τα δύο κύτταρα.



Εικόνα 1.17: Σχηματική απεικόνιση των συγχρονισμένων διαιρέσεων της βλαστοκύστης και ο προσανατολισμός των κυττάρων σε αυτήν, ο οποίος καθορίζεται από το συναπτόσωμα (κόκκινο χρώμα). Φαίνεται χαρακτηριστικά η ασύμμετρη κατανομή της υπερμοριακής δομής μετά από την κάθε μίτωση. Όταν η βλαστοκύστη διαιρείται εκτός από το αγκυροβολημένο, κληρονομούμενο συναπτόσωμα σχηματίζει ένα πώμα συναπτοσώματος στον ακινητοποιημένο δακτυλιοειδή δίαυλο στον αντίθετο πόλο του κυττάρου. Τα δύο συναπτοσώματα συγχωνεύονται, έτσι ώστε το πατρικό κύτταρο να περιέχει το αρχικό συναπτόσωμα και το μισό πώμα, ενώ το θυγατρικό κύτταρο να περιέχει το άλλο μισό πώμα. Αυτός ο ασύμμετρος διαχωρισμός επαναλαμβάνεται και στις επόμενες 3 διαιρέσεις. Τροποποίηση από Huynh and St Johnston, 2004.

Όταν η κύστη εισέρχεται στην περιοχή 2α όλα τα κύτταρά της είναι ίδια, αλλά μέχρι να φτάσει στην περιοχή 2β ένα από τα κύτταρα αυτά θα έχει διαφοροποιηθεί σε ωοκύτταρο και τα υπόλοιπα σε τροφοκύτταρα. Η διαφοροποίηση γίνεται με τη συσσώρευση πρωτεϊνών και mRNAs ειδικών για το ωοκύτταρο. Αρχικά η συγκέντρωσή τους είναι ίδια και στα δύο προωοκύτταρα και μάλιστα εντοπίζεται στις δύο πλευρές του μεγαλύτερου διαύλου που ενώνει τα δύο κύτταρα. Μέχρι την έξοδο της κύστης από την περιοχή 2α τα συγκεκριμένα βιομόρια έχουν συσσωρευτεί μόνο στο ωοκύτταρο. Υπάργουν δύο θεωρίες για τον τρόπο με τον οποίο αποφασίζεται ποιό κύτταρο από τα δύο θα γίνει ωοκύτταρο. Η πρώτη βασίζεται στη συμμετρική συμπεριφορά των δύο προ-ωοκυττάρων μέχρι την περιοχή 2α, όπου και προτείνεται η ύπαρξη ενός ανταγωνισμού μεταξύ τους. Το κύτταρο που «κερδίζει» γίνεται ωοκύτταρο και αυτό που «χάνει» διαφοροποιείται σε τροφοκύτταρο. Η δεύτερη υποστηρίζει ότι η διαλογή κατευθύνεται από την ασυμμετρία η οποία έχει καθιερωθεί από την πρώτη κιόλας διαίρεση της κύστης. Το μοντέλο αυτό δικαιολογείται από την ύπαρξη αλλά και τον ασύμμετρο διαχωρισμό του συναπτοσώματος, καθώς μετά από κάθε μιτωτική διαίρεση τα δύο τρίτα του οργανιδίου παραμένουν στο πατρικό κύτταρο και μόνο το ένα τρίτο μεταφέρεται στο θυγατρικό. Έτσι το αυθεντικό συναπτόσωμα καθορίζει το ωοκύτταρο και ελαχιστοποιεί την πιθανότητα και τα δύο προ-ωοκύτταρα να μετεξελιχθούν σε ωοκύτταρα (Huynh and St Johnston, 2004).

Μέχρι την έξοδο από την περιοχή 2β του γερμαρίου στο ωοκύτταρο αναπτύσσεται ένα κέντρο οργάνωσης μικροσωληνίσκων (Microtubules-Organizing Center - MTOC), το οποίο δημιουργεί ένα δίκτυο σύνδεσης με τα υπόλοιπα 15 τροφοκύτταρα (González-Reyes et al., 1997). Στο ωοκύτταρο ακολουθεί και δεύτερη μείωση, ενώ ταυτόχρονα τα θυλακοκύτταρα αρχίζουν να περιβάλλουν τα κύτταρα της γαμετικής σειράς. Εξερχόμενο το ωοθυλάκιο στην περιοχή 3, όλα τα συστατικά και οργανίδια του ωοκυττάρου έχουν συγκεντρωθεί στον εμπρόσθιο πόλο του, δημιουργώντας το σωμάτιο Balbiani (Huvnh and St Johnston, 2004). Το ωοκύτταρο πλέον βρίσκεται στο οπίσθιο μέρος της κύστης. Βγαίνοντας από την περιοχή του γερμαρίου το ωοκύτταρο αποκτά πολικότητα, με βάση τις θέσεις συγκεκριμένων mRNAs, τα οποία θα μεταφραστούν κατά τη διάρκεια του εμβρύου. Τα mRNAs που καθορίζουν την πολικότητα του εντόμου είναι τα oskar, bicoid, gurken και nanos και το καθένα εντοπίζεται σε συγκεκριμένα σημεία στο ωοκύτταρο (Εικόνα 1.18). Η οπίσθια – εμπρόσθια πολικότητα (κεφάλι – κοιλιά) καθορίζεται από την εναπόθεση των oskar και nanos mRNAs στο οπίσθιο τμήμα του ωοκυττάρου και του bicoid mRNA στο εμπρόσθιο. Ο ραγιαίος - κοιλιακός άξονας καθορίζεται de novo κατά τη μέση ωογένεση από το gurken mRNA, το οποίο βρίσκεται κοντά στον πυρήνα του ωοκυττάρου και μεταφράζεται σε μια ομόλογη του TGFa (Transforming Growth Factor a) πρωτεΐνη, η οποία αφού προσδένεται στον EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) των υπερκειμένων θυλακοκυττάρων τον ενεργοποιεί και έτσι καθορίζει την περιοχή της ράχης του εντόμου (Kugler and Larsko, 2009; Atkey et al., 2006). Κατά συνέπεια, οι δύο σημαντικές πολικότητες του εντόμου (ραγιαίος - κοιλιακός άξονας και οπίσθιο - εμπρόσθιο τμήμα) καθορίζονται πριν τη γονιμοποίηση του αυγού, κατά τη διάρκεια της ωογένεσης

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

(González-Reyes et al., 1997). Τέλος, το DNA του ωοκυττάρου συμπυκνώνεται και πλέον ονομάζεται καρυόσωμα (karyosome), ενώ ταυτόχρονα τα τροφοκύτταρα γίνονται πολυπλοειδικά.



Εικόνα 1.18: Η ενδοκυτταρική διαμερισματοποίηση των mRNAs είναι ένας γενικός μηχανισμός που παίζει σημαντικό ρόλο στην πολικότητα πολλών τύπων κυττάρων. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτού του φαινομένου παρέχεται από το ωοκύτταρο της Drosophila, όπου ο εντοπισμός των bicoid, oskar και gurken mRNAs σε τρεις διαφορετικές θέσεις εντός του κυττάρου καθορίζει την πολικότητα του εμπρόσθιου – οπίσθιου αλλά και του ραχιαίου – κοιλιακού άζονα του εμβρύου. Πηγή: http://mol-biol4masters.masters.grkraj.org/html/Developmental_Biology1-Drosophila.htm.

1.10.3.2 Βιτελλάριο

Όπως ήδη αναφέρθηκε, το βιτελλάριο αποτελείται από ωοθυλάκια διαφορετικών σταδίων, τα οποία διαχωρίζονται με βάση: 1) το μέγεθος και τη θέση που βρίσκονται μέσα στο ωοθηκάριο, 2) το μέγεθος του ωοκυττάρου συγκριτικά με το μέγεθος των τροφοκυττάρων, 3) τη μορφολογία των πυρήνων των τροφοκυττάρων, 4) την ύπαρξη και τον τύπο διαφόρων οργανιδίων στο εσωτερικό του ωοκυττάρου, καθώς και 5) την ύπαρξη των διαφορετικών ζωνών του χορίου (*King, 1970*). Με βάση αυτά τα χαρακτηριστικά, τα ωοθυλάκια διαχωρίζονται σε προβιτελλογενετικά, βιτελλογενετικά και χοριογενετικά.

1.10.3.3 Προβιτελλογενετικά στάδια

Τα προβιτελλογενετικά στάδια αποτελούν τα στάδια της πρώιμης ωογένεσης (early oogenesis). Ως προβιτελλογενετικά κατατάσσονται τα στάδια 2 - 6, τα οποία είναι μικρά σε μέγεθος. Στα στάδια αυτά τα τροφοκύτταρα αυξάνονται με τον ίδιο ρυθμό που αυξάνεται το ωοκύτταρο. Σε αντίθεση με τα τροφοκύτταρα που γίνονται αμέσως πολυπλοειδικά, τα θυλακοκύτταρα πρώτα αυξάνουν σε αριθμό και μετά μετατρέπονται σε πολυπλοειδικά κύτταρα. Συγκεκριμένα, στο στάδιο 2 υπάρχουν 80 θυλακοκύτταρα περιμετρικά του ωοθυλακίου τα οποία φτάνουν τα 650 στο στάδιο 6, όπου και σταματούν να πολλαπλασιάζονται περαιτέρω (Margolis and Spradling, 1995). Χαρακτηριστικό των προβιτελλογενετικών σταδίων είναι η απουσία λεκίθου από το ωοκύτταρο (**Εικόνα 1.19**).



Εικόνα 1.19: Φωτονιογραφία, στην οποία φαίνεται η δομή των προβιτελλογενετικών σταδίων. ΩΚ = ωοκύτταρο, ΘΚ = θυλακοκύτταρα, ΤΚ = τροφοκύτταρα. Ράβδος μεγέθυνσης = 50 μm.

1.10.3.4 Βιτελλογενετικά στάδια

Βιτελλογένεση καλείται η διαδικασία αποθήκευσης θρεπτικών συστατικών στο ωοκύτταρο, τα οποία θα χρησιμοποιηθούν κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης για την ανάπτυξη του εμβρύου. Η βιτελλογένεση χρησιμοποιείται από όλα τα ασπόνδυλα καθώς και κάποια σπονδυλωτά, όπως τα πτηνά. Στη Drosophila melanogaster η εναπόθεση θρεπτικών συστατικών (λεκιθοπρωτεϊνών, Yolk proteins –Yps) γίνεται κατά τα στάδια 8 – 10. Η μεγαλύτερη ποσότητα λεκίθου παράγεται από το λιπαρό σώμα, εκκρίνεται στην αιμολέμφο και λαμβάνεται από το ωοκύτταρο μέσω ενδοκύτωσης, η οποία επιτυγχάνεται με τη μεσολάβηση του Yolkless υποδοχέα. Ποσότητα όμως λεκίθου παράγουν και τα σωματικής προέλευσης θυλακοκύτταρα. Η λέκιθος, αφού ενδοκυτωθεί, αποθηκεύεται αρχικά σε πρώιμα ενδοσώματα και στη συνέχεια σε ώριμα ενδοσώματα (α-λεκιθοσφαιρίδια), ώστε να καταναλωθεί αργότερα κατά την εμβρυογένεση (Sommer et al., 2005; Tufail and Takeda, 2008). Τα ώριμα αυτά ενδοσώματα αποτελούν τροποποιημένα λυσοσώματα, στα οποία το pH βρίσκεται σε υψηλές τιμές κατά την ωογένεση, ενώ πέφτει κατά την εμβρυογένεση (Fagotto, 1995). Το βασικότερο χαρακτηριστικό των βιτελλινικών σταδίων είναι η άνιση ανάπτυξη του ωοκυττάρου συγκριτικά με τα τροφοκύτταρα, κυρίως λόγω της πρόσληψης των λεκιθοπρωτεϊνών.

Εκτός από τις λεκιθοπρωτεΐνες, κατά τα βιτελλογενετικά στάδια, τα θυλακοκύτταρα συνθέτουν και εκκρίνουν τις 4 δομικές πρωτεΐνες (sV17, sV23, Vm32E και Vm34C) της βιτελλινικής μεμβράνης (Vitellin Proteins – VPs) και κάποιους από τους παράγοντες που εμπλέκονται στον καθορισμό του άξονα του εμβρύου, όπως η πρωτεΐνη Torsolike που διευθετεί τον άξονα κεφάλι – κοιλιά στο έμβρυο (Ventura et al., 2010; Trougakos et al., 2001; LeMosy, 2003).

Η λέκιθος εντοπίζεται εντός του ωοκυττάρου στα α-λεκιθοσφαιρίδια πρώτη φορά στο στάδιο 8 (Εικόνα 1.20Α-Β). Στο στάδιο αυτό εμφανίζονται επίσης β-λεκιθοσφαιρίδια, τα οποία δεν περιβάλλονται από μεμβράνη όπως τα α-λεκιθοσφαιρίδια και αποτελούν συσσωματώματα φωσφολιπιδίων και πολυσακχαριτών (*Papassideri et al., 2007; Tufail and Takeda, 2008*). Κατά το στάδιο 9, το ωοκύτταρο αρχίζει να μεγαλώνει κατά πολύ συγκριτικά με τα τροφοκύτταρα, ενώ ταυτόχρονα στην περιφέρεια του ωοκυττάρου σχηματίζονται τα βιτελλινικά σωμάτια (Vitellin Bodies), τα οποία και αποτελούν τους πρόδρομους της βιτελλινικής μεμβράνης (Εικόνα 1.20Β και Γ). Στο επόμενο στάδιο, το στάδιο 10, το ωοθυλάκιο αυξάνει σημαντικά σε όγκο, τα βιτελλινικά σωμάτια συντήκονται μεταξύ τους σε μεγαλύτερες συναθροίσεις και τελικά σχηματίζουν μία συνεχή στιβάδα πάχους 1,6 μm, της οποίας η σύνθεση ολοκληρώνεται στο στάδιο 10C. Με την έξοδο του ωοθυλακίου από το στάδιο 10, η βιτελλινική μεμβράνη είναι πλέον μία ελαστική άμορφη και σπογγώδης μεμβράνη (*Margaritis, 1985*) (Εικόνα 1.20Δ και Ε).



Εικόνα 1.20: Βιτελλογένεση στο έντομο Drosophila melanogaster. Α. Διαγραμματική απεικόνιση των γεγονότων που τελούνται στα βιτελλογενετικά στάδια της ωογένεσης (8-10C). Παρατηρείται η συνεχής σύνθεση της βιτελλινικής μεμβράνης (VM, Vitelline Membrane), η μείωση του

όγκου των θυλακοκυττάρων (FC, Follicle Cells) και η συσσώρευση λεκιθοσφαιριδίων στο ωοκύτταρο (OC, Oocyte). Ανατύπωση από Μεσσήνη, 1982 **Β.** Φωτονιογραφία στην οποία επισημαίνονται τα στάδια 7, 8 και 9 της μέσης ωογένεσης. Η λέκιθος που ξεκινά να αποθηκεύεται στο ωοκύτταρο του σταδίου 8 προσδίδει στο ωοκύτταρο ένα σκούρο καφέ χρώμα. Επίσης, διακρίνεται η μεγάλη διαφορά μεγέθους του ωοθυλακίου μετά το στάδιο 9. Ράβδος μεγέθυνσης = 100 μm. **Γ-Ε.** Ηλεκτρονιογραφίες λεπτής δομής ωοθυλακίων. Ράβδοι μεγέθυνσης=1,6 μm. **Γ.** Ηλεκτρονιογραφία ωοθυλακίου σταδίου 9, στο οποίο φαίνονται τα βιτελλινικά σωμάτια (BΣ) στην περιφέρεια του ωοκυττάρου (ΩK), εκεί δηλαδή που έρχεται σε επαφή με τα θυλακοκύτταρα (ΘΚ). **Δ.** Ηλεκτρονιογραφία σταδίου 10, όπου διακρίνονται στη βιτελλινική μεμβράνη (BM) οι μεγαλύτερες συναθροίσεις βιτελλινικών σωματίων, καθώς και τα λεκιθοσφαιρίδια (ΛΣ) στο εσωτερικό του ωοκυττάρου. **Ε.** Ηλεκτρονιογραφία σταδίου 10C, όπου η βιτελλινική μεμβράνη (BM) έχει αποκτήσει την τελική μορφή της.

Η βιτελλινική μεμβράνη αποτελείται κατά 74% από πρωτεΐνες (*Petri et al., 1976*) και είναι το πρώτο στρώμα του κελύφους (egg shell) το οποίο περιβάλλει εξωτερικά το αυγό. Το πάχος της συνεχώς μειώνεται φτάνοντας στο τέλος της χοριογένεσης να είναι 0,3 μm, πιθανά λόγω της πίεσης που υφίσταται από την εναπόθεση των ζωνών του χορίου (*Margaritis, 1985*).

1.10.3.5 Χοριογενετικά στάδια

Η χοριογένεση συντελείται στην τελική φάση της ωογένεσης, στα στάδια 11 – 14, και περιλαμβάνει τα γεγονότα για τη σύνθεση των ζωνών του χορίου. Σημαντικό ρόλο στην ολοκλήρωση της διαδικασίας διαδραματίζουν τα θυλακοκύτταρα, τα οποία είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση και έκκριση του κεριού, καθώς και πολλών δομικών πρωτεϊνών. Μόλις ολοκληρωθεί το κέλυφος του αυγού, τα θυλακοκύτταρα εκφυλίζονται. Η διεξοδική ανάλυση του χορίου από τους Margaritis *et al.* (1980) καθιέρωσε την ακτινωτή πολυπλοκότητά του, η οποία αφορά στο επίπεδο διαφοροποίησης των κυττάρων, αλλά και την οριζόντια πολυπλοκότητά του, η οποία αντιστοιχεί στη διαφοροποίηση των ζωνών του χορίου.

Το κέλυφος αποτελείται από: τη βιτελλινική μεμβράνη (πάχους 300 nm), τη ζώνη κεριού (υδρόφοβες πλάκες πάχους 300 – 500 nm), την εσωτερική χοριονική ζώνη (Innermost Chorionic Layer – ICL, κρυσταλλίτες πάχους 40 – 50 nm), το δάπεδο του ενδοχορίου (Inner Endochorion – ΙΕ, σύμπλεγμα ινιδίων πάχους 40 nm), τους στυλίσκους (Pillars – P), την οροφή του ενδοχορίου (Outer Endochorion – OE, πάχους 200 nm) και το εξωχόριο (Exochorion, δίκτυο χαλαρά διατεταγμένων ινών πάχους 300 – 500 nm) (**Εικόνα 1.21**) (*Margaritis et al., 1980; Papassideri et al., 1993; Papassideri and Margaritis, 1996*).



Εικόνα 1.21: Ακτινωτή πολυπλοκότητα του κελύφους. Α. Ηλεκτρονιογραφία λεπτής δομής του κελύφους. Ράβδος μεγέθυνσης = 900 nm. **B.** Σχηματική αναπαράσταση της ακτινωτής πολυπλοκότητας των ζωνών του κελύφους από έζω προς τα μέσα αλλά και από μέσα προς τα έζω. ΕΧ = εζωχόριο, ΕΝ = ενδοχόριο, ICL = εσωτερική κρυσταλλική ζώνη, WL = ζώνη κεριού, VM = βιτελλινική μεμβράνη. Τροποποίηση από Margaritis et al., 1980.

Η χοριογένεση ξεκινά στο στάδιο 11, όπου το ωοκύτταρο καταλαμβάνει πλέον τα 2/3 του ωοθυλακίου. Στο στάδιο αυτό ενεργοποιείται η σύνθεση των αναπνευστικών νηματίων του αυγού, ταυτόχρονα με τη συγκρότηση της εσωτερικής χοριονικής ζώνης. Κατά το στάδιο 12, παρατηρούνται για πρώτη φορά τα αναπνευστικά νημάτια. Το ενδοχώριο έχει σχηματιστεί στο εμπρόσθιο – ραχιαίο τμήμα του ωοκυττάρου και συντίθεται στο κυρίως τμήμα του αυγού, ενώ στο τελευταίο διακρίνεται και το στρώμα κεριού. Τέλος, στο στάδιο αυτό διαχωρίζεται και η ICL (σε κρυσταλλική μορφή) από το ενδοχόριο στην περιοχή του πώματος. Στο στάδιο 13, ολοκληρώνεται η σύνθεση των στυλίσκων και ξεκινά η έκκριση συστατικών για την οροφή του χορίου, η οποία ολοκληρώνεται στο κύριο τμήμα του ωοθυλακίου. Τα αναπνευστικά νημάτια συνεχίζουν να επιμηκύνονται και στο εμπρόσθιο άκρο δημιουργείται ενδοχόριο. Τέλος, στο στάδιο 14, το δίκτυο της οροφής ολοκληρώνεται σε όλο το αυγό, διαμορφώνεται το δάπεδο του ενδοχορίου στο κύριο τμήμα, τα αναπνευστικά νημάτια φτάνουν στο μέγιστο μήκος τους, και εκκρίνεται το εξωχόριο από τα θυλακοκύτταρα, τα οποία τελικά εκφυλίζονται και αποχωρίζονται και αποχωρίζονται από το πλέον ώριμο αυγό.

Η οριζόντια πολυπλοκότητα του αυγού συνιστάται από τις διαφορετικές, εξειδικευμένες περιοχές του κελύφους (Εικόνα 1.22). Αναλυτικά οι περιοχές αυτές είναι: το πώμα, το κολάρο, η μικροπύλη, τα δύο αναπνευστικά νημάτια και ο οπίσθιος πόλος.



Εικόνα 1.22: Οριζόντια πολυπλοκότητα του κελύφους. Α. Τα βέλη δείχνουν το κολάρο (άσπρο) και τα αναπνευστικά νημάτια (κόκκινο). **Β** Φωτονιογραφία, στην οποία φαίνονται τα αποτυπώματα των εκφυλισμένων θυλακοκυττάρων (γκρι βέλος). Γ. Στη φωτογραφία το κίτρινο βέλος αντιστοιχεί στη μικροπύλη. Ράβδοι μεγέθυνσης = 100 nm.

1.10.3.6 Κυτταρικός θάνατος κατά την ωογένεση

Ο κυτταρικός θάνατος αποτελεί απαραίτητη διαδικασία για την ανάπτυξη της Drosophila. Μεγάλος αριθμός κυττάρων πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, της διαφοροποίησης των εμβρυϊκών δίσκων της προνύμφης, αλλά και κατά τη διάρκεια της μεταμόρφωσης της νύμφης σε τέλειο έντομο. Εκτεταμένος κυτταρικός θάνατος ανιχνεύεται επίσης στο ενήλικο θηλυκό έντομο, κατά την ωογένεση, ως μέρος της φυσιολογικής ανάπτυξης των ωοθυλακίων, αλλά και ως απόκριση σε διάφορες μη ευνοϊκές περιβαλλοντικές συνθήκες.

Οι κύριες μορφές του κυτταρικού θανάτου είναι η απόπτωση, ο κυτταρικός θάνατος μέσω αυτοφαγίας και η νέκρωση. Ωστόσο, οι τρεις αυτοί τύποι δεν είναι οι μοναδικοί που έχουν περιγραφεί (Kroemer et al., 2009; Galluzzi et al., 2012). Μέχρι σήμερα, και οι τρεις τυπικές μορφές κυτταρικού θανάτου έχουν βρεθεί στη Drosophila. Η πλειονότητα των κυττάρων που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης και της διαφοροποίησης της προνύμφης αποπίπτουν, ενώ ορισμένοι κυτταρικοί πληθυσμοί που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της μεταμόρφωσης της νύμφης ακολουθούν τον αυτοφαγικό κυτταρικό θάνατο. Αντιθέτως, η νέκρωση έχει περιγραφεί μόνο σε μεταλλαγμένα στελέχη Drosophila ή σε παθολογικές καταστάσεις.

Στην απόπτωση, ένα κύτταρο σκοτώνει εσκεμμένα τον εαυτό του και ενορχηστρώνει την απομάκρυνσή του χωρίς να προκαλεί φλεγμονώδη αντίδραση (*Galluzzi et al., 2012*). Ένα κύτταρο το οποίο αποπίπτει παρουσιάζει τα εξής μορφολογικά χαρακτηριστικά: 1) συρρίκνωση του πυρήνα και του κυττάρου, 2) θρυμματισμένο γονιδιωματικό DNA, 3) διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης, 4) φυσαλιδοποίηση της μεμβράνης και 5) δημιουργία αποπτωτικών σωματίων (apoptotic bodies) (*Taylor et al., 2008*). Σε μοριακό επίπεδο, η απόπτωση ελέγχεται

<u>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u>

από μία δυναμική ισορροπία μεταξύ αποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως οι κασπάσες, και αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως οι αποπτωτικοί αναστολείς (Inhibitor of Apoptosis Proteins – IAPs).

Στη Drosophila, έχουν βρεθεί τέσσερα ομόλογα γονίδια που κωδικοποιούν IAPs, δύο που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 και από ένα ομόλογο για τις πρωτεΐνες Apaf-1, p53, TNF (Tumor Necrosis Factor), και TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor). Όσον αφορά στις κασπάσες, από τις 7 που έχουν εντοπιστεί στη Drosophila, 2 είναι κασπάσες εναρκτές (Dronc και Dredd), 4 είναι κασπάσες τελεστές (Dcp-1, Drice, Damm, Decay), ενώ μία δεν έχει αποσαφηνιστεί ο ρόλος της (Strica) (McCall, 2004).

Στο εν λόγω έντομο, οι αποπτωτικοί αναστολείς είναι βασικοί ρυθμιστές της απόπτωσης και ο βασικότερος είναι ο DIAP1, ο οποίος καταστέλλει την ενεργοποίηση των κασπασών μέσω ουβικιτινυλίωσης τους. Άλλοι σημαντικοί ρυθμιστές της απόπτωσης είναι ο παράγοντας Ark (ορθόλογο του *Apaf-1* των θηλαστικών) και αρκετές πρωτεΐνες με δραστικότητα λιγάσης ουβικιτίνης, όπως η dBruce. Ο Ark σχηματίζει σύμπλοκο, γνωστό ως αποπτώσωμα, με την εναρκτήρια κασπάση Drone (ορθόλογο της κασπάσης 9) (*McCall, 2004*).

Στους περισσότερους ιστούς της Drosophila, η έκφραση των ανταγωνιστών των IAPs όπως reaper, grim και head involution defective (HID), τα γονίδια των οποίων αποκαλούνται συχνά RHG γονίδια, οδηγεί τα κύτταρα σε απόπτωση. Αυτές οι πρωτεΐνες φέρουν μοτίβα πρόσδεσης (IAP Binding Motif) στις περιοχές αναστολής της απόπτωσης (Baculovirus Inhibitor of Apoptosis Protein Repeat – BIR domains) των IAPs και έτσι τους καταστέλλουν. Μόλις κάποιο ερέθισμα οδηγήσει σε αποδόμηση του DIAP1, η ενεργοποιημένη κασπάση εναρκτής Dronc ενεργοποιεί τις κασπάσες τελεστές DrIce και Dcp-1 (Εικόνα 1.23). Μεταξύ των υποστρωμάτων των κασπασών είναι η κασπασο-ενεργοποιούμενη DNάση (Caspase-Activated Dnase – dCAD/Rep4) που κόβει το DNA, ανάμεσα στα νουκλεοσώματα, συστατικά του κυτταροσκελετού, όπως η ακτίνη και οι λαμίνες, καθώς και υπομονάδες του πρωτεασώματος. Ταυτόχρονα με τη διάλυση του πυρήνα και του κυτταροσκελετού καταστρέφεται και το μιτοχονδριακό δίκτυο (Jenkins et al., 2013).



Εικόνα 1.23: Οι ρυθμιστές της απόπτωσης είναι συντηρημένοι μεταξύ της Drosophila και των θηλαστικών. Στη Drosophila τα προϊόντα των RHG γονιδίων αποτελούν τους ανταγωνιστές των IAPs, όπως ο DIAP1 και οδηγούν σε ενεργοποίηση της εναρκτήριας κασπάσης Dronc και των τελεστών κασπασών Dcp1 και DrIce. Στα θηλαστικά, οι ανταγωνιστές SMAC/DIABLO και HtrA2 αποτελούν τους ανταγωνιστές των IAPs και η διαφορά με τα έντομα έγκειται στη συγκρότηση του αποπτωσώματος με το κυτόχρωμα c. Τροποποίηση από Fuchs and Steller, 2015.

Στη μακροαυτοφαγία (θα αναφέρεται πλέον ως αυτοφαγία), τα κυτταροπλασματικά συστατικά εγκολπώνονται στο εσωτερικό κυστιδίων με διπλή μεμβράνη και υδρολύονται μέσω λυσοσωμικών ενζύμων. Η αυτοφαγία αποτελεί τόσο μηχανισμό επιβίωσης όσο και μηχανισμό θανάτου. Οι πρωτεΐνες και τα οργανίδια περικλείονται σε ένα κυστίδιο που ονομάζεται αυτοφαγόσωμα (autophagosome), το οποίο συντήκεται τελικά με ένα λυσόσωμα που διασπά το περιεχόμενό του. Η όλη διαδικασία ελέγχεται από μία ομάδα πρωτεϊνών αποκαλούμενων Atg (Autophagy-Related) που σχετίζονται με την αυτοφαγία (*Denton et al., 2014*). Η αυτοφαγία μπορεί να είναι επιστατικός του άλλου. Μερικές φορές, όταν η απόπτωση εμποδίζεται, η αυτοφαγία ενεργοποιείται ως μηχανισμός κυτταρικού θανάτου (*Hou et al., 2008*).

Η νέκρωση αποτελεί πλέον ένα ενορχηστρωμένο μηχανισμό προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου και όχι το αποτέλεσμα τραυματισμού των κυττάρων. Χαρακτηρίζεται από

διόγκωση του κυτταρικού όγκου και των οργανιδίων, γεγονός που οδηγεί τελικά σε διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης. Τα βιοχημικά γεγονότα της νέκρωσης είναι η αύξηση του κυτοσολικού ασβεστίου και των ROS, μειωμένα επίπεδα ATP και χαμηλό pH, καθώς και η απελευθέρωση φλεγμονωδών σημάτων (Jenkins et al., 2013).

Στο ενήλικο θηλυκό έντομο, κυτταρικός θάνατος εμφανίζεται επίσης σποραδικά κατά την ωογένεση στην περιοχή 2 του γερμαρίου και στα στάδια 7-9 της μέσης ωογένεσης. Τα σημεία αυτά αποτελούν τα «σημεία ελέγχου» της ωογένεσης. Ο κυτταρικός θάνατος σε αυτές τις περιοχές έχει παρατηρηθεί ότι επάγεται ως απόκριση στην κακή διατροφή (Drummond-Barbosa and Spradling, 2001). Γενικά, ο επαγόμενος κυτταρικός θάνατος κατά την ωογένεση έχει μελετηθεί κυρίως μέσω της καλλιέργειας των ενήλικων εντόμων απουσία τροφής ή σε τροφή με μειωμένα θρεπτικά συστατικά, ενώ άλλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες δεν έχουν μελετηθεί ακόμα διεξοδικά. Θεωρείται ότι αυτά τα σημεία ελέγχου υπάρχουν πριν από τη διαδικασία της βιτελλογένεσης, η οποία είναι πολύ ενεργοβόρα για το έντομο, ώστε να αποτραπεί η δαπάνη επιπλέον ενέργειας για τη δημιουργία μη ικανών ή μεταλλαγμένων προς γονιμοποίηση αυγών (Drummond-Barbosa and Sprandling, 2001).

Όσον αφορά στο «σημείο ελέγχου» του γερμαρίου, η τεχνική TUNEL ανιχνεύει θετικό σήμα θρυμματισμένου DNA στην περιοχή 2 και κατά συνέπεια ο μηχανισμός του κυτταρικού θανάτου που παρατηρείται στη συγκεκριμένη περιοχή πιθανά είναι η απόπτωση. Οι Barbosa και Sprandling το 2001 έδειξαν ότι άτομα που κατανάλωναν τροφή που στερούνταν θρεπτικά συστατικά εμφάνισαν αυξημένο κυτταρικό θάνατο στο σημείο όπου η βλαστοκύστη των 16 κυττάρων περιβάλλεται από θυλακοκύτταρα. Λόγω του μειωμένου πολλαπλασιαστικού δυναμικού των τροφοκυττάρων έναντι των κυττάρων της γαμετικής σειράς, σε συνθήκες μειωμένης τροφής, μεγάλος αριθμός κυττάρων της γαμετικής σειράς αποπίπτει ώστε να διατηρηθεί η αριθμητική αναλογία αυτών με τα θυλακοκύτταρα (Drummond-Barbosa και Sprandling, 2001). Πιο πρόσφατες έρευνες έχουν δείζει ότι ο θάνατος των κυττάρων της γαμετικής σειράς στο γερμάριο πιθανά πραγματοποιείται μέσω αυτοφαγίας (Nezis et al., 2009). Η κασπάση Dcp-1 φαίνεται ότι ρυθμίζει θετικά τον αυτοφαγικό θάνατο σε αυτό το «σημείο ελέγχου» και ο IAP dBruce διαθέτει ανασταλτικό ρόλο (Hou et al., 2008).

Στο δεύτερο «σημείο ελέγχου» της μέσης ωογένεσης, ο μηχανισμός της απόπτωσης, όπως αποκαλύπτεται από το θρυμματισμένο DNA, έχει επίσης ενεργοποιηθεί ισχυρά. Ωστόσο, σε αυτό το «σημείο ελέγχου» δε φαίνεται να συμμετέχουν τα RHG γονίδια. Μελέτες έχουν δείξει ότι σε κύτταρα που υφίστανται μιτώσεις χωρίς κυτταροκίνηση, τα οποία μετατρέπονται σε πολυπλοειδικά (όπως τα τροφοκύτταρα και θυλακοκύτταρα), τα RHG γονίδια δεν μπορούν να ενεργοποιηθούν, προτείνοντας έτσι ότι οι συγκεκριμένοι γενετικοί τόποι είναι ειδικά κατασταλμένοι (*Mehrotra et al., 2008*) Το πρώτο γονίδιο που φαίνεται να ρυθμίζει τον αποπτωτικό θάνατο των κυττάρων της γαμετικής σειράς είναι η κασπάση τελεστής Dcp-1, καθώς στελέχη που φέρουν μεταλλαγμένη μορφή αυτής εμφανίζουν «αθάνατα» ωοθυλάκια χωρίς θυλακοκύτταρα. Τέτοια ωοθυλάκια παρατηρούνται και μετά από υπερέκφραση των p35 και DIAP1 (*Mazzalupo and Cooley, 2006; Laundrie et al., 2003*). Παρόλα αυτά, μεταλλαγές σε μεμονωμένες εναρκτήριες κασπάσες οδηγούν σε πολύ πιο ήπιο φαινότυπο, δείχνοντας ότι η ρύθμιση της ενεργοποίησης των κασπασών τελεστών είναι διαφορετική από ό,τι συνήθως και πιο συγκεκριμένα χρειάζεται τη συνεργασία των Dronc και Strica (*Baum et al., 2007*). Μελέτες με στελέχη που φέρουν μεταλλαγμένο τον παράγοντα TOR (Target Of Rapamycin) δείχνουν ότι πιθανός ρυθμιστής της απόπτωσης που προκαλείται από τη μειωμένη θρεπτικά τροφή είναι ο συγκεκριμένος παράγοντας (*Peterson et al., 2007*). Παράλληλα με την απόπτωση, στα στάδια αυτά, έχουν ανιχνευτεί και αυτοφαγικά σωμάτια, ενώ σε στελέχη στα οποία λείπουν τα γονίδια *Atg1* και *Atg7* υπάρχει συμπύκνωση της χρωματίνης αλλά λιγότερο θρυμματισμένο DNA. Τέλος, η αυτοφαγία μειώνεται σε στελέχη που φέρουν μεταλλαγμένη Dcp-1 (*Barth et al., 2011; Pritchett and McCall, 2012; Zhang et al., 2006; Hou et al., 2008; Nezis et al., 2009*).

Η απομάκρυνση των νεκρών κυττάρων γενικά γίνεται μέσω της διαδικασίας της εγκόλπωσης. Η εγκόλπωση επιτυγγάνεται από εξειδικευμένα μακροφάγα, ή στην περίπτωση απουσίας μακροφάγων από γειτονικά επιθηλιακά κύτταρα. Στην ωοθήκη της Drosophila κυκλοφορούν πολύ λίγα μακροφάγα (King, 1970) και έτσι η απομάκρυνση των νεκρών κυττάρων της γαμετικής σειράς γίνεται μέσω εγκόλπωσής τους από τα θυλακοκύτταρα. Πράγματι σε μελέτες στέρησης τροφής, τα θυλακοκύτταρα αυξάνουν σε όγκο και εγκολπώνουν τα νεκρά τροφοκύτταρα. Για την εγκόλπωση υπεύθυνος είναι ο υποδογέας Draper, ο οποίος ρυθμίζεται από τον παράγοντα Rac1 που με τη σειρά του είναι υπεύθυνος για την αναδόμηση και αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και την ενεργοποίηση των JNK (c-Jun-N-Terminal) κινασών. Πιο συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι η JNK κινάση basket ενεργοποιείται μετά την έναρξη της εγκόλπωσης (Etchegaray et al., 2012). Ωστόσο, εκτός του Rac1, το μονοπάτι των JNK κινασών ενεργοποιείται και από την JNKK κινάση hemipterous και μάλιστα η έκφραση της συγκεκριμένης κινάσης απουσία draper φαίνεται να ενεργοποιεί αποτελεσματικά την εγκόλπωση, γεγονός που σημαίνει ότι μπορεί να ενεργοποιεί άλλες οδούς ανεξάρτητες του της συγκεκριμένης κινάσης προκαλεί την εγκόλπωση Draper. Υπερέκφραση των τροφοκυττάρων από τα θυλακοκύτταρα και σε φυσιολογική τροφή, αποκαλύπτοντας την ικανότητα των θυλακυττάρων να επάγουν τον κυτταρικό θάνατο (Jenkins et al., 2013). Κατά συνέπεια, ο υποδοχέας Draper αναγνωρίζει ένα άγνωστο, μέχρι στιγμής, σήμα από τα τροφοκύτταρα και ενεργοποιεί την πρωτεΐνη Rac1 και τις JNK κινάσες. Το μονοπάτι των JNK κινασών οδηγεί σε περαιτέρω ενεργοποίηση του υποδογέα, δημιουργώντας έτσι μία θετική ανατροφοδότηση όσο η εγκόλπωση προχωράει.

Τέλος, προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος εμφανίζεται και φυσιολογικά κατά την ωογένεση, στα χοριογενετικά στάδια, σε τροφοκύτταρα και θυλακοκύτταρα, τα οποία έχουν απομακρυνθεί εντελώς κατά το στάδιο 14. Κατά τα στάδια αυτά, τα τροφοκύτταρα που προμηθεύουν το ωοκύτταρο με πρωτεΐνες, mRNAs και οργανίδια μεταφέρουν όλο το κυτταρικό τους περιεχόμενο στο ωοκύτταρο και πεθαίνουν. Παρά την εκτεταμένη μελέτη γύρω από το συγκεκριμένο αναπτυξιακό θάνατο από τη δεκαετία του 1930, ακόμη ο ακριβής μηχανισμός αλλά και το σήμα που τον ενεργοποιεί παραμένουν άγνωστα. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα τροφοκύτταρα παρουσιάζουν θρυμματισμένο DNA (*Nezis et al., 2000; 2002; 2006a*). Σημαντικό εύρημα αποτέλεσε το γεγονός ότι ούτε τα RHG γονίδια αλλά ούτε και κάποιος άλλος γνωστός προ-αποπτωτικός παράγοντας, όπως ο μεταγραφικός παράγοντας p53, διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στον αναπτυξιακά προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο των τροφοκυττάρων στα χοριογενετικά στάδια (Peterson et al., 2007). Παράλληλα, υπερέκφραση των αναστολέων κασπασών p35 και DIAP1, καθώς και μεταλλαγμένων κασπασών, δεν προκαλούν αισθητή μείωση του θανάτου (Jenkins et al., 2013). Κατά συνέπεια, η απόπτωση ρυθμίζεται διαφορετικά στα στάδια αυτά και πιθανά δεν αποτελεί το μόνο μηχανισμό θανάτου που λαμβάνει χώρα. Υπάρχουν μελέτες που έχουν δείξει ότι ένας άλλος πιθανός μηχανισμός είναι η αυτοφαγία, καθώς αυτοφαγικά σωμάτια έχουν εντοπιστεί γύρω από τον πυρήνα των τροφοκυττάρων. Επίσης, στελέχη που φέρουν μεταλλαγμένα Atg γονίδια έχει δειχτεί ότι στο στάδιο 14 έχουν ακόμα κάποια τροφοκύτταρα (Velentzas et al., 2007; Nezis et al., 2010). Έτσι, η αυτοφαγία ή η απόπτωση μόνες τους έχουν ώτι η αυτοφαγία και η απόπτωση δε λειτουργούν πλειοτροπικά, αλλά μάλλον σε συνδυασμό και με άλλες οδούς για τη διεξαγωγή του θανάτου των τροφοκυττάρων τροφοκυττάρων κατά τα τελευταία στάδια της ωογένεσης (Peterson and McCall, 2013).

Ο θάνατος των θυλακοκυττάρων στα τελευταία στάδια της ωογένεσης παραμένει μία άγνωστη διαδικασία. Τα θυλακοκύτταρα εξαφανίζονται μετά από την εγκόλπωση των τροφοκυττάρων και τη δημιουργία του χορίου. Μελέτες έχουν δείξει ότι μόνο ένας μικρός αριθμός θυλακοκυττάρων στο εμπρόσθιο τμήμα του αυγού, τα οποία παραμένουν συνδεδεμένα με το ωοκύτταρο, περιέχουν συμπυκνωμένη χρωματίνη και παρουσιάζουν θετικό σήμα μετά από χρώση με πορτοκαλί της ακριδίνης, μία χρωστική που είναι δείκτης του θρυμματισμένου DNA. Στα κύτταρα αυτά, βρέθηκαν και αυτοφαγοσώματα, χωρίς όμως να εντοπιστεί ενεργότητα κασπάσης (*Nezis et al., 2002; 2006b*). Σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα, ο θάνατος των θυλακοκυττάρων πιθανά λαμβάνει χώρα μέσω ενός αυτοφαγικού μηχανισμού, ο οποίος δε χρησιμοποιεί κασπάσες σε αντίθεση με το θάνατο των τροφοκυττάρων στα συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια.

1.11 Ο ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ p53

Η πρωτεΐνη p53 αποτελεί ένα μεταγραφικό παράγοντα γνωστό ως Παράγοντα Καταστολής Όγκου (Tumor Suppressor Factor). Ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου στον οποίο εκφράζεται αλλά και το εξωγενές ερέθισμα στο οποίον απαντά, μπορεί να προκαλέσει διαφορικές κυτταρικές αποκρίσεις, όπως η αναστολή του κυτταρικού κύκλου ή η απόπτωση, έναντι στρεσογόνων παραγόντων, με χαρακτηριστικά παραδείγματα το οξειδωτικό και γενοτοξικό στρες, ρυθμίζοντας έτσι την έκφραση μιας πληθώρας γονιδίων-στόχων σχετιζόμενων με τον κυτταρικό κύκλο, όπως η κυκλινο-εξαρτώμενη κινάση *CDK1* και ο αναστολέας *p*21, όσο και με την απόπτωση, όπως τα γονίδια *Puma* και *Noxa*. Ο ρόλος του ως «φύλακας του γονιδιώματος» καθιστά το μεταγραφικό παράγοντα p53 καθοριστικό ρυθμιστή του καρκίνου, καθώς μεταλλαγές στο γονίδιό του ή απενεργοποίηση της οδού ενεργοποίησής του, αποτελεί βασική προϋπόθεση για την ανάπτυξη των περισσότερων ανθρώπινων όγκων (*Liu and Xu*, 2011).

Στη Drosophila, η οικογένεια της p53 πρωτεΐνης διαθέτει μόνο ένα μέλος που αναφέρεται ως Dmp53, το οποίο στερείται του μοτίβου SAM (Sterile Alpha Motif) (Jin et al.

2000; Ollmann et al., 2000). Τα Dmp53^{-/-} μεταλλαγμένα έντομα είναι βιώσιμα και γόνιμα, γεγονός που καθιστά τη Drosophila ανεκτίμητο πρότυπο βιολογικό σύστημα για τη μελέτη του συγκεκριμένου παράγοντα. Η προ-αποπτωτική λειτουργία της είναι συντηρημένη στο έντομο Drosophila melanogaster και έχει βρεθεί ότι ενεργοποιεί τον μηχανισμό της απόπτωσης ρυθμίζοντας την έκφραση αναστολέων των IAPs, δηλαδή των RHG γονιδίων. Όπως ήδη έχει αναφερθεί, τα προ-αποπτωτικά RHG γονίδια, προάγουν την απόπτωση μέσω της απενεργοποίησης του αναστολέα κασπασών DIAP1, γεγονός που οδηγεί στην ενεργοποίηση της εναρκτήριας κασπάσης Drone και δύο κασπασών τελεστών, των DrICE και Dcp-1 (Jenkins et al., 2013).

Μελέτες γενοτοξικού στρες στη *Drosophila*, με χρήση ιονίζουσας ακτινοβολίας, έχουν δείξει ότι η ακτινο-επαγόμενη καταστροφή του DNA ενεργοποιεί την *Dm*p53, η οποία προάγει τη μεταγραφή του *rpr* (Reaper) γονιδίου, πυροδοτώντας κατωρροϊκά το μηχανισμό της απόπτωσης. Ωστόσο, στα έντομα, σε αντίθεση με τα θηλαστικά, δε φαίνεται να οδηγεί σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου αλλά ούτε και να ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου *Dacapo*, ορθόλογου του p21 αναστολέα (*Brodsky et al. 2004*).

Ο μεταγραφικός παράγοντας p53 διαδραματίζει επίσης ρόλο στο οξειδωτικό στρες και τη γήρανση. Τα επίπεδα των ROS έχουν σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη και επιβίωση των κυττάρων. Μάλιστα, όπως ήδη έχει αναφερθεί, ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους πυροδοτούν και διαφορετικές κυτταρικές αποκρίσεις. Για παράδειγμα, μικρή αύξηση των ROS οδηγεί σε ενεργοποίηση του αντιοξειδωτικού ρόλου της p53 και κατ' επέκταση στη μεταγραφή γονιδίων όπως η Sestrin, GPx και ALDH (Aldehyde dehydrogenase) (Liu and Xu, 2011). Αυξημένες συγκεντρώσεις ROS προκαλούν την προ-οξειδωτική δράση της p53, η οποία σε αυτή την περίπτωση επάγει την έκφραση άλλων γονιδίων-στόχων, όπως του PIG3 και της οξειδάσης της προλίνης. Ταυτόχρονα, επάγει την έκφραση προ-αποπτωτικών γονιδίων όπως Bax και Puma, ενώ καταστέλλει και την έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στον αντιοξειδωτικό μηγανισμό, όπως ο μεταγραφικός παράγοντας Nrf2 (Liu and Xu, 2011). Όσον αφορά στη διαδικασία της γήρανσης, υπερέκφραση της Dmp53 σε ενήλικα έντομα Drosophila προκάλεσε αύξηση της βιωσιμότητας των αρσενικών εντόμων και μείωση της βιωσιμότητας των θηλυκών. Εκτός της φυλο-ειδικής ανταγωνιστικής απόκρισης, φαίνεται να υπάργει και διαφορετική επίδραση ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο στο οποίον πραγματοποιείται η υπερέκφραση. Ενώ στα θηλυκά η υπερέκφραση στο ενήλικο έντομο μείωσε το προσδόκιμο ζωής, μετριοπαθής υπερέκφραση στο στάδιο της λάρβας προκάλεσε αύξηση αυτής (Waskar et al. 2009). Τέλος, διαφορά στη βιωσιμότητα των ενήλικων εντόμων σημειώθηκε ανάλογα και με τη συγκέντρωση της Dmp53. Με άλλα λόγια, υψηλά επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα κατά το αναπτυξιακό στάδιο της προνύμφης ήταν τοξικά τόσο για τα αρσενικά όσο και για τα θηλυκά έντομα και δεν παρήγαγαν καθόλου ενήλικα άτομα. Ωστόσο, μέτρια υπερέκφραση στο συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο οδήγησε στην παραγωγή ενήλικων εντόμων και των δύο φύλων με αυξημένη βιωσιμότητα (Waskar et al. 2009).

Τέλος, ο συγκεκριμένος μεταγραφικός παράγοντας αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της ομοιόστασης του μεταβολισμού και ρυθμίζει πολλές αποκρίσεις όταν υπάρχει μειωμένη

διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών. Ένα από τα γονίδια-στόχους της p53 είναι το TIGAR (TP53-Induced Glycolysis and Apoptosis Regulator), το προϊόν του οποίου μειώνει τα επίπεδα της 2,6-διφωσφορικής φρουκτόζης, οδηγώντας έτσι στον περιορισμό της γλυκόλυσης (Bensaad et al., 2006). In vitro μελέτες σε καλλιέργειες κυττάρων έχουν δείξει ότι η p53 οδηγεί σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου με σκοπό την επιβίωση σε συνθήκες μειωμένης λήψης γλυκόζης, ρυθμίζει την αυτοφαγία σε συνθήκες πλήρους έλλειψης τροφής και διατηρεί την αντιοξειδωτική ικανότητα των κυττάρων παράλληλα με την αύξηση της επιβίωσης τους μετά από στέρηση σερίνης (Barrio et al., 2014).

1.12 ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΗΛΕΚΤΡΟΜΑΓΝΗΤΙΚΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΣΤΗ DROSOPHILA MELANOGASTER

Όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 1.9, η D. melanogaster αποτελεί ένα πολύ δυναμικό, αξιόπιστο και πολύ-επίπεδο πρότυπο βιολογικό σύστημα, το οποίο έχει γρησιμοποιηθεί μεταξύ άλλωνκαι για τη μελέτη της επίδρασης τόσο της ιονίζουσας όσο και της μη ιονίζουσας ΗΜΑ. Μελέτη της ερευνητικής ομάδας της Rebecca Goodman στο έντομο D. melanogaster, το 2003, αποκάλυψε αύξηση στα επίπεδα της μοριακής συνοδού HSP70, και επαγωγή της φωσφορυλίωσης του μεταγραφικού παράγοντα ELK-1 σε λάρβες. Στη μελέτη αυτή βρέθηκε επίσης αύξηση της αναπαραγωγικής ικανότητας του εντόμου. Η ακτινοβόληση ξεκίνησε στα νεοεκδυθέντα πατρικά έντομα με συμβατικό κινητό τηλέφωνο για 1 ώρα το πρωί και 1 ώρα το μεσημέρι και διήρκησε καθ' όλο τον κύκλο ζωής, δηλαδή συνολικά για 10 ημέρες (Weisbrot et al., 2003). Αντίθετα, μελέτη στην οποία η ακτινοβόληση περιορίστηκε μόνο κατά το στάδιο της λάρβας 3^{ου} αναπτυξιακού σταδίου έδειξε μείωση της αναπαραγωγικής ικανότητας μετά από διακοπτόμενη ακτινοβόληση συνολικά 6 ωρών (3 ώρες ακτινοβόληση – διακοπή μισής ώρας – 3 ώρες ακτινοβόληση) με γεννήτρια που παρήγαγε παλμικό κύμα συγνότητας 10 GHz και SAR 9,8 mW/kg (Atli and Unlu, 2006). Μείωση της αναπαραγωγικής ικανότητας της Drosophila έχει περιγραφεί και σύμφωνα με μελέτες του εργαστηρίου ΗλεκτροΜαγνητικής Βιολογίας του Ομότιμου Καθηγητή Λουκά Χ. Μαργαρίτη (Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ). Συγκεκριμένα, 6λεπτη ημερήσια έκθεση νεοεκδυθέντων ενήλικων εντόμων σε ακτινοβολία συμβατικού κινητού τηλεφώνου GSM 900 MHz για 5 ημέρες οδήγησε σε πτώση 50% - 60% του αριθμού των νυμφών (Panagopoulos et al., 2004). Περαιτέρω έρευνες της συγκεκριμένης ομάδας έδειξαν ότι η έκθεση σε ακτινοβολία GSM 900 MHz και DCS 1800 MHz προκαλεί επαγωγή κυτταρικού θανάτου κατά την ωογένεση (Panagopoulos et al., 2006; Chavdoula et al., 2010). Παρ' όλα αυτά, μία πιο πρόσφατη μελέτη, στην οποία χρησιμοποιήθηκε συμβατικό κινητό τηλέφωνο για την ακτινοβόληση λαρβών 3^{ου} αναπτυξιακού σταδίου, δεν κατέγραψε κάποια αλλαγή στην αναπαραγωγική ικανότητα των εντόμων, ενώ έδειξε αλλαγή στην κινητική συμπεριφορά τους (El Kholy and El Husseiny, 2012).

Τέλος, έκθεση θηλυκών εντόμων 53 ημερών σε κύμα συχνότητας 835 MHz, το οποίο είχε παραχθεί από γεννήτρια ραδιοσυχνοτήτων, με τιμές SAR 1,6 W/kg και 4 W/kg, οδήγησε σε αύξηση των ROS και στις δύο τιμές SAR, τόσο μετά από 12 όσο και μετά από 18 ώρες ακτινοβόλησης καθώς και σε αύξηση των μοριακών συνοδών HSP27 και HSP70. Στην ίδια

μελέτη, η ακτινοβόληση θηλυκών εντόμων ηλικίας 103 ημερών μείωσε τη βιωσιμότητά τους μετά από 18 ώρες ακτινοβόληση στην τιμή SAR 4 W/kg, ενώ τέλος ακτινοβόληση των ωοθηκών έδειξε στο SAR 1,6 W/kg ενεργοποίηση των ERK (Extracellular Signal Regulated Kinase) κινασών. Στην τιμή 4 W/kg παρατηρήθηκε με ιδιαίτερο ενδιαφέρον ενεργοποίηση των JNK κινασών (Lee et al., 2008).

Οι παραπάνω μελέτες καταδεικνύουν την αναγκαιότητα της χρήσης καθημερινών πηγών ασύρματης τεχνολογίας, ώστε να προσομοιωθούν οι πραγματικές συνθήκες έκθεσης με σκοπό την καλύτερη δυνατή εκτίμηση της πιθανής επικινδυνότητας της HMA.

1.13 ΣΚΟΠΟΣ

Η ραγδαία εξέλιξη της ασύρματης τεχνολογίας οδήγησε στη θέσπιση «ορίων επιτρεπόμενης έντασης ακτινοβολίας» από τη χρήση των διαφόρων συσκευών που χρησιμοποιούν τη συγκεκριμένη τεχνολογία. Ωστόσο, η ανησυχία των ερευνητών, αλλά και του κοινού, για την ασφάλεια που προσφέρουν τα όρια αυτά στους χρήστες των συσκευών αυτών έχουν εντείνει τις έρευνες για την αποσαφήνιση των μηχανισμών δράσης της συγκεκριμένης ακτινοβολίας με την έμβια ύλη.

Παρά το γεγονός ότι έχει αυξηθεί το ερευνητικό ενδιαφέρον ως προς το θέμα αυτό, εντούτοις, οι μέχρι τώρα μελέτες δε δίνουν μία ξεκάθαρη απάντηση για την επικινδυνότητα της μη ιονίζουσας ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, λόγω της μεγάλης ετερογένειας των βιολογικών συστημάτων που χρησιμοποιούνται, σε συνδυασμό με τα διαφορετικά πρωτόκολλα ακτινοβόλησης (π.χ. συχνότητα, διάρκεια ακτινοβόλησης και ένταση ηλεκτρικού πεδίου) που εφαρμόζονται.

Από τη βιβλιογραφία, φαίνεται, ότι ένας σημαντικός αριθμός ερευνών προτείνουν την αύξηση των ελευθέρων ριζών, ως πιθανό μηχανισμό δράσης της ΗΜΑ στα βιολογικά συστήματα, με αποτέλεσμα την πρόκληση οξειδωτικού στρες και την ενεργοποίηση μηχανισμών απόκρισης σε αυτό. Παρόλα αυτά, οι μελέτες που έχουν διερευνήσει τη συγκεκριμένη επίδραση *in vivo* είναι πολύ λίγες και πολύ λιγότερες είναι οι έρευνες (κυρίως επιδημιολογικές) που έχουν χρησιμοποιήσει πηγές καθημερινής χρήσης για να εξετάσουν τις επιπτώσεις της έκθεσης του πληθυσμού στις συσκευές αυτές.

Για τους λόγους αυτούς, ο σκοπός της συγκεκριμένης Διδακτορικής Διατριβής ήταν η *in vivo* μελέτη των επιπτώσεων της ΗΜΑ, με εστίαση στην επαγωγή στρες, την απόπτωση και τις βιολογικές παραμέτρους που σχετίζονται με την ωογένεση και τη βιωσιμότητα. Για την επίτευξη του σκοπού αυτού, το πειραματικό βιολογικό σύστημα που αξιοποιήθηκε ήταν το έντομο *Drosophila melanogaster*, το οποίο ήδη αναφέρθηκε ότι αποτελεί ένα πολυδύναμο πρότυπο σύστημα μελέτης του οξειδωτικού στρες και της γήρανσης, καθώς και της απόπτωσης. Ως πηγές μη ιονίζουσας ακτινοβολίας χρησιμοποιήθηκαν τρεις συσκευές ασύρματης τεχνολογίας καθημερινής χρήσης:

- το κινητό τηλέφωνο, GSM 900 MHz και DCS 1800 MHz
- το ασύρματο τηλέφωνο, 1880 1900 MHz
- το ασύρματο δίκτυο, 2400 2500 MHz

Συγκριτικά χρησιμοποιήθηκε και γεννήτρια ραδιοσυχνοτήτων. Ο πειραματικός σχεδιασμός βασίστηκε σε πέντε προσεγγίσεις:

- 1. Αποσαφήνιση του ρόλου των χαρακτηριστικών της ΗΜΑ, όπως η συχνότητα, η διαμόρφωση, η ένταση και ο χρόνος έκθεσης στην οποιαδήποτε επίδραση
- 2. Ανίχνευση των επιπέδων των δραστικών μοεφών οξυγόνου (ROS) σε διάφορους σωματικούς ιστούς, αλλά και στον ωοθηκικό ιστό

- 3. Διερεύνηση της ΗΜΑ επίδρασης συναρτήσει της *in vivo* γήρανσης, καθώς και της ΗΜΑ επίδρασης στη βιωσιμότητα του εντόμου
- 4. Ανίχνευση στρες Ενδοπλασματικού Δικτύου (ΕΔ)
- 5. Μελέτη επαγωγής απόπτωσης κατά την ωογένεση, ως απόκριση στην ΗΜΑ
- Ανάλυση του προφίλ γονιδιακής έκφρασης κατά την ωογένεση, μετά από έκθεση στην ΗΜΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 УЛІКА

2.1.1 ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν τα εξής:

|--|

Χημικό / Αντιδραστήριο	Εταιρεία
1,2-propylene oxide	Merck-Millipore
2-mercaptoethanol	Applichem
2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ)	Sigma-Aldrich
3' IVT Express Kit	Affymetrix
Acetic acid	Merck-Millipore
Acridine orange base	Sigma-Aldrich
Acrylamide – Bis acrylamide	Sigma-Aldrich
Agar	Fluka
Ammonium persulfate (APS)	Research Organics
Araldite 502	Tousimis
Araldite resin, grade 502	Polysciences
Ascorbic acid	Sigma-Aldrich
Bradford dye reagent concentrate	Bio-rad
Bovine Albumin	Gibco
Bromophenol blue	Sigma-Aldrich
Butylated hydroxytoluene (BHT)	Sigma-Aldrich
Cacodylic acid	Serva
Calcium chloride (CaCl ₂)	Applichem
Chloroform	Sigma-Aldrich
CM-H ₂ DCFDA	Invitrogen
Coomassie brilliant blue R-250	Fluka
DABCO	Sigma-Aldrich
Developer	Sigma-Aldrich
Diethyl ether	Scharlau
DMSO	Sigma-Aldrich
DNase I	New England Biolabs
dNTPs	Thermo Fisher Scientific
Dodecenyl succinic anhydride (DDSA)	Serva

DPX mountant	Fluka
Dithiothreitol (DTT)	Applichem
EDTA Molecular biology grade	Research Organics
EGTA	Sigma-Aldrich
Epon 812	Fullam
Ethanol	Sigma-Aldrich
Fixer	Sigma-Aldrich
Formaldehyde 16% EM grade	Polysciences
GeneChip Drosophila genome 2.0 array	Affymetrix
GeneChip® hybridization, wash, and stain kit	Affymetrix
Glycerol	CARLO ERBA Reagents
Glycine	Serva
Glutaraldehyde 25%	Serva
HaeIII restriction enzyme	New England Biolabs
HCl 37%	Merck-Millipore
Immersion oil for microscopy	Merck-Millipore
Iron(III) chloride hexahydrate (FeCl ₃ *6H ₂ O)	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Scharlau
Lead citrate	BDH
Malondialdehyde (MDA)	Merck-Millipore
Maxima SYBR Green/ROX qPCR master mix	Thermo Fisher Scientific
Methanol	Sigma-Aldrich
Non fat milk	Regilait
Oligo(dT) ₁₈	Thermo Fisher Scientific
Osmium tetroxide (OsO ₄)	Polysciences
OxyBlot protein oxidation detection kit	Merck-Millipore
Phenyl-methyl-sulfonyl-fluoride (PMSF)	Applichem
Polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20)	Sigma-Aldrich
Ponceau S	Amresco Inc.
Potassium chloride (KCl)	Sigma-Aldrich
Propionic acid	Merck-Millipore
Protease inhibitors	Sigma-Aldrich
RevertAid H minus reverse transcriptase	Fermentas
RNase zap	Ambion
NucleoSpin® RNA II	MACHEREY-NAGEL
Schneider's insect medium	Sigma-Aldrich
Sodium acetate (CH ₃ COONa)	Merck-Millipore

Sodium azide (NaN ₃)	Ferak
Sodium bicarbonate (NaHCO ₃)	Merck-Millipore
Sodium chloride (NaCl)	Applichem
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Serva
Sodium fluoride (NaF)	Applichem
Sodium hydroxide pellets (NaOH)	Riedel-de-Haen
Sodium orthovanadate (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich
Sodium pyrophosphate (Na ₄ PO ₇)	Merck-Millipore
Sucrose	Serva
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma-Aldrich
Thiobarbituric acid (TBA)	Merck-Millipore
Toluidine blue	Ferak
Trichloroacetic acid (TCA)	Merck-Millipore
Tris	Applichem
Tris-(dimethyl amino methyl) phenol (DMP-30)	Serva
Triton X-100	Applichem
TRIzol reagent	Thermo Fisher Scientific
Uranyl acetate 95%	Polysciences
Western blotting chemiluminescence luminol reagent (ECL)	Santa Cruz

2.1.2 ΟΡΓΑΝΑ – ΣΥΣΚΕΥΕΣ

Τα όργανα και οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη είναι τα εξής:

111000005 2.2. Opyuvu kui 000000000	Πίνακας	2.2:	Οργανα	και	συσκευές
-------------------------------------	---------	------	--------	-----	----------

Όργανα / Συσκευές	Εταιρεία
Επιτραπέζια φυγόκεντρος	Eppendorf, 5410
Ηλεκτρονικός ζυγός	KERN PRS 320-3
Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης	Philips EM 300
Ηλεκτρονικό πεχάμετρο	Crison MicropH 2001
Κλίβανος επώασης	MIR products
Κλίβανος καλλιέργειας εντόμων σταθερών συνθηκών	Elvem
Μηχάνημα κοπής μαχαιριών	LKB Knifemaker Type 7801 B
Μικροσκόπιο φθορισμού – Συνεστιακό σαρωτικό	Nikon TE 2005

μικροσκόπιο laser – Φωτονικό Μικροσκόπιο	
Στερεομικροσκόπιο	Zeiss stereo IV
Συσκευή Agilent 2100 bioanalyzer	Agilent
Συσκευή Applied Biosystems® 2720 thermal cycler	Thermo Fisher Scientific
Συσκευή CFX 96 real time system	Bio-rad
Συσκευή ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών	Bio-rad
Συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών (Wet transfer)	Bio-rad
Πλάκα θερμότητας (Heat block)	Stewart Scientific
Υπερμικροτόμος	Sorval MT-2
Φασματικός αναλυτής	NARDA SRM3000
Φασματικός αναλυτής	ROHDE & SWARTZ FSL/6
Φθορισμόμετρο	Bio-rad
Φωτόμετρο	ZEISS
Φωτόμετρο Nano Drop 2000	Thermo Fisher Scientific
Ψυχόμενη επιτραπέζια φυγόκεντρος, κεφαλή #3344	Heraus

Για τον καθορισμό της δοσιμετρίας στη συγκεκριμένη έρευνα χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω αναλυτές:

2.1.2.1 Φασματικός Αναλυτής Πεδίου NARDA SRM3000

Ο φασματικός αναλυτής ραδιοσυχνοτήτων και μικροκυμάτων NARDA SRM 3000 δίνει τη δυνατότητα ισοτροπικών μετρήσεων, υψηλής ακρίβειας με δυνατότητα συχνοεπιλεκτικών μετρήσεων στην περιοχή συχνοτήτων 100 kHz – 3 GHz, με ευαισθησία μέτρησης 0,002 – 0,013 V/m ανάλογα με τη συχνότητα. Αποτελείται από μία πολυκατευθυντική ευρυζωνική κεφαλή, η οποία και επιτρέπει τη λήψη ισοτροπικών μετρήσεων. Παρέχει τη δυνατότητα καταγραφής τόσο της μέσης έντασης ηλεκτρικού πεδίου όσο και της μέγιστης τιμής αυτού. Οι τιμές της έντασης καταχωρούνται σε πίνακα, ενώ η μέση τιμή προκύπτει από την ολοκλήρωση των εντάσεων όλων των συχνοτήτων. Τέλος, δίνει τη δυνατότητα αποτύπωσης εικόνας με το φάσμα συχνοτήτων και την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (**Εικόνα 2.1**).



Εικόνα 2.1: Α. Φωτογραφία του φασματογράφου υψηλής ανάλυσης NARDA SRM3000. Β. Φάσμα συχνοτήτων από 1,8 έως 2,6 GHz. Αριστερά καταγράφονται οι συχνότητες της κινητής τηλεφωνίας και του ασύρματου τηλεφώνου DECT (μαύρο βέλος) και δεξιά οι συχνότητες του ασύρματου δικτύου Wi-Fi (κόκκινο βέλος). Καταγραφή Λ. Χ. Μαργαρίτης.

2.1.2.2 Φασματικός Αναλυτής Rohde και Schwarz FSL/6

Ο φασματικός αναλυτής Rohde και Schwarz FSL/6 χρησιμοποιήθηκε κυρίως για την καταγραφή των κυματομορφών και την ανάλυση του φάσματος εκπομπής της κάθε συσκευής (Εικόνα 2.2). Μπορεί και ανιχνεύει συχνότητες από 9 kHz έως 8 GHz, οπότε καλύπτει μήκη κύματος από 3,5 cm μέχρι περίπου 5 mm. Ο συγκεκριμένος αναλυτής προσφέρει τη δυνατότητα χρήσης ανιχνευτών της έντασης κοντινού – εγγύς πεδίου καθώς και πολύ μικρό χρονικό διάστημα σάρωσης, το οποίο επιτρέπει την καλύτερη απεικόνιση των παλμών που εκπέμπονται από τις συσκευές ασύρματης τεχνολογίας.



Εικόνα 2.2: Φωτογραφία του φασματικού αναλυτή Rohde and Schwarz FSL/6. Στην οθόνη του αναλυτή φαίνεται ο παλμός ασύρματου δικτύου Wi-Fi. Καταγραφή Λ. Χ. Μαργαρίτης.

2.1.3 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

2.1.3.1 Πειραματόζωα

Στη συγκεκριμένη Διδακτορική Διατριβή χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο βιολογικό σύστημα το Δίπτερο έντομο *Drosophila melanogaster*. Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα ακόλουθα:

- 1. Στέλεχος φυσικού τύπου (wild type wt) Oregon R, από τη μόνιμη καλλιέργεια του εργαστηρίου του Τομέα Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής του ΕΚΠΑ.
- 2. Διαγονιδιακό στέλεχος που φέρει το γονίδιο του ενζύμου καταλάση, με γονότυπο w1; P{UAS-Cat.A}2. Η ένθεση του γονιδίου έχει γίνει στο αυτοσωμικό χρωμόσωμα 2. Το στέλεχος αυτό καλλιεργείται στο Εργαστήριο Νευροεπιστημών του Ιδρύματος Ερευνών «Αλεξάντερ Φλέμινγκ» από τον Ερευνητή Β΄ κ. Ε. Σκουλάκη.
- Διαγονιδιακό στέλεχος που φέρει το γονίδιο GAL4 υπό τον έλεγχο του υποκινητή της ακτίνης, με γονότυπο y1 w*; P{Act5C-GAL4}25FO1 / CyO, y+. Η ένθεση του γονιδίου έχει γίνει στο αυτοσωμικό χρωμόσωμα 2.
- 4. Διαγονιδιακό στέλεχος που φέρει το γονίδιο της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης EGFP, με γονότυπο w*; P{UAS-2xEGFP}AH2. Η ένθεση του γονιδίου έχει γίνει στο αυτοσωμικό χρωμόσωμα 2.
- 5. Μεταλλαγμένο στέλεχος *Dm*p53^{-/-} με γονότυπο (y[1] w[1118] ; p53[5A-1-4]), στο οποίο απουσιάζει ο μεταγραφικός παράγοντας p53.
- 6. Διαγονιδιακό στέλεχος που φέρει το γονίδιο GAL4 υπό τον έλεγχο του υποκινητή της πρωτεΐνης αρμαντίλο, με γονότυπο GAL4-armadillo / GAL4-armadillo ; Sb / Tm6B. Η ένθεση του γονιδίου έχει γίνει στο αυτοσωμικό χρωμόσωμα 2.
- 7. Διαγονιδιακό στέλεχος που φέρει το γονίδιο του μεταγραφικού παράγοντα Xbp1, με γονότυπο w[*]; P{w[+mC] = UAS-Xbp1.EGFP}2. Η ένθεση του γονιδίου έχει γίνει στο αυτοσωμικό χρωμόσωμα 2.
- Τα στελέχη 3-7 καλλιεργούνται στο Εργαστήριο του Τομέα Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής του ΕΚΠΑ από την ερευνητική ομάδα του Επίκουρου Καθηγητή κ. Δ. Ι. Στραβοπόδη.

2.1.3.2 Καλλιέργεια εντόμων

Η ανάπτυξη των stock πληθυσμών των εντόμων πραγματοποιήθηκε σε αποστειρωμένους πλαστικούς σωλήνες καλλιέργειας 22 cm x 63 cm σε δωμάτιο καλλιέργειας σταθερών συνθηκών (θερμοκρασία 24 \pm 1°C, υγρασία 60 – 70%, 12 ώρες φως και 12 ώρες σκοτάδι). Για την ανάπτυξη μεγαλύτερου πληθυσμού χρησιμοποιήθηκαν γυάλες μεγαλύτερου μεγέθους, οι οποίες αποστειρώνονταν εκ νέου κάθε φορά πριν από τη χρήση. Οι συνθήκες είναι απαραίτητο να

διατηρούνται σταθερές, καθώς πιθανή μεταβολή επηρεάζει την ωογένεση του εντόμου (King, 1970).

Τα πρωτόκολλα ακτινοβόλησης έλαβαν χώρα σε ειδικούς κλιβάνους καλλιέργειας, οι οποίοι διατηρούσαν όλα τα περιβαλλοντικά χαρακτηριστικά του δωματίου καλλιέργειας των stock πληθυσμών. Κατά συνέπεια, οι πειραματικοί πληθυσμοί καλλιεργούνταν και αυτοί σε συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας 24 ± 1 °C, υγρασίας 60 - 70%, 12 ώρες φως και 12 ώρες σκοτάδι.

2.1.3.3 Τύποι θρεπτικών μέσων για την ανάπτυξη των εντόμων

Στη συγκεκριμένη Διατριβή χρησιμοποιήθηκαν δύο τύποι τροφής διαφορετικής θερμιδικής αξίας:

- Η πλήρης τροφή σε θρεπτικά συστατικά περιείχε 4g άγαρ, 3,9g ξηρή μαγιά, 25g τοματοπολτό, 16g ζάχαρη λευκή, 32g ριζάλευρο, 2mL αιθανόλη 95% v/v, 2mL προπιονικό οξύ και 700mL νερό.
- Η χαμηλότερη θερμιδικά τροφή περιείχε 4g άγαρ, 3,9g ξηρή μαγιά, 16g ζάχαρη λευκή, 2mL αιθανόλη 95% v/v, 2mL προπιονικό οξύ και 700mL νερό.

2.1.3.4 Γενετικό σύστημα GAL4/UAS

Το σύστημα GAL4/UAS είναι μία γενετική μέθοδος που αναπτύχθηκε το 1993 από τους Brand και Perrimon και χρησιμοποιείται για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης και λειτουργίας σε πρότυπους οργανισμούς, όπως η *D. melanogaster*. Η τεχνική βασίζεται στην ικανότητα πρόσδεσης στο DNA της πρωτεϊνης GAL4, η οποία παράγεται στη ζύμη. Συγκεκριμένα η πρόσδεση γίνεται στην αλληλουχία CGG-N₁₁-CCG, όπου "N" υποδηλώνει οποιαδήποτε βάση, που ονομάζεται UAS (Upstream Activation Sequence). Αν και η πρωτεϊνη GAL4 δεν υπάρχει σε άλλους οργανισμούς εκτός του ζυμομύκητα, έχει αποδειχθεί ότι λειτουργεί ως ενεργοποιητής της μεταγραφής σε μία ποικιλία οργανισμών όπως η *Drosophila (Fischer et al., 1988)*. Διασταυρώσεις μεταξύ παρθένων θηλυκών εντόμων, που φέρουν το γονίδιο GAL4 υπό τον έλεγχο συγκεκριμένων υποκινητών για ιστο-ειδική έκφραση, με αρσενικά έντομα, που φέρουν την αλληλουχία UAS στον υποκινητή του προς μελέτη γονιδίου-στόχου, οδηγούν στην παραγωγή απογόνων F1 γενεάς, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από την GAL4-εξαρτώμενη ιστοειδική αυξορύθμιση του υπό μελέτη διαγονιδίου (Εικόνα 2.3).



Εικόνα 2.3: Σχηματική απεικόνιση της διασταύρωσης ενός αρσενικού εντόμου, στελέχους που φέρει το γονίδιο GAL4, υπό τον έλεγχο ενός ιστοειδικού υποκινητή, με ένα παρθένο θηλυκό έντομο, στελέχους που φέρει το γονίδιο-στόχο υπό τον έλεγχο υποκινητή με την αλληλουχία UAS. Με το σύστημα GAL4/UAS οι απόγονοι (F1 γενιά) της συγκεκριμένης διασταύρωσης θα υπερεκφράζουν το γονίδιο-στόχο σε συγκεκριμένους ιστούς. Ράβδος μεγέθυνσης = 700 μm.

Στη συγκεκριμένη έρευνα διασταυρώθηκαν τα εξής στελέχη:

1. GAL4-armadillo / GAL4-armadillo ; Sb / Tm6B x UAS-Xbp1-EGFP / UAS-Xbp1-EGFP

Από τη συγκεκριμένη διασταύρωση προέκυψαν έντομα στην F1 γενιά με γονότυπο: GAL-4-armadillo / UAS-Xbp1-EGFP, στα σωματικά κύτταρα των οποίων, μεταγράφεται υβριδικό (χιμαιρικό) γονίδιο του μεταγραφικού παράγοντα Xbp1 και της GFP πρωτεΐνης.

2. GAL4-Actin5C / Cyo x UAS-Catalase / UAS-Catalase

Το γονίδιο Cyo είναι υπεύθυνο για καμπυλωτά φτερά. Οι απόγονοι της συγκεκριμένης διασταύρωσης έχουν σε αναλογία 1:1 καμπυλωτά και ίσια φτερά. Οι απόγονοι που φέρουν το γονίδιο-στόχο μαζί με το μεταγραφικό παράγοντα GAL4 έχουν ίσια φτερά και κατά συνέπεια αποτελούν τα έντομα μελέτης. Από τη συγκεκριμένη διασταύρωση προέκυψαν έντομα που υπερέκφραζαν το ένζυμο καταλάση σε όλα τα σωματικά κύτταρα.

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 ΔΟΣΙΜΕΤΡΙΑ – ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΕΚΘΕΣΗΣ ΣΤΗΝ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ

Όλες οι μετρήσεις της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου έγιναν εντός 6 λεπτών όπως προβλέπεται από τις οδηγίες της ICNIRP (International Commission on Non Ionizing Radiation Protection), που εκδόθηκαν το 1998. Οι τιμές του ειδικού ρυθμού απορρόφησης SAR υπολογίστηκαν με βάση τους Lee *et al.* (2008). Για τις ωοθήκες χρησιμοποιήθηκε τιμή ηλεκτρικής αγωγιμότητας σ = 1,19 S/m και πυκνότητα μάζας ρ = 1000 Kg/m³, ενώ για τους σωματικούς ιστούς οι αντίστοιχες σταθερές ήταν σ = 0,92 S/m και ρ = 1000 Kg/m³. Ως πηγές ακτινοβόλησης καθημερινής χρήσης χρησιμοποιήθηκαν το κινητό τηλέφωνο, η βάση ασύρματου τηλεφώνου τύπου DECT και το ασύρματο δίκτυο Wi-Fi, ενώ παράλληλα χρησιμοποιήθηκε και γεννήτρια ραδιοσυχνοτήτων (**Εικόνα 2.4A-Δ**).



Εικόνα 2.4: Φωτογραφίες διατάζεων ακτινοβόλησης με Α. κινητό τηλέφωνο, Β. βάση ασύρματου τηλεφώνου DECT, Γ. ασύρματο δίκτυο Wi-Fi και Δ. γεννήτρια ραδιοσυχνοτήτων. Η έκθεση των εντόμων στις τρεις πηγές καθημερινής χρήσης έγινε σε θάλαμο σταθερών συνθηκών.

<u>KINHTO THAEΦΩNO GSM (Global System for Mobile Telecommunications)</u>: Μέση τιμή έντασης ηλεκτρικού πεδίου E = 13 V/m και SAR = 0,2 W/Kg για τον ωοθηκικό ιστό και SAR = 0,15 W/Kg για τους σωματικούς ιστούς (Εικόνα 2.5A).

<u>**ΔΣΥΡΜΑΤΟ ΔΙΚΤΥΟ Wi-Fi:**</u> Μέση τιμή έντασης ηλεκτρικού πεδίου E = 2,5 V/m και SAR = 0,007 W/Kg για τον ωοθηκικό ιστό και SAR = 0,005 W/Kg για τους σωματικούς ιστούς (**Εικόνα 2.5B**).

<u>BAΣΗ ΑΣΥΡΜΑΤΟΥ ΤΗΛΕΦΩΝΟΥ ΤΥΠΟΥ DECT</u> (Digital Enhanced Cordless Telephone): Μέση τιμή έντασης ηλεκτρικού πεδίου E = 2,7 V/m και SAR = 0,008 W/Kg για τον ωοθηκικό ιστό και SAR = 0,007 W/Kg για τους σωματικούς ιστούς (Εικόνα 2.5Γ).



Εικόνα 2.5: Φάσματα συχνοτήτων εκπομπής των συσκευών: Α. κινητού τηλεφώνου, Β. ασύρματου δικτύου Wi-Fi, Γ. ασύρματου DECT και Ε. ασύρματου Wi-Fi. Η καταγραφή των φασμάτων πραγματοποιήθηκε με το φασματικό αναλυτή NARDA SRM3000 από τον Λ. Χ. Μαργαρίτη.

otropic Result

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

<u>ΓΕΝΝΗΤΡΙΑ ΡΑΔΙΟΣΥΧΝΟΤΗΤΩΝ (HP 8924E CDMA MS SERVICE Test Set 30-1000</u> <u>MHz):</u>

Η γεννήτρια ραδιοσυχνοτήτων που χρησιμοποιήθηκε παρήγαγε συνεχή κύματα, χωρίς διαμόρφωση (CW – Continuous Waves) (**Εικόνα 2.6A**), καθώς και διαμορφωμένα κύματα με διαμόρφωση συχνότητας 50 kHz (FM – Frequency Modulated) (**Εικόνα 2.6B**). Μελετήθηκαν διαφορετικές εντάσεις και συχνότητες. Οι μέσες εντάσεις ηλεκτρικού πεδίου που μελετήθηκαν ήταν: 0,3 V/m, 1 V/m, 2 V/m και 3 V/m, ενώ οι αντίστοιχες τιμές SAR ήταν για τον ωοθηκικό ιστό: 0,0001 W/kg, 0,001 W/kg, 0,004 W/kg και 0,01 W/kg αντίστοιχα. Οι προς μελέτη συχνότητες που επιλέχθηκαν ήταν τα: 100 MHz (που αντιστοιχεί στο φάσμα των συχνοτήτων του ραδιοφώνου), 395 MHz (που αντιστοιχεί στο φάσμα των συχνοτήτων των ΤΕΤRA – Trans European Trunked Radio Access – Πανευρωπαϊκό Δίκτυο Κοινών Διαύλων), 682 MHz (που αντιστοιχεί στο φάσμα των σταθμών της τηλεόρασης) και τέλος 900 MHz (που αντιστοιχεί στο φάσμα συχνοτήτων κινητής τηλεφωνίας 2^{ης} γενιάς GSM – Global System for Mobile communications – Παγκόσμιο Σύστημα Κινητών Τηλεπικοινωνιών).



Εικόνα 2.6: Εικόνες από τον αναλυτή Rohde and Schwarz FSL/6 που δείχνουν Α. συνεχές κύμα χωρίς καμία διαμόρφωση και Β. κύματα 3 σταθμών ραδιοφωνίας με διαμόρφωση συχνότητας. Καταγραφή Λ. Χ. Μαργαρίτης.

2.2.2 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΣΗΣ

Σκοπός της συγκεκριμένης Διατριβής ήταν η μελέτη πιθανών επιπτώσεων της μη ιονίζουσας ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, αλλά και ο συσχετισμός των επιπτώσεων αυτών με τα χαρακτηριστικά της συγκεκριμένης ακτινοβολίας. Ως εκ τούτου, επιχειρήθηκε η μελέτη της διαφορικής βιοδραστικότητας του χρόνου και της επαναληψιμότητας της έκθεσης, της συχνότητας, της έντασης, αλλά και της διαμόρφωσης.

Για το σκοπό αυτό, σχεδιάστηκαν ποικίλα πρωτόκολλα ακτινοβόλησης με βάση τα παραπάνω χαρακτηριστικά (Εικόνα 2.7, Εικόνα 2.8, Εικόνα 2.9 και Εικόνα 2.10). Τα

πρωτόκολλα της εφάπαξ ακτινοβόλησης εφαρμόστηκαν είτε την 4^η ημέρα είτε την 5^η ημέρα ενήλικης ζωής των εντόμων, καθώς τα θηλυκά έχουν ολοκληρώσει τη διαδικασία της ωογένεσης μετά την 3^η ημέρα και έχουν δημιουργήσει τα πρώτα ώριμα και έτοιμα προς γονιμοποίηση και εναπόθεση αυγά. Θέλοντας λοιπόν να μελετήσουμε την επίδραση της ΗΜΑ σε όλα τα στάδια επιλέξαμε τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή ώστε να έχουν δημιουργηθεί και τα ωοθυλάκια τελικού σταδίου 14.

2.2.2.1 Πηγές καθημερινής χρήσης

Σε όλα τα πρωτόκολλα ακτινοβόλησης τα έντομα, κατά τη συλλογή τους, χωρίστηκαν σε 2 ομάδες: Η πρώτη ομάδα περιελάμβανε τα ακτινοβολημένα έντομα, τα οποία μεταφέρθηκαν στους κλιβάνους καλλιέργειας και εκτέθηκαν στην ακτινοβολία που προερχόταν από τις πηγές καθημερινής χρήσης (βάση ασύρματου τηλεφώνου, ασύρματο δίκτυο, κινητό τηλέφωνο) για τα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα. Η δεύτερη ομάδα αποτελούνταν από τα έντομα «εικονικής ακτινοβόλησης», δηλαδή έντομα που παρέμειναν προστατευμένα από την ακτινοβολία, καθώς μεταφέρθηκαν σε αντίστοιχο κλίβανο καλλιέργειας, όπως τα ακτινοβολημένα έντομα, αλλά χωρίς ακτινοβολία.

2.2.2.1.1 Βάση ασύρματου τηλεφώνου

Για τη μελέτη της επίδρασης της βάσης ασύρματου τηλεφώνου σχεδιάστηκαν πρωτόκολλα ακτινοβόλησης μικρής, μεσαίας και μακράς διάρκειας. Τα πρωτόκολλα ακτινοβόλησης ήταν συνεχή με διάρκεια 30 και 60 λεπτών αλλά και 6, 24, 96 και 120 ωρών αντίστοιχα (Εικόνα 2.7B). Τα πρωτόκολλα των 96 και 120 ωρών εφαρμόστηκαν λίγες ώρες μετά την έκδυση των ενήλικων – τέλειων εντόμων (2 – 4 ώρες μετά), ενώ οι ακτινοβολήσεις από 30 λεπτά έως 24 ώρες πραγματοποιήθηκαν την τέταρτη ημέρα της ενήλικης ζωής τους. Το πρωτόκολλο των 120 ωρών εφαρμόστηκε και σε έντομα ηλικίας 20 και 50 ημερών αντίστοιχα. Τα συγκεκριμένα πειράματα αποσκοπούσαν στη μελέτη της ΗΜΑ συναρτήσει της οργανισμικής γήρανσης (Εικόνα 2.7A). Τέλος, εφαρμόστηκαν και δύο πρωτόκολλα δια βίου ακτινοβόλησης. Στο ένα, η ακτινοβόληση με τη βάση ήταν συνεχής (24 ώρες το 24ωρο και 7 ημέρες την εβδομάδα) και στο δεύτερο ήταν διακοπτόμενη για 1 ώρα κάθε 1 ώρα καθημερινά (Εικόνα 2.7Γ).



Εικόνα 2.7: Σχηματική απεικόνιση των πρωτοκόλλων ακτινοβόλησης που αφορούν την έκθεση σε βάση ασύρματου τηλεφώνου. Α. Πρωτόκολλο συνεχούς ακτινοβόλησης διάρκειας 120 ωρών σε διάφορες ηλικίες. Β. Πρωτόκολλα συνεχούς διάρκειας 30 και 60 λεπτών, καθώς και 6, 24, 96 και 120 ωρών που εφαρμόστηκαν σε έντομα νεαρής ηλικίας μέχρι 5 ημερών. Γ. Πρωτόκολλο καθημερινής συνεχούς ή διακοπτόμενης ακτινοβόλησης καθόλη τη διάρκεια ζωής των εντόμων.

2.2.2.1.2 Ασύρματο δίκτυο Wi-Fi

Η επίδραση του ασύρματου δικτύου μελετήθηκε συναρτήσει του πρωτοκόλλου έκθεσης στην ακτινοβολία. Κατά συνέπεια, σχεδιάστηκαν πρωτόκολλα διαφορετικής διάρκειας έκθεσης και διαφορετικών δόσεων ακτινοβολίας. Αναλυτικότερα, τα έντομα εκτέθηκαν σε πρωτόκολλο σύντομης ακτινοβόλησης 30 λεπτών, διακοπτόμενης έκθεσης 30 λεπτών, κάθε μέρα για συνολικά 4 ημέρες, αλλά και συνεχούς διάρκειας 120 ωρών (5 ημέρες συνεχόμενα) (Εικόνα 2.8A). Τέλος, για τη μελέτη της επίδρασης στη βιωσιμότητα των θηλυκών και αρσενικών εντόμων εφαρμόστηκε πρωτόκολλο καθημερινής διακοπτόμενης ακτινοβόλησης κάθε 30 λεπτά, καθ' όλη τη διάρκεια της ημέρας μέχρι το τέλος της ζωής των εντόμων (Εικόνα 2.8B).



Εικόνα 2.8: Σχηματική απεικόνιση των πρωτοκόλλων ακτινοβόλησης. Α. Πρωτόκολλα για την επίδραση της παλμικής ακτινοβολίας στο οζειδωτικό δυναμικό των εντόμων. Β. Διακοπτόμενη καθημερινή ακτινοβόληση από τη στιγμή της έκδυσης μέχρι το τέλος της ζωής των εντόμων.

2.2.2.1.3 Κινητό τηλέφωνο

Για τη μελέτη των επιπτώσεων του κινητού τηλεφώνου προτιμήθηκαν πρωτόκολλα σύντομης ακτινοβόλησης 6 και 30 λεπτών, τα οποία προσομοιάζουν ρεαλιστικές συνθήκες έκθεσης των χρηστών. Όπως και στην περίπτωση της βάσης του ασύρματου τηλεφώνου ο λόγος που επιλέχθηκε η συγκεκριμένη ημέρα ήταν για να έχει ξεκινήσει η εναπόθεση των γονιμοποιημένων αυγών (Εικόνα 2.9).



Εικόνα 2.9: Σχηματική αναπαράσταση της ωογένεσης συναρτήσει των ημερών της ενήλικης ζωής των θηλυκών εντόμων. Απεικόνιση του χρονικού σημείου (4^η ημέρα) όπου τα έντομα εκτέθηκαν στην παλμική ακτινοβολία κινητού τηλεφώνου, καθώς και απεικόνιση του χρόνου έκθεσης (6 λεπτά και 30 λεπτά). Τροποποίηση από Becalska and Gavis,2009.

2.2.2.1.4 Γεννήτρια ραδιοσυχνοτήτων

Στη συγκεκριμένη Διατριβή πέραν των πηγών καθημερινής χρήσης όπως το ασύρματο δίκτυο, το κινητό και ασύρματο τηλέφωνο, τα οποία εκπέμπουν παλμική ακτινοβολία συγκεκριμένων συχνοτήτων, χρησιμοποιήθηκε και γεννήτρια ραδιοσυχνοτήτων, η οποία είχε ρυθμιστεί για να παράγει κύματα συνεχή -χωρίς διαμόρφωση- ή κύματα με διαμόρφωση FM (50 kHz). Για τη μελέτη της επίδρασης των συγκεκριμένων κυματομορφών, σχεδιάστηκαν πρωτόκολλα ακτινοβόλησης διαφορετικής διάρκειας, αλλά και διαφορετικής δόσης ακτινοβολίας. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν 2 πρωτόκολλα σύντομης ακτινοβόλησης 6 και 60 λεπτών μόνο την 5^η ημέρα ζωής των εντόμων, αλλά και 2 πρωτόκολλα σύντομης καθημερινής ακτινοβόλησης για 6 και 60 λεπτά συνολικά για 5 ημέρες (Εικόνα 2.10).

Τα έντομα, κατά τη συλλογή τους, χωρίστηκαν σε 2 ομάδες: Η πρώτη ομάδα περιελάμβανε τα ακτινοβολημένα έντομα, τα οποία μεταφέρθηκαν στο δωμάτιο καλλιέργειας και εκτέθηκαν στην ακτινοβολία για τους καθορισμένους χρόνους. Η δεύτερη ομάδα αποτελούνταν από τα έντομα «εικονικής ακτινοβόλησης», δηλαδή έντομα που μεταφέρθηκαν στο δωμάτιο καλλιέργειας και παρέμειναν για αντίστοιχα χρονικά διαστήματα στα οποία, όμως, η γεννήτρια παρέμεινε κλειστή.


Εικόνα 2.10: Σχηματική απεικόνιση των πρωτοκόλλων ακτινοβόλησης που χρησιμοποίηθηκαν στην περίπτωση της γεννήτριας ραδιοσυχνοτήτων. Διακρίνονται οι διαφορετικοί χρόνοι διάρκειας της ακτινοβόλησης (6 και 60 λεπτά) αλλά και οι διαφορετικές δόσεις ακτινοβολίας (εφάπαξ μόνο την 5^η ημέρα ή καθημερινή ακτινοβόληση για 5 ημέρες).

2.2.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΑΚΡΟΒΙΟΤΗΤΑΣ ΑΡΣΕΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΘΗΛΥΚΩΝ ΕΝΤΟΜΩΝ

Λόγω της μικρής διάρκειας ζωής της *D. melanogaster* οι μελέτες της βιωσιμότητας αποτελούν ένα σημαντικό εργαλείο για την έρευνα διαφόρων παραγόντων στην παθοφυσιολογία του εντόμου. Για τον προσδιορισμό της μακροβιότητας των εντόμων, συλλέχθηκαν συνολικά περισσότερα από 100 αρσενικά και 100 θηλυκά έντομα για την ομάδα των ακτινοβολημένων εντόμων (A) και ίδιος αριθμός για την ομάδα των «εικονικά ακτινοβολημένων» – μαρτύρων (M). Οι καλλιέργειες ανανεώνονταν με καινούρια τροφή κάθε 2 μέρες, ενώ η καταγραφή των νεκρών εντόμων ήταν καθημερινή.

2.2.4 ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΘΗΛΥΚΩΝ ΕΝΤΟΜΩΝ – ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΩΟΘΥΛΑΚΙΩΝ

Πραγματοποιείται ήπια αναισθησία με διάλυμα αιθέρα. Τα θηλυκά έντομα διαχωρίζονται από τα αρσενικά και υπόκεινται σε ανατομία με τη χρήση ειδικών λαβίδων. Αφαιρούνται οι ωοθήκες και στη συνέχεια με ειδικές βελόνες ανατομίας διαχωρίζονται τα ωοθυλάκια. Συλλέγονται τα στάδια που μελετώνται σε κάθε μέθοδο ξεχωριστά. Η ανατομία των εντόμων πραγματοποιείται σε ισότονο διάλυμα με την αιμολέμφο (διάλυμα Ringer's), το οποίο αποτελείται από 0,75% NaCl, 0,02% CaCl₂, 0,01% KCl και 0,02% NaHCO₃, όλα διαλυμένα σε ddH₂O.

2.2.5 ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΟΞΥΓΟΝΟΥ (ROS)

Για τη δοκιμασία ανίχνευσης ROS χρησιμοποιήθηκε ο εστέρας 5-6 χλωρομεθυλ-2,7διχλωρο-διϋδροφθορισμο-διοξικος ακετυλεστέρας (5-6-chloromethyl-2',7'dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester, CM – H₂DCFDA), ο οποίος χρησιμοποιείται ως γενικός δείκτης για την ανίχνευση δραστικών μορφών οξυγόνου. Διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη και παραμένει εντός του κυττάρου ύστερα από αφαίρεση των πλευρικών ακετυλομάδων από τις ενδοκυτταρικές εστεράσες. Φθορίζει στα 520 nm μετά από διέγερση (490 nm), αφού πρώτα έχει αντιδράσει με τις ενεργές μορφές οξυγόνου και έχει υποστεί οξείδωση εντός του κυττάρου.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε αναισθητοποίηση και διαχωρισμός θηλυκών και αρσενικών εντόμων. Στη συνέχεια, αφαιρέθηκαν τα φτερά σε όλα τα έντομα. Από τα θηλυκά έντομα αφαιρέθηκαν και οι ωοθήκες, οι οποίες εξετάστηκαν ξεχωριστά για επίπεδα ROS, ενώ σε κάποια πειράματα διαγωρίστηκαν και τα στάδια των ωοθυλακίων, και πραγματοποιήθηκε μέτρηση των ROS ξεχωριστά στα στάδια της πρώιμης – μέσης ωογένεσης και ξεχωριστά στα χοριογενετικά στάδια. Τα έντομα και οι ωοθήκες τοποθετήθηκαν σε ισότονο διάλυμα PBS (Phosphate-Buffered Saline) (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO4 $\kappa \alpha 12$ mM KH₂PO4, pH = 7,4) to oto io περιείγε τον εστέρα σε συγκέντρωση 10 μΜ. Ακολούθησε επώαση, απουσία φωτός, για 30' στους 25°C. Μετά το πέρας της μισής ώρας, το διάλυμα με τον εστέρα απομακρύνθηκε και προστέθηκε καθαρό PBS για 20', απουσία φωτός στους 25°C. Ακολούθησαν 3 γρήγορες πλύσεις με PBS και τελικά το ισότονο διάλυμα αφαιρέθηκε και ακολούθησε ομογενοποίηση σε απεσταγμένο νερό. Το ομογενοποίημα φυγοκεντρήθηκε στις 6.000 rpm για 10' στους 4°C. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, πραγματοποιήθηκε λήψη του υπερκειμένου, στο οποίο πραγματοποιήθηκε μέτρηση των επιπέδων φθορισμού με χρήση ειδικού φθορισμομέτρου (μήκος κύματος διέγερσης 490 nm / μήκος κύματος εκπομπής 520 nm). Η κανονικοποίηση των απόλυτων μονάδων φθορισμού έγινε ως προς την ολική ποσότητα πρωτεΐνης κάθε δείγματος.

2.2.6 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Απομονώθηκαν πρωτεΐνες από 15 αρσενικά και 15 θηλυκά έντομα. Η διαδικασία απομόνωσης είχε ως εξής: Τα σώματα συλλέχθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Μετά από απομάκρυνση του ισότονου ρυθμιστικού διαλύματος, προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (50 mM Tris-HCl, pH = 7,6, 1 mM Na₃VO₄, 275 mM NaCl, 50 mM NaF, 2,5 mM Na₄PO₇, 1 mM EDTA, 2 mM EGTA, 1 mM PMSF, 1,5% v/v β-μερκαπτοαιθανόλη και αναστολείς πρωτεασών). Ακολούθησε ομογενοποίηση και φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm για 20' στους 4°C. Τέλος, το υπερκείμενο αποθηκεύτηκε στους -80 °C.

2.2.7 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ – ΜΕΘΟΔΟΣ BRADFORD

Η μέθοδος Bradford βασίζεται στην παρατήρηση ότι η μέγιστη απορρόφηση της χρωστικής Coomassie brilliant blue R-250 μετατοπίζεται από τα 465 nm στα 595 nm κατά το σχηματισμό σταθερού συμπλόκου κυανού χρώματος (για περίπου 1 ώρα) μεταξύ του αντιδραστηρίου Bradford και των πρωτεϊνών.

Αρχικά κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη αναφοράς από κλιμακούμενες γνωστές συγκεντρώσεις αλβουμίνης ορού βοός (Bovine Serum Albumin, BSA). Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την πρότυπη καμπύλη ήταν 1 μg/ml, 2 μg/ml, 4 μg/ml, 6 μg/ml, 8 μg/ml και 16 μg/ml. Η ανίχνευση της συγκέντρωσης στα άγνωστα δείγματα έγινε ως εξής: Προστέθηκε 1 μL από κάθε δείγμα σε 799 μL ddH₂0 και 200 μL Bradford. Ακολούθησε επώαση για 15΄ σε θερμοκρασία δωματίου και τέλος φωτομέτρηση στα 595 nm. Με βάση την πρότυπη καμπύλη, υπολογίστηκε η συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα με αντιστοίχιση της οπτικής απορρόφησης του άγνωστου δείγματος.

2.2.8 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ (ΟΧΥΒΙΟΤ)

Η ανίχνευση των οξειδωμένων, κυρίως καρβονυλιωμένων, πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με το OxyBlot® Kit. Η ανίχνευση έγινε μέσω των καρβονυλομάδων που απέκτησαν οι πρωτεΐνες μετά την οξείδωσή τους. Συγκεκριμένα, οι καρβονυλομάδες στις πλευρικές αλυσίδες των οξειδωμένων πρωτεϊνών αντιδρούν με τη 2,4-δινιτροφαινυλυδραζίνη (DNPH), δίνοντας ένα παράγωγο 2,4-δινιτροφαινυλυδραζόνης (DNP) (Εικόνα 2.11). Οι τροποποιημένες αυτές πρωτεΐνες ανιχνεύονται με ειδικά αντισώματα (αντι-DNP) με τη μέθοδο ανοσο-στυπώματος Western (Levine et al., 1990).



Εικόνα 2.11: Σχηματική απεικόνιση της καρβονυλίωσης πλευρικών ομάδων. Συγκεκριμένα, απεικονίζεται ο σχηματισμός της γλουταμικής ημιαλδεΰδης από ένα κατάλοιπο αργινίνης. Ο εντοπισμός της καρβονυλικής ομάδας, δηλαδή της αλδεΰδης, επιτυγχάνεται μέσω της 2,4δινιτροφαινυλυδραζίνης (DNPH). Το προϊόν της αντίδρασης είναι μία τροποποιημένη πρωτεΐνη, η οποία μπορεί να ανιχνευθεί με μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-DNP με ανοσοστύπωμα Western. Πηγή: http://blog.restek.com/?p=4664.

Για την ανίχνευση οξειδωμένων πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν 15 μg ολικής πρωτεΐνης που είχε απομονωθεί από τα σώματα αρσενικών και θηλυκών εντόμων.

Προστέθηκε ίσος όγκος 12% SDS, για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών, διπλάσιος όγκος 10 x DNPH (επώαση 15' σε θερμοκρασία δωματίου), διάλυμα εξουδετέρωσης της αντίδρασης (σε όγκο 1,5 φορές του αρχικού όγκου των πρωτεϊνών) και τέλος 5% β-μερκαπτοαιθανόλη για περαιτέρω αποδιάταξη των πρωτεϊνών.

Τα δείγματα, στη συνέχεια, μπορούν να χρησιμοποιηθούν άμεσα για ηλεκτροφόρηση και ανοσο-στύπωμα Western, ή μπορούν να φυλαχθούν στους 4°C για μία εβδομάδα.

2.2.9 SDS – PAGE ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΤΑ LAEMMLI

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μία αναλυτική μέθοδο διαχωρισμού φορτισμένων μακρομορίων σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος, το ισοηλεκτρικό τους σημείο ή το φορτίο τους, υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Ένα πρωτεϊνικό μίγμα μπορεί να διαχωριστεί ηλεκτροφορητικά σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου με παρουσία δωδεκυλοθειϊκού νατρίου (Sodium dodecyl sulfate – SDS), ενός αποδιατακτικού παράγοντα. Η ηλεκτροφόρηση αυτή ονομάζεται επίπεδη SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση κατά Laemmli (SDS – polyacrylamide gel electrophoresis) (*Laemmli, 1970*). Το SDS προστίθεται στο πρωτεϊνικό εναιώρημα όπου αποδιατάσσει τις πρωτεϊνες και τις φορτίζει αρνητικά, ώστε τελικά να έχουν παρόμοιες αναλογίες φορτίου / βάρους. Στο μίγμα προστίθεται επίσης μερκαπτοαιθανόλη που αποδιατάσσει τους δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ των καταλοίπων κυστεΐνης. Τελικά, ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών σε μία ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμίδης σε αποδιατακτικές συνθήκες εξαρτάται κυρίως από τη μάζα τους.

2.2.9.1 Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδης – ηλεκτροφόρηση

Για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών, χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω διαλύματα – αντιδραστήρια:

- 1. Ακρυλαμίδη N, N μεθυλενο-δις-ακρυλαμίδη (30 : 0,8 w/v)
- 2. Stacking Gel Buffer: 1 M Tris HCl, pH 6,8
- 3. Resolving Gel Buffer: 1,5 M Tris HCl, pH 8,9
- 4. 10% Ammonium Persulfate (w/v)
- 5. TEMED, καταλύτης του σχηματισμού ελευθέρων ριζών από το υπερθειικό αμμώνιο. Με την παραγωγή οξυγόνου ξεκινά ο πολυμερισμός του πηκτώματος

Πάνω από το πήκτωμα διαχωρισμού (resolving gel) επιστιβάχτηκε πήκτωμα χαμηλότερης συγκέντρωσης ακρυλαμίδης και με χαμηλότερο pH (stacking gel – πήκτωμα επιστίβαξης). Η διαφορετική κινητικότητα χλωρίου και γλυκίνης και ο χαμηλός ρυθμός εισόδου των μορίων στο πήκτωμα διαχωρισμού βοηθούν έτσι ώστε όλες οι πρωτεΐνες να συγκεντρώνονται σε μία γραμμή-ζώνη ανάμεσα στα δύο πηκτώματα. Αυτό επιτρέπει, παρά τη φόρτωση δειγμάτων διαφορετικών συγκεντρώσεων και όγκων, την εκκίνηση όλων των πρωτεϊνών την ίδια χρονική στιγμή από το ίδιο σημείο ώστε να διαχωριστούν μαζί. Τα δύο διαφορετικά πηκτώματα παρασκευάστηκαν όπως φαίνεται στον Πίνακα 2.1:

Συστατικά	Πήκτωμα διαχωρισμού	Πήκτωμα επιστίβαξης
Ακρυλαμίδη – δις-ακρυλαμίδη	10% ακρυλαμίδη	3% ακρυλαμίδη
Buffer	0,375 M Tris/HCl pH 8,9	0,125 M Tris/HCl pH 6,8
SDS	0,1% SDS	0,1% SDS
APS	0,1% APS	0,1% APS
TEMED	0,04% TEMED	0,1% TEMED

Πίνακας 2.1: Αναλυτική περιγραφή της σύστασης των πηκτωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν

Παρασκευάστηκε αρχικά το πήκτωμα διαχωρισμού, το οποίο τοποθετήθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και στεγανοποιήθηκε με μικρή ποσότητα νερού. Η συγκέντρωση της ακρυλαμίδης στο πήκτωμα είναι αυτή που καθορίζει και τη διαχωριστική του ικανότητα, καθώς μεγάλη συγκέντρωση ακρυλαμίδης έχει ως αποτέλεσμα την καλύτερη ανάλυση πρωτεϊνών χαμηλού μοριακού βάρους, ενώ χαμηλή συγκέντρωση ακρυλαμίδης βοηθά στην ανάλυση πρωτεϊνών χαμηλού μοριακού βάρους. Τα μικρά μόρια συγκριτικά με τους πόρους του πηκτώματος μετακινούνται εύκολα, ενώ τα μεγαλύτερα μόρια καθυστερούν. Μετά τον πολυμερισμό του πηκτώματος διαχωρισμού και την απομάκρυνση του νερού προστέθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα επιστίβαξης με το ειδικό χτενάκι για τη δημιουργία των θέσεων φόρτωσης των δειγμάτων. Τέλος, φορτώθηκαν τα δείγματα αφού πρώτα είχαν αναμειχθεί με ειδικό διάλυμα. Τα δείγματα της ηλεκτροφόρησης περιείχαν 2% SDS, 1 mM EDTA, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη, και 0,01% μπλε της βρωμοφαινόλης προς ανίχνευση του μετώπου των πρωτεϊνών. Εκτός από τα δείγματα, φορτώθηκαν σε ξεχωριστή θέση 5 μL δείκτη μοριακού βάρους.

Για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε διάλυμα ηλεκτροδίων (Running Buffer – 10 x Running Buffer: 0,25 M Tris, 1,92 M Glycine και 1% SDS), το οποίο βοηθά στην επίδραση του ρεύματος επάνω στις πρωτεΐνες. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης κλείνει και τα δύο ηλεκτρόδια συνδέονται με ειδική διάταξη εφαρμογής τάσης. Έτσι, επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών υπό σταθερό ρεύμα I = 20 mA, για κάθε πήκτωμα πακεταρίσματος, και υπό σταθερό ρεύμα I = 35 mA, για κάθε πήκτωμα διαχωρισμού.

2.2.9.2 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης οι πρωτεϊνικές ζώνες μεταφέρονται και δεσμεύονται με μη ομοιοπολικούς δεσμούς σε κατάλληλη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μέσω ηλεκτρικού ρεύματος (σε διεύθυνση κάθετη με αυτή του επιπέδου του πηκτώματος και της μεμβράνης) και ταυτοποιούνται με βύθιση της μεμβράνης σε συζευγμένο με ένζυμο, πολυκλωνικό ή μονοκλωνικό αντίσωμα, ειδικό για την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει.

Η τεχνική του ανοσο-στυπώματος Western των πρωτεϊνών είναι μια αναλυτική μέθοδος που περιλαμβάνει τη μεταφορά των πρωτεϊνών, που έχουν διαχωριστεί ηλεκτροφορητικά, από το πήκτωμα σε ένα λεπτό και μεμβρανώδες υλικό στήριξης (νιτροκυτταρίνη), καθώς και την ανίχνευσή τους με αντισώματα. Αυτή η διαδικασία είναι χρήσιμη για την ευκολότερη ανίχνευση των πρωτεϊνών από τα αντισώματα, καθώς οι πρωτεΐνες προσδένονται επιφανειακά στις μεμβράνες της νιτροκυτταρίνης.

Πιο συγκεκριμένα, μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης αφαιρέθηκε προσεκτικά το πήκτωμα στα οποία έχει γίνει ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών. Η μεταφορά των πρωτεϊνών έγινε με τη χρήση ειδικής συσκευής Wet Transfer. Για τη μεταφορά των πρωτεϊνών δημιουργήθηκε ένα «σάντουϊτς» από φύλλα χαρτιών Whatmann, εμβαπτισμένα στο διάλυμα μεταφοράς (Transfer Buffer – 10 x Transfer Buffer: 50mM Tris, 40mM Glycine, 0,04% SDS και 20% Methanol, pH = 8,3), τη νιτροκυτταρίνη τοποθετημένη στο θετικό πόλο, το πήκτωμα με τις πρωτεϊνες τοποθετημένο στον αρνητικό πόλο και σε επαφή με τη μεμβράνη και τέλος ίσο αριθμό από χαρτιά Whatmann. Λόγω του ότι οι πρωτεϊνες είναι φορτισμένες αρνητικά κινούνται μετά από εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος από τον αρνητικό προς το θετικό πόλο των ηλεκτροδίων, και έτσι μεταφέρονται στη νιτροκυτταρίνη. Σε κάθε στάδιο είναι απαραίτητη η αφαίρεση των φυσαλίδων. Η συσκευή ενώθηκε με συσκευή εφαρμογής τάσης μέσω ηλεκτροδίων και ακολούθησε η μεταφορά πρωτεϊνών στη νιτροκυτταρίνη για περίπου 1 ώρα και 30 λεπτά σε σταθερή τάση 100 V.

Μετά το τέλος της μεταφοράς, ακολούθησε πλύσιμο της μεμβράνης με ddH₂O και η μεμβράνη επωάστηκε για 5΄ σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση με τη χρωστική Ponceau S, ώστε να εμφανιστούν οι πρωτεϊνικές ζώνες στη μεμβράνη.

2.2.9.3 Δέσμευση μη-ειδικών θέσεων – Ανοσο-στύπωμα Western

Η δέσμευση των μη-ειδικών θέσεων στην επιφάνεια της μεμβράνης γίνεται με την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος δέσμευσης (blocking buffer), το οποίο αποτελείται από το διάλυμα πλύσης συν αλβουμίνη ορού βοός (BSA) ή γάλα, το οποίο περιέχει τις πρωτεΐνες γάλακτος. Το διάλυμα δέσμευσης είναι πλούσιο σε πρωτεΐνες που καταλαμβάνουν ελεύθερες θέσεις πρόσδεσης στη μεμβράνη, με αποτέλεσμα να ελαχιστοποιείται η μη-ειδική δέσμευση του πρωτογενούς αντισώματος.

Παρασκευάστηκε αρχικά διάλυμα 10 x TBS (Tris-buffered saline) τελικού όγκου 500 mL προσθέτοντας 12,1 g Tris base, 40 g NaCl και ρυθμίζοντας το pH στο 7,6. Για το διάλυμα

πλύσης χρησιμοποιήθηκε 1 x TBS και 0.1% v/v Tween-20. Στο τελευταίο διάλυμα προστέθηκε 5% w/v γάλα ή αλβουμίνη ορού βοός.

Η μεμβράνη επωάστηκε με το διάλυμα δέσμευσης υπό ανάδευση για 1 ώρα και 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, ακολούθησαν 3 πλύσεις με διάλυμα πλύσης TBS-T (~10 mL) για 10 λεπτά.

Ακολούθως, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επωάστηκε με πρωτογενές αντίσωμα, το οποίο δεσμεύεται στην πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει να ανιχνεύσουμε. Στη συγκεκριμένη Διατριβή χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω πρωτογενή αντισώματα:

- 1. Rabbit anti-DNP (*Chemicon, Temecula California, United States*) με αραίωση 1:150 σε 8 mL διαλύματος TBS-T περιεκτικότητας 5% w/v BSA.
- Mouse anti-β actin (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, United States, mouse monoclonal IgG) με αραίωση 1:1.000 σε 5 mL διαλύματος TBS-T περιεκτικότητας 5% w/v σε γάλα.

Η επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα πραγματοποιήθηκε υπό συνεχή ανάδευση στους 4°C καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας (O/N). Στη συνέχεια, η μεμβράνη ξεπλύθηκε με διάλυμα πλύσης TBS-T (~10 mL) για 10 λεπτά και οι πλύσεις επαναλήφθηκαν 3 φορές.

Ακολούθησε η επώαση της μεμβράνης με το δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο είναι πολυκλωνικό έναντι του είδους στο οποίο έγινε η ανοσοποίηση για την παρασκευή του πρωτογενούς αντισώματος. Η επώαση έγινε υπό ανάδευση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω δευτερογενή αντισώματα:

- 1. Goat anti-rabbit-IgG/HRP (*Chemicon, Temecula California, United States*) με αραίωση 1:300 σε 8mL διαλύματος TBS-T περιεκτικότητας 5% w/v σε γάλα.
- 2. Rabbit anti-mouse-IgG/HRP (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, United States) με αραίωση 1:10.000 σε 10mL διαλύματος TBS-T περιεκτικότητας 5% w/v σε γάλα.

Τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη Διατριβή ήταν συζευγμένα με το ένζυμο υπεροξειδάση. Στη συνέχεια, ακολούθησαν 3 δεκάλεπτες πλύσεις της μεμβράνης.

Η ανίχνευση της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης πραγματοποιήθηκε με το σύστημα ECL (Enhanced ChemiLuminescence) που βασίζεται στην ενισχυμένη χημειοφωταύγεια. Η νιτροκυτταρίνη επωάστηκε με το υπόστρωμα του ενζύμου υπεροξειδάση και τη λουμινόλη, η οποία οξειδώνεται και διεγείρεται. Μετά τη διέγερσή της, επιστρέφοντας στην κατάσταση ηρεμίας παράγει φως το οποίο προσβάλλει φωτοευαίσθητα φιλμ αυτοραδιογραφίας. Η ανίχνευση του σήματος γίνεται σε σκοτεινό θάλαμο, λόγω της φωτοευαισθησίας των φιλμ.

Πραγματοποιήθηκε επώαση της μεμβράνης με ECL για 1 – 2 λεπτά και ακολούθησε τοποθέτησή της σε ειδική κασέτα μαζί με κομμάτι φιλμ για προκαθορισμένους χρόνους έκθεσης.

Τέλος, ακολούθησε εμφάνιση των ζωνών με ειδικό εμφανιστικό διάλυμα, ξέπλυμα του φιλμ και «στερέωση» με ειδικό διάλυμα Fixer.

Μετά το τέλος της ανοσο-ανίχνευσης, είναι δυνατή η επαναχρησιμοποίηση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης, ύστερα από κατάλληλη επεξεργασία, για τον εντοπισμό και άλλων πρωτεϊνών που πιθανόν υπάρχουν στο ίδιο δείγμα. Για την πραγματοποίηση ενός νέου κύκλου ανοσο-ανίχνευσης, είναι αναγκαία η αποκόλληση (stripping) των προηγούμενων ιχνηθετών που τοποθετήθηκαν στη μεμβράνη, κατά τον πρώτο κύκλο. Αυτό επιτυγχάνεται με επώαση της μεμβράνης στους 55°C, για 30 λεπτά σε διάλυμα απορρυπαντικού PBS-T που περιέχει μερκαπτοαιθανόλη, σε κατάλληλη ποσότητα ώστε η τελική συγκέντρωσή της να είναι 0,7%. Ακολουθούν ξεπλύματα της μεμβράνης και στέγνωμα, ώστε να είναι έτοιμη για τον επόμενο κύκλο ανοσο-ανίχνευσης.

2.2.9.4 Ποσοτική εκτίμηση πρωτεϊνικών ζωνών

Τα φιλμ σαρώνονται και πυκνομετρούνται με τη βοήθεια του λογισμικου επεξεργασίας εικόνων Gel Analyser (Biosure Ltd, κατασκευή Χ. Λ. Μαργαρίτης). Ο τρόπος με τον οποίο γίνεται εκτίμηση της ποσότητας της κάθε ζώνης περιλαμβάνει τον ορισμό του υποβάθρου και του περιγράμματος της κάθε ζώνης. Συγκεκριμένα, ο χρήστης ορίζει την περιοχή του υποβάθρου της ζώνης και στη συνέχεια το περίγραμμα της ζώνης. Μετά την αφαίρεση του υποβάθρου υπολογίζεται το άθροισμα της φωτεινότητας όλων των εικονοστοιχείων (pixels) που περιέχονται στη ζώνη και οι τιμές που προκύπτουν επεξεργάζονται με τη βοήθεια του προγράμματος Excel. Για κάθε δείγμα, υπολογίζεται η τιμή της κάθε πρωτεϊνικής ζώνης, το άθροισμα των τιμών όλων των πρωτεϊνών, καθώς και η τιμή του λόγου της κάθε πρωτεΐνης προς το άθροισμα αυτό.

2.2.10 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΩΝ ΔΙΠΙΔΙΩΝ

Ο προσδιορισμός των οξειδωμένων λιπιδίων πραγματοποιήθηκε στα σώματα αρσενικών και θηλυκών εντόμων. Η διαδικασία είναι έμμεση μέσω ανίχνευσης της μαλονδιαλδεΰδης (MDA), η οποία αποτελεί τελικό προϊόν της υπεροξείδωσης των λιπιδίων (**Εικόνα 2.12A**). Η διαδικασία στηρίζεται στην αντίδραση του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBA, 2-thiobarbituric acid) με τη μαλονδιαλδεΰδη προς σχηματισμό ενός προϊόντος το οποίο έχει ροζ χρώμα και μέγιστο οπτικής απορρόφησης τα 532 nm (**Εικόνα 2.12B**). Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων βασίζεται στη σύγκριση των επιπέδων απορρόφησης με πρότυπη καμπύλη (διαλύματα MDA γνωστής συγκέντρωσης), που παρασκευάζεται παράλληλα με την επεξεργασία των δειγμάτων.



Εικόνα 2.12: Α. Παραγωγή της μαλονδιαλδεϋδης (MDA) κατά την υπεροξείδωση των λιπιδίων. Τροποποίηση από Singh et al., 2001. **Β.** Αντίδραση της μαλονδιαλδεΰδης (MDA) με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA). Ανατύπωση από Grotto et al., 2009.

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- 1. Ήπια αναισθητοποίηση των εντόμων
- 2. Συλλογή 60 εντόμων ανά δείγμα
- Μέτρηση του βάρους και προσθήκη διαλύματος TBS στο οποίο έχει προστεθεί 5% v/v BHT (butylated hydroxytoluene). Ο όγκος του διαλύματος ομογενοποίησης είναι τόσος ώστε τελικά η αναλογία του ιστού σε αυτό να είναι 10% w/v
- 4. Ομογενοποίηση
- 5. Φυγοκέντρηση στις 3.000 rpm για 10'. Μεταφορά υπερκειμένου σε καθαρό eppendorf
- 6. Αφαίρεση 175 μL από το ομογενοποίημα και μεταφορά τους σε καινούριο eppendorf
- 7. Προσθήκη 175 μL 10% SDS και ανάδευση με vortex
- 8. Επώαση για 10΄ στους 37°C
- 9. Προσθήκη 436,8 μL διαλύματος TBA (2-thiobarbituric acid), το οποίο έχει παρασκευαστεί προσθέτοντας 0,052 g σε 9 mL ddH₂O και 1 mL 100% οξικό οξύ
- 10. Επώαση για 50΄
στους 95°C
- 11. Μέτρηση απορρόφησης στα 532 nm

2.2.11 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ – ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΓΩΓΗΣ ΣΙΔΗΡΟΥ (FRAP)

Η μέτρηση των επιπέδων συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της μεθόδου FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) η οποία υπολογίζει την ικανότητα αναγωγής του Fe³⁺ σε Fe²⁺ από μικρά μόρια όπως το ουρικό ή το ασκορβικό οξύ (*Benzie and Strain, 1999*). Σε χαμηλό pH, η αναγωγή του συμπλόκου τρισθενούς σιδήρουτριπυριδυλοτριαζίνη (Fe³⁺-TPTZ) σε σύμπλοκο δισθενούς σιδήρου-TPTZ (Fe²⁺-TPTZ) οδηγεί σε έντονο μπλε χρώμα το οποίο μετράται σε μήκος κύματος 593 nm. Συνοπτικά ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα:

- 1. Προσθήκη ομογενοποιήματος στο αντιδραστήριο FRAP
- 2. Επώαση στους 37°C για 4΄
- 3. Φωτομέτρηση στα 593 nm
- Υπολογισμός της συγκέντρωσης (μM) Fe²⁺ με αντιστοίχιση της τιμής της απορρόφησης σε πρότυπη καμπύλη η οποία παρασκευάζεται από πρότυπα διαλύματα ασκορβικού οξέος γνωστής συγκέντρωσης (100 – 1000 μM)

Το αντιδραστήριο FRAP περιέχει σε αναλογία 10:1:1, ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος – οξικού νατρίου (300 mM), διάλυμα TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) (10 mM) σε HCl (40 mM) και διάλυμα FeCl₃ (20 mM), αντίστοιχα.

2.2.12 ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ

2.2.12.1 Φωτονική μικροσκοπία

Για την παρατήρηση της εξωτερικής μορφολογίας των παρασκευασμάτων, καθώς και για την ανατομία των εντόμων, χρησιμοποιήθηκαν:

- 1. Στερεομικροσκόπιο Zeiss stereo IV με ειδική διάταξη προσπίπτοντος ψυχρού φωτισμού.
- 2. Φωτονικό μικροσκόπιο Nikon Eclipse TE-2000 (Ανάστροφο) σε μεγεθύνσεις 4x και 10x.

2.2.12.2 Μικροσκόπιο φθορισμού

Ο φθορισμός είναι χαρακτηριστικό φαινόμενο πολλών μορίων (βιολογικών και μη) και προκειμένου να εκδηλωθεί απαιτείται διέγερση του μορίου με ακτινοβολία μικρού μήκους κύματος, π.χ. υπεριώδη (250 – 350 nm). Με τον τρόπο αυτό μέρος της ενέργειας που απορροφά το μόριο αποδίδεται με μεγαλύτερο μήκος κύματος (μικρότερη ενέργεια), το οποίο συνήθως εμπίπτει στην ορατή περιοχή του φάσματος. Η μικροσκοπία φθορισμού επιτρέπει την ανίχνευση ενδογενών μορίων, όπως βιταμίνες και ριβοφλαβίνη, οι οποίες αυτό-φθορίζουν. Μία από τις σημαντικότερες, όμως, σύγχρονες εφαρμογές της μικροσκοπίας φθορισμού είναι ο εντοπισμός εξωγενών ουσιών που φθορίζουν (ετερο-φθορισμός). Η εφαρμογή αυτή επιτρέπει την ανίχνευση βιομορίων μετά από σήμανσή τους με φθορίζοντα μόρια, όπως η φλουορεσκίνη που φθορίζει στο πράσινο μήκος κύματος ή η ροδαμίνη που φθορίζει στο κόκκινο (*Kapuscinski and Darzynkiewicz, 1990; Bialecka-Fornal et al., 2016*).

2.2.12.2.1 Ανίχνευση αποπτωτικών ωοθυλακίων – Χρώση με πορτοκαλί της ακριδίνης

Το πορτοκαλί της ακριδίνης (3,6-dimethylaminoacridine) είναι μία φθορίζουσα χρωστική η οποία συνδέεται με νουκλεϊκά οξέα (DNA και RNA). Η σύνθεσή της της επιτρέπει να διαφοροποιείται ανάλογα με το μόριο σύνδεσης, δηλαδή ανάλογα με το αν έχει συνδεθεί σε DNA ή RNA παράγει πράσινο ή κόκκινο χρώμα, αντίστοιχα. Σε ζωντανό ιστό αποτελεί δείκτη του θρυμματισμένου DNA και χρησιμοποιείται ευρύτατα ως ανιχνευτής της απόπτωσης (Kapuscinski and Darzynkiewicz, 1990; Wang et al., 1999). Αντίθετα, σε μονιμοποιημένο ιστό δεσμεύεται απλά στο DNA και αποτελεί πυρηνική χρώση όπως το ιωδιούχο προπίδιο.

Στη συγκεκριμένη Διατριβή, χρησιμοποιήθηκε ως αποπτωτικός δείκτης και το πρωτόκολλο χρώσης που ακολουθήθηκε ήταν το εξής: Τα ωοθυλάκια που έχουν ήδη απομονωθεί ξεπλένονται με διάλυμα Ringer's. Το διάλυμα απομακρύνεται και προστίθενται 200 μL Ringer's που περιέχει 1,6 μΜ πορτοκαλί της ακριδίνης. Ακολουθεί επώαση απουσία φωτός, υπό συνεχή ανάδευση για 5 λεπτά. Απομακρύνεται η χρωστική και τα ωοθυλάκια ξεπλένονται 3 φορές γρήγορα με διάλυμα Ringer's. Τέλος, ακολουθεί μία πλύση 5 λεπτών, υπό ανάδευση, με το ρυθμιστικό διάλυμα. Μετά την απομάκρυνση του ρυθμιστικού διαλύματος και την προσθήκη

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

νέου, τα ωοθυλάκια συλλέγονται με γυάλινη πιπέτα Pasteur και μεταφέρονται σε αντικειμενοφόρο vidal. Η παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού (Nikon TE 2005) είναι άμεση καθώς η διαδικασία δεν πρέπει να ξεπερνά τα 20 λεπτά λόγω διάχυσης της χρωστικής.

2.2.12.3 Συνεστιακό σαρωτικό μικροσκόπιο laser

Η σημαντικότερη, ίσως, εξέλιξη των τελευταίων ετών στο χώρο της Φωτονικής Μικροσκοπίας είναι η κατασκευή του Συνεστιακού Σαρωτικού Μικροσκοπίου Laser (CLSM), το οποίο έρχεται να καλύψει το κενό της τρισδιάστατης απεικόνισης κυττάρων και κυτταρικών συστατικών. Η βασική ιδέα διατυπώθηκε από το Μαθηματικό Marvin Minsky, το 1955, στις Η.Π.Α. Μία δέσμη laser σαρώνει το παρασκεύασμα είτε κινούμενη η ίδια (beam scanning) είτε με μετακίνηση του παρασκευάσματος (object scanning) (Εικόνα 2.13). Η σάρωση του αντικειμένου από τη δέσμη laser γίνεται με τη βοήθεια περιστρεφόμενων καθρεπτών (σχηματισμός εικόνας σε 0,1 sec), αφού η απόκλιση δέσμης φωτός δεν είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί με διαφορετικό τρόπο (Wilson, 1989).



Εικόνα 2.13: Σχηματική απεικόνιση ενός απλού συνεστιακού μικροσκοπίου laser. Η συνολική οπτική διάταξη αποτελείται από ένα κλασικό αλλά υψηλής ποιότητας οπτικό μικροσκόπιο, στο οποίο είναι προσαρτημένη μία «συνεστιακή μονάδα». Η μονάδα αυτή αποτελείται από μία πηγή laser, το φως της οποίας εισέρχεται στο οπτικό μικροσκόπιο μέσω μίας μικρής οπής μεταβλητής διαμέτρου (pinhole). Η λεπτή δέσμη φωτός που δημιουργείται με αυτό τον τρόπο εστιάζεται με μεγάλη ακρίβεια και σαρώνει το παρασκεύασμα με τη βοήθεια μίας συσκευής σάρωσης. Το φως μετά την αλληλεπίδρασή του με το δείγμα ανακλάται από αυτό και επιστρέφει περνώντας μέσα από μία δεύτερη μικρή οπή, για να συλλεχθεί τελικά από έναν κατάλληλο φωτοανιχνευτή. Τροποποίηση από http://www.upf.edu/sct/_img/microscopia/clsm5.gif.

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

Το μικροσκόπιο αυτό χαρακτηρίζεται από δύο σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι του κλασικού οπτικού μικροσκοπίου: Α) τη βελτιωμένη οριζόντια διακριτική ικανότητά του και Β) τη μοναδική δυνατότητα για ανάλυση του βάθους του δείγματος, κάτι το οποίο περιγράφεται με τον όρο «οπτική μικροτομία» (Wilson and Sheppard, 1984; Wilson and Carlini, 1987).

Πρακτικά, η έννοια της οπτικής τομής αναφέρεται στο γεγονός ότι το συνεστιακό μικροσκόπιο «βλέπει» μόνο εκείνες τις περιοχές που βρίσκονται μέσα ή πολύ κοντά στο εστιακό επίπεδο. Η ιδιότητα αυτή επιτρέπει, με την κατακόρυφη μετακίνηση του δείγματος, τη διαδοχική εστίαση σε μία σειρά από διαδοχικά, οριζόντια επίπεδα ενός παχέος δείγματος. Οι εικόνες που λαμβάνονται με αυτό τον τρόπο μπορούν στη συνέχεια να αναπαρασταθούν σε τρεις διαστάσεις (οπτική επανασύσταση) με τη βοήθεια ειδικού λογισμικού (Εικόνα 2.14).



Εικόνα 2.14: *Α* – *Ε.* Σειριακές οπτικές τομές σιελογόνου αδένα μέσω Συνεστιακού σαρωτικού μικροσκοπίου laser. Ράβδοι μεγέθυνσης = 60 μm. ΣΤ. Ανασύσταση οπτικών τομών. Ράβδος μεγέθυνσης = 114 μm. Αδημοσίευτα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης.

2.2.12.3.1 Ανίχνευση δραστικών μορφών οξυγόνου μέσω Συνεστιακού σαρωτικού μικροσκοπίου laser

Πραγματοποιήθηκε ανατομία θηλυκών εντόμων, λήψη ωοθηκών και διαχωρισμός ωοθυλακίων όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.2.4. Τα ωοθυλάκια επωάστηκαν με 1 μΜ εστέρα CM-H₂DCFDA, διαλυμένο σε ισότονο διάλυμα PBS, υπό ανάδευση στο σκοτάδι για 30 λεπτά. Ακολούθησε αφαίρεση του διαλύματος της χρωστικής και επώαση με PBS για 20' στο σκοτάδι, υπό ανάδευση. Τέλος, τα ωοθυλάκια ξεπλύθηκαν 3 φορές και μεταφέρθηκαν σε ειδική αντικειμενοφόρο vidal για παρατήρηση σε Συνεστιακό σαρωτικό μικροσόπιο laser.

2.2.12.4 Ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης αποτελεί ένα από τα είδη ηλεκτρονικών μικροσκοπίων που έχουν αναπτυχθεί μέχρι σήμερα. Οι τύποι διαφέρουν ανάλογα με τον τρόπο που η δέσμη ηλεκτρονίων αλληλεπιδρά με την ύλη. Στην περίπτωση του μικροσκοπίου διέλευσης, ή σταθερής δέσμης (Transmission ή Scanning Electron Microscope TEM - SEM), το δείγμα αφήνει να περάσουν τα ηλεκτρόνια. Για να μπορεί να περάσει ένα σημαντικό ποσοστό (50 – 90%) της προσπίπτουσας δέσμης ηλεκτρονίων, το δείγμα πρέπει να είναι πολύ λεπτό (~500 Å). Σε ένα συμβατικό ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης, ένα λεπτό δείγμα ακτινοβολείται από μία δέσμη ηλεκτρονίων ομοιόμορφης πυκνότητας ρεύματος. Το δυναμικό επιτάχυνσης σε ένα τυπικό TEM είναι 80 – 200 kV. Τα ηλεκτρόνια που διαπερνούν το δείγμα παράγονται με θερμιονική εκπομπή από ένα νήμα βολφραμίου, το οποίο βρίσκεται στο πάνω μέρος της στήλης κενού. Η εκπεμπόμενη δέσμη ηλεκτρονίων επιταχύνεται με τη βοήθεια ηλεκτροδίων που βρίσκονται σε υψηλή τάση (kV – MV). Η δέσμη εστιάζεται σε μία μικρή περιοχή τετραγωνικών μικρομέτρων (μm²) στο επίπεδο του αντικειμένου με τη βοήθεια δύο συγκεντρωτικών φακών, οι οποίοι είναι δύο μαγνητικά πηνία τοποθετημένα έτσι ώστε η δέσμη των ηλεκτρονίων να περνά κατά μήκος του άξονά τους. Μετά το δείγμα βρίσκεται ο αντικειμενικός φακός, ο οποίος επιτρέπει τη μελέτη της κρυσταλλικής δομής του αντικειμένου, μέσω του σχηματισμού περίθλασης μακρινού πεδίου του δείγματος. Στη συνέχεια, τα ηλεκτρόνια διέρχονται από έναν ενδιάμεσο φακό, με την βοήθεια του οποίου σχηματίζεται ένα ενδιάμεσο είδωλο, το οποίον αποτελεί μεγεθυμένη απεικόνιση του αντικειμένου. Το ενδιάμεσο αυτό είδωλο, μέσω ενός τελευταίου φακού (προβολικός φακός), προβάλλεται, μετά από μία τελευταία μεγέθυνση, σε φθορίζουσα οθόνη, για παρατήρηση ή φωτογράφηση (Εικόνα 2.15).



Εικόνα 2.15: Α. Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης και πορεία ηλεκτρονίων.. Β. Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης Philips EM 300 του Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, ΕΚΠΑ.

2.2.12.4.1 Ανίχνευση μορφολογικών αλλοιώσεων λεπτής δομής – Έγκλειση σε εποξεικές ρητίνες

Μετά από ανατομία σε ισότονο διάλυμα Ringer's για λήψη ολόκληρων ωοθηκών ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία έγκλεισης (Margaritis et al., 1980):

- 1. Μονιμοποίηση σε διάλυμα 2% γλουταρικής αλδεΰδης και 2% φορμαλδε
ΰδης σε 0,1 Μ κακοδυλικό νάτριο pH = 7,4 για 90΄ σε θερμοκρασία δωματίου
- 2. Ξέπλυμα σε διάλυμα 4% σακχαρόζη σε 0,08 M κακοδυλικό νάτριο pH = 7,4, 2 x 20΄ στους 4°C
- 3. Μονιμοποίηση σε διάλυμα 2% τετροξείδιο του οσμίου σε ddH2O για 1 ώρα στους 4°C
- 4. Ξέπλυμα σε διάλυμα 4% σακχαρόζη σε 0,08 M κακοδυλικό νάτριο pH = 7,4, 2 x 20΄ στους 4°C
- 5. Αφυδάτωση των δειγμάτων σε διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης αιθυλικής αλκοόλης (π.χ. 30%, 50% και 70%) για 10΄ σε κάθε διάλυμα στους 4°C
- 6. Χρώση en bloc με διάλυμα 2% οξικού ουρανυλίου σε 70% αιθυλική αλκοόλη για 30΄ στους 4°C
- Συνέχιση της αφυδάτωσης σε διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης αιθυλικής αλκοόλης (π.χ. 85%, 95% και 100%) για 10' σε κάθε διάλυμα στους 4°C

- Αφυδάτωση σε 100% απόλυτα αφυδατωμένη αλκοόλη για 2 x 15΄ σε θερμοκρασία δωματίου
- 9. Επώαση σε προπυλενοξείδιο 2 x 15' υπό συνεχή ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου
- 10. Διαπότιση σε διάλυμα Ρητίνης:Προπυλενοξειδίου 1:3 για 15΄ υπό συνεχή ανακίνηση
- 11. Διαπότιση σε διάλυμα Ρητίνης:Προπυλενοξειδίου 1:1 για 30΄ υπό συνεχή ανακίνηση
- 12. Διαπότιση σε διάλυμα Ρητίνης:Προπυλενοξειδίου 3:1 για 60΄ υπό συνεχή ανακίνηση
- 13. Διαπότιση σε διάλυμα καθαρής Ρητίνης για 5΄ x 3 φορές υπό συνεχή ανακίνηση
- 14. Πολυμερισμός της ρητίνης σε ειδικές πλαστικές θήκες για 1 ημέρα στους 60°C. Πριν τοποθετήσουμε τις θήκες στον κλίβανο, γίνεται προσανατολισμός των δειγμάτων κάτω από στερεοσκόπιο ανατομίας, προκειμένου να είναι δυνατές οι κατά μήκος ή οι εγκάρσιες τομές.

2.2.12.4.2 Τομές από block εποξεικών ρητινών

Ακολούθησαν τομές των block (Εικόνα 2.16) μετά από ειδική επεξεργασία (trimming) για επιλογή ωοθυλακίων συγκεκριμένων σταδίων. Αρχικά, ημίλεπτες τομές πάχους 1 - 2 μm τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες σε σταγόνα ddH₂O και στη συνέχεια αφέθηκαν σε θερμαινόμενη πλάκα ώστε οι τομές να επικαθίσουν. Χρωματίστηκαν με 0,5% μπλε της τολουϊδίνης για 80 δευτερόλεπτα. Η περίσσεια της χρωστικής απομακρύνθηκε με τρεχούμενο απεσταγμένο νερό και το παρασκεύασμα στέγνωσε με ελαφρά θέρμανση. Οι αντικειμενοφόροι καλύφθηκαν με μία σταγόνα Biomount, ώστε να επιτραπεί η παρατήρηση με ελαιοκαταδυτικό φακό 100x. Ακολούθησαν λεπτές τομές πάχους 60 έως 100 nm, χρησιμοποιώντας γυάλινα μαχαίρια σε υπερμικροτόμο Sorval MT-2. Οι λεπτές τομές τοποθετήθηκαν σε χάλκινα πλέγματα διαμέτρου 3 mm και ανοιγμάτων 100, 150 και 200 Mesh, στη ματ πλευρά τους.



Εικόνα 2.16: Α. Block εποξεικών ρητινών στα οποία έχουν εγκλειστεί ωοθήκες του εντόμου Drosophila melanogaster. Ράβδος μεγέθυνσης = 9,2 μm **B.** Εικόνα ωοθήκης εγκλεισμένης σε εποξεική ρητίνη από φωτονικό μικροσκόπιο. Τα μεγάλα χοριογεννετικά στάδια μετά τη χρώση με τον κιτρικό μόλυβδο χρωματίζονται σκούρο καφέ, ενώ μικρότερα στάδια χρωματίζονται με ανοιχτό καφέ χρώμα. Ράβδος μεγέθυνσης = 92 μm.

2.2.12.4.3 Χρώση τομών

Εφαρμόστηκε διπλή χρώση με οξικό ουρανύλιο και κιτρικό μόλυβδο:

Οξεικό Ουρανύλιο (UA): Παρασκευάστηκε διάλυμα οξεικού ουρανυλίου 7% σε ddH2O.

Κιτρικός Μόλυβδος (LC): Παρασκευάστηκε διάλυμα κιτρικού μολύβδου, ζυγίζοντας 0,01 - 0,02 mg σε 8 mL ddH₂O.

2.2.12.4.4 Παρατήρηση σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης

Η παρατήρηση των παρασκευασμάτων ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης έγινε σε μικροσκόπιο Philips EM 300 σε ανοδική τάση 60 kV. Οι ηλεκτρονιογραφίες αποτυπώθηκαν σε ορθοχρωματικό φωτογραφικό φιλμ 35 mm. Οι φωτογραφίες ψηφιοποιήθηκαν με τον σαρωτή Polaroid SprintScan 35Plus. Στη συνέχεια, οι εικόνες επεξεργάστηκαν με το λογισμικό εικόνας Adobe Photoshop CS.

2.2.13 ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΩΝ

Το λεξικό "American Heritage" ορίζει τη συστοιχία ως την «παράταξη σε τακτική διάταξη». Η τεγνολογία των μικροσυστοιγιών (microarrays) DNA επιτρέπει την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης, σε επίπεδο mRNA, μεγάλου αριθμού γονιδίων ταυτόχρονα. Μία μικροσυστοιχία αποτελεί εργαλείο για την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης, καθώς μπορεί να περιέχει αλληλουχίες πολλών γονιδίων ακινητοποιημένων με ομοιοπολικούς δεσμούς, και διατεταγμένων με συμμετρικό τρόπο επάνω σε μία στερεή επιφάνεια, όπως τσιπς σιλικόνης ή μεμβράνες από νάιλον. Είναι σημαντικό οι αλληλουχίες των γονιδίων να είναι τοποθετημένες στο τσιπ, το οποίο αποτελεί πλέον το πιο διαδεδομένο υλικό προσκόλλησης, με συγκεκριμένο τρόπο, ώστε να μπορεί μετά να ταυτοποιηθεί η κάθε αλληλουχία και άρα το κάθε γονίδιο. Οι μικροσυστοιγίες DNA διακρίνονται σε δύο ομάδες, ανάλογα με το υλικό που γρησιμοποιείται ως ιγνηθέτης για την υβριδοποίηση των κυτταρικών νουκλεϊκών οξέων. Πρόκειται για μικροσυστοιχίες που είτε περιλαμβάνουν μικρές ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες, είτε αποτελούνται από θραύσματα συμπληρωματικών DNA μεγαλύτερου μήκους που προέρχονται από βιβλιοθήκες cDNA ή από προϊόντα ενίσχυσης αλυσι(δ)ωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Οι μικροσυστοιχίες ολιγονουκλεοτιδίων πλεονεκτούν επειδή δεν απαιτούν την προβληματική πολλές φορές- πρόσβαση σε μεγάλες συλλογές κλώνων cDNA. Επιπλέον, μπορούν να διακρίνουν γονίδια που παρουσιάζουν εκτεταμένη ομολογία στη νουκλεοτιδική τους αλληλουχία, ή αποτελούν προϊόντα διαφορικής μεταγραφικής ωρίμανσης του RNA. Εντούτοις, η παραγωγή τους απαιτεί περισσότερο εξειδικευμένο εξοπλισμό σε σύγκριση με τις μικροσυστοιχίες συμπληρωματικών DNA. Oι συστοιχίες ολιγονουκλεοτιδίων ή συμπληρωματικού DNA είναι δυνατόν να περιλαμβάνουν μέχρι 25.000 συμπληρωματικά DNA ή ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες γνωστών γονιδίων. Η μέθοδος των μικροσυστοιχίων γονιδίων εκμεταλλεύεται την εκλεκτική φύση της αρχής της συμπληρωματικότητας μεταξύ

νουκλεϊκών οξέων (DNA-DNA ή DNA-RNA) και του υβριδισμού υπό αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας, ενώ η ανάλυση στηρίζεται στη χρήση χημειοφωταύγειας, φθοριζουσών ουσιών ή ραδιενεργών ισοτόπων. Αναλυτικότερα, η απομόνωση RNA από το προς ανάλυση υλικό (στη συγκεκριμένη Διατριβή ωοθηκικός ιστός) συνοδεύεται από την ενζυματική μετατροπή του (αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής), σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) ή cRNA, το οποίο στη συνέχεια υβριδοποιείται στους ιχνηθέτες (DNA probes) που είναι ακινητοποιημένοι στο συμπαγές υπόστρωμα. Ο επισημασμένος στόχος συνδεόμενος με τους ιχνηθέτες σε κάθε κηλίδα (spot) ανιχνεύεται συνήθως με μεθόδους χημειοφωταύγειας (chemiluminescence), φθορισμού (fluorescence) ή ραδιενέργειας (radioactivity). Το σήμα που παράγεται σε κάθε κηλίδα αντιπροσωπεύει την ποσότητα της έκφρασης σε mRNA του συγκεκριμένου γονιδίου που υπάρχει στο αρχικό δείγμα RNA.

2.2.13.1 Απομόνωση ολικού RNA

Θηλυκά έντομα 4 ημερών συλλέχθηκαν και αναισθητοποιήθηκαν με αιθέρα. Η ανατομία για λήψη των ωοθηκών τους πραγματοποιήθηκε σε 1 x Ringer's. Κατά την ανατομία έγινε διαχωρισμός σταδίων και τα στάδια μετά το 12 απομακρύνθηκαν. Μετά από αφαίρεση του ισότονου διαλύματος προστέθηκε Trizol και ακολούθησε ομογενοποίηση των δειγμάτων. Τέλος, τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε βαθιά κατάψυξη -80°C μέχρι την ανάλυση των γονιδιακών μικροσυστοιχιών.

Για την απομόνωση του ολικού RNA, τα δείγματα ξεπάγωσαν και προστέθηκε χλωροφόρμιο σε αναλογία όγκου 1:5 με τον όγκο του Trizol που είχε αρχικά προστεθεί. Στη συνέχεια, ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο απομόνωσης που προτείνεται από την εμπορικά διαθέσιμη, τυποποιημένη συσκευασία Nucleospin II RNA. Η συγκέντρωση και καθαρότητα του RNA προσδιορίστηκαν μέσω φωτομέτρησης στα 240, 260, 280 και 320 nm με χρήση NanoDrop φωτομέτρου. Όλα τα δείγματα εμφάνισαν σχεδόν μηδενικές τιμές στα 240 nm και 320 nm, τα οποία είναι ενδεικτικά των προσμίξεων από τη φαινόλη και τα άλατα των διάφορων διαλυμάτων, ενώ ταυτόχρονα η αναλογία 260 nm / 280 nm ήταν πολύ κοντά στο 2 για όλα τα δείγματα. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ποιοτικός έλεγχος για την ακεραιότητα του RNA με το Agilent Bioanalyzer. Χρησιμοποιήθηκε μικρή ποσότητα δείγματος, το οποίο διαχωρίστηκε ηλεκτροφορητικά σε ένα τσιπ και ανιχνεύθηκε μέσω φθορισμού μετά από διέγερσή του με κατάλληλο laser. Η χρήση ενός δείκτη γνωστού μοριακού βάρους χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση των RNA μορίων μετά την ηλεκτροφόρηση, ενώ η ακεραιότητα του RNA μπορεί να εκτιμηθεί με απεικόνιση των 18S και 28S ριβοσωμικών RNA ζωνών (Εικόνα 2.17). Ένα RNA το οποίο δεν είναι θρυμματισμένο, αλλά δομικά ακέραιο εμφανίζει υψηλές κορυφές και στις 2 υπομονάδες. Ωστόσο, στα έντομα στο μοριακό βάρος του 28S ριβοσωμικού RNA εμφανίζεται μικρή κορυφή κάτι όμως που δεν αντιστοιχεί σε κατακερματισμένο RNA. Στα έντομα αυτό το προφίλ διαφέρει, καθώς το 28S rRNA, στα περισσότερα έντομα όταν θερμανθεί, αλλάζει στερεοδιαμόρφωση, πιθανά λόγω αποδιάταξης των δεσμών υδρογόνου, και ηλεκτροφορητικά βρίσκεται πολύ κοντά στο 18S rRNA (Εικόνα 2.17).



Εικόνα 2.17: Διάγραμμα απεικόνισης των κορυφών φθορισμού που εμφανίζουν τα ριβοσωμικά RNA 18S και 28S. Αδημοσίευτα αποτελέσματα της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής.

2.2.13.2 Σύνθεση cRNA και υβριδοποίηση

Για την ανάλυση γονιδιακών μικροσυστοιχιών χρησιμοποιήθηκαν 200 ng από ολικό RNA και εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο που περιγράφεται από τον κατασκευαστή στο εγχειρίδιο Gene Chip Expression Analysis Technical Manual (*Affymetrix Inc., Santa Clara, California, United States*) (**Εικόνα 2.18**).



Εικόνα 2.18: Σχηματική απεικόνιση του πρωτοκόλλου που ακολουθήθηκε για την ανάλυση των μικροσυστοιχιών.

Αναλυτικότερα, το RNA που απομονώθηκε χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση cDNA (complementary DNA). Ακολούθησε σύνθεση βιοτινυλιωμένου cRNA (complementary RNA), με *in vitro* μεταγραφή. Απομονώθηκε το poly[A⁺]-mRNA, με τη βοήθεια ειδικών σφαιριδίων που έφεραν στην επιφάνειά τους poly[T⁺] αλληλουχίες (Εικόνα 2.19). Τελικά 12 μg cRNA κερματίστηκε σε μικρότερα μόρια 100 νουκλεοτιδίων και υβριδοποιήθηκε με τις γονιδιακές μικροσυστοιχίες GeneChip® *Drosophila* Genome 2.0 Array (*Affymetrix Inc., Santa Clara, California, United States*), οι οποίες περιείχαν ~18.880 ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες – ιχνηθέτες (probes) που αντιστοιχούν σε περισσότερα από 18.500 μετάγραφα.



Εικόνα 2.19: Στάδια της διαδικασίας καθαρισμού και απομόνωσης του poly[A⁺] cRNA.

2.2.13.3 Βιοπληροφορική ανάλυση

Η ανάλυση των δεδομένων έγινε μέσω του προγράμματος R/Bioconductor. Το υπόβαθρο διορθώθηκε μέσω του MAS5.0 αλγορίθμου, ενώ οι ανιχνευτές (probes) κανονικοποιήθηκαν με τη διάμεσο και μετασχηματίστηκαν με τον λογάριθμο του 2. Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το Student's two-tailed T-test, ενώ το κατώφλι για διαφορική έκφραση γονιδίων μεταξύ ακτινοβολημένων εντόμων και μαρτύρων ορίστηκε στο 1,25. Για την ανάλυση των γονιδίων και την κατάταξή τους σε διάφορες βιολογικές λειτουργίες και μονοπάτια χρησιμοποιήθηκαν οι βάσεις δεδομένων: Gene Ontology (http://www.geneontology.org), Flybase (http://flybase.org), David Knowledgebase (http://david.abcc.ncifcrf.gov), Panther Classification System (http://www.pantherdb.org), KEGG pathway maps (http://www.genome.jp/kegg/pathway.html), (Interpro (http://www.ebi.ac.uk/interpro/) και Ingenuity System (http://www.ingenuity.com).

2.2.14 ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟ XPONO (Quantitative real-time polymerase chain reaction / qRT-PCR)

Η αλυσι(δ)ωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) αποτελεί μία τεχνική που βασίζεται στον εκθετικό πολλαπλασιασμό των μορίων DNA ή cDNA από μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση, όπως αυτή του Thermus aquaticus (Taq). Κατά την PCR χρησιμοποιείται ένα ζεύγος συνθετικών ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (primers), καθένας από τους οποίους υβριδοποιείται, λόγω της συμπληρωματικότητας των βάσεων A-T και C-G, σε έναν κλώνο ενός δίκλωνου μορίου DNA (dsDNA). Το ζεύγος των εκκινητών οριοθετεί την περιοχή που θα πολλαπλασιαστεί εκθετικά. Οι υβριδοποιμένοι εκκινητές λειτουργούν ως υπόστρωμα για την DNA πολυμεράση και έτσι για κάθε αλυσίδα του υποστρώματος δημιουργείται ένας συμπληρωματικός κλώνος DNA μέσω της διαδοχικής προσθήκης δεοξυριβο(ζο)νουκλεοτιδίων (dNTPs). Η διαδικασία της PCR συνήθως περιλαμβάνει τρία βασικά βήματα που επαναλαμβάνονται για 30 – 40 φορές:

- 1. Αποδιάταξη (denaturation) του δίκλωνου συνήθως DNA στους 94 95°C
- Υβριδοποίηση (annealing) των εκκινητών στα μονόκλωνα μόρια DNA σε μία θερμοκρασία που εξαρτάται από το μήκος και την αλληλουχία τους, χαρακτηριστική για κάθε ζεύγος εκκινητών
- Επιμήκυνση (extension) των εκκινητών στους 72°C με τη βοήθεια της DNA πολυμεράσης και με δομικό υλικό τα dNTPs

Η ποσοτική PCR (quantitative PCR, qPCR) είναι μία γρήγορη, αξιόπιστη και ευαίσθητη μέθοδος, η οποία επιτρέπει την ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων αλληλουχιών-στόχων. Υπάρχουν δύο είδη ποσοτικής PCR: (A) η τελικού σημείου (end-point), όπου ο υπολογισμός του προϊόντος πραγματοποιείται στο τέλος της αντίδρασης, με εμφανές μειονέκτημα τη μείωση της αποδοτικότητας της αντίδρασης, λόγω της κατανάλωσης των αντιδρώντων και της συσσώρευσης αναστολέων, με τελικό αποτέλεσμα την ύπαρξη δυσκολιών όσον αφορά στην αξιόπιστη ποσοτικοποίηση και (B) η πραγματικού χρόνου (real-time) PCR, όπου η μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος πραγματοποιείται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), γεγονός που επιτρέπει στον ερευνητή να παρακολουθεί όλη τη διαδικασία της αντίδρασης. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος.

2.2.14.1 Σύνθεση cDNA με τη μέθοδο της PCR αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse transcription polymerase chain reaction / RT-PCR)

Από το ολικό απομονωμένο RNA (βλ. Ενότητα 2.2.13.1) χρησιμοποιήθηκαν 10 μg, στα οποία προστέθηκε DNάση σε συνδυασμό με τη νουκλεάση HeaIII για περαιτέρω πέψη οποιουδήποτε υπολείμματος DNA στο δείγμα. Η πέψη πραγματοποιήθηκε στους 37°C για 1 ώρα.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της 1^{ης} αλυσίδας του συμπληρωματικού cDNA με τη μέθοδο PCR της αντίστροφης μεταγραφάσης (RT-PCR). Χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο RevertAidTM H Minus Reverse Transcriptase, με το ακόλουθο πρωτόκολλο:

- 1. Παρασκευάστηκε για το κάθε δείγμα μίγμα το οποίο περιείχε 9 μg ολικό RNA, 1 μg/μL oligo(dT)₁₈ primer και ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 11,5 μL
- 2. Το μίγμα επωάστηκε για 5΄ λεπτά στους 65°C και αφέθηκε στους 4°C για 5΄. Η επώαση έγινε σε ειδικό μηχάνημα Thermocycler
- 3. Στο μίγμα προστέθηκαν 200 units του ενζύμου RevertAid[™] H Minus Reverse Transcriptase, 1 mM dNTPs και το ειδικό διάλυμα (buffer) για το ένζυμο
- 4. Ακολούθησε επώαση των αντιδραστηρίων στους 65°C για 1 ώρα

2.2.14.2 Κινητική της αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real time PCR)

Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε τρεις φάσεις με βάση τη συγκέντρωση των συστατικών της αντίδρασης: (A) στην εκθετική (exponential), (B) τη γραμμική (linear) και (Γ) στη φάση κορεσμού (plateau) (Εικόνα 2.20).



Εικόνα 2.20: Χαρακτηριστική καμπύλη ενίσχυσης, όπου διακρίνονται η εκθετική, η γραμμική και η φάση κορεσμού. Το όριο φθορισμού που τίθεται για τον προσδιορισμό της τιμής Ct ορίζεται έτσι

ώστε να βρίσκεται πάνω από το επίπεδο «θορύβου» (baseline) και στην αρχή της εκθετικής φάσης. Στον οριζόντιο άζονα παριστάνεται ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης, ενώ στον κατακόρυφο η τιμή των επιπέδων φθορισμού. Αδημοσίευτα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης.

Κατά την εκθετική φάση, σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται ακριβής διπλασιασμός του προϊόντος, καθώς όλα τα απαραίτητα για την PCR συστατικά (π.χ. dNTPs, εκινητές και πολυμεράση) βρίσκονται σε περίσσεια (100% αποδοτικότητα). Καθώς συνεχίζεται η αντίδραση, επέρχεται η γραμμική φάση κατά την οποία κάποια από τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται, ενώ παράλληλα συσσωρεύονται, σταδιακά, αναστολείς. Στη συγκεκριμένη φάση, η αντίδραση της ενίσχυσης επιβραδύνεται, καθώς μειώνεται η αποδοτικότητά της και τελικά σταματάει εντελώς, οπότε η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού. Το σημείο κορεσμού διαφέρει μεταξύ των δειγμάτων και εξαρτάται από τις κινητικές των αντιδράσεών τους. Οι μετρήσεις για την ποσοτικοποίηση αφορούν στην εκθετική φάση της αντίδρασης. Σημαντική παράμετρο για την ποσοτικοποίηση αποτελεί η τιμή Ct (cycle threshold). Πρόκειται για τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο (threshold). Η τιμή του ορίου αυτού ορίζεται πάνω από την αντίστοιχη του μη-ειδικού σήματος (background). Η τιμή Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος: όσο μικρότερη είναι η τιμή Ct τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος.

2.2.14.3 Σύστημα ανίχνευσης

Για την ανίχνευση των προϊόντων της PCR χρησιμοποιήθηκε η φθορίζουσα χρωστική SYBR green I, η οποία ενσωματώνεται σε δίκλωνο μόριο DNA (dsDNA). Η ουσία αυτή διεγείρεται με ακτινοβολία μήκους κύματος 497 nm και εκπέμπει στα 520 nm. Σημειώνεται ότι η SYBR green I δε φθορίζει όταν βρίσκεται ελεύθερη σε διάλυμα. Ωστόσο, η ενσωμάτωσή της στο DNA κατά τη σύνθεσή του, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού (**Εικόνα 2.21**). Η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος.



Εικόνα 2.21: Αρχή της μεθόδου real time PCR της μη-ειδικής ανίχνευσης με τη φθορίζουσα χρωστική SYBR green Ι. Όταν η χρωστική βρίσκεται ελεύθερη στο διάλυμα δεν παράγεται φθορισμός.

Η ενσωμάτωσή της στο DNA κατά τη σύνθεσή του σε συνδυασμό με τη διέγερσή της με ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού. Η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος. Τροποποίηση από http://projects.nfstc.org/pdi/Subject03/pdi_s03_m05_07_a.htm.

Η χρήση μη-ειδικών συστημάτων ανίχνευσης παρουσιάζει τόσο πλεονεκτήματα όσο και μειονεκτήματα. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της SYBR green Ι είναι η δυνατότητα χρήσης της με οποιοδήποτε ζευγάρι εκκινητών, για την ενίσχυση οποιασδήποτε αλληλουχίας-στόχου, γεγονός που την καθιστά πολύ πιο οικονομική μέθοδο από την χρήση ειδικού ανιχνευτή (probe). Επιπλέον, συνιστά μια ιδιαίτερα ευαίσθητη μέθοδο, καθώς σε κάθε μόριο DNA που συντίθεται δεσμεύονται πολλά μόρια χρωστικής, με αποτέλεσμα την ενίσχυση του προκύπτοντος σήματος. Αντίθετα, σημαντικό μειονέκτημα της SYBR green Ι αποτελεί το γεγονός ότι προσδένεται σε όλα τα δίκλωνα μόρια DNA που συντίθενται κατά την αντίδραση ενίσχυσης, στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα πιθανά διμερή των εκκινητών, καθώς και μη-ειδικά προϊόντα που ενδέχεται να προκύπτουν. Το γεγονός αυτό οδηγεί σε λανθασμένη υπερεκτίμηση της συγκέντρωσης της αλληλουγίας-στόγου. Παρόλα αυτά, υπάργει τρόπος να ξεπεραστούν αυτοί οι περιορισμοί. Ο σωστός σχεδιασμός ειδικών εκκινητών, όπως επίσης και η βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης, μπορούν να συμβάλλουν στην αποτροπή δημιουργίας διμερών των εκκινητών. Επιπλέον, η μελέτη των καμπύλων αποδιάταξης (melting curves), μετά το πέρας της αντίδρασης, δίνει τη δυνατότητα διαγωρισμού του φθορισμού που προέκυψε από την ενίσχυση της αλληλουγίας-στόγου από το φθορισμό που οφείλεται στα διμερή των εκκινητών ή σε μηειδικά προϊόντα.

2.2.14.4 qReal time PCR – Πειραματικό μέρος

Από τα cDNA δείγματα χρησιμοποιήθηκαν 8 ng για την αντίδραση qPCR. Σε αυτά προστέθηκαν 0,25 μM forward και reverse primers (ζεύγη εκκινητών), οι αλληλουχίες των οποίων παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.2, και το ειδικό διάλυμα (buffer) Maxima SYBR Green qPCR Master Mix, το οποίο περιέχει MgCl₂, KCl και (NH₄)₂SO₄, το ένζυμο Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase και τη χρωστική SYBR Green I, η οποία διεγείρεται στα 494 nm και εκπέμπει στα 521 nm.

Πίνακας 2.2: Στον	πίνακα παρουσ	ιάζονται οι α	αλληλουχίες	των ζευγαριώι	ν εκκινητών που	σχεδιάστηκαν για
τα γο	ννίδια στόχους, 1	το μέγεθος τα	ου προϊόντος	· και οι θερμοκ	ερασίες αποδιάτο	αζής τους (Tm)

ΓΟΝΙΔΙΟ ΣΤΟΧΟΣ	АЛ	ΛΗΛΟΥΧΙΑ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	ΜΕΓΕΘΟΣ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ (bp)	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗΣ (Tm)
Drosomycin (Drs)	Forward: Reverse:	5'ACTTGTTCGCCCTCTTCGC 3' 5'CACCAGCACTTCAGACTGG 3'	184 bp	Tm = 62.32 Tm = 62.32
UpSET	Forward: Reverse:	5'GGTATTGGTGTCACGGTGTC 3' 5'CTGTGCTGGCTAATCCCATC 3'	154 bp	Tm = 62.43 Tm = 62.43
Luna	Forward: Reverse:	5'TACTACTCGTCGCAGCC 3' 5'TGTCCCACGGATTGTCCAG 3'	128 bp	Tm = 62.17 Tm = 62.32
Eip93F	Forward: Reverse:	5'CCGAGTCAGCAGCAACTG 3' 5'GTGCCCTGTTGCCACTG 3'	147 bp	Tm = 62.17 Tm = 62.01
Actin5C	Forward: Reverse:	5'CGACTTTGAGCAGGAGATGG 3' 5'CAAGAACGAGGGCTGGAAC 3'	139 bp	Tm = 62.45 Tm = 62.32
Claret	Forward: Reverse:	5'TTGGACAGGGAAGCTGCG 3' 5'CATGTGGCTGTTGGGTGC 3'	131 bp	Tm = 62.18 Tm = 62.18
Ras-related which interacted with Calmodulin (RIC)	Forward: Reverse:	5'CGGTCTGCGGGTCTATAAG 3' 5'GTGGTAGTCCAGGAAACTGTG 3'	100 bp	Tm = 62.32 Tm = 62.67
Tetraspanin 42E (Tsp42Ei)	Forward: Reverse:	5'TGGAGAATCAGTGGGAGCTG 3' 5'GCAACAGCTACTTGGAACGG 3'	143 bp	Tm = 62.45 Tm = 62.45
Anon87Ab	Forward: Reverse:	5'GTGAAACAGCCACAGCATTTGC 3' 5'CCACCATTGGAATAGTCGTCCT 3'	142 bp	Tm = 62.67 Tm = 62.67
CG40178	Forward: Reverse:	5'TGCGTTGGTACTGTTCTGG 3' 5'TGGTTCGGACTCTGATTCTTC 3'	191 bp	Tm = 62.16 Tm = 62.61

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 15 μL και οι κύκλοι που ακολουθήθηκαν περιγράφονται αναλυτικά στον Πίνακα 2.3.

BHMA	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ	ΔΙΑΡΚΕΙΑ	ΕΠΑΝΑΛΑΗΨΕΙΣ
Αρχική αποδιάταζη	95°C	10 λεπτά	1
Αποδιάταζη	95°C	15 δευτερόλεπτα	
Πρόσδεση	Θερμοκρασία ειδική για κάθε ζεύγους εκκινητών	30 δευτερόλεπτα	40
Επιμήκυνση	72°C	30 δευτερόλεπτα	

Πίνακας 2.3: Αναλυτική περιγραφή των βημάτων της qPCR αντίδρασης

2.2.14.5 Ανάλυση – Ποσοτικοποίηση αποτελεσμάτων

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων της real time PCR χρησιμοποιήθηκε η σχετική ποσοτικοποίηση. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, οι αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης του mRNA ενός γονιδίου-στόχου, προσδιορίζονται σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα mRNA ενός κατάλληλου, παράλληλα ενισχυόμενου, ενδογενούς γονιδίου αναφοράς-ελέγχου (reference gene), του οποίου η έκφραση παραμένει σταθερή στις εκάστοτε προς μελέτη διαφορετικές συνθήκες. Επιπλέον, πραγματοποιείται σύγκριση των Ct τιμών των δειγμάτων προς ανάλυση με τις αντίστοιχες τιμές ενός δείγματος-αναφοράς, που γνωρίζουμε πως εκφράζει τα γονίδια στόχους. Οι τιμές Ct του mRNA-στόχου, τόσο των δειγμάτων προς εξέταση όσο και του δείγματος αναφοράς, κανονικοποιούνται ως προς τις αντίστοιχες τιμές του ενδογενούς γονιδίου αναφοράς απαιτείται για τη διόρθωση των πιθανών διαφορών μεταξύ των δειγμάτων, οι οποίες οφείλονται σε διαφορετική συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος (cDNA) ή σε διαφορές στην απόδοση της αντίδρασης ενίσχυσης.

Η μέθοδος σχετικής ποσοτικοποίησης υπολογίζεται μαθηματικά από την εξίσωση $2^{-\Delta\Delta Ct}$, όπου $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ δείγματος προς μελέτη - ΔCt δείγματος αναφοράς. Η ΔCt του δείγματος προς μελέτη είναι η κανονικοποιημένη τιμή Ct για κάθε δείγμα, ως προς την αντίστοιχη τιμή του ενδογενούς γονιδίου αναφοράς σταθερής έκφρασης ($\Delta Ct = Ct$ γονιδίου προς μελέτη – Ct γονιδίου αναφοράς). Έτσι, και η ΔCt του δείγματος αναφοράς είναι η αντίστοιχα κανονικοποιημένη τιμή Ct για το ενδογενές γονίδιο. Εξ' ορισμού, για το δείγμα αναφοράς ισχύει ότι $2^{-\Delta\Delta CT} = 2^0 = 1$, οπότε η διαφορά στην έκφραση του γονιδίου στόχου στο δείγμα αναφοράς σε σχέση με τον εαυτό του ισούται με 1. Οι αντίστοιχες εξισώσεις για τα υπόλοιπα δείγματα δείχνουν πόσες φορές είναι αυξημένη ή μειωμένη η γονιδιακή έκφραση του γονιδίου-στόχου, στα δείγματα αυτά, σε σχέση με το δείγμα αναφοράς.

2.2.15 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε σε τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις για τη διασφάλιση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων. Για τη στατιστική επεξεργασία χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα IBM SPSS (Statistical Package for Social Sciences, έκδοση 22.0 για Windows). Οι διαφορές ανάμεσα σε διαφορετικές ομάδες δειγμάτων ελέγχθηκαν μέσω t-test για ανεξάρτητα δείγματα ή Mann-Whitney, ανάλογα με την κατανομή των προς εξέταση δειγμάτων. Στην περίπτωση κανονικής κατανομής των δειγμάτων, για τη σύγκριση περισσότερων των δύο ομάδων, πραγματοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (one way analysis of variance, ANOVA) μετά από προσαρμογή Bonferroni ή Games-Howell για πολλαπλές συγκρίσεις ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων και τη διακύμανση. Στην περίπτωση της μη κανονικής κατανομής για την ταυτόχρονη σύγκριση πολλαπλών δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος Kruskal-Wallis. Οι καμπύλες βιωσιμότητας επεξεργάστηκαν στατιστικά με τη μέθοδο Kaplan-Meier και τη δοκιμασία Log-Rank. Σε κάθε ανάλυση που αναφέρθηκε πραγματοποιήθηκαν όλοι οι απαραίτητοι έλεγχοι όσον αφορά στις προϋποθέσεις χρήσης του επιλεγμένου μοντέλου. Τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικά για p<0,05 ή p<0,01.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΟΞΥΓΟΝΟΥ (ROS)

Στη συγκεκριμένη Διδακτορική Διατριβή, μελετήθηκε η επίδραση της μη ιονίζουσας ακτινοβολίας στο οξειδωτικό δυναμικό του Δίπτερου εντόμου Drosophila melanogaster, χρησιμοποιώντας πηγές ασύρματης τεχνολογίας καθημερινής χρήσης, όπως είναι το κινητό τηλέφωνο, το ασύρματο τηλέφωνο και το ασύρματο δίκτυο. Οι πηγές ασύρματης τεχνολογίας που χρησιμοποιήθηκαν εκπέμπουν διαμορφωμένα, παλμικά κύματα συγκεκριμένων συχνοτήτων.

Παράλληλα με τις πηγές αυτές, χρησιμοποιήθηκε και γεννήτρια ραδιοσυχνοτήτων, η οποία είχε ρυθμιστεί να παράγει κύματα συχνότητας 100 MHz, 900 MHz και 1800 MHz (που αντιστοιχούν σε συχνότητες ραδιοφωνίας, κινητής τηλεφωνίας GSM 900 MHz, κινητής και ασύρματης τηλεφωνίας GSM 1800 MHz, αντίστοιχα). Η γεννήτρια παρήγαγε κύματα με διαμόρφωση συχνότητας 50 kHz (Frequency Modulated – FM) καθώς και μη διαμορφωμένα κύματα (Continuous Waves – CW).

Τα έντομα κατά τη συλλογή τους χωρίστηκαν σε 2 ομάδες: Η πρώτη ομάδα περιελάμβανε τα ακτινοβολημένα έντομα, τα οποία μεταφέρθηκαν στους κλιβάνους καλλιέργειας και εκτέθηκαν στην ακτινοβολία, ενώ η δεύτερη ομάδα αποτελούνταν από τα έντομα «εικονικής ακτινοβόλησης» – μάρτυρες, δηλαδή έντομα που παρέμειναν προστατευμένα από την ακτινοβολία. Οι μάρτυρες μεταφέρθηκαν σε αντίστοιχο κλίβανο καλλιέργειας, όπως τα ακτινοβολημένα έντομα που παρέμειναν προστατευμένα από την ακτινοβολημένα έντομα, αλλά χωρίς την παρουσία της ακτινοβολίας. Για τα πειράματα αυτά έγινε συλλογή νεοεκδυθέντων εντόμων *D. melanogaster* φυσικού τύπου (2 – 4 ώρες από τη στιγμή της έκδυσης). Συνολικά, συλλέχθηκαν 10 αρσενικά και 10 θηλυκά έντομα ανά συνθήκη. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν 3 φορές και σε κάθε πείραμα υπήρχαν 2 δείγματα ανά συνθήκη. Στόχος ήταν ο προσδιορισμός της βιοδραστικότητας των χαρακτηριστικών της μη ιονίζουσας ακτινοβολίας, όπως η διαμόρφωση, η ένταση και η συχνότητα, στο οξειδωτικό φορτίο των σωματικών και των γαμετικών ιστών των εντόμων.

3.1.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΒΑΣΗΣ ΑΣΥΡΜΑΤΟΥ ΤΗΛΕΦΩΝΟΥ DECT ΣΤΑ ΣΩΜΑΤΑ ΝΕΑΡΩΝ ΑΡΣΕΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΘΗΛΥΚΩΝ ΦΥΣΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ΕΝΤΟΜΩΝ

Για τη μελέτη της επίδρασης συναρτήσει του χρόνου έκθεσης, εφαρμόστηκαν πρωτόκολλα με διαφορετική, αλλά συνεχή διάρκεια έκθεσης. Τα πρωτόκολλα ήταν διάρκειας 0,5, 1, 6, 24, 96 και 120 ωρών. Για 0,5, 1 και 6 ώρες ακτινοβολήθηκαν έντομα την τέταρτη ημέρα της ενήλικης ζωής τους, για 24 ώρες ακτινοβολήθηκαν την τρίτη ημέρα, ενώ για 96 και 120 ώρες ακτινοβολήθηκαν αμέσως μετά την έκδυσή τους (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1: Σχηματική απεικόνιση των πρωτοκόλλων συνεχούς ακτινοβόλησης που εφαρμόστηκαν για τη μελέτη της πιθανής επίδρασης της παλμικής ακτινοβολίας, χαμηλής ενέργειας βάσης ασύρματου τηλεφώνου στα επίπεδα των δραστικών μορφών οζυγόνου.

Όσον αφορά στα σώματα των αρσενικών εντόμων, η ακτινοβόληση μικρής διάρκειας 30 και 60 λεπτών δεν οδήγησε σε αλλαγή των επιπέδων των ROS, καθώς η μείωση που παρατηρήθηκε σε κάθε περίπτωση δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Αντίθετα, συνεχής έκθεση μεγαλύτερη από 6 ώρες προκάλεσε σχεδόν διπλασιασμό στα επίπεδα των δραστικών μορφών οξυγόνου (73,9% αύξηση, p<0,001) (Εικόνα 3.2). Η μεγαλύτερη αύξηση από τους μάρτυρες καταγράφηκε μετά από 24 ώρες συνεχούς ακτινοβόλησης (103%, p<0,001). Διαστήματα έκθεσης μεγαλύτερα από τις 24 ώρες δεν παρουσίασαν περαιτέρω αύξηση. Συγκεκριμένα, μετά από 96 και 120 ώρες τα επίπεδα αυξήθηκαν κατά 81% (p = 0,006) και 94% (p = 0,014), αντίστοιχα (Πίνακας 3.1).

Πίνακας 3.1: Στον Πίνακα παρατίθενται τα επίπεδα των ROS που μετρήθηκαν στα σώματα αρσενικών εντόμων αμέσως μετά το τέλος της κάθε ακτινοβόλησης με βάση ασύρματου τηλεφώνου, κανονικοποιημένα επί τοις εκατό ως προς τους μάρτυρες (0 ώρες) ± το τυπικό σφάλμα. Καταγράφεται επίσης το ποσοστό αύξησης ή μείωσης των επιπέδων ROS στα ακτινοβολημένα έντομα συγκριτικά με τα μη ακτινοβολημένα

ΩΡΕΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΣΗΣ	ΕΠΙΠΕΔΑ ROS (%)	% ΔΙΑΦΟΡΑ
0	100.4 ± 4,2	-
0,5	83,6 ± 21,1	-16,8
1	81,5 ± 7,2	-18,8
6	174,7 ± 7,5	73,9
24	204,2 ± 9,5	103,4
96	182,3 ± 13,3	81,5
120	195,3 ± 19,0	94,5





Στατιστική ανάλυση μεταξύ των διαφορετικών πρωτοκόλλων έδειξε πως οι 6, 24, 96 και 120 ώρες συνεχούς ακτινοβόλησης είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά από τους μάρτυρες, αλλά και από τα 30 και 60 λεπτά. Δεν είχαν όμως κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους, γεγονός που ανέδειξε την ύπαρξη κορεσμού στα επίπεδα ROS (Πίνακας 3.2).

Πίνακας 3.2: Καταγραφή των επιπέδων σημαντικότητας (τιμών p) μετά από στατιστική επεζεργασία μεταξύ των διαφόρων χρονικών διαστημάτων έκθεσης αρσενικών εντόμων. Οι αριθμοί 0,5, 1, 6, 24, 96 και 120 αντιστοιχούν στα χρονικά διαστήματα έκθεσης (σε ώρες) στην παλμική ακτινοβολία βάσης DECT. Η στατιστική επεζεργασία έγινε με την παραμετρική ανάλυση one way analysis of variance (ANOVA), με προσαρμογή Games-Howell Post – Hoc, για πολλαπλές συγκρίσεις

ΩΡΕΣ	0	0,5	1	6	24	96	120
0		0,948	0,212	<0,001	<0,001	<0,001	0,014
0,5	0,948		1,000	0,019	0,003	0,013	0,012
1	0,212	1,000		<0,001	<0,001	0,001	0,004
6	<0,001	0,019	<0,001		0,257	0,998	0,939
24	<0,001	0,003	<0,001	0,257		0,817	0,999
96	0,006	0,13	0,001	0,998	0,817		0,997
120	0,014	0,012	0,004	0,939	0,999	0,997	

<u>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u>

Στους σωματικούς ιστούς των θηλυκών εντόμων, όπως αναφέρθηκε και στην περίπτωση των αρσενικών, η ακτινοβόληση μικρής διάρκειας 30 και 60 λεπτών δεν επέφερε αλλαγή στη συγκέντρωση των ROS. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και στα δύο φύλα χρειάστηκαν μεγαλύτερα διαστήματα έκθεσης για να προκαλέσουν κάποια μεταβολή στο οξειδωτικό φορτίο (Πίνακας 3.3 και Εικόνα 3.3).

Πίνακας 3.3: Παρουσιάζονται τα επίπεδα ROS που μετρήθηκαν στα σώματα θηλυκών εντόμων, αμέσως μετά το τέλος της κάθε ακτινοβόλησης με βάση DECT, κανονικοποιημένα επί τοις εκατό ως προς τους μάρτυρες (0 ώρες) ± τυπικό σφάλμα. Καταγράφεται, επίσης, το ποσοστό αύξησης ή μείωσης των επιπέδων στα ακτινοβολημένα έντομα συγκριτικά με τα μη ακτινοβολημένα

ΩΡΕΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΣΗΣ	ΕΠΙΠΕΔΑ ROS (%)	% ΔΙΑΦΟΡΑ
0	110,2 ± 5,9	
0,5	100,4 ± 14,6	-8,9
1	112,2 ± 8,5	1,8
6	159,0 ± 11,6	44,3
24	250,3 ± 20,0	127,1
96	269,8 ± 23,4	144,8
120	370,0 ± 55,2	235,7

Όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 3.3, για την αύξηση των ROS στο σωματικό ιστό των νεαρών θηλυκών εντόμων χρειάστηκε έκθεση μεγαλύτερη ή ίση των 6 ωρών. Αναλυτικότερα, η αύξηση που καταγράφηκε μετά από 6 ώρες συνεχούς ακτινοβόλησης ήταν 44% (p<0,05), μετά από 24 ώρες 127% (p<0,001), μετά από 96 ώρες 144% (p<0,001) και, τέλος, μετά από 120 ώρες 235% (p<0,001). Σε αντίθεση με τα αρσενικά έντομα, οι ROS συνέχισαν να αυξάνουν συναρτήσει του αυξανόμενου χρόνου ακτινοβόλησης (**Εικόνα 3.3**).



Εικόνα 3.3: Ραβδόγραμμα απεικόνισης των επιπέδων ROS, κανονικοποιημένων ως προς τα έντομα εικονικής ακτινοβόλησης (0 ώρες έκθεσης) ± τυπικό σφάλμα, όπως μετρήθηκαν στους

σωματικούς ιστούς των θηλυκών εντόμων, αμέσως μετά το τέλος της κάθε ακτινοβόλησης με τη βάση του ασύρματου τηλεφώνου. Οι αριθμοί 0,5, 1, 6, 24, 96 και 120 αντιστοιχούν σε χρονικά διαστήματα έκθεσης (ώρες) στην ακτινοβολία βάσης DECT. Η στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων έγινε με την παραμετρική ανάλυση ANOVA, με προσαρμογή Games-Howell Post – Hoc, για πολλαπλές συγκρίσεις, *p<0,05, **p<0,01.

Σύγκριση μεταξύ των διαφορετικών διαστημάτων έκθεσης ανέδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις 6 ώρες και στα μεγαλύτερα διαστήματα (24, 96 και 120 ωρών), τα οποία ωστόσο δε διέφεραν περαιτέρω μεταξύ τους. Όλοι οι χρόνοι έκθεσης πέραν των 6 ωρών είχαν στατιστική διαφορά από τους μάρτυρες και τους δύο μικρότερους χρόνους (Πίνακας 3.4).

Πίνακας 3.4: Παράθεση των επιπέδων σημαντικότητας (τιμών p), μετά από στατιστική επεξεργασία μεταξύ των διαφόρων χρονικών διαστημάτων έκθεσης. Οι αριθμοί 0,5, 1, 6, 24, 96 και 120 αντιστοιχούν σε χρονικά διαστήματα έκθεσης (ώρες) στην ακτινοβολία βάσης DECT. Η στατιστική επεξεργασία έγινε με την παραμετρική ανάλυση one way analysis of variance (ANOVA), με την προσαρμογή Games-Howell Post – Hoc, για πολλαπλές συγκρίσεις

ΩΡΕΣ	0	0,5	1	6	24	96	120
0		0,999	0,997	0,005	0,005	0,006	0,010
0,5	0,999		0,989	0,151	0,002	0,003	0,008
1	0,997	0,989		0,068	0,004	0,006	0,012
6	0,005	0,151	0,068		0,025	0,024	0,029
24	0,005	0,002	0,004	0,025		0,994	0,394
96	0,006	0,003	0,006	0,024	0,994		0,598
120	0,010	0,008	0,012	0,029	0,394	0,598	

3.1.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΒΑΣΗΣ ΑΣΥΡΜΑΤΟΥ ΤΗΛΕΦΩΝΟΥ ΣΤΑ ΚΕΦΑΛΙΑ ΝΕΑΡΩΝ ΑΡΣΕΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΘΗΛΥΚΩΝ ΦΥΣΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ΕΝΤΟΜΩΝ

Αναζητώντας πιθανή ιστο-ειδική απόκριση έναντι της ακτινοβολίας χαμηλής έντασης, εκπεμπόμενης από βάση ασύρματου τηλεφώνου, εξετάσθηκαν χωριστά τα κεφάλια των εντόμων από το υπόλοιπο σώμα. Η ακτινοβόληση ήταν συνεχής για 96 ώρες και τα επίπεδα των δραστικών μορφών οξυγόνου μετρήθηκαν αμέσως μετά το τέλος της ακτινοβόλησης. Διαπιστώθηκε αύξηση των επιπέδων στα κεφάλια και των δύο φύλων, και μάλιστα η αύξηση ήταν μεγαλύτερη από την αντίστοιχη που είχε σημειωθεί στην περίπτωση των σωμάτων (Πίνακας 3.5). Η ιστο-ειδική απόκριση ήταν εμφανής τόσο στα αρσενικά όσο και στα θηλυκά έντομα.

Πίνακας 3.5: Στον Πίνακα παρατίθενται τα επίπεδα των ROS που μετρήθηκαν στα κεφάλια θηλυκών και αρσενικών εντόμων, αμέσως μετά το τέλος της ακτινοβόλησης (διάρκειας 96 ωρών) με βάση ασύρματου τηλεφώνου. Τα επίπεδα παρουσιάζονται κανονικοποιημένα επί τοις εκατό ως προς τους μάρτυρες (0 ώρες) ± το τυπικό σφάλμα. Επίσης, δίνονται τα επίπεδα σημαντικότητας (τιμές p), όπως προέκυψαν μετά από στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων με τη μη παραμετρική ανάλυση Mann – Whitney U test. Τέλος, καταγράφεται και το ποσοστό αύξησης των επιπέδων ROS στα ακτινοβολημένα έντομα συγκριτικά με τα μη ακτινοβολημένα

	ΜΑΡΤΥΡΕΣ	ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΜΕΝΑ	% ΑΥΞΗΣΗ	Τιμή <i>p</i>
ΑΡΣΕΝΙΚΑ	104,5 ± 3,7	264,8 ± 11,4	153,3	0,002
ΘΗΛΥΚΑ	106,9 ± 2,3	326,7 ± 3,6	205,7	0,002

Εκτός της ιστο-ειδικής διαφοροποίησης που ανιχνεύθηκε στα συγκεκριμένα πειράματα, σημαντικό αποτέλεσε και το εύρημα ότι η αύξηση στα ακτινοβολημένα θηλυκά ήταν μεγαλύτερη έναντι των αρσενικών και η διαφορά μεταξύ τους ήταν στατιστικά σημαντική (Εικόνα 3.4). Δηλαδή, υπήρξε και φυλο-ειδική απόκριση στην ακτινοβολία, με τα θηλυκά να εμφανίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία.



Εικόνα 3.4: Ραβδόγραμμα στο οποίο απεικονίζονται τα επίπεδα ROS στα κεφάλια θηλυκών και αρσενικών εντόμων μετά από ακτινοβόληση 96 ωρών με παλμική ακτινοβολία βάσης DECT. Οι τιμές παρουσιάζονται κανονικοποιημένες ως προς τα έντομα «εικονικής ακτινοβόλησης» – μάρτυρες (ctrl) ± τυπικό σφάλμα. Η στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων έγινε με τη μη παραμετρική ανάλυση Mann – Whitney U test, *p<0,05, **p<0,01, (ctrl = μάρτυρες, exp = ακτινοβολημένα έντομα).

3.1.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΑΣΥΡΜΑΤΟΥ ΔΙΚΤΥΟΥ WI-FI ΣΤΑ ΚΕΦΑΛΙΑ ΝΕΑΡΩΝ ΘΗΛΥΚΩΝ ΦΥΣΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ΕΝΤΟΜΩΝ

Για τη μελέτη της επίδρασης του ασύρματου δικτύου επιλέχθηκαν τα κεφάλια των εντόμων, λόγω της μεγαλύτερης ευαισθησίας που παρουσίασαν στην περίπτωση της ακτινοβολίας που προερχόταν από τη βάση ασύρματου τηλεφώνου. Επίσης, λόγω της φυλοειδικής απόκρισης που παρατηρήθηκε έναντι της συγκεκριμένης ακτινοβολίας, η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε θηλυκά έντομα. Η επίδραση του ασύρματου δικτύου μελετήθηκε συναρτήσει του πρωτοκόλλου έκθεσης στην ακτινοβολία. Έτσι, σχεδιάστηκαν πρωτόκολλα έκθεσης ίδιας έντασης ηλεκτρικού πεδίου 0,3 V/m, διαφορετικής όμως διάρκειας και διαφορετικών δόσεων ακτινοβολίας. Αναλυτικότερα, τα έντομα εκτέθηκαν σε πρωτόκολλο σύντομης ακτινοβόλησης 30 λεπτών, διακοπτόμενης έκθεσης 30 λεπτών, κάθε μέρα για συνολικά 4 ημέρες, αλλά και συνεχούς διάρκειας 120 ωρών (5 ημέρες συνεχόμενα).

Σύντομη, εφάπαξ 30λεπτη δόση μη ιονίζουσας ακτινοβολίας, εκπεμπόμενη από ασύρματο δίκτυο προκάλεσε οριακά μη στατιστικά σημαντική αύξηση (p = 0,059) 22% στα επίπεδα των ROS, συγκριτικά με τους μάρτυρες. Ωστόσο, όταν η 30λεπτη έκθεση επαναλήφθηκε καθημερινά δεν επέφερε κάποια αλλαγή στα επίπεδα των δραστικών μορφών οξυγόνου. Παράλληλα, συνεχής ακτινοβόληση 120 ωρών (5 ημέρες συνεχόμενα) οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση 166% (Πίνακας 3.6 και Εικόνα 3.5). Στο σημείο αυτό οφείλει να αναφερθεί η μικρή ένταση του Wi-Fi, η οποία ενισχύει το συμπέρασμα ότι ο συγκεκριμένος ιστός εμφανίζεται περισσότερο ευαίσθητος έναντι της παλμικής ακτινοβολίας.

Πίνακας 3.6: Στον Πίνακα παρατίθενται τα επίπεδα των ROS που μετρήθηκαν στα κεφάλια θηλυκών εντόμων αμέσως μετά το τέλος του κάθε πρωτοκόλλου ακτινοβόλησης με ασύρματο δίκτυο Wi-Fi, κανονικοποιημένα επί τοις εκατό ως προς τους μάρτυρες ± το τυπικό σφάλμα. Επίσης, παρουσιάζονται τα επίπεδα σημαντικότητας (τιμές p) όπως προέκυψαν μετά από στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων με τη μη παραμετρική ανάλυση Mann – Whitney U test. Τέλος, καταγράφεται το ποσοστό αύξησης των ROS στα ακτινοβολημένα έντομα συγκριτικά με τα μη ακτινοβολημένα

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ	ΜΑΡΤΥΡΕΣ	ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΜΕΝΑ	% ΑΥΞΗΣΗ	TIMH p
30 λεπτά την 4 ^η ημέρα ενήλικης ζωής	87,9 ± 8,4	107,5 ± 11,0	22,3	0,059
30 λεπτά κάθε μέρα για 4 ημέρες	87,1 ± 7,1	89,3 ± 6,9	2,5	0,936
5 ημέρες συνεχόμενα (120 ώρες)	89,4 ± 4,6	237,6 ±9,8	165,8	<0,001


Εικόνα 3.5: Ραβδόγραμμα, στο οποίο απεικονίζονται τα επίπεδα ROS στα κεφάλια θηλυκών εντόμων που εκτέθηκαν σε Wi-Fi. Οι τιμές παρουσιάζονται κανονικοποιημένες ως προς τα έντομα «εικονικής ακτινοβόλησης» – μάρτυρες (ctrl) ± τυπικό σφάλμα. Η στατιστική επεζεργασία των δειγμάτων έγινε με τη μη παραμετρική ανάλυση Mann – Whitney U test, **p<0,01 (ctrl = μάρτυρες, exp = ακτινοβολημένα έντομα).

3.1.4 ΕΠΙΠΕΔΑ ROS ΣΤΟΥΣ ΣΩΜΑΤΙΚΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ ΝΕΑΡΩΝ ΑΡΣΕΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΘΗΛΥΚΩΝ ΕΝΤΟΜΩΝ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΑ ΣΤΙΓΜΙΟΤΥΠΑ ΜΕΤΑ ΤΟ ΠΕΡΑΣ ΤΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΣΗΣ

Προκειμένου να διερευνηθεί κατά πόσον υπάρχουν κυτταρικοί μηχανισμοί ικανοί να αντισταθμίσουν την αύξηση στα επίπεδα των δραστικών μορφών οξυγόνου, το αποτέλεσμα δηλαδή της έκθεσης στην παλμική ακτινοβολία βάσης DECT, μετρήθηκαν τα επίπεδα ROS σε διάφορα χρονικά στιγμιότυπα μετά το τέλος της ακτινοβόλησης. Ως διάστημα έκθεσης χρησιμοποιήθηκαν οι 6 ώρες την τρίτη ημέρα ενήλικης ζωής των εντόμων. Το συγκεκριμένο χρονικό διάστημα ακτινοβόλησης ήταν το μικρότερο που έδωσε στατιστικά σημαντική αύξηση των ROS τόσο στα σώματα των αρσενικών όσο και στα σώματα των θηλυκών εντόμων. Τα επίπεδα των ROS μετρήθηκαν 1, 4 και 24 ώρες μετά το τέλος της ακτινοβόλησης και οι τιμές παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.7.

Πίνακας 3.7: Στον Πίνακα παρατίθενται τα επίπεδα των ROS που μετρήθηκαν στα σώματα θηλυκών και αρσενικών εντόμων στα αντίστοιχα χρονικά στιγμιότυπα μετά το τέλος της συνεχούς 6ωρης ακτινοβόλησης με βάση ασύρματου τηλεφώνου (0, 1, 4 και 24 ώρες μετά το τέλος της ακτινοβόλησης) κανονικοποιημένα επί τοις εκατό ως προς τους μάρτυρες ± το τυπικό σφάλμα. Επίσης, δίνονται τα επίπεδα σημαντικότητας (τιμές p,) όπως προέκυψαν μετά από στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων με την παραμετρική ανάλυση ANOVA, με προσαρμογή Games-Howell Post – Hoc, για πολλαπλές συγκρίσεις. Τέλος, καταγράφεται

	ΩΡΕΣ ΜΕΤΑ ΤΟ ΤΕΛΟΣ ΤΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΣΗΣ	ΕΠΙΠΕΔΑ ROS ΣΤΑ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΜΕΝΑ ΕΝΤΟΜΑ	% ΑΥΞΗΣΗ ΑΠΟ ΤΟΥΣ ΜΑΡΤΥΡΕΣ	ΕΠΙΠΕΔΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΗΤΑΣ (<i>p</i> value)
ЛА	ΜΑΡΤΥΡΕΣ	100,4 ± 4,2	-	
NTON	0	174,7 ± 7,5	73,9	<0,001
KA EI	1	172,9 ± 6,3	72,2	<0,001
ΣΕΝΙ	4	151,5 ± 12,7	50,9	0,028
AP	24	101,8 ± 4,1	1,4	0,999
A	ΜΑΡΤΥΡΕΣ	110,2 ± 5,9	-	
ITOM	0	159,0 ± 11,6	44,3	0,002
A EN	1	173,3 ± 6,3	57,3	<0,001
НЛҮК	4	160,9 ± 8,4	46,0	0,001
ō	24	100,7 ± 9,7	8,6	0,978

και το ποσοστό αύζησης των επιπέδων ROS στα ακτινοβολημένα έντομα συγκριτικά με τα μη ακτινοβολημένα

Παρατηρήθηκε ότι τα αυξημένα επίπεδα ROS μειώνονταν μετά το πέρας της ακτινοβόλησης. Ωστόσο, παρά τη σταδιακή μείωση, η διαφορά με τους μάρτυρες παρέμεινε στατιστικά σημαντική 4 ώρες μετά τη διακοπή. Τελικά, οι συγκεντρώσεις των ROS επανήλθαν σε φυσιολογικά επίπεδα 24 ώρες μετά το τέλος της ακτινοβόλησης. Οι παρατηρήσεις ήταν κοινές και για τα αρσενικά, αλλά και για τα θηλυκά έντομα (Εικόνα 3.6).



Εικόνα 3.6: Γράφημα χρονικής απεικόνισης των επιπέδων των ROS στα σώματα των αρσενικών και θηλυκών εντόμων, μετά το τέλος της συνεχούς 6ωρης ακτινοβόλησης με βάση DECT. Οι τιμές

παρουσιάζονται κανονικοποιημένες ως προς τα έντομα εικονικής ακτινοβόλησης (0 ώρες) \pm τυπικό σφάλμα. Ο αριθμός 6 υποδηλώνει τις ώρες ακτινοβόλησης με τη βάση του ασύρματου τηλεφώνου και οι αριθμοί που ακολουθούν αντιστοιχούν στις ώρες μετά την ακτινοβόληση, όπου πραγματοποιήθηκε η μέτρηση των ROS (1, 4 και 24 ώρες μετά το τέλος της ακτινοβόλησης). Η στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων έγινε με την παραμετρική ανάλυση ANOVA, με προσαρμογή Games-Howell Post – Hoc, για πολλαπλές συγκρίσεις, *p<0,05, **p<0,01.

3.1.5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΒΑΣΗΣ ΑΣΥΡΜΑΤΟΥ ΤΗΛΕΦΩΝΟΥ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ROS ΤΩΝ ΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΙΣΤΩΝ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΤΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ

Για τη μελέτη της επίδρασης της ακτινοβολίας βάσης DECT συναρτήσει της *in vivo* γήρανσης, εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο συνεχούς έκθεσης 120 ωρών και τα έντομα χωρίστηκαν σε τρεις ηλικιακές κλάσεις. Συγκεκριμένα, η κλάση των νεαρών εντόμων αντιστοιχούσε σε έντομα ηλικίας 5 ημερών, η κλάση της μέσης ηλικίας σε έντομα 25 ημερών και η κλάση των γηρασμένων σε έντομα 55 ημερών. Τα έντομα που ακτινοβολήθηκαν μεταφέρθηκαν σε κλίβανο καλλιέργειας σταθερών περιβαλλοντικών συνθηκών για 5 ημέρης ηλικίας και την 50^η ημέρα της ενήλικης ζωής για τα μέσης ηλικίας και την 50^η ημέρα για τα γηρασμένα έντομα. Τα έντομα «εικονικής ακτινοβόλησης» – μάρτυρες μεταφέρθηκαν για 5 ημέρες σε αντίστοιχο κλίβανο καλλιέργειας σταθερών περιβαλλοντικών συνθηκών περιβαλλοντικών συνθηκών, ο οποίος ήταν προστατευμένος από την ακτινοβολία.

Τα επίπεδα των ROS φάνηκε να διαφοροποιούνται συναρτήσει της ηλικίας, ανεξάρτητα της παρουσίας ή όχι ακτινοβολίας. Πιο αναλυτικά, τόσο στα μη ακτινοβολημένα αρσενικά όσο και στα θηλυκά έντομα καταγράφηκε αύξηση της συγκέντρωσης των δραστικών μορφών οξυγόνου στους μέσης ηλικίας και γηρασμένους σωματικούς ιστούς. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η *in vivo* γήρανση προάγει τη συσσώρευση οξειδωτικού φορτίου στα έντομα (Πίνακας 3.8).

Πίνακας 3.8: Στον Πίνακα παρατίθενται τα επίπεδα των ROS που μετρήθηκαν στα σώματα αρσενικών εντόμων αμέσως μετά το τέλος της ακτινοβόλησης με βάση ασύρματου τηλεφώνου, κανονικοποιημένα επί τοις εκατό ως προς τους νεαρούς μάρτυρες (0 ώρες) ± το τυπικό σφάλμα. Επίσης, δίνονται τα επίπεδα σημαντικότητας (τιμές p), όπως προέκυψαν μετά από στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων με τη μη παραμετρική ανάλυση Mann – Whitney U test. Τέλος, καταγράφεται και το ποσοστό αύξησης των επιπέδων ROS στα ακτινοβολημένα έντομα συγκριτικά με τα μη ακτινοβολημένα

ΗΛΙΚΙΑΚΗ ΚΛΑΣΗ	ΜΑΡΤΥΡΕΣ	ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΜΕΝΑ	% ΑΥΞΗΣΗ	TIMH p
NEAPA	100,4 ± 4,2	195,3 ± 19,0	94,5	<0,001
ΜΕΣΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ	156,8 ± 18,3	205,3 ± 30,0	30,9	0,234
ΓΗΡΑΣΜΕΝΑ	166,2 ± 6,2	336,9 ± 21,9	102,7	0,001

<u>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u>

Παρουσία ακτινοβολίας, τα αρσενικά έντομα εμφάνισαν αύξηση στις ROS σε όλες τις ηλικιακές κλάσεις. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έδειξε ότι μόνο στα νεαρά και γηρασμένα έντομα η αύξηση αυτή ήταν στατιστικά σημαντική. Η απόκριση, συνεπώς, στην ακτινοβολία φάνηκε να είναι ηλικιο-εξαρτώμενη. Μάλιστα, τα γηρασμένα έντομα αποδείχθηκαν περισσότερο ευαίσθητα στην ακτινοβολία (Εικόνα 3.7).



Εικόνα 3.7: Ραβδόγραμμα, στο οποίο απεικονίζονται τα επίπεδα ROS στα σώματα νεαρών (N), μέσης ηλικίας (MH) και γηρασμένων (Γ) αρσενικών εντόμων. Οι τιμές παρουσιάζονται κανονικοποιημένες ως προς τα νεαρά έντομα «εικονικής ακτινοβόλησης» – μάρτυρες (M) ± τυπικό σφάλμα. Η στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων έγινε με τη μη παραμετρική ανάλυση Mann – Whitney U test, **p<0,01 (M = Μάρτυρες, A = Ακτινοβολημένα έντομα).

Σημαντική παρατήρηση ήταν ότι τα θηλυκά μη ακτινοβολημένα έντομα παρουσίασαν μεγαλύτερη συσσώρευση ROS κατά την εξέλιξη του γήρατος. Οι γηρασμένοι σωματικοί ιστοί είχαν διπλάσια συγκέντρωση ROS από τους νεαρούς. Το οξειδωτικό φορτίο, ανεξαρτήτως ύπαρξης ακτινοβολίας, φάνηκε να είναι μεγαλύτερο στα θηλυκά έντομα συγκριτικά με τα αρσενικά (Πίνακας 3.9).

Πίνακας 3.9: Στον Πίνακα παρατίθενται τα επίπεδα των ROS που μετρήθηκαν στα σώματα θηλυκών εντόμων αμέσως μετά το τέλος της ακτινοβόλησης 120 ωρών με βάση DECT κανονικοποιημένα επί τοις εκατό ως προς τους νεαρούς μάρτυρες ± το τυπικό σφάλμα. Επίσης, δίνονται τα επίπεδα σημαντικότητας (τιμές p) όπως προέκυψαν μετά από στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων. Η στατιστική επεξεργασία έγινε με τη μη παραμετρική ανάλυση Mann – Whitney U test. Τέλος, καταγράφεται και το ποσοστό αύξησης των επιπέδων ROS στα ακτινοβολημένα έντομα συγκριτικά με τα μη ακτινοβολημένα

ΗΛΙΚΙΑ ΕΝΤΟΜΩΝ	ΜΑΡΤΥΡΕΣ	ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΜΕΝΑ	% ΑΥΞΗΣΗ	TIMH p
NEAPA	106,7 ± 10,7	370,0 ± 55,2	246,6	<0,001

<u>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u>

ΜΕΣΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ	172,5 ± 21,7	304,4 ± 21,3	76,5	0,002
ΓΗΡΑΣΜΕΝΑ	191,6 ± 9,1	544,1 ± 73,8	183,9	0,002

Όσον αφορά στην επίδραση του εξωγενούς παράγοντα της ακτινοβολίας, στους σωματικούς ιστούς των θηλυκών εντόμων, υπήρξε διαφοροποίηση συγκριτικά με τα αρσενικά έντομα καταδεικνύοντας και πάλι μία πλειοτροπική, φυλο-ειδική απόκριση στην παλμική ακτινοβολία. Αναλυτικότερα, στα θηλυκά σημειώθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των ROS σε όλες τις ηλικιακές κλάσεις, με τα νεαρά ακτινοβολημένα έντομα να παρουσιάζουν σχεδόν 3,5 φορές υψηλότερα επίπεδα από τους μάρτυρες, τα μέσης ηλικίας 1,8 φορές και τα γηρασμένα έντομα σχεδόν 3 φορές (Εικόνα 3.8). Συνεπώς, στα θηλυκά έντομα η μεγαλύτερη επίδραση σημειώθηκε στα νεαρά και όχι στα γηρασμένα έντομα.





3.1.6 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΒΑΣΗΣ ΑΣΥΡΜΑΤΟΥ ΤΗΛΕΦΩΝΟΥ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ROS ΤΟΥ ΩΟΘΗΚΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ

Με σκοπό την περαιτέρω διερεύνηση της ιστο-ειδικής απόκρισης στην παλμική ακτινοβολία εξετάσθηκαν ξεχωριστά και οι ωοθήκες των θηλυκών εντόμων. Για τη μελέτη της επίδρασης συναρτήσει του χρόνου έκθεσης εφαρμόστηκαν πρωτόκολλα με διαφορετική αλλά συνεχή διάρκεια έκθεσης. Τα χρονικά διαστήματα έκθεσης ήταν 0,5, 1, 6, 24, 96 και 120 ωρών. Για 0,5, 1 και 6 ώρες τα θηλυκά έντομα ακτινοβολήθηκαν την τέταρτη ημέρα της ενήλικης ζωής τους, ενώ την τρίτη ημέρα ενήλικης ζωής ακτινοβολήθηκαν για 24 ώρες. Η ακτινοβόληση διάρκειας 96 και 120 ωρών ξεκίνησε αμέσως μετά τη συλλογή των νεοεκδυθέντων θηλυκών (βλ. Εικόνα 3.1).

Στις ωοθήκες παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των δραστικών μορφών μετά από όλα τα χρονικά διαστήματα ακτινοβόλησης. Συγκριτικά με τους σωματικούς ιστούς η επίδραση ήταν μεγαλύτερη στις ωοθήκες, ωστόσο και εδώ η αύξηση δε φάνηκε να είναι γραμμική με την αυξανόμενη χρονική διάρκεια ακτινοβόλησης (Πίνακας 3.10).

Πίνακας 3.10: Στον Πίνακα παρατίθενται τα επίπεδα των ROS που μετρήθηκαν στις ωοθήκες θηλυκών εντόμων, αμέσως μετά το τέλος της κάθε ακτινοβόλησης με βάση ασύρματου τηλεφώνου, κανονικοποιημένα επί τοις εκατό ως προς τους μάρτυρες (0 ώρες) ± το τυπικό σφάλμα. Παρουσιάζεται, επίσης, το ποσοστό αύξησης των επιπέδων ROS στα ακτινοβολημένα έντομα συγκριτικά με τα μη ακτινοβολημένα

ΩΡΕΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΣΗΣ	ΕΠΙΠΕΔΑ ROS (%)	% ΑΥΞΗΣΗ
0	98,2 ± 5,4	-
0,5	155,0 ± 13,7	57,8
1	255,8 ± 21,4	160,4
6	192,9 ± 6,1	49,1
24	228,6 ± 39,2	132,7
96	203,8 ± 19,0	107,4
120	255,3 ± 31,1	159,9

Σημαντικό εύρημα αποτέλεσε το γεγονός ότι τα επίπεδα των ROS σχεδόν διπλασιάστηκαν μετά τη σύντομη έκθεση των θηλυκών εντόμων στην ακτινοβολία βάσης ασύρματου τηλεφώνου. Μάλιστα, φάνηκε ότι τα επίπεδα των ROS αυξάνονται στατιστικά σημαντικά ακόμα και στο μικρότερο χρονικό διάστημα της μισής ώρας (Εικόνα 3.9). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν μία μεγαλύτερη ευαισθησία των γονάδων στον εξωγενή παράγοντα της ακτινοβολίας, όσον αφορά στο οξειδωτικό δυναμικό τους.



Εικόνα 3.9: Ραβδόγραμμα απεικόνισης των επιπέδων ROS, κανονικοποιημένων ως προς τα έντομα εικονικής ακτινοβόλησης (0 ώρες έκθεσης), όπως μετρήθηκαν στις ωοθήκες νεαρών θηλυκών εντόμων. Οι αριθμοί 0,5, 1, 6, 24, 96 και 120 αντιστοιχούν σε χρονικά διαστήματα έκθεσης (σε ώρες) στην ακτινοβολία της βάσης DECT. Παρατίθενται οι τιμές ± τυπικό σφάλμα όπως προέκυψαν από μέτρηση των ROS, αμέσως μετά το τέλος της ακτινοβόλησης. Η στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων έγινε με τη μη παραμετρική ανάλυση Kruskal – Wallis, για πολλαπλές συγκρίσεις, *p<0,05, **p<0,01.

Στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων με τη μη παραμετρική ανάλυση Kruskal – Wallis, για πολλαπλές συγκρίσεις, αποκάλυψε ότι όλα τα διαστήματα έκθεσης είχαν στατιστικά υψηλότερα επίπεδα ROS από τους μάρτυρες. Στατιστική διαφορά παρατηρήθηκε και μεταξύ της μισής και μίας ώρας. Σημαντική παρατήρηση ήταν ότι οι τιμές εμφάνισαν κορεσμό μετά τη 1 ώρα, καθώς τα διαστήματα έκθεσης 6, 24, 96 και 120 ωρών δε διέφεραν στατιστικά από τη μία ώρα (Πίνακας 3.11).

Πίνακας 3.11: Παράθεση των επιπέδων σημαντικότητας (τιμές p) μετά από στατιστική επεξεργασία μεταξύ των διαφόρων χρονικών διαστημάτων έκθεσης (ώρες) με βάση ασύρματου τηλεφώνου. Η στατιστική επεξεργασία έγινε με τη μη παραμετρική ανάλυση Kruskal – Wallis

ΩΡΕΣ	0	0,5	1	6	24	96	120
0		0,019	<0,001	0,001	0,001	0,001	<0,001
0,5	0,019		0,006	0,252	0,160	0,210	0,019
1	<0,001	0,006		0,199	0,467	0,238	0,823
6	0,001	0,252	0,199		0,710	0,924	0,310
24	0,001	0,160	0,467	0,710		0,775	0,604
96	0,001	0,210	0,238	0,924	0,775		0,360

120 <0,001 0,019 0,823 0,310 0,604 0,360	
-------------------------------------------------	--

3.1.7 ΕΠΙΠΕΔΑ ROS ΣΤΟΝ ΩΟΘΗΚΙΚΟ ΙΣΤΟ ΝΕΑΡΩΝ ΦΥΣΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ΘΗΛΥΚΩΝ ΕΝΤΟΜΩΝ 4 ΩΡΕΣ ΜΕΤΑ ΤΟ ΠΕΡΑΣ ΤΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΣΗΣ

Προκειμένου να διερευνηθεί τυχόν μεταβολή στα επίπεδα των ROS μετά το τέλος της ακτινοβόλησης πραγματοποιήθηκε μέτρησή τους 4 ώρες μετά. Ως διάρκεια ακτινοβόλησης χρησιμοποιήθηκε αφενός η μισή ώρα, καθώς ήταν το μικρότερο χρονικό διάστημα ακτινοβόλησης που επέφερε στατιστικά σημαντική αύξηση στις ROS, και αφετέρου η μία ώρα λόγω της μεγάλης αύξησης που προκάλεσε.

Τόσο μετά το τέλος της 30λεπτης ακτινοβόλησης όσο και της 60λεπτης, παρατηρήθηκε μείωση στα αυξημένα επίπεδα των δραστικών μορφών οξυγόνου, η οποία είχε προκληθεί από την παλμική ακτινοβολία βάσης ασύρματου τηλεφώνου. Συγκεκριμένα, 4 ώρες μετά το τέλος της ακτινοβόλησης φάνηκε μία πτώση των τιμών κατά 16% και 30% για τη μισή και μία ώρα, αντίστοιχα (Πίνακας 3.12). Ο ωοθηκικός ιστός φάνηκε να αποκρίνεται γρηγορότερα όσον αφορά στην αντιμετώπιση της ακτινο-επαγόμενης αύξησης των ROS. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι παρά τη μεγαλύτερη ευαισθησία συγκριτικά με τους σωματικούς ιστούς, η αντιστάθμιση της αρνητικής επίδρασης του παράγοντα της ακτινοβολίας λαμβάνει χώρα γρηγορότερα στις γονάδες.

Πίνακας 3.12: Στον Πίνακα παρατίθενται τα επίπεδα των ROS που μετρήθηκαν στις ωοθήκες θηλυκών εντόμων 4 ώρες μετά το τέλος της κάθε ακτινοβόλησης κανονικοποιημένα επί τοις εκατό ως προς τους μάρτυρες ± το τυπικό σφάλμα. Οι χρόνοι ακτινοβόλησης και οι χρόνοι αναμονής παρουσιάζονται ως εξής: 0/0 = Μάρτυρες των 0 ωρών, 0/4 = Μάρτυρες των 4 ωρών, 0,5/0 = μισή ώρα ακτινοβόληση/μέτρηση ROS αμέσως μετά (0 ώρες), 0,5/4 = μισή ώρα ακτινοβόληση/μέτρηση ROS 4 ώρες μετά το τέλος της ακτινοβόλησης, 1/0 = 1 ώρα ακτινοβόληση/μέτρηση ROS αμέσως μετά (0 ώρες), 1/4 = 1 ώρα ακτινοβόληση/μέτρηση ROS 4 ώρες μετά το τέλος της ακτινοβόλησης. Επίσης, δίνονται οι ποσοστιαίες διαφορές μεταζύ ακτινοβολημένων εντόμων και μαρτύρων καθώς και οι διαφορές μεταζύ 0 και 4 ωρών. Στον Πίνακα φαίνονται και οι αντίστοιχες τιμές p όπως προέκυψαν μετά από στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων με τη μη παραμετρική ανάλυση Kruskal – Wallis . Τέλος, καταγράφεται το ποσοστό αύξησης των επιπέδων ROS στα ακτινοβολημένα έντομα συγκριτικά με τα μη ακτινοβολημένα αμέσως και 4 ώρες μετά το τέλος των δύο διαστημάτων ακτινοβόλησης

ΩΡΕΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΣΗΣ / ΩΡΕΣ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΣΗ	ΕΠΙΠΕΔΑ ROS ± ΤΥΠΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ	% ΑΥΞΗΣΗ ΑΠΟ ΤΟΥΣ ΜΑΡΤΥΡΕΣ	ΕΠΙΠΕΔΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΗΤΑΣ (<i>p</i> value)	% ΔΙΑΦΟΡΑ (0 / 4 ΩΡΕΣ)	ΕΠΙΠΕΔΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΗΤΑΣ (p value)
0/0	104,6 ± 11,6			2.0	
0/4	108,6 ± 3,8			3,0	

0,5/0	152,6 ±14,4	45,9	0,019	15 0	0.087
0,5/4	128,3 ± 11,5	18,1	0,057	-13,9	0,087
1/0	253,3 ± 35,3	142,2	<0,001	20 E	0.001
1/4	178,5 ± 21,3	64,4	0,008	-29,5	0,001

Παρά το γεγονός ότι τα επίπεδα μειώθηκαν, στην περίπτωση της 60λεπτης ακτινοβόλησης παρέμειναν στατιστικά σημαντικά αυξημένα, συγκριτικά με τα έντομα «εικονικής ακτινοβόλησης» – μάρτυρες. Αντίθετα, στην περίπτωση της 30λεπτης ακτινοβόλησης, 4 ώρες μετά το τέλος της, η διαφορά στα επίπεδα των ROS μεταξύ ακτινοβολημένων εντόμων και μαρτύρων δεν ήταν πλέον στατιστικά σημαντική (Εικόνα 3.10).



Εικόνα 3.10: Γράφημα απεικόνισης των επιπέδων ROS στις ωοθήκες νεαρών θηλυκών εντόμων, αμέσως και 4 ώρες μετά το τέλος των δύο διαστημάτων ακτινοβόλησης με βάση DECT. Οι τιμές παρουσιάζονται κανονικοποιημένες ως προς τα έντομα εικονικής ακτινοβόλησης (0 ώρες) ± τυπικό σφάλμα. Οι αριθμοί 0,5 και 1 υποδηλώνουν τις ώρες ακτινοβόλησης με τη βάση του ασύρματου τηλεφώνου. Η στατιστική επεζεργασία των δειγμάτων έγινε με τη μη παραμετρική ανάλυση Kruskal – Wallis, *p<0,05, **p<0,01.

3.1.8 ΕΠΙΠΕΔΑ ROS ΩΟΘΥΛΑΚΙΩΝ ΦΥΣΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ, ΠΡΙΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑ ΤΟ ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΟ ΣΤΑΔΙΟ 10 ΤΗΣ ΩΟΓΕΝΕΣΗΣ, ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ ΚΙΝΗΤΟ ΤΗΛΕΦΩΝΟ

Με σκοπό την περαιτέρω διερεύνηση του οξειδωτικού στρες στα ωοθυλάκια, ώστε να εντοπιστούν τα στάδια στα οποία επιδρά η ακτινοβολία, επιλέχθηκε διάρκεια ακτινοβόλησης 30 λεπτών, καθώς η διάρκεια αυτή βρέθηκε ότι είναι ικανή να επάγει την αύξηση των ROS στις ωοθήκες μετά από έκθεση θηλυκών εντόμων σε παλμική ακτινοβολία (βλ. Κεφάλαιο 3.1.6 –

<u>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u>

Εικόνα 3.9). Η ακτινοβόληση πραγματοποιήθηκε την 3^η ημέρα της ενήλικης ζωής των εντόμων, καθώς από την ημέρα αυτή και μετά τα θηλυκά έχουν ολοκληρώσει τη διαδικασία παραγωγής ώριμων αυγών και η ωοθήκη περιέχει όλα τα στάδια της ωογένεσης. Τα επίπεδα μετρήθηκαν αμέσως μετά το τέλος της ακτινοβόλησης, αφού προηγήθηκε διαχωρισμός των ωοθυλακίων και ομαδοποίησή τους με βάση το στάδιο ανάπτυξής. Τα ωοθυλάκια από το στάδιο του γερμαρίου και μέχρι το στάδιο 10, αποτέλεσαν τη μία υπό μελέτη ομάδα, ενώ τα χοριογενετικά στάδια 11 – 14Α, αποτέλεσαν τη δεύτερη πειραματική ομάδα (Εικόνα 3.11).



Εικόνα 3.11: Σχηματική απεικόνιση του πρωτοκόλλου που ακολουθήθηκε για τη μελέτη της επίδρασης της παλμικής ακτινοβολίας κινητού τηλεφώνου στα στάδια των ωοθυλακίων κατά την ωογένεση των θηλυκών εντόμων Drosophila melanogaster.

Σύντομη εφάπαξ ακτινοβόληση 30 λεπτών οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση των ROS μόνο στα ωοθυλάκια της πρώιμης και μέσης ωογένεσης του στελέχους φυσικού τύπου και όχι στα χοριογενετικά στάδια (Πίνακας 3.13).

Πίνακας 3.13: Στον Πίνακα παρατίθενται τα επίπεδα των ROS ± το τυπικό σφάλμα. Οι ROS μετρήθηκαν στα ωοθυλάκια του στελέχους φυσικού τύπου, πριν και μετά το στάδιο 10, στις ωοθήκες θηλυκών εντόμων, αμέσως μετά το τέλος της ακτινοβόλησης με κινητό τηλέφωνο. Παρουσιάζονται, επίσης, το ποσοστό αύξησης των επιπέδων ROS στα ακτινοβολημένα έντομα συγκριτικά με τα μη ακτινοβολημένα και τα επίπεδα σημαντικότητας (τιμές p), όπως

ΣΤΑΔΙΑ	ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΕΠΙΠΕΔΑ ROS	% ΑΥΞΗΣΗ	TIMH p
ΓΕΡΜΑΡΙΟ – ΣΤΑΔΙΟ	ΜΑΡΤΥΡΕΣ	129,5 ± 15,5	-	-
10	ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΜΕΝΑ	206,7 ± 30,4	59,7	0,043
ΣΤΑΔΙΟ 11 – 14	ΜΑΡΤΥΡΕΣ	343,7 ±23,5	-	-
	ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΜΕΝΑ	402,9 ± 60,4	17,3	0,413

αυτά προέκυψαν μετά από στατιστική επεζεργασία των δειγμάτων με την παραμετρική ανάλυση independent t – test.

Τα στάδια από το γερμάριο μέχρι και το στάδιο 10 (προ-βιτελλογενετικά και βιτελλογενετικά στάδια), τα οποία και εξετάσθηκαν ξεχωριστά από τα υπόλοιπα, εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου κατά 60%, συγκρινόμενα με αντίστοιχων σταδίων ωοθυλάκια απομονωμένα από τους μάρτυρες. Αντίθετα, τα ωοθυλάκια μεγαλύτερων σταδίων (στάδια 11 – 14A) παρουσίασαν μία τάση αύξησης των ROS, η οποία όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Εικόνα 3.12).



Εικόνα 3.12: Ραβδόγραμμα απεικόνισης των επιπέδων ROS, πριν και μετά το στάδιο 10 της μέσης ωογένεσης, στο στέλεχος wt, κανονικοποιημένων ως προς τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης κάθε δείγματος. Παρατίθενται οι τιμές ± τυπικό σφάλμα όπως προέκυψαν αμέσως μετά το τέλος της σύντομης, 30λεπτης ακτινοβόλησης με το κινητό τηλέφωνο. Η στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων έγινε με την παραμετρική ανάλυση independent t – test, *p<0,05 (Στ. 1 – 10 = αναπτυζιακά στάδια ωοθυλακίων από γερμάριο μέχρι στάδιο 10, Στ. 11 – 14A = αναπτυζιακά στάδια ωοθυλακίων από στάδιο 11 έως 14A, M = μάρτυρες, A = ακτινοβολημένα έντομα).

3.1.9 ΕΠΙΠΕΔΑ ROS ΩΟΘΥΛΑΚΙΩΝ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ *Dm*p53^{-/-}, ΠΡΙΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑ ΤΟ ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΟ ΣΤΑΔΙΟ 10 ΤΗΣ ΩΟΓΕΝΕΣΗΣ, ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ ΚΙΝΗΤΟ ΤΗΛΕΦΩΝΟ

Η ίδια συλλογιστική όπως περιγράφηκε και στην παράγραφο 3.1.8 (βλ. Εικόνα 3.11) ακολουθήθηκε και για το στέλεχος Dmp53^{-/-}, στο οποίο απουσιάζει ο μεταγραφικός παράγοντας p53. Σύντομη εφάπαξ ακτινοβόληση 30 λεπτών του στελέχους Dmp53^{-/-} δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντική αύξηση στα ωοθυλάκια σε κανένα από τα αναπτυξιακά στάδια της ωογένεσης (Πίνακας 3.14).

Πίνακας 3.14: Στον Πίνακα παρατίθενται τα επίπεδα ROS που μετρήθηκαν στα ωοθυλάκια του στελέχους Dmp53^{-/-}, πριν και μετά το αναπτυζιακό στάδιο 10, στις ωοθήκες θηλυκών εντόμων αμέσως μετά το τέλος της 30λεπτης ακτινοβόλησης με κινητό τηλέφωνο. Παρουσιάζονται, επίσης, το αντίστοιχο ποσοστό αύζησης ή μείωσης των επιπέδων ROS στα ακτινοβολημένα έντομα συγκριτικά με τα μη ακτινοβολημένα και τα επίπεδα σημαντικότητας (τιμές p), όπως προέκυψαν μετά από στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων με την παραμετρική ανάλυση independent t – test.

ΣΤΑΔΙΑ	ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΕΠΙΠΕΔΑ ROS	% ΑΥΞΗΣΗ	TIMH p
ΓΕΡΜΑΡΙΟ – ΣΤΑΔΙΟ	ΜΑΡΤΥΡΕΣ	84,9 ± 3,9		
10	ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΜΕΝΑ	110,2 ± 12,5	29,8	0,115
ΣΤΑΔΙΟ 11 – 14	ΜΑΡΤΥΡΕΣ	426,4 ± 29,5		
	ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΜΕΝΑ	384,7 ± 77,7	-9,8	0,637

Στο στέλεχος Dmp53^{-/-} σημειώθηκε 30% αύξηση των ROS στα στάδια της πρώιμης και μέσης ωογένεσης μετά από *in vivo* ακτινοβόληση των θηλυκών εντόμων. Ωστόσο, στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων έδειξε ότι τόσο τα στάδια αυτά όσο και τα χοριογενετικά, από το στάδιο 11 έως 14, δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μεταβολή στα επίπεδα των ROS (**Εικόνα 3.13**). Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν μία σχέση του παράγοντα p53 με την ακτινοεπαγόμενη αύξηση του οξειδωτικού φορτίου στις ωοθήκες, καθώς η απουσία του μεταγραφικού παράγοντα φαίνεται να μην προκαλεί διαφοροποίηση στα επίπεδα των ROS.



Εικόνα 3.13: Ραβδόγραμμα απεικόνισης των επιπέδων ROS πριν και μετά το στάδιο 10 της ωογένεσης στο στέλεχος Dmp53^{-/-}, κανονικοποιημένων ως προς τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης κάθε δείγματος. Παρατίθενται οι τιμές ± τυπικό σφάλμα, όπως μετρήθηκαν αμέσως μετά το τέλος της 30λεπτης ακτινοβόλησης με το κινητό τηλέφωνο. Η στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων έγινε με την παραμετρική ανάλυση independent t – test (Στ. 1 – 10 = αναπτυξιακά στάδια ωοθυλακίων από γερμάριο μέχρι στάδιο 10, Στ. 11 – 14 = αναπτυξιακά στάδια ωοθυλακίων από στάδιο 11 έως 14Α, Μ = μάρτυρες, Α = ακτινοβολημένα έντομα).

3.1.10 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ROS ΣΤΑ ΩΟΘΥΛΑΚΙΑ ΤΟΥ ΕΝΤΟΜΟΥ *DROSOPHILA* ΜΕΤΑ ΑΠΟ *IN VITRO* ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΣΗ

Έχοντας καταγράψει ποσοτική αύξηση των ROS στα προ-χοριογενετικά στάδια μετά από επίδραση παλμικής, μη ιονίζουσας ακτινοβολίας, επόμενο στάδιο αποτέλεσε ο προσδιορισμός του κυτταρικού πληθυσμού ο οποίος αποκρίνεται με αύξηση των ROS ύστερα από έκθεση στη συγκεκριμένη ακτινοβολία. Για το λόγο αυτό, απομονώθηκαν ωοθήκες από θηλυκά έντομα τριών ημερών, οι οποίες υποβλήθηκαν σε ακτινοβόληση για 60 λεπτά *in vitro* σε ισότονο διάλυμα Ringer's. Στη συνέχεια αφαιρέθηκαν τα χοριογενετικά στάδια και τα μικρότερων σταδίων ωοθυλάκια παρατηρήθηκαν κάτω από σαρωτικό συνεστιακό μικροσκόπιο laser ύστερα από προσθήκη ειδικής φθορίζουσας χρωστικής για τον εντοπισμό των ROS. Συγκεκριμένα, τα ωοθυλάκια μετά το τέλος της ακτινοβόλησης, επωάστηκαν με ειδικό εστέρα, ο οποίος αντιδρά με τις δραστικές μορφές οξυγόνου και καθιστά δυνατή την ανίχνευσή τους. Ωοθυλάκια παρουσία ακτινοβολίας, χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες.

Για τα συγκεκριμένα πειράματα, απομονώθηκαν ωοθυλάκια από 5 ζεύγη ωοθηκών ανά συνθήκη, το οποίο αντιστοιχεί σε περίπου 400 ωοθυλάκια συνολικά. Παρατηρήθηκε θετικό σήμα φθορισμού στα τροφοκύτταρα των ακτινοβολημένων ωοθυλακίων (Εικόνα 3.14Γ). Θετικό σήμα φθορισμού έδωσαν και τα ωοθυλάκια που είχαν επωαστεί με υπεροξείδιο του υδρογόνου

(H₂O₂) (Εικόνα 3.14Δ). Κατά συνέπεια, φαίνεται ότι ο συγκεκριμένος κυτταρικός πληθυσμός είναι αυτός που αποκρίνεται στην ακτινοβολία κινητού τηλεφώνου παράγοντας ROS.

Η ημι-ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.14Ε. Σημειώθηκε 1,8 φορές αύξηση (p<0,01) των θετικά σημασμένων ωοθυλακίων που είχαν εκτεθεί στην ΗΜΑ κινητού τηλεφώνου. Όπως αναμενόταν, η παρουσία του οξειδωτικού παράγοντα H₂O₂, στους θετικούς μάρτυρες, οδήγησε σε σαφώς μεγαλύτερη αύξηση των ROS (p<0,001) συγκριτικά με τον παράγοντα της ακτινοβολίας. Τα αποτελέσματα αυτά επαληθεύουν τη στατιστικά σημαντική διαφορά, που βρέθηκε, μέσω βιοχημικής ανίχνευσης των ROS, μεταξύ μαρτύρων και ακτινοβολημένων εντόμων, μετά από *in vivo* ακτινοβόληση.



Εικόνα 3.14: Χαρακτηριστικές εικόνες ωοθυλακίων σταδίου 9Β. Α. Ωοθυλάκιο απομονωμένο από την ομάδα των μαρτύρων, όπως φαίνεται σε φωτονικό μικροσκόπιο. Β. Ωοθυλάκιο

απομονωμένο από ωοθήκη χωρίς την παρουσία H_2O_2 και ακτινοβολίας (Μάρτυρας) **Γ**. Ωοθυλάκιο που επωάστηκε με το H_2O_2 (Θετικός Μάρτυρας). Δ. Ωοθυλάκιο που εκτέθηκε in vitro σε ασύρματη παλμική ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία (ΗΜΑ) εκπεμπόμενη από κινητό τηλέφωνο σε ομιλούσα κατάσταση. Στις φωτογραφίες (Γ) και (Δ) φαίνονται τα θετικά, φθορίζοντα, τροφοκύτταρα (ΤΚ). Τα θυλακοκύτταρα (ΘΚ), που περιβάλλουν το ωοκύτταρο (ΩΚ), δε φαίνεται να φθορίζουν, ενώ το ωοκύτταρο πιθανά δίνει φθορισμό λόγω τον λεκιθοσφαιριδίων που περιέχει, τα οποία αυτοφθορίζουν (εγγενής αυτό-φθορισμός). Ράβδος μεγέθυνσης = 50 μm. **Ε**. Ημι-ποσοτικοποίηση των θετικά σημασμένων ωοθυλακίων ως προς το συνολικό αριθμό (% θετικά ωοθυλάκια). Η στατιστική επεξεργασία έγινε με την παραμετρική ανάλυση independent t – test, **p<0,01 (M = Μάρτυρες, HMA = ωοθυλάκια που επωάστηκαν για 30 λεπτά με υπεροζείδιο του υδρογόνου).

3.1.11 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΤΗΣ ΜΗ ΙΟΝΙΖΟΥΣΑΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΣΤΟΝ ΩΟΘΗΚΙΚΟ ΙΣΤΟ ΦΥΣΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ΕΝΤΟΜΩΝ

Για τη μελέτη των χαρακτηριστικών της ακτινοβολίας, όπως η συχνότητα, η διαμόρφωση και η ένταση, στα επίπεδα των δραστικών μορφών οξυγόνου, χρησιμοποιήθηκαν οι ωοθήκες των εντόμων, λόγω της μεγαλύτερης ευαισθησίας που κατέδειξαν στην ακτινοβολία. Στον ωοθηκικό ιστό η αύξηση των ROS ανιχνεύτηκε άμεσα μετά από πρωτόκολλα σύντομης έκθεσης 30 και 60 λεπτών. Ως πρωτόκολλο ακτινοβόλησης χρησιμοποιήθηκε η μία ώρα, καθώς οι ωοθήκες εμφάνισαν τη μέγιστη αύξηση στα επίπεδα των ROS, μετά από το συγκεκριμένο χρονικό διάστημα έκθεσης στην παλμική ακτινοβολία (βλ. Κεφάλαιο 3.1.6 – Εικόνα 3.9).

3.1.11.1 Επίδραση της ακτινοβολίας συχνότητας 1800 MHz, με η χωρίς διαμόρφωση, στα επίπεδα ROS του ωοθηκικού ιστού

Στα συγκεκριμένα πειράματα, σκοπός ήταν η μελέτη της βιοδραστικότητας της διαμόρφωσης των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε γεννήτρια ραδιοσυχνοτήτων, η οποία ρυθμίστηκε να παράγει κύματα συχνότητας 1800 MHz με διαμόρφωση συχνότητας (Frequency Modulation – FM) καθώς και συνεχή κύματα ίδιας συχνότητας χωρίς όμως κάποια διαμόρφωση (Continuous Waves – CW). Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκε και η βάση ασύρματου τηλεφώνου, η οποία εξέπεμπε παλμικά κύματα (PULSED) συχνότητας 1800 MHz. Η μέση ένταση ηλεκτρικού πεδίου ήταν σε όλες τις περιπτώσεις 1 V/m. Κατά συνέπεια, η μόνη διαφοροποίηση μεταξύ των ακτινοβολήσεων ήταν η διαμόρφωση της ακτινοβολίας.

Παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων των ROS μόνο στις δύο περιπτώσεις των διαμορφωμένων κυμάτων. Τα συνεχή κύματα της συχνότητας 1800 MHz και της συγκεκριμένης έντασης δεν κατάφεραν να αυξήσουν τα επίπεδα των δραστικών μορφών οξυγόνου στις ωοθήκες των ακτινοβολημένων θηλυκών εντόμων (Πίνακας 3.15).

Πίνακας 3.15: Στον Πίνακα παρατίθενται τα επίπεδα των ROS που μετρήθηκαν στις ωοθήκες θηλυκών εντόμων αμέσως μετά το τέλος της 60λεπτης ακτινοβόλησης με τις αντίστοιχες κυματομορφές με ή χωρίς διαμόρφωση και συχνότητα 1800 MHz κανονικοποιημένα επί τοις εκατό ως προς τους μάρτυρες (0 ώρες) ± το τυπικό σφάλμα. Επίσης, φαίνεται το αντίστοιχο ποσοστό αύζησης των επιπέδων ROS στα ακτινοβολημένα έντομα συγκριτικά με τα μη ακτινοβολημένα και τα επίπεδα σημαντικότητας (τιμές p), όπως προέκυψαν από στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων με την παραμετρική ανάλυση ANOVA, με προσαρμογή Bonferroni Post – Hoc, για πολλαπλές συγκρίσεις. Οι υπό μελέτη διαμορφώσεις απεικονίζονται ως εξής στον Πίνακα: CW = συνεχές κύμα, FM = κύμα με διαμόρφωση συχνότητας 50 kHz, PULSED = παλμικό κύμα εκπεμπόμενο από βάση ασύρματου τηλεφώνου DECT

ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ	ΕΠΙΠΕΔΑ ROS (%)	% ΑΥΞΗΣΗ	TIMH p
ΜΑΡΤΥΡΕΣ	87,8 ± 8,0		
CW	90,9 ± 14,2	3,5	1,000
FM	101,1 ± 12,3	15,1	1,000
PULSED	140,0 ± 16,2	59,5	0,024

Τα επίπεδα ROS που καταγράφηκαν μετά από την επίδραση των κυμάτων με FM διαμόρφωση ήταν οριακά αυξημένα κατά 15%, ενώ τα αντίστοιχα μετά από επίδραση με παλμική, ασύρματη ακτινοβολία ήταν αυξημένα κατά 60%. Στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων που υποβλήθηκαν στις συγκεκριμένες συνθήκες έκθεσης έδειξε ότι, συγκριτικά με τους μάρτυρες, μόνο η αύξηση που προκλήθηκε από τη βάση ασύρματου τηλεφώνου ήταν στατιστικά σημαντική (p = 0.024) (Εικόνα 3.15).



Εικόνα 3.15: Ραβδόγραμμα απεικόνισης των επιπέδων ROS, κανονικοποιημένων ως προς τους μάρτυρες (CTRL). Παρατίθενται οι τιμές ± τυπικό σφάλμα όπως προέκυψαν αμέσως μετά το τέλος της 60λεπτης ακτινοβόλησης με διαφορετικούς τύπους κυμάτων στη συχνότητα 1,8 GHz. Η στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων έγινε με την παραμετρική ανάλυση ANOVA, με

προσαρμογή Bonferroni Post – Ηος, για πολλαπλές συγκρίσεις, *p<0,05 (CTRL = μάρτυρες, CW = συνεχές κύμα, FM = κύμα με διαμόρφωση συχνότητας 50 kHz και PULSED = παλμικό κύμα).

3.1.11.2 Επίδραση ακτινοβολίας χωρίς διαμόρφωση (CW) στα επίπεδα ROS του ωοθηκικού ιστού συναρτήσει της συχνότητας

Στα συγκεκριμένα πειράματα σκοπός ήταν η μελέτη πιθανής διαφοροποίησης στο οξειδωτικό δυναμικό των εντόμων συναρτήσει της συχνότητας των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκε η ίδια γεννήτρια ραδιοσυχνοτήτων, η οποία ρυθμίστηκε να παράγει κύματα συχνότητας 100 MHz, 900 MHz και 1800 MHz (αντιστοιχεί σε συχνότητα GSM κινητής τηλεφωνίας και ασύρματου τηλεφώνου). Για να αποκλειστούν οι λοιπές παράμετροι, όπως η ένταση και η διαμόρφωση και να μελετηθεί αποκλειστικά η επιβάρυνση που προκύπτει από τη συχνότητα, χρησιμοποιήθηκαν αρχικά συνεχή κύματα (CW) χωρίς διαμόρφωση, ενώ η μέση ένταση του ηλεκτρικού πεδίου σε όλα τα πρωτόκολλα ακτινοβόλησης ήταν 1 V/m. Κατά συνέπεια, η μόνη διαφοροποίηση μεταξύ των ακτινοβολήσεων, ήταν η συχνότητα της ακτινοβολίας.

Παρατηρήθηκε αύξηση στα επίπεδα ROS των ωοθηκών, μόνο μετά από έκθεση των θηλυκών εντόμων στις συχνότητες 100 MHz και 900 MHz. Η συχνότητα 1800 MHz φάνηκε να είναι λιγότερο δραστική στις ωοθήκες, καθώς δεν προκάλεσε μεταβολή στα επίπεδα των δραστικών μορφών οξυγόνου (Πίνακας 3.16).

Πίνακας 3.16: Στον Πίνακα παρατίθενται τα επίπεδα των ROS που μετρήθηκαν στις ωοθήκες θηλυκών εντόμων αμέσως μετά το τέλος της 60λεπτης ακτινοβόλησης με κύματα χωρίς διαμόρφωση (CW) διαφορετικών συχνοτήτων κανονικοποιημένα επί τοις εκατό ως προς τους μάρτυρες (0 ώρες) ± το τυπικό σφάλμα. Επίσης δίνεται το αντίστοιχο ποσοστό αύζησης των επιπέδων ROS στα ακτινοβολημένα έντομα συγκριτικά με τα μη ακτινοβολημένα και τα επίπεδα σημαντικότητας (τιμές p), όπως προέκυψαν από στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων με την παραμετρική ανάλυση ANOVA, με προσαρμογή Bonferroni Post – Hoc, για πολλαπλές συγκρίσεις

ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ	ΕΠΙΠΕΔΑ ROS (%)	% ΑΥΞΗΣΗ	TIMH p
ΜΑΡΤΥΡΕΣ	89,3 ± 6,3		
100 MHz	204,5 ± 29,4	129,0	<0,001
900 MHz	230,7 ±25,2	158,3	<0,001
1800 MHz	90,9 ± 14,2	1,8	1,000

Τα επίπεδα που καταγράφηκαν στην περίπτωση των ακτινοβολημένων ωοθηκών στα 100 MHz ήταν διπλάσια σε σχέση με τους μάρτυρες, ενώ στην περίπτωση των 900 MHz ήταν 2,5 φορές υψηλότερα στις ακτινοβολημένες ωοθήκες σε σχέση με τις ωοθήκες που δε δέχθηκαν ακτινοβολία. Στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων έδειξε ότι η αύξηση που προκλήθηκε από τις συχνότητες των 100 MHz (p<0,001) και 900 MHz ήταν στατιστικά σημαντική (p<0,001).

Τέλος, δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστική διαφορά μεταξύ της αύξησης που προκλήθηκε από τη συχνότητα των 100 MHz και της αντίστοιχης των 900 MHz (Εικόνα 3.16).





3.1.11.3 Επίδραση ακτινοβολίας κυμάτων με διαμόρφωση FM στα επίπεδα ROS του ωοθηκικού ιστού συναρτήσει της συχνότητας

Έχοντας ήδη μελετήσει τον παράγοντα της διαμόρφωσης και έχοντας παρατηρήσει ότι τα διαμορφωμένα κύματα προκάλεσαν μεγαλύτερη αύξηση στις δραστικές μορφές οξυγόνου, συγκριτικά με τα συνεχή, εξετάστηκε η συχνότητα σε συνδυασμό με τη διαμόρφωση ώστε να διερευνηθεί πιθανό αθροιστικό ή ανταγωνιστικό αποτέλεσμα των δύο αυτών χαρακτηριστικών της ακτινοβολίας. Συγκεκριμένα, εφαρμόστηκαν τα ίδια πρωτόκολλα ακτινοβόλησης όπως αναφέρθηκαν προηγουμένως στην ενότητα 3.1.11.2, για τα συνεχή κύματα, μόνο που στην περίπτωση αυτή τα κύματα έφεραν διαμόρφωση συχνότητας 50 kHz (FM). ενώ η μέση ένταση του ηλεκτρικού πεδίου σε όλα τα πρωτόκολλα ακτινοβόλησης ήταν 1 V/m. Κατά συνέπεια, η μόνη διαφοροποίηση μεταξύ των ακτινοβολήσεων, ήταν η συχνότητα της ακτινοβολίας

Στην περίπτωση των διαμορφωμένων κυμάτων, προκλήθηκε αύξηση σε όλες τις συχνότητες. Ωστόσο, όπως και στην περίπτωση των συνεχών κυμάτων, στατιστικά σημαντική αύξηση στα επίπεδα των δραστικών μορφών οξυγόνου παρατηρήθηκε μόνο στις συχνότητες των 100 MHz (p<0,001) και 900 MHz (p<0,001). Η συχνότητα των 1800 MHz δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντική αύξηση (**Πίνακας 3.17**).

<u>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u>

Πίνακας 3.17: Στον Πίνακα παρατίθενται τα επίπεδα των ROS που μετρήθηκαν στις ωοθήκες θηλυκών εντόμων, αμέσως μετά το τέλος της 60λεπτης ακτινοβόλησης με διαμορφωμένα κύματα FM, συχνοτήτων 100 MHz, 900 MHz και 1800 MHz. Τα επίπεδα παρουσιάζονται κανονικοποιημένα επί τοις εκατό ως προς τους μάρτυρες (0 ώρες) ± το τυπικό σφάλμα. Επίσης, δίνεται το αντίστοιχο ποσοστό αύξησης των επιπέδων ROS στα ακτινοβολημένα έντομα συγκριτικά με τα μη ακτινοβολημένα και τα επίπεδα σημαντικότητας (τιμές p), όπως προέκυψαν από στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων με την παραμετρική ανάλυση ΑΝΟVΑ, με προσαρμογή Bonferroni Post – Hoc, για πολλαπλές συγκρίσεις

ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ	ΕΠΙΠΕΔΑ ROS (%)	% ΑΥΞΗΣΗ	TIMH p
ΜΑΡΤΥΡΕΣ	89,3 ± 6,3		
100 MHz	357,8 ± 41,7	300,7	1,8E-11
900 MHz	254,8 ± 22,5	185,4	1,3E-8
1800 MHz	101,1 ±12,3	13,2	1,000

Η αύξηση που παρατηρήθηκε στα διαμορφωμένα κύματα ήταν 300% στην περίπτωση των 100 MHz, 185% στην περίπτωση των 900 MHz και 13% στην περίπτωση των 1800 MHz (Εικόνα 3.17). Στην περίπτωση των συνεχών κυμάτων, η συγκέντρωση των ROS στα ακτινοβολημένα έντομα ήταν σαφώς μικρότερη. Από τα συγκεκριμένα αποτελέσματα φαίνεται ότι η διαμόρφωση συνδυαστικά με τη συχνότητα προκαλούν μεγαλύτερη επιβάρυνση και κατά συνέπεια δρουν αθροιστικά.



Εικόνα 3.17: Ραβδόγραμμα απεικόνισης των επιπέδων ROS στις ωοθήκες, κανονικοποιημένων ως προς τους μάρτυρες (CTRL). Παρατίθενται οι τιμές ± τυπικό σφάλμα όπως προέκυψαν αμέσως μετά το τέλος της 60λεπτης ακτινοβόλησης με κύματα που έφεραν διαμόρφωση συχνότητας (FM) 50 kHz και φέρουσα συχνότητα τα 100 MHz, 900 MHz και 1800 MHz. Η στατιστική

επεξεργασία των δειγμάτων έγινε με την παραμετρική ανάλυση ANOVA, με προσαρμογή Bonferroni Post – Hoc, για πολλαπλές συγκρίσεις, **p<0,01.

3.1.11.4 Επίδραση ακτινοβολίας στον ωοθηκικό ιστό συναρτήσει της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου της ακτινοβολίας κυμάτων CW και συχνότητας 900 MHz

Η συχνότητα 900 MHz χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της επίδρασης της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου στις ωοθήκες. Η επιλογή αυτής της συχνότητας έγινε με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων που αφορούσαν στην επίδραση της HMA συναρτήσει της συχνότητας. Τα συγκεκριμένα πειράματα κατέδειξαν ότι η συχνότητα των 900 MHz προκάλεσε τη μεγαλύτερη αύξηση στα επίπεδα των ROS. Όπως και στις παραπάνω περιπτώσεις, έτσι και εδώ τα πρωτόκολλα διέφεραν μόνο στο υπό μελέτη χαρακτηριστικό της ακτινοβολίας. Με άλλα λόγια, χρησιμοποιήθηκαν συνεχή κύματα 900 MHz, ενώ οι εντάσεις που εξετάσθηκαν ήταν 0,3, 1, 2 και 3 V/m, αντίστοιχα.

Σημαντικό γεγονός αποτέλεσε ότι οι ROS αυξήθηκαν σε όλα τα πρωτόκολλα ακτινοβόλησης. Ωστόσο, στατιστικά σημαντική αύξηση καταγράφηκε σε εντάσεις μεγαλύτερες του 1 V/m. Συγκεκριμένα, μετά από έκθεση σε ακτινοβολία έντασης 0,3 V/m προκλήθηκε αύξηση κατά 40%, η οποία όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Στην ένταση 1 V/m τα επίπεδα αυξήθηκαν σημαντικά κατά 150% (p<0,001), στα 2 V/m κατά 54% (p = 0,02), ενώ τέλος στα 3 V/m κατά 112% (p<0,001) (Πίνακας 3.18 και Εικόνα 3.18).

Πίνακας 3.18: Στον Πίνακα παρατίθενται τα επίπεδα των ROS που μετρήθηκαν στις ωοθήκες θηλυκών εντόμων αμέσως μετά το τέλος της 60λεπτης ακτινοβόλησης με συνεχές κύμα (CW) συχνότητας 900 MHz διαφορετικών εντάσεων ηλεκτρικού πεδίου (0,3 V/m, 1 V/m, 2 V/m και 3 V/m) κανονικοποιημένα επί τοις εκατό ως προς τους μάρτυρες (0 ώρες) ± το τυπικό σφάλμα. Καταγράφεται, επίσης, το αντίστοιχο ποσοστό αύξησης των επιπέδων ROS στα ακτινοβολημένα έντομα συγκριτικά με τα μη ακτινοβολημένα και τα επίπεδα σημαντικότητας (τιμές p), όπως προέκυψαν από στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων με την παραμετρική ανάλυση ANOVA, με προσαρμογή Bonferroni Post – Hoc, για πολλαπλές συγκρίσεις

ΕΝΤΑΣΗ	ΕΠΙΠΕΔΑ ROS (%)	% ΑΥΞΗΣΗ	TIMH p
ΜΑΡΤΥΡΕΣ	92,4 ± 5,1	-	
0,3 V/m	129,9 ± 17,0	40,5	0,190
1 V/m	230,7 ± 25,2	149,6	<0,001
2 V/m	142,9 ± 9,7	54,6	0,020
3 V/m	196,7 ± 10,2	112,8	<0,001

Όσον αφορά στη συσχέτιση της έντασης με την επίδραση, δε φάνηκε κάποια γραμμικότητα μεταξύ τους. Η ένταση 1 V/m παρουσίασε τη μέγιστη επίδραση. Εντούτοις, περαιτέρω αύξηση της έντασης δεν προκάλεσε μεγαλύτερη αύξηση στα επίπεδα των ROS,

γεγονός που υποδηλώνει την απουσία γραμμικής σχέσης μεταξύ της έντασης της ακτινοβολίας και της αύξησης των δραστικών μορφών οξυγόνου.



Εικόνα 3.18: Ραβδόγραμμα απεικόνισης των επιπέδων ROS, κανονικοποιημένων ως προς τους μάρτυρες (CTRL). Παρατίθενται οι τιμές ± τυπικό σφάλμα, όπως προέκυψαν αμέσως μετά το τέλος της 60λεπτης ακτινοβόλησης με συνεχή κύματα χωρίς διαμόρφωση (CW) συχνότητας 900 MHz διαφορετικών εντάσεων ηλεκτρικού πεδίου. Η στατιστική επεζεργασία των δειγμάτων έγινε με την παραμετρική ανάλυση ANOVA, με προσαρμογή Bonferroni Post – Hoc, για πολλαπλές συγκρίσεις, *p<0,05, **p<0,01.

Στατιστική επεξεργασία μεταξύ των διαφορετικών εντάσεων δεν εμφάνισε σημαντικές διαφορές μεταξύ των εντάσεων 1 και 3 V/m, καθώς και των 3 και 2 V/m (Πίνακας 3.19). Στο σημείο αυτό, αξίζει να ειπωθεί ότι όλες οι εντάσεις στις οποίες εκτέθηκαν τα έντομα ήταν κάτω των ορίων ασφαλείας που έχουν θεσπιστεί στην Ελλάδα. Τα αποτελέσματα, λοιπόν, έδειξαν ότι μικρή ένταση, πολύ κάτω των ορίων ασφαλείας, είναι ικανή να προκαλέσει διαταραχή στο οξειδωτικό δυναμικό των ωοθηκών της Drosophilla.

Πίνακας 3.19: Παράθεση των επιπέδων σημαντικότητας (τιμές p) μετά από στατιστική επεξεργασία μεταξύ των διαφόρων εντάσεων ηλεκτρικού πεδίου με συνεχές κύμα συχνότητας 900 MHz. Η στατιστική επεξεργασία έγινε με τη μη παραμετρική ανάλυση Kruskal – Wallis

ENTAΣΗ (V/m)	ΜΑΡΤΥΡΕΣ	0,3	1	2	3
ΜΑΡΤΥΡΕΣ		0,190	<0,001	0,020	<0,001
0,3	0,190		<0,001	1,000	0,013
1	<0,001	<0,001		<0,001	0,857
2	0,020	1,000	<0,001		0,081
3	<0,001	0,013	0,857	0,081	

3.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΣΤΗΝ ΚΑΡΒΟΝΥΛΙΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΟΥΣ ΣΩΜΑΤΙΚΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ ΑΡΣΕΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΘΗΛΥΚΩΝ ΦΥΣΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ΕΝΤΟΜΩΝ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΤΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ

Για τα πειράματα αυτά έγινε συλλογή 15 αρσενικών και 15 θηλυκών νεοεκδυθέντων (2 – 4 ώρες από τη στιγμή της έκδυσης) εντόμων *D. melanogaster* φυσικού τύπου, ανά συνθήκη. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν 3 φορές.

Ως πρωτόκολλο ακτινοβόλησης επιλέχθηκαν οι 120 ώρες συνεχούς ακτινοβόλησης. Τα έντομα χωρίστηκαν σε τρεις ηλικιακές κλάσεις: (Α) την κλάση των νεαρών εντόμων που αποτελούνταν από έντομα ηλικίας 5 ημερών, (Β) την κλάση της μέσης ηλικίας με έντομα 25 ημερών και (Γ) την κλάση των γηρασμένων εντόμων 55 ημερών. Η ακτινοβόληση των συγκεκριμένων εντόμων ξεκίνησε από τη στιγμή της έκδυσης για τα νεαρά έντομα, την 20^η ημέρα της ενήλικης ζωής για τα μέσης ηλικίας, και την 50^η ημέρα για τα γηρασμένα έντομα.

Αρχικά, σημαντικό ήταν το γεγονός ότι οι θηλυκοί μάρτυρες παρουσίασαν μεγαλύτερο δείκτη καρβονυλίωσης από τους αρσενικούς, σε όλες τις ηλικιακές κλάσεις. Μετά από επίδραση με τη βάση ασύρματου τηλεφώνου, παρατηρήθηκε ότι τα έντομα εμφάνισαν διαφορική απόκριση στην εκπεμπόμενη ακτινοβολία, η οποία φάνηκε να εξαρτάται από την ηλικία στην οποία εκτέθηκαν τα έντομα για πρώτη φορά στην παλμική ακτινοβολία (Πίνακας 3.20). Τέλος, και στα δύο φύλα η μεγαλύτερη επιβάρυνση, όσον αφορά στην οξείδωση των πρωτεϊνών καταγράφηκε στα γηρασμένα, ακτινοβολημένα έντομα.

Πίνακας	3.20:	Στον Πίνακα παρατίθενται οι δείκτες καρβονυλίωσης για τους μάρτυρες, και τα
		ακτινοβολημένα αρσενικά και θηλυκά έντομα κάθε ηλικιακής κλάσης. Παρουσιάζεται το
		ποσοστό αύξησης ή μείωσης στα ακτινοβολημένα έντομα, συγκριτικά με τα μη
		ακτινοβολημένα, καθώς και τα επίπεδα σημαντικότητας, όπως προέκυψαν με τη μη
		παραμετρική ανάλυση Mann – Whitney U test

ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ	ΜΑΡΤΥΡΕΣ	ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΜΕΝΑ	% ΔΙΑΦΟΡΑ	TIMH p
	NEAPA	7,30 ± 0,75	3,80 ± 0,60	-47,9	0,121
ΑΡΣΕΝΙΚΑ	ΜΕΣΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ	5,16 ± 0,46	5,72 ± 0,06	+10,9	0,333
	ΓΗΡΑΣΜΕΝΑ	3,22 ± 0,05	15,28 ± 3,38	+374,5	0,037
	NEAPA	27,7 ± 7,9	27,9 ± 11,8	0	1,000
ΘΗΛΥΚΑ	ΜΕΣΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ	30,1 ± 8,5	28,5 ± 8,0	-5,3	0,667
	ΓΗΡΑΣΜΕΝΑ	26,6 ± 6,0	42,0 ± 8,3	+57,9	0,043

Ανοσο-στύπωμα Western έδειξε ότι η συγκέντρωση των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών, στους αρσενικούς σωματικούς ιστούς, είναι μειωμένη στα ακτινοβολημένα νεαρά έντομα και ελαφρώς αυξημένη στα ακτινοβολημένα έντομα μέσης ηλικίας. Παράλληλα, φάνηκε συσσώρευση των οξειδωμένων αυτών μακρομορίων στα γηρασμένα ακτινοβολημένα έντομα. Η ποσοτικοποίηση του ανοσο-στυπώματος των αρσενικών εντόμων έδειξε 50% μικρότερο δείκτη καρβονυλίωσης στα νεαρά ακτινοβολημένα έντομα και 374% αυξημένο στα ακτινοβολημένα γηρασμένα. Τα μέσης ηλικίας έντομα δεν παρουσίασαν, τελικά, κάποια μεταβολή στα επίπεδα των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών τους (Εικόνα 3.19Α και Β). Στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων, με τη μη παραμετρική ανάλυση Mann – Whitney U test, επιβεβαίωσε τη διαφορά μόνο στα ακτινοβολημένα έντομα 55 ημερών. Στα νεαρά έντομα, η διαφορά που σημειώθηκε δεν ήταν στατιστικά σημαντική μετά από το συγκεκριμένο πρωτόκολλο ακτινοβόλησης (Πίνακας 3.20).



Εικόνα 3.19: Α. Ανοσο-στύπωμα Western έναντι της 2,4-δινιτροφαινυλυδραζόνης, η οποία έχει παραχθεί μετά από αντίδραση της 2,4-δινιτροφαινυλυδραζίνης με τις καρβονυλικές – πλευρικές ομάδες

των οξειδωμένων πρωτεϊνών στα σώματα αρσενικών νεαρών (N), μέσης ηλικίας (MH) και γηρασμένων (Γ) εντόμων. **B**. Γράφημα ποσοτικοποίησης των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών που παράχθηκαν μετά από συνεχή ακτινοβόληση 120 ωρών με βάση ασύρματου τηλεφώνου τύπου DECT. Η κανονικοποίηση έγινε ως προς την πρωτεΐνη αναφοράς (β ακτίνη). Η στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων έγινε με τη μη παραμετρική ανάλυση Mann – Whitney U test, *p<0,05 (M = μάρτυρες, A = ακτινοβολημένα έντομα).

Στην περίπτωση των θηλυκών εντόμων, η συνεχής ακτινοβόληση 120 ωρών προκάλεσε στατιστικά σημαντική αύξηση (p<0,05) των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών στα γηρασμένα έντομα χωρίς να διαφοροποιήσει τα αντίστοιχα επίπεδα στα νεαρά και μέσης ηλικίας έντομα (**Εικόνα 3.20A** και **B**). Κατά συνέπεια, η συγκεκριμένη διάρκεια ακτινοβόλησης επηρέασε τη συγκέντρωση των οξειδωμένων πρωτεϊνών μόνο στα έντομα ηλικίας 55 ημερών και όχι σε έντομα μικρότερης ηλικίας.



Εικόνα 3.20: Α. Ανοσο-στύπωμα Western έναντι της 2,4-δινιτρο-φαινυλυδραζόνης, η οποία έχει παραχθεί μετά από αντίδραση της 2,4-δινιτρο-φαινυλυδραζίνης με τις καρβονυλικές – πλευρικές ομάδες των οζειδωμένων πρωτεϊνών στα σώματα νεαρών (Ν), μέσης ηλικίας (ΜΗ) και γηρασμένων (Γ) θηλυκών εντόμων. **Β.** Γράφημα ποσοτικοποίησης των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών που παράχθηκαν μετά από συνεχή ακτινοβόληση 120 ωρών με βάση ασύρματου τηλεφώνου τύπου DECT. Η κανονικοποίηση έγινε ως προς την πρωτεΐνη αναφοράς (β ακτίνη). Η στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων έγινε με τη μη παραμετρική ανάλυση Mann – Whitney U test, *p<0,05 (M = μάρτυρες, A = ακτινοβολημένα έντομα).

3.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΙΣΤΩΝ ΑΡΣΕΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΘΗΛΥΚΩΝ ΦΥΣΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ΕΝΤΟΜΩΝ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΤΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ

Εκτός από την οξείδωση των πρωτεϊνών, μελετήθηκε και η οξείδωση των λιπιδίων μετά από επίδραση με μη ιονίζουσα ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, χαμηλής ενέργειας, εκπεμπόμενη από βάση ασύρματου τηλεφώνου.

Το πρωτόκολλο ακτινοβόλησης που εφαρμόστηκε ήταν και σε αυτή την περίπτωση οι 120 συνεχόμενες ώρες και τα έντομα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αγρίου τύπου τριών ηλικιών (Νεαρά – 5 ημερών, Μέσης ηλικίας – 25 ημερών και Γηρασμένα – 55 ημερών). Για κάθε συνθήκη χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 60 έντομα. Σε κάθε πείραμα υπήρχαν δύο δείγματα ανά συνθήκη και τα πειράματα επαναλήφθηκαν 3 φορές.

Η συσσώρευση των οξειδωμένων λιπιδίων είναι σαφής κατά το πέρας της ηλικίας τόσο στα αρσενικά όσο και στα θηλυκά έντομα. Ιδιαίτερα αυξημένη συγκέντρωση MDA εντοπίζεται στους ηλικιωμένους σωματικούς ιστούς. Στους αρσενικούς μάρτυρες ηλικίας 55 ημερών, η συγκέντρωση ήταν 200 nmoles MDA / gr ιστού και στους θηλυκούς 177 nmoles /gr ιστού, αντίστοιχα (Πίνακας 3.21). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν το γεγονός ότι τα λιπίδια, ιδιαίτερα μάλιστα τα πολυακόρεστα, είναι αρκετά ευαίσθητα στην οξείδωση.

Πίνακας 3.21: Στον Πίνακα παρατίθενται τα επίπεδα μαλονδιαλδεΰδης (MDA) για τους μάρτυρες, και τα ακτινοβολημένα αρσενικά και θηλυκά έντομα κάθε ηλικιακής κλάσης. Η κανονικοποίηση των επιπέδων έγινε ως προς το βάρος των εντόμων. Παρουσιάζεται το ποσοστό αύξησης ή μείωσης στα ακτινοβολημένα έντομα συγκριτικά με τα μη ακτινοβολημένα, καθώς και τα επίπεδα σημαντικότητας, όπως προέκυψαν με την παραμετρική ανάλυση independent t – test

ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ	ΜΑΡΤΥΡΕΣ	ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΜΕΝΑ	% ΔΙΑΦΟΡΑ	TIMH p
	NEAPA	34,5 ± 1,8	59,9 ± 9,0	+73.6	0,050
ΑΡΣΕΝΙΚΑ	ΜΕΣΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ	56,3 ± 16,3	54,7 ± 9,0	-2,8	1,000
	ΓΗΡΑΣΜΕΝΑ	200,9 ± 25,2	356,0 ± 33,0	+77,2	0,023
	NEAPA	18,0 ± 1,9	17,8 ± 1,7	-1,1	0,955
ΘΗΛΥΚΑ	ΜΕΣΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ	44,8 ± 10,0	42,7 ± 2,2	-4,7	0,807
	ΓΗΡΑΣΜΕΝΑ	177,7 ± 13,1	296,1 ± 35,6	-67,2	0,047

Μετά την επίδραση της ΗΜΑ τα αρσενικά έντομα παρουσίασαν σημαντική αύξηση των οξειδωμένων λιπιδίων τους στα νεαρά και γηρασμένα ακτινοβολημένα έντομα. Εντυπωσιακό ήταν το γεγονός ότι τα μέσης ηλικίας έντομα δεν παρουσίασαν καμία μεταβολή στα επίπεδα μαλονδιαλδεΰδης μετά την έκθεσή τους στη βάση DECT. Στατιστικά σημαντική ήταν η αύξηση των οξειδωμένων λιπιδίων που παρατηρήθηκε στα γηρασμένα ακτινοβολημένα έντομα (Εικόνα 3.21).



Εικόνα 3.21: Ραβδόγραμμα απεικόνισης των επιπέδων οζειδωμένων λιπιδίων, στα σώματα νεαρών (N), μέσης ηλικίας (MH) και γηρασμένων (Γ) αρσενικών εντόμων, κανονικοποιημένων ως προς το βάρος του κάθε δείγματος. Παρατίθενται οι τιμές μαλονδιαλδεΰδης ± τυπικό σφάλμα όπως προέκυψαν αμέσως μετά το τέλος της συνεχούς ακτινοβόλησης 120 ωρών με βάση ασύρματου DECT. Η στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων έγινε με την παραμετρική ανάλυση independent t – test, * p<0,05 (M = μάρτυρες, A = ακτινοβολημένα έντομα).

Στα θηλυκά έντομα μεταβολή της συγκέντρωσης του MDA παρατηρήθηκε μόνο στην περίπτωση των γηρασμένων ακτινοβολημένων εντόμων, ενώ τα ακτινοβολημένα νεαρά και μέσης ηλικίας έντομα δεν παρουσίασαν καμία διαφοροποίηση (Εικόνα 3.22). Τόσο στα αρσενικά όσο και στα θηλυκά έντομα, η επεξεργασία των αποτελεσμάτων αποκάλυψε ότι οι 120 ώρες συνεχούς ακτινοβόληση προκαλούν βλάβη στα λιπίδια, μέσω οξείδωσης, κυρίως, στα μεγαλύτερης ηλικίας έντομα.



Εικόνα 3.22: Ραβδόγραμμα απεικόνισης των επιπέδων οζειδωμένων λιπιδίων, στα σώματα νεαρών (N), μέσης ηλικίας (MH) και γηρασμένων (Γ) θηλυκών εντόμων, κανονικοποιημένων ως προς το βάρος του κάθε δείγματος. Παρατίθενται οι τιμές Μαλονδιαλδεΰδης ± τυπικό σφάλμα, όπως προέκυψαν αμέσως μετά το τέλος της συνεχούς ακτινοβόλησης 120 ωρών με βάση DECT. Η στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων έγινε με την παραμετρική ανάλυση independent t – test, *p<0,05 (M = μάρτυρες, A = ακτινοβολημένα έντομα).

3.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΣΤΗΝ ΟΛΙΚΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΙΣΤΩΝ ΑΡΣΕΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΘΗΛΥΚΩΝ ΦΥΣΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ΕΝΤΟΜΩΝ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΤΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ

Έχοντας μελετήσει την επίδραση της ακτινοβολίας στο οξειδωτικό δυναμικό των αρσενικών και θηλυκών εντόμων, διαφόρων ηλικιών, διερευνήθηκε και η επίδραση σε επίπεδο αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Συγκεκριμένα, επιχειρήθηκε η μελέτη της μη ενζυμικής ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των εντόμων.

Το πρωτόκολλο ακτινοβόλησης που εφαρμόστηκε ήταν, όπως και στην περίπτωση των οξειδωμένων μακρομορίων, οι 120 συνεχόμενες ώρες με βάση ασύρματου τηλεφώνου και τα έντομα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν φυσικού τύπου τριών ηλικιών (Νεαρά – 5 ημερών, Μέσης ηλικίας – 25 ημερών και Γηρασμένα – 55 ημερών). Ο συνολικός αριθμός ανά δείγμα ήταν 60 έντομα.

Κατά την *in vivo* γήρανση, η αντιοξειδωτική ικανότητα των μαρτύρων φαίνεται να μειώνεται στα αρσενικά έντομα ανεξαρτήτως ακτινοβολίας. Στα θηλυκά έντομα, με εξαίρεση τα μέσης ηλικίας, η αντιοξειδωτική ικανότητα φαίνεται να διατηρείται συναρτήσει του χρόνου. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η μικρότερη αναγωγική δυναμική ισχύς εμφανίζεται στα

έντομα μέσης ηλικίας (Πίνακας 3.22). Τα έντομα της συγκεκριμένης ηλικιακής κλάσης εμφάνισαν καλύτερη εικόνα όσον αφορά στο οξειδωτικό τους φορτίο, γεγονός που πιθανά να σχετίζεται με τη μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα. Κατά συνέπεια, τα αποτελέσματα που αφορούσαν στην *in vivo* γήρανση δείχνουν ότι το οξειδωτικό φορτίο αυξάνεται και το αντιοξειδωτικό δυναμικό μειώνεται με το πέρας του χρόνου. Αναλυτικότερα, η παρούσα μελέτη αποκάλυψε ότι τα έντομα υφίστανται ηλικιο-εξαρτώμενη αύξηση των ROS, των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών και των οξειδωμένων λιπιδίων σε συνδυασμό με πτώση της μη ενζυμικής αντιοξειδωτικής τους ικανότητας.

Πίνακας 3.22: Στον Πίνακα παρατίθενται τα επίπεδα ασκορβικού οζέος των μαρτύρων και των ακτινοβολημένων εντόμων, κανονικοποιημένα ως προς το βάρος. Καταγράφονται τα επίπεδα όλων των ηλικιακών κλάσεων πριν και μετά την ακτινοβόληση. Παρουσιάζεται το ποσοστό αύζησης ή μείωσης στα ακτινοβολημένα έντομα, συγκριτικά με τα μη ακτινοβολημένα, καθώς και τα επίπεδα σημαντικότητας, όπως προέκυψαν με την παραμετρική ανάλυση independent t – test

ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ	ΜΑΡΤΥΡΕΣ	ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΜΕΝΑ	% ΔΙΑΦΟΡΑ	TIMH p
	NEAPA	401,4 ± 25,8	229,0 ± 21,3	-42,9	0,041
ΑΡΣΕΝΙΚΑ	ΜΕΣΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ	293,2 ± 30,3	265,4 ± 15,6	-9,5	0,530
	ΓΗΡΑΣΜΕΝΑ	329,2 ± 8,1	227,4 ± 32,9	-30,9	0,043
	NEAPA	300,4 ± 17,5	239,1 ± 32,3	-20,4	0,156
ΘΗΛΥΚΑ	ΜΕΣΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ	193,7 ± 14,4	210,9 ± 11,6	-8,9	0,118
	ΓΗΡΑΣΜΕΝΑ	286,0 ± 22,2	209,8 ± 29,3	-26,6	0,045

Μετά από επίδραση με ακτινοβολία βάσης ασύρματου τηλεφώνου, τα αρσενικά έντομα παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μείωση της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας στη νεαρή και γηρασμένη ηλικιακή κλάση. Σε αντίθεση με τα νεαρά και τα γηρασμένα αρσενικά έντομα, τα έντομα μέσης ηλικίας εμφάνισαν μικρή πτώση της τάξης του 9%, η οποία όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική. (Εικόνα 3.23).



Εικόνα 3.23: Ραβδόγραμμα απεικόνισης της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των σωμάτων νεαρών (N), μέσης ηλικίας (MH) και γηρασμένων (Γ) αρσενικών εντόμων, κανονικοποιημένων ως προς το βάρος του κάθε δείγματος. Παρατίθενται οι τιμές ± τυπικό σφάλμα, όπως προέκυψαν αμέσως μετά το τέλος της ακτινοβόλησης με βάση ασύρματου τηλεφώνου. Η στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων έγινε με τη μη παραμετρική ανάλυση Mann – Whitney U test, *p<0,05 (M = μάρτυρες, A = ακτινοβολημένα έντομα).

Στα θηλυκά έντομα, στατιστικά σημαντική πτώση κατά 27% (*p*<0,05) παρατηρήθηκε μόνο στα γηρασμένα. Στα νεαρά θηλυκά άτομα, υπήρξε μία μικρή πτώση 13%, η οποία όμως δε φάνηκε να είναι στατιστικά σημαντική. Τέλος, σημαντική παρατήρηση υπήρξε και σε αυτή την περίπτωση η μη μεταβολή της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εντόμων μέσης ηλικίας (**Εικόνα** 3.24).



Εικόνα 3.24: Ραβδόγραμμα απεικόνισης της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των σωμάτων νεαρών (N), μέσης ηλικίας (MH) και γηρασμένων (Γ) θηλυκών εντόμων, κανονικοποιημένων ως προς το βάρος του κάθε δείγματος. Παρατίθενται οι τιμές ± τυπικό σφάλμα, όπως προέκυψαν αμέσως μετά το τέλος της ακτινοβόλησης με βάση DECT. Η στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων έγινε με τη μη παραμετρική ανάλυση Mann – Whitney U test, *p<0,05 (M = μάρτυρες, A = ακτινοβολημένα έντομα).

3.5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΣΗΣ ΕΝΗΛΙΚΩΝ ΕΝΤΟΜΩΝ, ΣΤΗΝ ΕΠΑΓΩΓΗ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΩΟΓΕΝΕΣΗ

Στη συγκεκριμένη Διατριβή αντικείμενο μελέτης αποτέλεσε, επίσης, η επίδραση της μη ιονίζουσας ακτινοβολίας στο αποπτωτικό δυναμικό του Δίπτερου εντόμου *Drosophila melanogaster*. Η μελέτη αφορούσε τόσο πηγές καθημερινής χρήσης, όπως το κινητό τηλέφωνο, όσο και γεννήτρια παραγωγής ραδιοσυχνοτήτων.

Το κινητό τηλέφωνο που χρησιμοποιήθηκε ως πηγή ασύρματης τεχνολογίας εξέπεμπε παλμικά κύματα συγκεκριμένων συχνοτήτων. Παράλληλα, η γεννήτρια που χρησιμοποιήθηκε είχε ρυθμιστεί ώστε να παράγει κύματα με διαμόρφωση συχνότητας (FM), καθώς και μη διαμορφωμένα κύματα (CW). Στόχος ήταν ο προσδιορισμός της βιοδραστικότητας των χαρακτηριστικών της μη ιονίζουσας ακτινοβολίας, όπως η διαμόρφωση, η ένταση, η διάρκεια και η συχνότητα στην ωογένεση του εντόμου Drosophila melanogaster.

Για τη διερεύνηση τυχόν επαγωγής απόπτωσης κατά την ωογένεση, απομονώθηκαν οι ωοθήκες και διαχωρίστηκαν τα ωοθυλάκια διαφορετικών σταδίων, 4 ώρες μετά το τέλος της εκάστοτε ακτινοβόλησης. Κατά τη διαδικασία της ωογένεσης, θρυμματισμένο DNA εμφανίζεται κυρίως στο στάδιο του γερμαρίου (Εικόνα 3.25Α) και στα στάδια της μέσης ωογένεσης 7 – 9 (Εικόνα 3.25Β).



Εικόνα 3.25: Χαρακτηριστικές εικόνες αποπτωτικών ωοθυλακίων μετά από χρώση με πορτοκαλί της ακριδίνης. Α. Ωοθυλάκια πρώιμης ωογένεσης από το στάδιο του γερμαρίου (κίτρινα βέλη) έως το στάδιο 8 της μέσης ωογένεσης. Β. Αποπτωτικό ωοθυλάκιο σταδίου 8 (κόκκινο βέλος). Ράβδοι μεγέθυνσης = 400 μm.

Η ποσοτικοποίηση της απόπτωσης πραγματοποιήθηκε υπολογίζοντας το λόγο των αποπτωτικών ωοθυλακίων, τα οποία καταμετρούνται μετά από χρώση με πορτοκαλί της ακριδίνης σε μικροσκόπιο φθορισμού, ως προς το συνολικό αριθμό ωοθυλακίων από το γερμάριο μέχρι και το στάδιο 9. Ο συγκεκριμένος λόγος έδωσε τα αντίστοιχα ποσοστά αποπτωτικών ωοθυλακίων που παρουσιάζονται στα επόμενα διαγράμματα.

3.5.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΤΗΣ ΜΗ ΙΟΝΙΖΟΥΣΑΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΣΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΩΟΓΕΝΕΣΗ

Για τα πειράματα αυτά, έγινε αρχικά συλλογή νεοεκδυθέντων εντόμων *D. melanogaster* φυσικού τύπου (2 – 4 ώρες από τη στιγμή της έκδυσης). Τα έντομα κατά τη συλλογή τους χωρίστηκαν σε 2 ομάδες: Η πρώτη ομάδα περιελάμβανε τα ακτινοβολημένα έντομα, τα οποία μεταφέρθηκαν στους κλιβάνους καλλιέργειας σταθερών περιβαλλοντικών συνθηκών και εκτέθηκαν στην ακτινοβολία. Η δεύτερη ομάδα αποτελούνταν από τα έντομα «εικονικής ακτινοβόλησης» – μάρτυρες, δηλαδή έντομα που παρέμειναν προστατευμένα από την ακτινοβολία και μεταφέρθηκαν σε αντίστοιχο κλίβανο καλλιέργειας σταθερών συνθηκών, όπως τα ακτινοβολημένα έντομα, αλλά χωρίς την παρουσία ακτινοβολίας. Σε κάθε ομάδα συλλέχθηκαν 5 θηλυκά έντομα και σε κάθε πείραμα υπήρχαν 2 δείγματα ανά συνθήκη, ενώ τα πειράματα επαναλήφθηκαν τουλάχιστον 3 φορές.

3.5.1.1 Επίδραση στην απόπτωση συναρτήσει του πρωτοκόλλου έκθεσης ακτινοβολίας 900 MHz χωρίς διαμόρφωση

Ως πρωτόκολλα ακτινοβόλησης για τη μελέτη της επίδρασης του χρόνου έκθεσης στην ωογένεση του δίπτερου *Drosophila melanogaster*, χρησιμοποιήθηκαν τα 6 λεπτά και τα 60 λεπτά αντίστοιχα, ενώ η έκθεση ήταν είτε εφάπαξ για μία φορά την 5^η ημέρα της ενήλικης ζωής των εντόμων, είτε καθημερινή για 5 ημέρες.

Με σκοπό τη μελέτη μόνο του πρωτοκόλλου έκθεσης, τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά παρέμειναν σε όλα τα πρωτόκολλα ακτινοβόλησης τα ίδια. Με άλλα λόγια, τα θηλυκά έντομα εκτέθηκαν σε συνεχή κύματα χωρίς διαμόρφωση συχνότητας 900 MHz και σε σταθερή ένταση πεδίου 3 V/m.

Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στα ποσοστά των αποπτωτικών ωοθυλακίων σε όλα τα πρωτόκολλα ακτινοβόλησης συγκριτικά με τα έντομα «εικονικής ακτινοβόλησης» – μάρτυρες. Ακόμα και η σύντομη ακτινοβόληση των 6 λεπτών βρέθηκε ικανή να επάγει την απόπτωση στα σημεία ελέγχου της ωογένεσης. Συγκεκριμένα, μετά από καθημερινή ακτινοβόληση 60 λεπτών, για 5 ημέρες, τα ποσοστά των αποπτωτικών ωοθυλακίων από 3% που ήταν στους μάρτυρες, ανήλθαν στο 8% (p<0,001), ενώ ίδιας διάρκειας ακτινοβόληση για μία φορά μόνο προκάλεσε εξίσου στατιστικά σημαντική μεταβολή του ποσοστού (p = 0,001), με το ποσοστό που καταγράφηκε να φτάνει το 8,6%. Τη μικρότερη αύξηση κατέγραψε το πρωτόκολλο της καθημερινής 6λεπτης ακτινοβόλησης, της τάξης του 43%, ενώ και σε αυτή την περίπτωση η αύξηση ήταν στατιστικά σημαντική (p = 0,035). Τέλος, σύντομη 6λεπτη ακτινοβόληση, μόνο την 5^η ημέρα, προκάλεσε 2,5 φορές αύξηση του ποσοστού των αποπτωτικών ωοθυλακίων στα ακτινοβολημένα θηλυκά έντομα, η οποία ήταν στατιστικά σημαντική μεταιστικά σημαντική μεταισο των αποπτωτικών μοθυλακίων του τους μάρτυρες (**Πίνακας 3.23** και **Εικόνα 3.26**).

Πίνακας 3.23: Στον Πίνακα παρατίθενται τα ποσοστά \pm το τυπικό σφάλμα αποπτωτικών ωοθυλακίων όπως ανιχνεύθηκαν 4 ώρες μετά το τέλος του κάθε πρωτοκόλλου ακτινοβόλησης με συνεχές κύμα (CW) συχνότητας 900 MHz και έντασης ηλεκτρικού πεδίου 3 V/m. Δίνεται, επίσης, το αντίστοιχο ποσοστό αύξησης στα ακτινοβολημένα έντομα, συγκριτικά με τα μη ακτινοβολημένα. Τα πρωτόκολλα ακτινοβόλησης απεικονίζονται ως εξής: 60 min / 5 d = 60 λεπτά καθημερινά για 5 ημέρες, 60 min / 1 d = 60 λεπτά μόνο την 5^η ημέρα ενήλικης ζωής, 6 min / 5 d = 6 λεπτά καθημερινά για 5 ημέρες, 6 min / 1 d = 6 λεπτά μόνο την 5^η ημέρα ενήλικης ζωής

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ	% ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΑ ΩΟΘΥΛΑΚΙΑ	% ΑΥΞΗΣΗ
ΜΑΡΤΥΡΕΣ	3,2 ± 0,1	-
60 min / 5 d	8,1 ± 0,4	151,3
60 min / 1 d	8,6 ± 0,1	164,0
6 min / 5 d	4,6 ± 0,1	42,7
6 min / 1 d	8,3 ± 0,3	154,8



Εικόνα 3.26: Ραβδόγραμμα απεικόνισης των ποσοστών των αποπτωτικών ωοθυλακίων, 4 ώρες μετά από κάθε πρωτόκολλο ακτινοβόλησης με συνεχή κύματα συχνότητας 900 MHz και έντασης ηλεκτρικού πεδίου 3 V/m. Παρατίθενται οι τιμές ± τυπικό σφάλμα, όπως προέκυψαν μετά από καταμέτρηση των αποπτωτικών και φυσιολογικών ωοθυλακίων 4 ώρες μετά το τέλος της κάθε ακτινοβόλησης. Τα πρωτόκολλα ακτινοβόλησης απεικονίζονται ως εξής: 60 min / 5 d = 60 λεπτά καθημερινά για 5 ημέρες, 60 min / 1 d = 60 λεπτά μόνο την 5^η ημέρα ενήλικης ζωής, 6 min / 5 d = 6 λεπτά καθημερινά για 5 ημέρες και 6 min / 1 d = 6 λεπτά μόνο την 5^η ημέρα ενήλικης ζωής. Η στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων έγινε με τη μη παραμετρική ανάλυση Kruskal – Wallis test, *p<0,05, **p<0,01 (CTRL = Μάρτυρες).

Στατιστική επεξεργασία μεταξύ των καθημερινών και των εφάπαξ πρωτοκόλλων ακτινοβόλησης, με τη μη παραμετρική ανάλυση Kruskal – Wallis, δεν αποκάλυψε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Πιο αναλυτικά, δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της αύξησης στο ποσοστό των αποπτωτικών ωοθυλακίων, που προκλήθηκε από το πρωτόκολλο των 60 λεπτών καθημερινής ακτινοβόλησης, συγκριτικά με την αντίστοιχη αύξηση που προκλήθηκε από την εφάπαξ ακτινοβόληση των 60 λεπτών. Το ίδιο παρατηρήθηκε και όσον αφορά στα πρωτόκολλα των 6 λεπτών. Τέλος, μεταξύ των 60 και 6 λεπτών ακτινοβόλησης δε σημειώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα ποσοστά των αποπτωτικών ωοθυλακίων (Πίνακας 3.24).

Πίνακας 3.24: Παράθεση των επιπέδων σημαντικότητας (τιμές p) μετά από στατιστική επεξεργασία μεταξύ των διαφορετικών πρωτοκόλλων ακτινοβόλησης κυμάτων CW 900 MHz. Η στατιστική επεξεργασία έγινε με τη μη παραμετρική ανάλυση Kruskal – Wallis . Τα πρωτόκολλα ακτινοβόλησης απεικονίζονται ως εξής: 60 min / 5 d = 60 λεπτά καθημερινά για 5 ημέρες, 60 min / 1 d = 60 λεπτά μόνο την 5^η ημέρα ενήλικης ζωής, 6 min / 5 d = 6 λεπτά καθημερινά για 5 ημέρες και 6 min / 1 d = 6 λεπτά μόνο την 5^η ημέρα ενήλικης ζωή (CTRL = Μάρτυρες)

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ	CTRL	60 min / 5 d	60 min / 1 d	6 min / 5 d	6 min / 1 d
CTRL		<0,001	0,001	0,035	<0,001
60 min / 5 d	<0,001		0,792	0,153	0,982
60 min / 1 d	0,001	0,792		0,174	0,814
6 min / 5 d	0,035	0,153	0,174		0,172
6 min / 1 d	<0,001	0,982	0,814	0,172	

3.5.1.2 Επίδραση στην απόπτωση συναρτήσει της διαμόρφωσης της ακτινοβολίας συχνότητας 1800 MHz

Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα πειράματα που αφορούσαν στην επίδραση του πρωτοκόλλου έκθεσης, για τη διερεύνηση της διαμόρφωσης στη συγκεκριμένη βιολογική διαδικασία επιλέχθηκε το πρωτόκολλο της μίας ώρας εφάπαξ ακτινοβόλησης την 5^η ημέρα της ενήλικης ζωής των εντόμων.

Στα συγκεκριμένα πειράματα, σκοπός ήταν η μελέτη της βιοδραστικότητας της διαμόρφωσης των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων στην ωογένεση του δίπτερου εντόμου. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκε γεννήτρια ραδιοσυχνοτήτων, η οποία είχε ρυθμιστεί να παράγει κύματα (FM) συχνότητας 1800 MHz, καθώς και συνεχή κύματα (CW) ίδιας συχνότητας. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκε και η βάση ασύρματου τηλεφώνου, η οποία εξέπεμπε παλμικά κύματα (PULSED) συχνότητας 1800 MHz. Η μέση ένταση ηλεκτρικού πεδίου ήταν σε όλες τις περιπτώσεις 1 V/m. Κατά συνέπεια, η μόνη διαφοροποίηση μεταξύ των ακτινοβολήσεων ήταν η διαμόρφωση της ακτινοβολίας.

Παρατηρήθηκε, στατιστικά σημαντική αύξηση του ποσοστού των αποπτωτικών ωοθυλακίων μετά από επίδραση όλων των κυματομορφών. Τα συνεχή κύματα φάνηκε να προκαλούν διπλασιασμό στον αριθμό των αποπτωτικών ωοθυλακίων, καθώς το ποσοστό που καταγράφηκε ήταν 5% (p = 0,038) έναντι 2,3% των εντόμων που δεν ακτινοβολήθηκαν. Η αύξηση αυτή ήταν στατιστικά σημαντική. Στην περίπτωση των διαμορφωμένων κυμάτων, η αντίστοιχη αύξηση ήταν πολύ μεγαλύτερη καθώς το ποσοστό των αποπτωτικών ωοθυλακίων μετά από επίδραση με παλμική ασύρματη ακτινοβολία ήταν 8,6% (p<0,001) (Πίνακας 3.25 και Εικόνα 3.27).

Πίνακας 3.25: Στον Πίνακα παρατίθενται τα ποσοστά ± το τυπικό σφάλμα αποπτωτικών ωοθυλακίων, όπως καταμετρήθηκαν 4 ώρες μετά το τέλος της 60λεπτης ακτινοβόλησης κυμάτων με ή χωρίς διαμόρφωση, συχνότητας 100 MHz και έντασης ηλεκτρικού πεδίου 1 V/m. Παρουσιάζεται, επίσης, το αντίστοιχο ποσοστό αύξησης στα ακτινοβολημένα έντομα συγκριτικά με τα μη ακτινοβολημένα. CW = συνεχές κύμα, FM = κύμα με διαμόρφωση συχνότητας 50 KHz και PULSED = παλμικό κύμα εκπεμπόμενο από βάση ασύρματου τηλεφώνου

ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ	% ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΑ ΩΟΘΥΛΑΚΙΑ	% ΑΥΞΗΣΗ
ΜΑΡΤΥΡΕΣ	2,3 ± 0,2	
CW	5,1 ±0,1	119,1
FM	8,3 ± 0,4	258,0
PULSED	8,6 ± 1,1	272,5



Εικόνα 3.27: Ραβδόγραμμα απεικόνισης των ποσοστών των αποπτωτικών ωοθυλακίων μέσης και πρώιμης ωογένεσης μετά από ακτινοβόληση με διαφορετικούς τύπους κυμάτων στην συχνότητα 1,8 GHz. μίας ώρας εφάπαξ ακτινοβόλησης την 5^η ημέρα της ενήλικης ζωής των εντόμων Παρατίθενται οι ποσοστιαίες τιμές ± τυπικό σφάλμα, όπως προέκυψαν μετά από καταμέτρηση των αποπτωτικών και φυσιολογικών ωοθυλακίων 4 ώρες μετά το τέλος της κάθε ακτινοβόλησης. Η στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων έγινε με την παραμετρική ανάλυση ANOVA, με προσαρμογή Bonferroni Post – Hoc, για πολλαπλές συγκρίσεις, *p<0,05, **p<0,01 (CTRL = μάρτυρες, CW = συνεχές κύμα, FM = κύμα με διαμόρφωση συχνότητας και PULSED = παλμικό κύμα εκπεμπόμενο από βάση ασύρματου τηλεφώνου DECT).

Στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων έδειξε ότι τόσο η αύξηση που προκλήθηκε από τη βάση ασύρματου τηλεφώνου όσο και από την FM διαμόρφωση της ίδιας φέρουσας συχνότητας 1,8 GHz ήταν στατιστικά σημαντικές. Τα ποσοστά μεταξύ των δύο διαμορφωμένων κυμάτων, δεν παρουσίασαν κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά, αντίθετα υπήρξε στατιστική
διαφορά μεταξύ των ποσοστών που καταγράφηκαν μετά από επίδραση παλμικών κυμάτων έναντι των συνεχών (Πίνακας 3.26).

Πίνακας 3.26: Παράθεση των επιπέδων σημαντικότητας (τιμές p), όπως προέκυψαν μετά από στατιστική επεξεργασία μεταξύ των διαφορετικών τύπων κυμάτων στη συχνότητα 1800 MHz. Η στατιστική επεξεργασία έγινε με την παραμετρική ανάλυση ANOVA, με προσαρμογή Bonferroni Post – Hoc, για πολλαπλές συγκρίσεις (CTRL = μάρτυρες, CW = συνεχές κύμα, FM = κύμα με διαμόρφωση συχνότητας και PULSED = παλμικό κύμα εκπεμπόμενο από βάση ασύρματου τηλεφώνου DECT)

ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ	CTRL	CW	FM	PULSED
CTRL		0,006	<0,001	<0,001
CW	0,006		0,011	0,002
FM	<0,001	0,011		0,739
PULSED	<0,001	0,002	0,739	

3.5.1.3 Επίδραση στην απόπτωση συναρτήσει της συχνότητας της ακτινοβολίας με κύματα CW

Στα συγκεκριμένα πειράματα, σκοπός ήταν η διερεύνηση τυχόν εξάρτησης της επίδρασης από τη συχνότητα των κυμάτων. Όπως και στην περίπτωση του οξειδωτικού δυναμικού, έτσι και εδώ, χρησιμοποιήθηκε γεννήτρια ραδιοσυχνοτήτων, η οποία ρυθμιζόταν να παράγει κύματα συχνότητας 100 MHz, 900 MHz και 1800 MHz (που να αντιστοιχούν με συχνότητες ραδιοφωνίας, GSM 900 MHz και GSM 1800 MHz). Για τη μελέτη αποκλειστικά της επίδρασης της συχνότητας, χρησιμοποιήθηκαν αρχικά συνεχή κύματα χωρίς διαμόρφωση. Το πρωτόκολλο ακτινοβόλησης ήταν ίδιο για όλες τις συχνότητες (σύντομη 60λεπτη ακτινοβόληση μόνο την 5^η ημέρα της ενήλικης ζωής των εντόμων), ενώ, τέλος, η μέση ένταση ηλεκτρικού πεδίου για όλες τις συχνότητες η συχνότητας ήταν 1 V/m. Κατά συνέπεια, η μόνη διαφοροποίηση μεταξύ των ακτινοβολήσεων ήταν η συχνότητα της ακτινοβολίας.

Όλες οι συχνότητες οδήγησαν σε στατιστικά σημαντική αύξηση του ποσοστού των αποπτωτικών ωοθυλακίων. Συγκεκριμένα, μετά από έκθεση σε συχνότητα 100 MHz το ποσοστό που καταγράφηκε ήταν 4,6% (p = 0,004), έναντι 2,3% των μαρτύρων. Τα ποσοστά που καταγράφηκαν στην περίπτωση των 900 MHz ήταν 5,7% (p<0,001), και τα αντίστοιχα των 1800 MHz ήταν 5,1% (p = 0,001). Τέλος, δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ποσοστών και των τριών συχνοτήτων, δηλαδή η επίδραση όσον αφορά στην επαγωγή της απόπτωσης ήταν η ίδια, ανεξαρτήτως συχνότητας. (Πίνακας 3.27 και Εικόνα 3.28).

<u>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u>

Πίνακας 3.27: Στον Πίνακα παρατίθενται τα ποσοστά ± το τυπικό σφάλμα αποπτωτικών ωοθυλακίων, όπως καταμετρήθηκαν 4 ώρες μετά το τέλος της 60λεπτης ακτινοβόλησης συνεχών κυμάτων διαφορετικών συχνοτήτων και έντασης ηλεκτρικού πεδίου 1 V/m. Καταγράφεται, επίσης, αντίστοιχο ποσοστό αύζησης στα ακτινοβολημένα έντομα, συγκριτικά με τα μη ακτινοβολημένα

ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ	% ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΑ ΩΟΘΥΛΑΚΙΑ	% ΑΥΞΗΣΗ
ΜΑΡΤΥΡΕΣ	2,3 ± 0,2	
100 MHz	4,6 ± 0,2	98,6
900 MHz	5,7 ± 0,8	146,8
1800 MHz	5,1 ± 0,1	119,1



Εικόνα 3.28: Ραβδόγραμμα απεικόνισης των ποσοστών των αποπτωτικών ωοθυλακίων μέσης και πρώιμης ωογένεσης μετά από ακτινοβόληση με συνεχή κύματα διαφορετικών συχνοτήτων. Παρατίθενται οι ποσοστιαίες τιμές ± τυπικό σφάλμα, όπως προέκυψαν μετά από καταμέτρηση των αποπτωτικών και φυσιολογικών ωοθυλακίων 4 ώρες μετά το τέλος της 60λεπτης ακτινοβόλησης (μέση ένταση ηλεκτρικού πεδίου 1 V/m). Η στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων έγινε με τη μη παραμετρική ανάλυση Kruskal – Wallis, *p<0,05, **p<0,01 (CTRL = μάρτυρες, CW = συνεχές κύμα).

Στατιστική επεξεργασία μεταξύ των δειγμάτων έδειξε ότι όλες οι συχνότητες επέφεραν στατιστικά σημαντική επαγωγή της απόπτωσης στα σημεία ελέγχου της ωογένεσης. Ωστόσο, δε φάνηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των διαφορετικών συχνοτήτων, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα συνεχή κύματα είχαν την ίδια επίδραση, όσον αφορά στην ωογένεση, ανεξάρτητα από τη συχνότητα εκπομπής τους (Πίνακας 3.28).

Пі́vaкаς 3.28:	Η Παράθεση των επιπέδων σημαντικότητας (τιμές p) μετά από στατιστική επεξεργασία μεταξύ
	των διαφορετικών συχνοτήτων συνεχών κυμάτων. Η στατιστική επεξεργασία έγινε με τη μη
	παραμετρική ανάλυση Kruskal – Wallis

ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ	ΜΑΡΤΥΡΕΣ	100 MHz	900 MHz	1800 MHz
ΜΑΡΤΥΡΕΣ		0,024	0,001	0,004
100 MHz	0,024		0,701	0,623
900 MHz	0,001	0,701		0,854
1800 MHz	0,004	0,623	0,854	

Έχοντας ήδη εξετάσει τον παράγοντα της διαμόρφωσης, και έχοντας παρατηρήσει ότι τα διαμορφωμένα κύματα προκαλούν μεγαλύτερη επίπτωση και επαγωγή της απόπτωσης στα σημεία ελέγχου της ωογένεσης, μελετήθηκε η συχνότητα σε συνδυασμό με τη διαμόρφωση, ώστε να εξετασθεί πιθανή αθροιστική δράση των δύο αυτών χαρακτηριστικών της ακτινοβολίας στην ακτινο-επαγόμενη απόπτωση. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν κύματα διαφορετικών συχνοτήτων, όπως αναφέρθηκαν προηγουμένως, μόνο που στην περίπτωση αυτή, τα κύματα έφεραν διαμόρφωση συχνότητας (FM) 50 kHz. Η διάρκεια της ακτινοβόλησης ήταν 60 λεπτά και η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου ήταν 1 V/m.

Στην περίπτωση των διαμορφωμένων κυμάτων, όπως και στην περίπτωση των συνεχών κυμάτων, στατιστικά σημαντική αύξηση του ποσοστού των αποπτωτικών ωοθυλακίων προκλήθηκε μετά από έκθεση των θηλυκών εντόμων σε όλες τις συχνότητες (Πίνακας 3.29 και Εικόνα 3.29).

Πίνακας 3.29: Στον Πίνακα παρατίθενται τα ποσοστά ± το τυπικό σφάλμα αποπτωτικών ωοθυλακίων, όπως καταμετρήθηκαν 4 ώρες μετά το τέλος της 60λεπτης ακτινοβόλησης με κύματα FM συχνοτήτων 100 MHz, 900 MHz και 1800 MHz, και έντασης ηλεκτρικού πεδίου 1 V/m, και το αντίστοιχο ποσοστό αύξησης στα ακτινοβολημένα έντομα συγκριτικά με τα μη ακτινοβολημένα

ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ	% ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΑ ΩΟΘΥΛΑΚΙΑ	% ΑΥΞΗΣΗ
ΜΑΡΤΥΡΕΣ	2,3 ± 0,2	
100 MHz	6,5 ± 0,1	178,2
900 MHz	6,5 ± 0,8	182,0
1800 MHz	8,3 ± 0,4	258,0

Τα αποτελέσματα έδειξαν αθροιστική επίδραση της συχνότητας με τη διαμόρφωση, καθώς σε όλες τις περιπτώσεις η επίδραση ήταν μεγαλύτερη συγκριτικά με τα μη διαμορφωμένα κύματα. Συγκεκριμένα, μετά από ακτινοβόληση 60 λεπτών με συχνότητα 100 MHz, το ποσοστό της απόπτωσης έφτασε το 6,5% (p = 0,021), έναντι 2,3% του ποσοστού των μαρτύρων. Στην περίπτωση της συχνότητας των 900 MHz, το ποσοστό των αποπτωτικών ωοθυλακίων ήταν επίσης 6,5% (p = 0,002), ενώ, τέλος, μετά από έκθεση των θηλυκών εντόμων στη συχνότητα των 1800 MHz, καταμετρήθηκε 8,3% (p = 0,001) ποσοστό αποπτωτικών ωοθυλακίων.



Εικόνα 3.29: Ραβδόγραμμα απεικόνισης των ποσοστών των αποπτωτικών ωοθυλακίων μέσης και πρώιμης ωογένεσης, μετά από ακτινοβόληση κυμάτων FM διαφορετικών συχνοτήτων. Παρατίθενται οι ποσοστιαίες τιμές ± τυπικό σφάλμα, όπως προέκυψαν μετά από καταμέτρηση των αποπτωτικών και φυσιολογικών ωοθυλακίων 4 ώρες μετά το τέλος της 60λεπτηςακτινοβόλησης. Η στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων έγινε με τη μη παραμετρική ανάλυση Kruskal – Wallis, για πολλαπλές συγκρίσεις, *p<0,05, **p<0,01 (CTRL = μάρτυρες, FM = κύμα με διαμόρφωση συχνότητας 50 kHz).

Στατιστική επεξεργασία, μεταξύ των δειγμάτων έδειξε στην περίπτωση των διαμορφωμένων κυμάτων, όπως και στην περίπτωση των συνεχών κυμάτων, ότι δεν υπήρξε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των διαφορετικών συχνοτήτων (Πίνακας 3.30).

Πίνακας 3.30: Παράθεση των επιπέδων σημαντικότητας (τιμές p) μετά από στατιστική επεξεργασία μεταξύ των διαφορετικών συχνοτήτων. Η στατιστική επεξεργασία έγινε με τη μη παραμετρική ανάλυση Kruskal – Wallis, για πολλαπλές συγκρίσεις

ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ	ΜΑΡΤΥΡΕΣ	100 MHz	900 MHz	1800 MHz
ΜΑΡΤΥΡΕΣ		0,021	0,002	0,001
100 MHz	0,021		0,894	0,419
900 MHz	0,002	0,894		0,424
1800 MHz	0,001	0,419	0,424	

3.5.1.4 Επίδραση στην απόπτωση συναρτήσει της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου της ακτινοβολίας κυμάτων CW και συχνότητας 900 MHz

Σκοπό των συγκεκριμένων πειραμάτων αποτέλεσε η μελέτη της πιθανής εξάρτησης της απόπτωσης από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου. Η συχνότητα 900 MHz χρησιμοποιήθηκε με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων που αφορούσαν στη βιοδραστικότητα της συχνότητας, τα οποία κατέδειξαν, στην περίπτωση των συνεχών κυμάτων, ότι η συχνότητα των 900 MHz προκάλεσε τη μεγαλύτερη αύξηση στον αριθμό των αποπτωτικών ωοθυλακίων. Όπως και στις παραπάνω περιπτώσεις, έτσι και σε αυτήν, τα πρωτόκολλα διέφεραν μόνο στο υπό μελέτη χαρακτηριστικό της ακτινοβολίας. Χρησιμοποιήθηκαν συνεχή κύματα 900 MHz, ενώ οι εντάσεις που εξετάσθηκαν ήταν 0,3 V/m, 1 V/m, 2 V/m και 3 V/m, αντίστοιχα.

Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στα ποσοστά των αποπτωτικών ωοθυλακίων, μετά από έκθεση των θηλυκών εντόμων σε όλες τις εντάσεις ηλεκτρικού πεδίου που επιλέχθηκαν. Το αποτέλεσμα αυτό αποτελεί ιδιαίτερα σημαντικό εύρημα, καθώς όλες οι εντάσεις ήταν πολύ κάτω από τα «όρια ασφαλείας» που ισχύουν για την έκθεση του πληθυσμού στη μη ιονίζουσα ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Συγκεκριμένα, η ένταση 0,3 V/m προκάλεσε αύξηση του ποσοστού της απόπτωσης 120% (p<0,001), η ένταση 1 V/m 126% (p<0,001), η ένταση 2 V/m 247% (p<0,001) και η ένταση 3 V/m 212% (p<0,001), αντίστοιχα (Πίνακας 3.31 και Εικόνα 3.30).

Πίνακας 3.31: Στον Πίνακα παρατίθενται τα ποσοστά ± το τυπικό σφάλμα αποπτωτικών ωοθυλακίων, όπως καταμετρήθηκαν 4 ώρες μετά το τέλος της 60λεπτης ακτινοβόλησης με κύματα συχνότητας 900 MHz διαφορετικής έντασης ηλεκτρικού πεδίου, και το αντίστοιχο ποσοστό αύζησης στα ακτινοβολημένα έντομα συγκριτικά με τα μη ακτινοβολημένα

εντάση (ε)	% ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΑ ΩΟΘΥΛΑΚΙΑ	% ΑΥΞΗΣΗ
ΜΑΡΤΥΡΕΣ	2,5 ± 0,1	
0,3 V/m	5,6 ± 0,2	120,1
1 V/m	5,7 ± 0,8	126,4
2 V/m	8,8 ± 0,5	247,0
3 V/m	7,9 ± 0,3	212,7



Εικόνα 3.30: Ραβδόγραμμα απεικόνισης των ποσοστών των αποπτωτικών ωοθυλακίων μέσης και πρώιμης ωογένεσης, μετά την 60λεπτη ακτινοβόληση διαφορετικών εντάσεων ηλεκτρικού πεδίου.

Παρατίθενται οι ποσοστιαίες τιμές \pm τυπικό σφάλμα, όπως προέκυψαν μετά από καταμέτρηση των αποπτωτικών και φυσιολογικών ωοθυλακίων 4 ώρες μετά το τέλος της κάθε ακτινοβόλησης, για συχνότητα 900 MHz και κύματα CW. Η στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων έγινε με την παραμετρική ανάλυση ANOVA, με προσαρμογή Bonferroni Post – Hoc, για πολλαπλές συγκρίσεις, *p<0,05, **p<0,01 (CTRL = μάρτυρες, CW = συνεχές κύμα).

Από το διάγραμμα διαπιστώνεται σημαντική διαφορά μεταξύ του μάρτυρα και όλων των τιμών έντασης ηλεκτρικού πεδίου. Η επεξεργασία μεταξύ των διαφορετικών εντάσεων έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ένταση 0,3 V/m και τις εντάσεις 2 και 3 V/m, ενώ ταυτόχρονα οι εντάσεις 2 και 3 V/m δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά, παρά το γεγονός ότι το αποπτωτικό ποσοστό που σημειώθηκε στα 3 V/m ήταν μικρότερο του αντίστοιχου των 2 V/m (Πίνακας 3.32). Κατά συνέπεια, δε σημειώθηκε γραμμική συσχέτιση μεταξύ της αυξανόμενης έντασης και της επαγόμενης απόπτωσης.

Πίνακας 3.32: Παράθεση των επιπέδων σημαντικότητας (τιμές p), μετά από στατιστική επεξεργασία μεταξύ των διαφορετικών εντάσεων ηλεκτρικού πεδίου σε ακτινοβόληση κυμάτων CW, συχνότητας 900 MH_z και διάρκειας 60 λεπτών. Η στατιστική επεξεργασία έγινε με την παραμετρική ανάλυση ANOVA, με προσαρμογή Bonferroni Post – Hoc, για πολλαπλές συγκρίσεις

εντάση (ε)	ΜΑΡΤΥΡΕΣ	0,3 V/m	1 V/m	2 V/m	3 V/m
ΜΑΡΤΥΡΕΣ		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
0,3 V/m	<0,001		1,000	<0,001	0,001
1 V/m	<0,001	1,000		<0,001	0,003
2 V/m	<0,001	<0,001	1,000		1,000
3 V/m	<0,001	0,001	0,003	1,000	

3.5.2 ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ p53 ΣΤΗΝ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ, ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΑΛΜΙΚΗ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ, ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΩΟΓΕΝΕΣΗ

Έχοντας ως στόχο τη διερεύνηση πιθανού ρόλου του μεταγραφικού παράγοντα p53 στην απόπτωση που παρατηρείται μετά από έκθεση σε μη ιονίζουσα ακτινοβολία, χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος Dmp53^{-/-}.

Η πηγή που επιλέχθηκε ήταν το κινητό τηλέφωνο, με σκοπό την προσομοίωση ρεαλιστικών συνθηκών έκθεσης. Ως πρωτόκολλα ακτινοβόλησης χρησιμοποιήθηκαν: (Α) τα 6 λεπτά ακτινοβόλησης την 4^η ημέρα ενήλικης ζωής, που προκάλεσαν την ίδια αύξηση με το αντίστοιχο πρωτόκολλο 60 λεπτών στην περίπτωση των πειραμάτων γεννήτριας ραδιοσυχνοτήτων (βλ. Ενότητα 3.5.1.1) και (Β) τα 30 λεπτά ακτινοβόλησης την 4^η ημέρα ενήλικης ζωής, που προκάλεσαν αύξηση στα επίπεδα των δραστικών μορφών οξυγόνου (βλ. Ενότητα 3.1.6).

Καταμέτρηση των αποπτωτικών και φυσιολογικών ωοθυλακίων έδειξε αύξηση στον αριθμό των πρώτων, στα ακτινοβολημένα δείγματα και στα δύο στελέχη (Πίνακας 3.33).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πίνακας 3.33: Στον Πίνακα παρατίθενται τα ποσοστά ± το τυπικό σφάλμα αποπτωτικών ωοθυλακίων, όπως καταμετρήθηκαν στα 2 στελέχη, 4 ώρες μετά το τέλος της κάθε ακτινοβόλησης με κινητό τηλέφωνο. Επίσης, καταγράφεται το αντίστοιχο ποσοστό αύξησης στα ακτινοβολημένα έντομα συγκριτικά με τα μη ακτινοβολημένα και τα επίπεδα σημαντικότητας (τιμές p), όπως προέκυψαν μετά από στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων με την παραμετρική ανάλυση independent t – test

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ	% ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΑ ΩΟΘΥΛΑΚΙΑ		% ΑΥΞΗΣΗ	TIMH p
		ΜΑΡΤΥΡΕΣ	ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΜΕΝΑ		
	6 λεπτά	3,4 ± 0,2	9,3 ± 0,7	172,7	<0,001
wi	30 λεπτά	3,9 ± 0,3	8,0 ± 0,4	107,1	<0,001
D	6 λεπτά	3,0 ± 0,3	4,4 ± 0,6	46,8	0,043
Dmpss	30 λεπτά	3,3 ± 0,3	5,8 ± 0,3	76,6	<0,001

Ωστόσο, η αύξηση που παρατηρήθηκε στο στέλεχος φυσικού τύπου και στα δύο πρωτόκολλα ακτινοβόλησης ήταν μεγαλύτερη από αυτή που καταγράφηκε στο μεταλλαγμένο στέλεχος *Dm*p53^{-/-} (Πίνακας 3.33). Κατά συνέπεια, σημειώθηκε διαφορετική απόκριση, έναντι της ακτινοβολίας ανάμεσα στα δύο στελέχη.

Πιο αναλυτικά, μετά από 6λεπτη ακτινοβόληση στα φυσικού τύπου ακτινοβολημένα έντομα το ποσοστό των αποπτωτικών ωοθυλακίων ήταν 9,3% έναντι 3,3% των μη ακτινοβολημένων εντόμων (Εικόνα 3.31 και Πίνακας 3.33). Στο στέλεχος Dmp53^{-/-} η αύξηση που παρατηρήθηκε ήταν μικρότερη του φυσικού τύπου στελέχους, καθώς τα αντίστοιχα ποσοστά αποπτωτικών ωοθυλακίων ήταν 4,4% στα ακτινοβολημένα και 3% στους μάρτυρες (Εικόνα 3.31 και Πίνακας 3.33). Παράλληλα, έκθεση 30 λεπτών οδήγησε σε ποσοστό 8% αποπτωτικών ωοθυλακίων στα φυσικού τύπου ακτινοβολημένα έντομα, έναντι 3,9% των εντόμων που δεν είχαν εκτεθεί στην ακτινοβολία. Στο μεταλλαγμένο στέλεχος Dmp53^{-/-} τα αντίστοιχα ποσοστά στα ακτινοβολημένα άτομα ήταν 5,8% και στους μάρτυρες 3,3% (Εικόνα 3.31 και Πίνακας 3.33). Περαιτέρω επεξεργασία των αποτελεσμάτων έδειξε διαφοροποίηση στην επαγωγή της απόπτωσης συναρτήσει του χρόνου έκθεσης ανάμεσα στα δύο στελέχη. Στα φυσικού τύπου έντομα, η αύξηση της απόπτωσης ήταν μεγαλύτερη μετά από 6 λεπτά 30 λεπτά (Πίνακας 3.33).



Εικόνα 3.31: Ραβδόγραμμα απεικόνισης των ποσοστών των αποπτωτικών ωοθυλακίων μέσης και πρώιμης ωογένεσης στα δύο υπό μελέτη στελέχη φυσικού (wt) και μεταλλαγμένου Dmp53^{-/} τύπου⁻. Παρατίθενται οι ποσοστιαίες τιμές ± το τυπικό σφάλμα, όπως προέκυψαν μετά από καταμέτρηση των αποπτωτικών και φυσιολογικών ωοθυλακίων, 4 ώρες μετά το τέλος της κάθε ακτινοβόλησης με κινητό τηλέφωνο. Η στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων έγινε με την παραμετρική ανάλυση independent t - test, *p<0,05, **p<0,01 (M =μάρτυρες, A =ακτινοβολημένα έντομα).

Με σκοπό την περαιτέρω διερεύνηση της διαφορετικής απόκρισης που παρατηρήθηκε και μεταλλαγμένου Dmp53^{-/-} τύπου ακτινοβολημένων φυσικού εντόμων. μεταξύ πραγματοποιήθηκε ξεχωριστή μελέτη των αποπτωτικών γερμαρίων και των σταδίων της μέσης ωογένεσης 7 - 9. Με άλλα λόγια, η καταμέτρησή τους έγινε ξεχωριστά τόσο στους μάρτυρες όσο και στα ακτινοβολημένα έντομα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το μεταλλαγμένο Dmp53-/στέλεγος εμφάνισε μικρότερο αριθμό αποπτωτικών γερμαρίων έναντι του αγρίου τύπου, ενώ είχε τα ίδια ποσοστά αποπτωτικών ωοθυλακίων μέσης ωογένεσης. Συγκεκριμένα, το ποσοστό των αποπτωτικών γερμαρίων μετά από 6 λεπτά ακτινοβόληση αυξήθηκε στα φυσικού τύπου έντομα 3,3 φορές ενώ στα μεταλλαγμένα άτομα δεν υπήρξε μεταβολή του. Τα αποπτωτικά ωοθυλάκια σταδίων 7 – 9 αυξήθηκαν στα φυσικού τύπου έντομα 2,2 φορές και στα Dmp53-/άτομα 1,9 φορές, αντίστοιχα. Παράλληλα, η ακτινοβόληση 30 λεπτών προκάλεσε αύξηση του ποσοστού των αποπτωτικών γερμαρίων στα φυσικού τύπου θηλυκά έντομα 2,8 φορές, ενώ στα μεταλλαγμένα $Dmp53^{-/-}$ άτομα δε σημειώθηκε αισθητή αύξηση (1,2 φορές). Τέλος, μετά από 30λεπτη ακτινοβόληση τα ποσοστά απόπτωσης που καταγράφηκαν στα ακτινοβολημένα, μέσης ωογένεσης, ωοθυλάκια ήταν 2,1 φορές υψηλότερα, συγκριτικά με τα αντίστοιγα των μαρτύρων, στα φυσικού τύπου, ενώ 2,3 φορές στα Dmp53^{-/-} μεταλλαγμένα έντομα (Εικόνα 3.32A και B).



Εικόνα 3.32: Ραβδόγραμμα απεικόνισης της αναλογικής αύξησης, σε σχέση με τους μάρτυρες, των αποπτωτικών γερμαρίων (A) και των αποπτωτικών σταδίων 7 – 9 (B), και στα δύο στελέχη εντόμων. Η αύξηση προέκυψε από το λόγο του ποσοστού των αποπτωτικών ωοθυλακίων που καταμετρήθηκε στα ακτινοβολημένα έντομα, μετά από κάθε ακτινοβόληση, προς το αντίστοιχο ποσοστό που καταγράφηκε στα έντομα που δεν είχαν εκτεθεί στην ακτινοβολία (wt = φυσικού τύπου στέλεχος, Dmp53^{-/-} = μεταλλαγμένο στέλεχος στο οποίο απουσιάζει ο μεταγραφικός παράγοντας p53).

3.6 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΣΤΡΕΣ ΕΝΔΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟΥ ΔΙΚΤΥΟΥ (ER STRESS)

Με σκοπό την ανίχνευση πιθανής επαγωγής του φαινομένου ER Stress μετά από την επίδραση της μη ιονίζουσας ακτινοβολίας, χρησιμοποιήθηκαν διαγονιδιακά στελέχη και το γενετικό σύστημα UAS/GAL4. Συγκεκριμένα, στέλεχος, το οποίο έφερε το γονίδιο για το μεταγραφικό παράγοντα GAL4 κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή της κυτταροσκελετικής πρωτεΐνης αρμαντίλο (armadillo), η οποία εκφράζεται καθολικά, διασταυρώθηκε με στέλεχος που έφερε τον παράγοντα Xbp-1 συζευγμένο με τη φθορίζουσα πράσινη πρωτεΐνη GFP κάτω από τον έλεγχο υποκινητή, ο οποίος έφερε την αλληλουχία πρόσδεσης του GAL4 (UAS αλληλουχία). Σε φυσιολογικές συνθήκες, το γονίδιο της GFP δε μεταφράζεται και δεν παράγεται η πρωτεΐνη. Σε συνθήκες όμως στρες, όπου υπάρχει η ενεργοποίηση του μηχανισμού για την αντιμετώπιση του στρες του ΕΔ, και πραγματοποιείται η αφαίρεση του εσωνίου από το mRNA του Xbp-1, η GFP εντοπίζεται στον πυρήνα.

Για τον έλεγχο της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα GAL4, πραγματοποιήθηκε διασταύρωση ελέγχου του στελέχους armadillo-GAL4 με στέλεχος, στο οποίο το γονίδιο GFP βρίσκεται υπό τον έλεγχο υποκινητή ο οποίος φέρει την αλληλουχία UAS (Εικόνα 3.33).



Εικόνα 3.33: Φωτογραφίες σιελογόνων αδένων, οι οποίοι έχουν απομονωθεί από προνύμφη εντόμων D. melanogaster αναπτυζιακού σταδίου 3, η οποία προέκυψε από τις συγκεκριμένες διασταυρώσεις. Αριστερά παρουσιάζεται σιελογόνος αδένας από λάρβα της διασταύρωσης ελέγχου, του armadillo-GAL4 στελέχους με το UAS-GFP στέλεχος, όπως φαίνεται (A) στο φωτονικό μικροσκόπιο και (B) στο μικροσκόπιο φθορισμού. Δεζιά απεικονίζεται σιελογόνος αδένας από τη διασταύρωση του armadillo-GAL4 με το διαγονιδιακό στέλεχος που φέρει τον

<u>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u>

παράγοντα Xbp-1 και την αλληλουχία UAS, όπως φαίνεται (Γ) στο φωτονικό μικροσκόπιο και (Δ) στο μικροσκόπιο φθορισμού. Ράβδοι μεγέθυνσης = 20 μm.

Ως πηγή ακτινοβόλησης χρησιμοποιήθηκε το κινητό τηλέφωνο, ενώ η ακτινοβόληση διάρκειας 60 λεπτών πραγματοποιήθηκε *in vitro* σε σιελογόνους αδένες λαρβών σταδίου 3 που προέκυψαν από τη διασταύρωση, για την υπερέκφραση του Xbp-1, στους σωματικούς ιστούς. Οι σιελογόνοι αδένες αποτελούν ιδανικό σύστημα για οπτική παρατήρηση, καθώς αποτελούνται από μεγάλα κύτταρα με ευδιάκριτους πυρήνες (Εικόνα 3.33).

Ως θετικός μάρτυρας επαγωγής του ER Stress χρησιμοποιήθηκε η ουσία DTT, η οποία προκαλεί οξείδωση και αναδιάταξη των δισουλφιδικών δεσμών στις πρωτεΐνες, και γενικά εμποδίζει τη δημιουργία γεφυρών θείου μεταξύ των καταλοίπων κυστεΐνης, με αποτέλεσμα να μην επιτρέπεται η σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών.

Μετά από μία ώρα *in vitro* ακτινοβόλησης, παρατηρήθηκε επαγωγή του στρες του Ενδοπλασματικού Δικτύου στους σιελογόνους αδένες (Εικόνα 3.34Α-Γ). Απουσία της ΗΜΑ και του DTT δεν έδωσε θετικό σήμα φθορισμού στους πυρήνες των κυττάρων των σιελογόνων αδένων (Εικόνα 3.34Α). Αντίθετα, η ακτινοβολία προκάλεσε επαγωγή του ER Stress στους εκτεθειμένους σιελογόνους, καθώς ο παράγοντας Xbp-1, που ήταν συζευγμένος με GFP, εντοπίστηκε στους πυρήνες των κυττάρων (Εικόνα 3.34Α). Θετικό πυρηνικό σήμα φθορισμού εμφανίστηκε και στους θετικούς μάρτυρες, μετά την επίδραση του DTT (Εικόνα 3.34Β).



Εικόνα 3.34: Φωτογραφίες από συνεστιακό σαρωτικό μικροσκόπιο laser σιελογόνων αδένων που απομονώθηκαν από (A) αρνητικούς μάρτυρες, προστατευμένους από την ακτινοβολία και τον οξειδωτικό παράγοντα DTT, (B) θετικούς μάρτυρες, οι οποίοι επωάστηκαν για 1 ώρα με 500 μM DTT και (Γ) in vitro ακτινοβολημένους για μία ώρα σιελογόνους αδένες. Είναι

εμφανές το θετικό πυρηνικό σήμα φθορισμού στο θετικό μάρτυρα, αλλά και στο ακτινοβολημένο δείγμα. Ράβδοι μεγέθυνσης = 20 μm.

3.7 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΗΜΑ ΣΤΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΩΟΓΕΝΕΣΗ

Έχοντας παρατηρήσει στο στέλεχος φυσικού τύπου αύξηση των ROS στα προ- και βιτελλογενετικά στάδια (γερμάριο – στάδιο 10), και ταυτόχρονα επαγωγή της απόπτωσης στα δύο σημεία ελέγχου της ωογένεσης (στάδια γερμαρίου και μέσης ωογένεσης 7 – 9), μετά από σύντομη ακτινοβόληση 30 λεπτών πραγματοποιήθηκε περαιτέρω μελέτη για την πιθανή αλλαγή στη γονιδιακή έκφραση κατά την ωογένεση, μέσω χρήσης της τεχνολογίας των γονιδιακών μικροσυστοιχιών. Για τη συγκεκριμένη μελέτη, επιλέχθηκε το χρονικό στιγμιότυπο των 2 ωρών μετά το τέλος της ακτινοβόλησης, καθώς οι ROS ανιχνεύθηκαν αμέσως μετά και τα μέγιστα ποσοστά αποπτωτικών ωοθυλακίων καταμετρήθηκαν 4 ώρες μετά το τέλος της.

Τα θηλυκά έντομα ακτινοβολήθηκαν με κινητό τηλέφωνο την 3^η ημέρα της ενήλικης ζωής τους για 30 λεπτά και αφέθηκαν για 2 ώρες, χωρίς παρουσία ακτινοβολίας. Μετά το πέρας των 2 ωρών, πραγματοποιήθηκε ανατομία, λήψη ωοθηκών, διαχωρισμός των ωοθυλακίων και απομόνωση όσων ήταν μέχρι σταδίου 12. Συνολικά, απομονώθηκαν ωοθυλάκια από 90 ζεύγη ωοθηκών, ανά δείγμα, ώστε να αποκλειστεί τυχόν διακύμανση μεταξύ των δειγμάτων. Τελικά, για την ανάλυση των γονιδιακών μικροσυστοιχιών χρησιμοποιήθηκαν 2 δείγματα ακτινοβολημένων εντόμων και 2 δείγματα μαρτύρων (Εικόνα 3.35).



Εικόνα 3.35: Σχηματική απεικόνιση του πειραματικού σχεδιασμού για την απομόνωση των υπό μελέτη δειγμάτων, τα οποία αναλύθηκαν με τη βοήθεια ανάλυσης γονιδιακών μικροσυστοιχιών.

3.7.1 ΑΛΛΑΓΉ ΣΤΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΉ ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΤΆ ΤΗΝ ΩΟΓΕΝΕΣΗ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΚΘΕΣΉ ΣΕ ΚΙΝΗΤΟ ΤΗΛΕΦΩΝΟ

Στατιστική επεξεργασία μεταξύ των ακτινοβολημένων δειγμάτων και των μαρτύρων, μέσω ανάλυσης συστάδων, έδειξε ότι τα ακτινοβολημένα δείγματα ομαδοποιούνταν ξεχωριστά από τα αντίστοιχα των μαρτύρων (Εικόνα 3.36A). Περαιτέρω επεξεργασία των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τις μικροσυστοιχίες, μέσω της μη παραμετρικής ανάλυσης independent t – test, έδειξε ότι 168 γονίδια (βλ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ) είχαν υποστεί στατιστικά σημαντική αλλαγή στην έκφρασή τους. Πιο αναλυτικά, 153 γονίδια είχαν υπερεκφραστεί τουλάχιστον 1,25 φορές και 15 είχαν υποεκφραστεί λιγότερο από 0,8 φορές (Εικόνα 3.36B και Εικόνα 3.37A). Η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η ακτινοβολία, αρχικά τουλάχιστον, επάγει σε μεγαλύτερο βαθμό τη μεταγραφή των γονιδίων και σε μικρότερο βαθμό οδηγεί σε καταστολή της έκφρασής τους.



Εικόνα 3.36: Α. Δενδρόγραμμα συστάδων, στο οποίο κατηγοριοποιούνται σε ζεχωριστές ομάδες τα δείγματα των ακτινοβολημένων εντόμων και των μαρτύρων, με βάση τα γονίδια που εκφράζουν, όπως προέκυψε μετά από αντίστοιχη στατιστική ανάλυση των δειγμάτων που αναλύθηκαν. **Β.** Γράφημα απεικόνισης του αριθμού των υπερεκφρασμένων και υποεκφρασμένων γονιδίων.

Ανάμεσα στα γονίδια που υπερεκφράστηκαν, τα 37 παρουσίασαν περισσότερο από 1,5 φορές μεγαλύτερη έκφραση, ενώ στην περίπτωση των υποεκφρασμένων γονιδίων, 4 γονίδια εμφάνισαν μείωση λιγότερο από 0,8 φορές (Εικόνα 3.37Β).



Εικόνα 3.37: Χάρτης (Heat map) απεικόνισης, μέσω διαβαθμίσεων δύο χρωμάτων, των γονιδίων τα οποία υπέστησαν τροποποίηση στην έκφρασή τους μετά από την επίδραση της ακτινοβολίας κινητού

τηλεφώνου σε σχέση με τους μάρτυρες. Το μαύρο χρώμα αντιστοιχεί σε απουσία μεταβολής έκφρασης, το πράσινο αντιστοιχεί σε γονίδια που υπερεκφράζονται και το κόκκινο σε γονίδια που υποεκφράζονται. **Α.** Χάρτης των συνολικών γονιδίων (168 γονίδια, \geq 1,25 φορές, p<0,05). **Β.** Χάρτης των 39 γονιδίων που η έκφρασή τους διαφοροποιήθηκε περισσότερο από 1,5 φορές (M = μάρτυρες, A = ακτινοβολημένα έντομα).

3.7.2 ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΤΑ ΟΠΟΙΑ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΘΗΚΕ Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ ΚΙΝΗΤΟΥ ΤΗΛΕΦΩΝΟΥ

Τα γονίδια των οποίων η έκφραση διαφοροποιήθηκε μετά την επίδραση της ακτινοβολίας κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη λειτουργία, το κυτταρικό διαμέρισμα και τις βιολογικές διεργασίες στις οποίες συμμετέχουν, μέσω Βιοπληροφορικής ανάλυσης και με χρήση των βάσεων δεδομένων: Gene Ontology (GO), David Knowledgebase, Flybase, KEGG pathway analysis, Ingenuity και Panther Pathway.

Όσον αφορά στην κυτταρική τοπολογία αναφορές σχετικά με τον εξωκυττάριο χώρο βρέθηκαν για 3 γονιδιακά προϊόντα, σχετικά με το κυτοσόλιο για 7 και σχετικά με την κυτταρική μεμβράνη για 26. Η πλειονότητα των πρωτεϊνών κατανεμήθηκε σε οργανίδια (51) και κυρίως στον πυρήνα (31). Με τα μιτοχόνδρια συσχετίστηκαν 5 πρωτεΐνες όπως και με τα ριβοσώματα. Τέλος, τροποποιημένα ως προς την έκφρασή τους γονίδια βρέθηκαν να σχετίζονται με οργανίδια του εκκριτικού δικτύου του κυττάρου, όπως το Ενδοπλασματικό Δίκτυο (2), το Σύμπλεγμα Golgi (2) και το Ενδόσωμα (5) (Εικόνα 3.38Α). Συνεπώς, φάνηκε ότι η ΗΜΑ οδήγησε σε αναδιαμόρφωση των οργανιδίων του κυττάρου.

Τα γονίδια που παρατηρήθηκε ότι άλλαξαν πρότυπο έκφρασης φάνηκε να συμμετέχουν σε ποικίλες βιολογικές διεργασίες και η πλειονότητά τους κατηγοριοποιήθηκε σε μεταβολικές οδούς (74) και κυρίως καταβολικές, όπως η πρωτεόλυση. Επόμενη κατηγορία με πολλά γονίδια ήταν οι κυτταρικές διαδικασίες (42), όπως η μεταφορά μέσω κυστιδίων, η οργάνωση της μεμβράνης, η ενδοκύτωση και η φαγοκύτωση (Εικόνα 3.38B). Τέλος, πολλά ήταν και τα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχουν τα συγκεκριμένα γονίδια και τα οποία θα μπορούσαν να έχουν επηρεαστεί από την ακτινοβολία, μεταξύ των οποίων το μονοπάτι του p53, του Toll υποδοχέα, της αποικοδόμησης στο πρωτεάσωμα μέσω ουβικουιτινυλίωσης κ.λπ. (Εικόνα 3.38Γ). Μέσω της Βιοπληροφορικής ανάλυσης φάνηκε ότι η επίδραση του κινητού ήταν μη-στοχευμένη και πολύ-επίπεδη, καθώς η απόκριση σε αυτό περιελάμβανε ποικίλες διεργασίες.



Εικόνα 3.38: Χαρακτηρισμός των γονιδίων στα οποία τροποποιήθηκε το πρότυπο έκφρασής τους, μετά από επίδραση της ΗΜΑ, με βάση την κυτταρική θέση, τις βιολογικές διεργασίες και τα

σηματοδοτικά μονοπάτια που τα ομοειδή πρωτεϊνικά τους προϊόντα συμμετέχουν. Για κάθε κατηγορία δίνεται και ο αντίστοιχος αριθμός των σχετιζόμενων γονιδιακών προϊόντων. Α. Γράφημα που παρουσιάζει την κατανομή των πρωτεϊνών στο κύτταρο. Τα προϊόντα της πλειονότητας των γονιδίων, που η έκφραση τους βρέθηκε να έχει τροποποιηθεί 4 ώρες μετά τη σύντομη 30λεπτη ακτινοβόληση με κινητό τηλέφωνο, σχετίζονται με κυτταρικά οργανίδια. Η ανάλυση έγινε με τη βάση δεδομένων David. **Β.** Γενικές κατηγορίες βιολογικών διεργασιών, οι οποίες θα μπορούσαν να έχουν επηρεαστεί από την ακτινοβολία κινητού τηλεφώνου. Η ανάλυση έγινε με τη βάση δεδομένων David. **Γ.** Σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχουν τα γονίδια που βρέθηκε να έχει τροποποιηθεί η έκφρασή τους 2 ώρες μετά την επίδραση 30λεπτης ακτινοβολίας κινητού τηλεφώνου. Η ανάλυση έγινε με τη βάση δεδομένων Panther.

3.7.3 ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΦΑΝΗΚΕ ΝΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΟΣΟΝ ΑΦΟΡΑ ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥΣ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕ ΚΙΝΗΤΟ ΤΗΛΕΦΩΝΟ

Το γεγονός ότι η σύντομη 30λεπτη ακτινοβόληση προκάλεσε αύξηση στα επίπεδα των δραστικών μορφών οξυγόνου, αλλά και αύξηση των αποπτωτικών ωοθυλακίων οδήγησε σε μία πιο ενδελεχή μελέτη της λίστας των γονιδίων που προέκυψαν από τις γονιδιακές μικροσυστοιχίες για τον εντοπισμό γονιδίων που σχετίζονται με απόκριση στο στρες ή με τον κυτταρικό θάνατο.

Η μελέτη ανέδειξε 15 γονίδια τα οποία σχετίζονται με την απόκριση του κυττάρου σε στρεσογόνα ερεθίσματα. Πιο αναλυτικά, βρέθηκαν 6 γονίδια που ενεργοποιούνται από βλάβη του DNA και 3 που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες (Πίνακας 3.34). Από τα 15 αυτά γονίδια μόνο τα 2 βρέθηκαν να υποεκφράζονται στα ακτινοβολημένα έντομα. Το cryptochrome, το οποίο είναι αρνητικός ρυθμιστής του μεταβολισμού των νουκλεϊκών οξέων και του μονοπατιού για την επιδιόρθωση του DNA, καθώς επίσης και το CG33276 του οποίου η θειοκαρβοξυλιωμένη μορφή λειτουργεί ως επαγωγέας του οξειδωτικού στρες (Πίνακας 3.34). Τέλος, τα επίπεδα έκφρασης της πλειονότητας των συγκεκριμένων γονιδίων βρέθηκε, μέσω της βάσης δεδομένων FlyAtlas (*http://flyatlas.org*), ότι είναι υψηλά στις ωοθήκες συγκριτικά με τα σώματα.

Πίνακας 3.34: Στον Πίνακα παρουσιάζονται τα γονίδια που βρέθηκαν να σχετίζονται με την απόκριση σε στρεσογόνα ερεθίσματα. Οι αναφορές προέκυψαν από τις βάσεις δεδομένων: GO, INTERPRO, Flybase και David Knowledgebase. Επίσης, καταγράφεται η αναλογική αύζηση ή μείωση (fold) της έκφρασης των γονιδίων στα ακτινοβολημένα έντομα, συγκριτικά με τους μάρτυρες, αλλά και τα επίπεδα σημαντικότητας (τιμές p). Τέλος, παρουσιάζεται ο λόγος των επιπέδων mRNA στην ωοθήκη συγκριτικά με το υπόλοιπο σώμα των εντόμων

Όνομα γονιδίου	Επίσημος συμβολισμός γονιδίου	Αναφορές (GO, INTERPRO, Flybase και David Knowledgebase)	Αναλογική άυξηση / μείωση (Fold)	Ρύθμιση μεταγραφής	Επίπεδα σημαντικότητας (p values)	Επίπεδα mRNA
-------------------	-------------------------------------	-------------------------------------------------------------------	----------------------------------------	-----------------------	-----------------------------------------	-----------------

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Glutamate- cysteine ligase modifier subunit	Gclm	Απόκριση σε βλάβη του DNA	1,8	Ť	0,026	0,60
	CG40178	Ομοιόσταση οξειδωτικού δυναμικού	1,78	Ť	0,038	0,60
Ras-related protein interacting with calmodulin	Ric	Απόκριση στο οξειδωτικό στρες	1,74	ţ	0,030	1,40
methuselah- like 4	mthl4	Απόκριση στο στρες	1,57	1	0,015	0,80
timeout	timeout	Σημείο ελέγχου βλαβών του DNA	1,54	1	0,029	2,80
Subdued	CG16718	Ανίχνευση αύξησης θερμοκρασίας που σχετίζεται με πόνο	1,52	↑	0,042	2,10
TNF-receptor- associated factor 6	Traf6	Στρεσοεπαγόμενη ενεργοποίηση καταρράκτη κινασών	1.39	↑	0,015	2,10
Hormone receptor-like in 96	Hr96	Απόκριση στην έλλειψη θρεπτικών συστατικών	1.38	↑	0,013	1,90
Spf45	CG17540	Απόκριση σε βλάβη του DNA	1.35	1	0,018	2,10
	CG6227	DNA επιδιόρθωση	1.35	↑	0,045	2,30
Scamp	Scamp	Απόκριση στο στρες	1.34	1	0,034	1,60
DNApol-iota	DNApol-iota	Απόκριση στο στρες, Σύνδεση σε DNA που έχει υποστεί βλάβη	1.29	Ť	0,006	1,50
	CG5001	Σύνδεση σε ανορθόδοξα αναδιπλωμένες πρωτεΐνες, μοριακή συνοδός	1.27	ţ	0,038	0,30
	CG33276	Θετική ρύθμιση του οξειδωτικού στρες	0.68	Ļ	0,041	1,40
cryptochrome	cry	Αρνητικός ρυθμιστής του μηχανισμού της DNA επιδιόρθωσης	0.67	¥	0,028	0,00

Εκτός των γονιδίων που σχετίζονται με την απόκριση του κυττάρου σε στρεσογόνα ερεθίσματα στη λίστα υπήρχαν και γονίδια που βρέθηκαν να σχετίζονται με τον κυτταρικό θάνατο (Πίνακας 3.35). Συγκεκριμένα, σχετικές αναφορές βρέθηκαν για 10 γονίδια τα οποία

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ήταν όλα υπερεκφρασμένα στα ακτινοβολημένα έντομα. Αναλυτικότερα, 4 από τα 10 σχετίστηκαν με την αυτοφαγία, γεγονός που μπορεί να υποδηλώνει ένα πιθανό μηχανισμό προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, ο οποίος επάγεται ειδικά από τη συγκεκριμένη ακτινοβολία.

Πίνακας 3.35: Στον Πίνακα παρουσιάζονται τα γονίδια που βρέθηκε να σχετίζονται με τον κυτταρικό θάνατο. Οι αναφορές προέκυψαν από τις βάσεις δεδομένων: GO, INTERPRO, Flybase και David Knowledgebase. Επίσης, καταγράφεται η αναλογική αύζηση ή μείωση (fold) της έκφρασης των γονιδίων στα ακτινοβολημένα έντομα, συγκριτικά με τους μάρτυρες, αλλά και τα επίπεδα σημαντικότητας (τιμές p). Τέλος, παρουσιάζεται ο λόγος των επιπέδων mRNA στην ωοθήκη συγκριτικά με το υπόλοιπο σώμα των εντόμων

Όνομα γονιδίου	Σύμβολο γονιδίου	Αναφορές (GO, INTERPRO, Flybase και David Knowledgebase)	Αναλογική αύξηση / μείωση (Fold)	Ρύθμιση μεταγραφής	Επίπεδα σημαντικότητας (p values)	Επίπεδα mRNA
Anon 87Ab	CG12213	Θετική ρύθμιση του μονοπατιού JAK/STAT	1,75	↑	<0,001	1,20
claret	са	Ρύθμιση της αυτοφαγίας	1,64	↑	0,015	1,90
Ecdysone- induced protein 93F	Eip93F	Ενεργοποίηση κασπασών και αυτοφαγικού θανάτου	1,57	Ť	0,015	0,20
TNF- receptor- associated factor 6	Traf6	Κυτταρικός θάνατος, Θετική ρύθμιση αυτοφαγίας	1,39	ţ	0,015	2,10
HTRA2- related serine protease	HtrA2	Ρύθμιση προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου	1,37	Ť	0,046	0,80
bendless	ben	Θετική ρύθμιση του καταρράκτη των JNK κινασών	1,34	↑	0,020	0,50
abstract	abs	Απόπτωση, Κυτταρικός θάνατος	1,32	1	0,031	1,70
draper	drpr	Κυτταρική εκκαθάριση μέσω απόπτωσης	1,31	Ť	0,023	1,50
Mediator complex subunit 24	MED24	Θετική ρύθμιση προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου	1,31	↑	0,033	1,90
Vacuolar protein sorting 4	Vps4	Σύνθεση αυτοφαγοσώματος	1,27	↑	0,012	1,30
	CG5001	Απόπτωση, Κυτταρικός θάνατος	1,27	Ť	0,038	0,30

3.7.4 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΟΣΥΝΘΕΤΙΚΗ, ΜΕΤΑΦΟΡΙΚΗ ΚΑΙ ΕΚΚΡΙΤΙΚΗ ΜΗΧΑΝΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ

Όπως ήδη αναφέρθηκε, οι βιολογικές διεργασίες στις οποίες κατηγοριοποιήθηκαν τα περισσότερα γονίδια ήταν ο καταβολισμός των πρωτεϊνών, η μεταφορά μέσω κυστιδίων, η οργάνωση της μεμβράνης, η ενδοκύτωση και η φαγοκύτωση. Με σκοπό την εύρεση της ακριβής αυτών των γονιδίων στις αντίστοιχες διεργασίες που συμμετέχουν, λειτουργίας χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων KEGG Pathway, στην οποία απεικονίζονται βασικές κυτταρικές λειτουργίες. Ωστόσο, από τα 168 γονίδια μόνο τα 41 γονίδια αναγνωρίστηκαν και αντιστοιχήθηκαν σε συγκεκριμένες κυτταρικές διαδικασίες και σηματοδοτικά μονοπάτια. Οι κατηγορίες με τα περισσότερα γονιδιακά προϊόντα ήταν το μονοπάτι του ενδοσώματος (4) (Εικόνα 3.39Α), η υπερμοριακή δομή του ριβοσώματος (5) (Εικόνα 3.39Β) και η πρωτεόλυση μέσω σήμανσης με ουβικουιτίνη (3) (Εικόνα 3.39Γ). Στην περίπτωση του ενδοσώματος και της οδού ουβικουιτίνης – πρωτεασώματος, όλα τα γονίδια υπερεκφράστηκαν μετά από σύντομη έκθεση στην παλμική ακτινοβολία κινητού τηλεφώνου, ενώ αντίθετα τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες των υπομονάδων του ριβοσώματος υποεκφράστηκαν στα ακτινοβολημένα έντομα. Οι λειτουργίες της πρωτεϊνοσύνθεσης, μεταφοράς πρωτεϊνών και έκκρισης, καθώς και ενδοκύτωσης είναι πολύ σημαντικές κατά την ωογένεση, καθώς διαδραματίζουν πρωτεύοντα ρόλο στην αποθήκευση της λεκίθου στο ωοκύτταρο, κάτι το οποίο θα προκαλέσει μετέπειτα διαταραχή στην εμβρυογένεση. Κατά συνέπεια, φαίνεται η ΗΜΑ να επηρεάζει δυσμενώς την ωογένεση, δημιουργώντας διαταραχή σε κρίσιμες φυσιολογικές κυτταρικές διεργασίες στα κύτταρα των αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων.







Εικόνα 3.39: Α. Μοριακή επανασύσταση του μονοπατιού του ενδοσώματος. Β. Απεικόνιση της μεγάλης και μικρής υπομονάδας του ριβοσώματος. Γ. Ανασυγκρότηση του μονοπατιού της πρωτεόλυσης μέσω της οδού ουβικουιτίνη – πρωτεάσωμα. Οι πρωτεΐνες που απεικονίζονται με κόκκινο αποτελούν προϊόντα γονιδίων που υπερεκφράστηκαν, ενώ αυτές που απεικονίζονται με πορτοκαλί χρώμα αντιστοιχούν σε γονίδια που υποεκφράστηκαν, μετά την επίδραση της ακτινοβολίας. Οι πρωτεΐνες που εμφανίζονται με ανοιχτό πράσινο χρώμα έχει βρεθεί ότι συμμετέχουν στη συγκεκριμένη διαδικασία στη Drosophila melanogaster, ενώ όσες είναι λευκές δεν έχει ταυτοποιηθεί ακόμα ότι συμμετέχουν στο συγκεκριμένο μονοπάτι της D. melanogaster.

3.7.5 ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΟΡΘΟΛΟΓΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΤΗΣ DROSOPHILA MELANOGASTER ΚΑΙ ΤΟΥ HOMO SAPIENS

Μέσω της βάσης δεδομένων Pathfinder pathway βρέθηκε ότι τα γονίδια frizzled και CG16718 σχετίζονται με το Alzheimer, ενώ το γονίδιο Calpain B με τη νόσο του Huntington, δύο πολύ σημαντικές ασθένειες του ανθρώπου. Για το λόγο αυτό, προχωρήσαμε σε περαιτέρω μελέτη των υπό ανάλυση γονιδίων και συγκεκριμένα αναζητήσαμε γονίδια που εμφανίζουν ορθόλογα στο ανθρώπινο γονιδίωμα, με σκοπό τελικά να διερευνήσουμε την πιθανή επίδραση της ακτινοβολίας κινητού τηλεφώνου στην παθοφυσιολογία του ανθρώπινου οργανισμού. Μεταξύ των 168 γονιδίων που βρέθηκε να έχει αλλάξει η έκφρασή τους, 124 διαθέτουν ορθόλογα γονίδια και από αυτά τα 113 υπερεκφράστηκαν ενώ τα 11 υποεκφράστηκαν, 2 ώρες μετά την έκθεση στο κινητό τηλέφωνο. Τα γονίδια αυτά σχετίστηκαν μέσω της βάσης δεδομένων Ingenuity με διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια από τα οποία τα στατιστικά σημαντικά απεικονίζονται στην Εικόνα 3.40.



Εικόνα 3.40: Απεικόνιση των στατιστικά σημαντικών μονοπατιών – διεργασιών, στα οποία εμπλέκονται τα ορθόλογα των γονιδίων στην έκφραση των οποίων επέδρασε η ακτινοβολία του κινητού τηλεφώνου. Τα επίπεδα σημαντικότητας προκύπτουν από το λόγο (Ratio) του αριθμού των γονιδίων που έχουν προκύψει πειραματικά προς το σύνολο των γονιδίων που συμμετέχουν στο κάθε μονοπάτι – διεργασία.

Συγκεκριμένα, βρέθηκαν μονοπάτια που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, όπως της p38 (Εικόνα 3.41Α) και της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης (Εικόνα 3.41Β), αλλά και σημαντικές βιολογικές διαδικασίες, όπως η πρωτεόλυση μέσω σήμανσης με ουβικουιτίνη, η ρύθμιση της μετάφρασης μέσω του EIF2 (Eukaryotic Initiaton Factor 2), η μεταφορά ασβεστίου κ.λπ.



Εικόνα 3.41: Εικόνες από τη βάση δεδομένων Ingenuity. Α. Ανασύσταση του σηματοδοτικού μονοπατιού της p38. B. Η διαδικασία βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης. Οι πρωτεΐνες που απεικονίζονται έγχρωμα κωδικοποιούνται από ορθόλογα γονίδια, των οποίων την έκφρασή φάνηκε να διαφοροποιεί η ακτινοβολία του κινητού τηλεφώνου.

Τέλος, τα γονίδια αυτά, σχετιζόμενα με άλλα γονίδια από τη Διεθνή βιβλιογραφία, δημιούργησαν 8 στατιστικά σημαντικά δίκτυα, τα οποία αφορούσαν κρίσιμες κυτταρικές διεργασίες, όπως ο κυτταρικός κύκλος (Εικόνα 3.42A), ο κυτταρικός θάνατος και η επιβίωση (Εικόνα 3.42B), η DNA επιδιόρθωση (Εικόνα 3.42Γ), και, τέλος, η εμβρυϊκή ανάπτυξη (Εικόνα 3.42Δ).



Εικόνα 3.42: Δίκτυα συσχετίσεων τα οποία δημιουργούνται από τις αλληλεπιδράσεις των προϊόντων που κωδικοποιούν τα αντίστοιχα γονίδια και που ρυθμίζουν σημαντικές βιολογικές διεργασίες όπως, (A) ο κυτταρικός κύκλος, (B). ο θάνατος και η επιβίωση του κυττάρου, η (Γ)

επιδιόρθωση του DNA και (Δ) η εμβρυϊκή ανάπτυζη. Το πράσινο χρώμα αντιστοιχεί σε υποεκφρασμένα γονίδια, το κόκκινο σε υπερεκφρασμένα, ενώ με λευκό απεικονίζονται γονίδια στα οποία δεν έχει τροποποιηθεί η έκφρασή τους.

3.7.6 ΕΠΑΛΗΘΕΥΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΩΝ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ qPCR

Με σκοπό την επιβεβαίωση των γονιδίων που προέκυψαν από την ανάλυση των μικροσυστοιχιών επιλέχθηκαν 9 γονίδια με βάση τη λειτουργία τους αλλά και με απώτερο στόχο να καλύπτουν μία ποικιλία βιολογικών διεργασιών. Πιο συγκεκριμένα, σε qPCR ανάλυση υποβλήθηκαν τα γονίδια UpSET και Luna, τα οποία διαδραματίζουν ρόλο στη διαδικασία της ωογένεσης, τα γονίδια Eip93F, Claret και Anon87A που σχετίζονται με τον κυτταρικό θάνατο, τα γονίδια RIC και CG40178 τα οποία σχετίζονται με το στρες, το γονίδιο Drosomycin (Drs) που κωδικοποιεί πεπτίδιο της φυσικής ανοσίας και τέλος το Tsp42Ei το οποίο αποτελεί απαραίτητο συστατικό της κυτταρικής μεμβράνης. Όλα τα γονίδια εκτός των Drs και Tsp42Ei, υπερεκφράστηκαν 2 ώρες μετά την έκθεση των θηλυκών εντόμων στην παλμική ακτινοβολία του κινητού τηλεφώνου. Ως γονίδιο αναφοράς επιλέχθηκε η ακτίνη (Actin5C) (**Εικόνα 3.43**).

Η διαφοροποίηση της έκφρασης που ανιχνεύθηκε μέσω των μικροσυστοιχιών επιβεβαιώθηκε για όλα τα υποψήφια γονίδια. Όσα γονίδια στα ακτινοβολημένα έντομα βρέθηκαν υπερεκφρασμένα, έδωσαν το ίδιο πρότυπο και στην qPCR ανάλυση (Εικόνα 3.43). Στην περίπτωση της *Drosomycin* η qPCR έδειξε πολύ μεγαλύτερη διαφορά στα επίπεδα του mRNA των ακτινοβολημένων εντόμων, σε σχέση με τη διαφορά που είχε εντοπιστεί με τις μικροσυστοιχίες, ενώ η *Tsp42Ei* παρουσίασε το ίδιο πρότυπο με αυτές (Εικόνα 3.43 και 3.44).



Εικόνα 3.43: Χαρακτηριστικές καμπύλες qPCR των επιλεγμένων γονιδίων.



Εικόνα 3.44: Στο γράφημα παρουσιάζεται η αναλογική αύζηση ή μείωση των επιπέδων mRNA των ακτινοβολημένων δειγμάτων, συγκριτικά με τους μάρτυρες. Ο λόγος υπολογίστηκε με βάση την ημι-ποσοτική μέθοδο υπολογισμού των ΔCt.

3.8 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΣΤΗ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΕΝΤΟΜΟΥ DROSOPHILA MELANOGASTER

Με σκοπό τη μελέτη της ακτινοβολίας στο προσδόκιμο ζωής των θηλυκών και αρσενικών εντόμων, σχεδιάστηκαν πειράματα που αφορούσαν στη βιωσιμότητα των εντόμων μετά από έκθεση στην ακτινοβολία. Χρησιμοποιήθηκαν 3 διαφορετικά στελέχη: το στέλεχος φυσικού τύπου, το μεταλλαγμένο στέλεχος *Dm*p53^{-/-}, από το οποίο απουσιάζει ο μεταγραφικός παράγοντας p53 και τέλος το διαγονιδιακό στέλεχος Actin5C-GAL4/UAS-Catalase που υπερεκφράζει το αντιοξειδωτικό ένζυμο καταλάση σε όλους τους σωματικούς ιστούς του εντόμου.

Η στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω σύγκρισης των καμπυλών επιβίωσης με τη μέθοδο Kaplan-Meier και τη δοκιμασία Log-Rank.

3.8.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΒΑΣΗΣ ΑΣΥΡΜΑΤΟΥ ΤΗΛΕΦΩΝΟΥ ΣΤΟ ΠΡΟΣΔΟΚΙΜΟ ΖΩΗΣ

Για τα συγκεκριμένα πειράματα, έγινε συλλογή περισσοτέρων από 100 νεοεκδυθέντων εντόμων (2 – 4 ώρες μετά την έκδυση), για κάθε συνθήκη, τα οποία καλλιεργήθηκαν σε κλιβάνους καλλιέργειας σταθερών συνθηκών. Με τη βάση ασύρματου τηλεφώνου ακτινοβολήθηκαν και τα τρία στελέχη που αναφέρθηκαν στην Ενότητα 3.8. Τα πρωτόκολλα

ακτινοβόλησης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν δύο, με σκοπό τη διερεύνηση πιθανής διαφορετικής επίδρασης μεταξύ διακοπτόμενης και συνεχούς ακτινοβόλησης. Συγκεκριμένα, τα έντομα ακτινοβολήθηκαν συνεχόμενα 24 ώρες το 24ωρο για όλη τη διάρκεια ζωής των εντόμων και διακοπτόμενα για 1 ώρα κάθε 1 ώρα για όλο το 24ωρο και καθόλη τη διάρκεια της ζωής τους.

3.8.1.1 Επίδραση στο προσδόκιμο ζωής φυσικού τύπου εντόμων μετά από συνεχή και διακοπτόμενη ακτινοβόληση βάσης ασύρματου τηλεφώνου

Συνεχής έκθεση σε παλμική ακτινοβολία βάσης ασύρματου τηλεφώνου προκάλεσε μείωση του προσδόκιμου ζωής στα αρσενικά και θηλυκά έντομα. Επεξεργασία των καμπυλών επιβίωσης αποκάλυψε ότι η μείωση της βιωσιμότητας που παρατηρήθηκε στα ακτινοβολημένα έντομα ήταν στατιστικά σημαντική (Εικόνα 3.45Α). Συγκεκριμένα, το 50% των ακτινοβολημένων είχαν πεθάνει μέχρι τις 39 ημέρες, ενώ των μαρτύρων μέχρι τις 50. Στατιστικά σημαντική μείωση της βιωσιμότητας παρατηρήθηκε και στα θηλυκά έντομα (Εικόνα 3.45B). Το 50% των ακτινοβολημένων θηλυκών είχε πεθάνει μέχρι τις 47 ημέρες, συγκριτικά με τους μάρτυρες όπου το 50% είχε πεθάνει μέχρι τις 54 ημέρες.



Εικόνα 3.45: Καμπύλες βιωσιμότητας (Α) αρσενικών και (Β) θηλυκών φυσικού τύπου (wt) εντόμων, στις οποίες φαίνεται η μείωση που προκλήθηκε στο προσδόκιμο ζωής των ακτινοβολημένων ατόμων, συγκριτικά με τους μάρτυρες, μετά από συνεχή έκθεση σε βάση ασύρματου τηλεφώνου DECT. **p<0,01.

Διακοπτόμενη ακτινοβόληση προκάλεσε, επίσης, μείωση του προσδόκιμου ζωής στα αρσενικά και θηλυκά έντομα. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι η μείωση στη βιωσιμότητα των ακτινοβολημένων εντόμων ήταν στατιστικά σημαντική και στα αρσενικά, αλλά και στα θηλυκά, έντομα. Το 50% των αρσενικών ακτινοβολημένων εντόμων είχαν πεθάνει μέχρι τις 35 ημέρες ενώ το 50% των μαρτύρων μέχρι τις 50 (Εικόνα 3.46Α). Αντίστοιχα, στα θηλυκά έντομα, το 50% των νεκρών ακτινοβολημένων εντόμων καταμετρήθηκε μέχρι την 43^η ημέρα και των μαρτύρων μέχρι την 54^η (Εικόνα 3.46B).



Εικόνα 3.46: Καμπύλες βιωσιμότητας (A) αρσενικών και (B) θηλυκών φυσικού τύπου (wt) εντόμων, στις οποίες φαίνεται η μείωση που προκλήθηκε στο προσδόκιμο ζωής των ακτινοβολημένων ατόμων, συγκριτικά με τους μάρτυρες, μετά από διακοπτόμενη έκθεση σε βάση ασύρματου τηλεφώνου DECT. **p<0,01.

3.8.1.2 Επίδραση στο προσδόκιμο ζωής Dmp53^{-/-} εντόμων μετά από συνεχή και διακοπτόμενη ακτινοβόληση βάσης ασύρματου τηλεφώνου

Συνεχής έκθεση σε παλμική ακτινοβολία βάσης ασύρματου τηλεφώνου οδήγησε σε αύξηση της βιωσιμότητας στα αρσενικά και θηλυκά έντομα. Στατιστική επεξεργασία της καμπύλης επιβίωσης των ακτινοβολημένων Dmp53^{-/-} αρσενικών εντόμων με την αντίστοιχη των εντόμων «εικονικής ακτινοβόλησης» – μάρτυρες έδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση της διάρκειας ζωής στα ακτινοβολημένα έντομα (**Εικόνα 3.47A**). Συγκεκριμένα, το 50% των ακτινοβολημένων εντόμων είχαν πεθάνει μέχρι τις 23 ημέρες ενώ των μαρτύρων μέχρι τις 18. Καλύτερη καμπύλη βιωσιμότητας παρατηρήθηκε και στα θηλυκά έντομα, ωστόσο η διαφορά μεταξύ ακτινοβολημένων και μαρτύρων δεν ήταν στατιστικά σημαντική (**Εικόνα 3.47B**). Το 50% των ακτινοβολημένων θηλυκών εντόμων είχε πεθάνει μέχρι τις 20 ημέρες.



Εικόνα 3.47: Καμπύλες βιωσιμότητας Dmp53^{-/-} στελέχους. (Α) Στα αρσενικά είναι εμφανής η αύζηση στο προσδόκιμο ζωής των ακτινοβολημένων εντόμων μετά από συνεχή έκθεση σε βάση ασύρματου τηλεφώνου DECT. (Β) Στα θηλυκά φαίνεται η καλύτερη βιωσιμότητα που παρουσιάζουν τα ακτινοβολημένα έντομα έναντι των μαρτύρων. **p<0,01.

Διακοπτόμενη ακτινοβόληση προκάλεσε, επίσης, αύξηση του προσδόκιμου ζωής στα αρσενικά *Dm*p53^{-/-} έντομα και μάλιστα η αύξηση αυτή ήταν στατιστικά σημαντική. Το 50% των αρσενικών ακτινοβολημένων εντόμων είχαν πεθάνει μέχρι τις 29 ημέρες, ενώ το 50% των μαρτύρων μέχρι τις 18 (**Εικόνα 3.48A**). Αντίστοιχα, τα θηλυκά ακτινοβολημένα έντομα παρουσίασαν καλύτερη επιβίωση, χωρίς όμως στατιστική διαφορά από τα «εικονικής ακτινοβόλησης» άτομα. Το 50% των νεκρών ακτινοβολημένων εντόμων καταμετρήθηκε μέχρι την 29^η ημέρα και των μαρτύρων μέχρι την 27^η (**Εικόνα 3.48B**).



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Εικόνα 3.48: Καμπύλες βιωσιμότητας Dmp53^{-/-} στελέχους. (Α) Στα αρσενικά είναι εμφανής η αύζηση στο προσδόκιμο ζωής των ακτινοβολημένων εντόμων μετά από διακοπτόμενη έκθεση σε βάση ασύρματου τηλεφώνου DECT. (Β) Στα θηλυκά φαίνεται ότι η ακτινοβολία δεν είχε κάποια ιδιαίτερη επίπτωση στην επιβίωση των μεταλλαγμένων εντόμων. **p<0,01.

3.8.1.3 Επίδραση στο προσδόκιμο ζωής του διαγονιδιακού στελέχους που υπερεκφράζει το ένζυμο καταλάση

Συνεχής έκθεση σε παλμική ακτινοβολία βάσης ασύρματου τηλεφώνου δε διαφοροποίησε σημαντικά τη βιωσιμότητα των αρσενικών διαγονιδιακών εντόμων που εκτέθηκαν στην ακτινοβολία, συγκριτικά με τα έντομα που παρέμειναν προστατευμένα από αυτήν, καθ' όλη τη διάρκεια ζωής τους (Εικόνα 3.49Α). Από την Εικόνα 3.48Α φαίνεται ότι στην αρχή της ζωής των εντόμων τα ακτινοβολημένα έντομα κατέγραψαν περισσότερους θανάτους, ωστόσο η διαφορά με τους μάρτυρες δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Το 50% των ακτινοβολημένων εντόμων είχαν πεθάνει μέχρι τις 26 ημέρες, ενώ των μαρτύρων μέχρι τις 30. Στα θηλυκά έντομα, η συνεχής έκθεση σε παλμική ακτινοβολία βάσης ασύρματου τηλεφώνου προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση της βιωσιμότητάς τους (Εικόνα 3.49B). Συγκεκριμένα, το 50% των ακτινοβολημένων θηλυκών εντόμων είχε πεθάνει μέχρι τις 50 ημέρες, συγκριτικά με τους μάρτυρες όπου το 50% είχε πεθάνει μέχρι τις 58 ημέρες.



Εικόνα 3.49: Καμπύλες βιωσιμότητας. Στα αρσενικά Actin5C-GAL4/UAS-Catalase διαγονιδιακά έντομα, τα οποία υπερεκφράζουν το ένζυμο καταλάση, σε όλους τους σωματικούς ιστούς, δεν υπήρξε διαφοροποίηση στη βιωσιμότητα μετά από συνεχή έκθεση στην ακτινοβολία DECT (A). Στα θηλυκά διαγονιδιακά έντομα φαίνεται ότι η ακτινοβολία μείωσε στατιστικά σημαντικά την επιβίωση τους (B). **p<0,01.

3.8.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΑΣΥΡΜΑΤΟΥ ΔΙΚΤΥΟΥ ΣΤΟ ΠΡΟΣΔΟΚΙΜΟ ΖΩΗΣ

Για τα συγκεκριμένα πειράματα, έγινε συλλογή περισσοτέρων από 100 νεοεκδυθέντων εντόμων (2 – 4 ώρες μετά την έκδυση), για κάθε συνθήκη, τα οποία καλλιεργήθηκαν σε 2 είδη τροφής όπως αναφέρθηκαν στην Ενότητα 3.8. Με το ασύρματο δίκτυο Wi-Fi ακτινοβολήθηκαν τα φυσικού τύπου στελέχη, και το πρωτόκολλο ακτινοβόλησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν διακοπτόμενης έκθεσης, καθώς φάνηκε ότι η διακοπτόμενη έκθεση προκάλεσε μεγαλύτερη μείωση της βιωσιμότητας στα αρσενικά και θηλυκά φυσικού τύπου έντομα. Το πρωτόκολλο περιελάμβανε έκθεση των εντόμων στην παλμική ακτινοβολία για μισή ώρα, κάθε 30 λεπτά, για όλο το 24ωρο και καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους. Στο σημείο αυτό, θα πρέπει να αναφερθεί ότι στο ασύρματο δίκτυο είχε τοποθετηθεί ένας ενισχυτής και η μέση έντασή του είχε αυξηθεί

Όσον αφορά στην πλήρη θερμιδικά τροφή, διακοπτόμενη έκθεση σε παλμική ακτινοβολία ασύρματου δικτύου προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση του προσδόκιμου ζωής στα αρσενικά και θηλυκά έντομα (Εικόνα 3.50A και B). Αναλυτικότερα, το 50% των ακτινοβολημένων αρσενικών εντόμων είχαν πεθάνει μέχρι τις 39 ημέρες και των θηλυκών μέχρι τις 42, έναντι των μαρτύρων όπου το 50% των αρσενικών εντόμων είχαν πεθάνει μέχρι τις 50 ημέρες και των θηλυκών μέχρι τις 54 ημέρες, αντίστοιχα.

Αντίθετα, στην τροφή όπου αφαιρέθηκε η ντομάτα και το άνθος ορύζης, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της βιωσιμότητας στα αρσενικά ακτινοβολημένα έντομα έναντι των μη ακτινοβολημένων (Εικόνα 3.50Γ). Συγκεκριμένα, η μέση επιβίωση των ακτινοβολημένων αρσενικών εντόμων ήταν 18 ημέρες, ενώ των μαρτύρων 19 και η μέγιστη επιβίωση ήταν 38 και 42 ημέρες, αντίστοιχα. Στα θηλυκά έντομα, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της επιβίωσης των ακτινοβολημένων και μη εντόμων (Εικόνα 3.50Δ). Ο μισός πληθυσμός των ακτινοβολημένων θηλυκών είχε πεθάνει μέχρι τις 26 ημέρες, ενώ των μαρτύρων μέχρι τις 27 ημέρες. Κατά συνέπεια, φάνηκε ότι η ακτινοβολία στην περίπτωση της καλλιέργειας σε τροφή, όπου είχαν αφαιρεθεί όλα τα αντιοξειδωτικά συστατικά οδήγησε σε καλύτερη βιωσιμότητα.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί στο σημείο αυτό, ότι η συγκεκριμένη τροφή μείωσε κατά πολύ τη βιωσιμότητα των μαρτύρων, συγκριτικά με την πλήρη θερμιδικά τροφή, ανεξαρτήτως επίδρασης ακτινοβολίας. Στα αρσενικά έντομα που καλλιεργήθηκαν στην πλήρη θερμιδικά τροφή, το 50% είχε πεθάνει μέχρι τις 50 ημέρες, ενώ στη χαμηλότερη θερμιδικά τροφή το ποσοστό αυτό καταμετρήθηκε μέχρι τις 19 ημέρες. Παρομοίως, στα θηλυκά έντομα «εικονικής ακτινοβόλησης» οι αντίστοιχες ημέρες ήταν 54 και 27. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η ύπαρξη του ήπιου και ενδεχομένως ελεγχόμενου οξειδωτικού στρες, που εμφανίζεται στα ακτινοβολημένα έντομα λειτουργεί ευεργετικά σε ένα περιβάλλον που προκαλεί περαιτέρω αύξηση του οξειδωτικού φορτίου.



Εικόνα 3.50: Καμπύλες βιωσιμότητας. Α. Διακοπτόμενη έκθεση σε παλμική ακτινοβολία ασύρματου δικτύου προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση στα αρσενικά έντομα που καλλιεργήθηκαν στην τροφή που περιείχε όλα τα υλικά. Β. Στατιστικά σημαντική μείωση του προσδόκιμου ζωής παρατηρήθηκε στα θηλυκά ακτινοβολημένα έντομα φυσικού τύπου που καλλιεργήθηκαν σε πλήρη θερμιδικά τροφή. Γ. Η τροφή που δεν περιείχε ντομάτα και άνθος ορύζης, σε συνδυασμό με την ακτινοβολία οδήγησε σε καλύτερη βιωσιμότητα των ακτινοβολημένων εντόμων, συγκριτικά με τους μάρτυρες, που ανανπτύχθηκαν στη

συγκεκριμένη τροφή. **Δ.** Τα θηλυκά έντομα φυσικού τύπου (wt) που καλλιεργήθηκαν σε χαμηλότερης θερμιδικής αζίας τροφή δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά όταν εκτέθηκαν στο ασύρματο δίκτυο, σε σχέση με τα έντομα που παρέμειναν προστατευμένα από την ακτινοβολία. ******p<0,01.

3.9 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΛΛΟΙΩΣΕΩΝ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΩΝ ΩΟΘΥΛΑΚΙΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ

Έχοντας ανιχνεύσει αλλαγές στο οξειδωτικό και αποπτωτικό δυναμικό, καθώς και τροποποίηση της γονιδιακής έκφρασης του ωοθηκικού ιστού, μελετήθηκε περαιτέρω η επίδραση της μη ιονίζουσας, παλμικής ακτινοβολίας στη διαδικασία της ωογένεσης, μέσω παρατήρησης της λεπτής δομής των ωοθυλακίων με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (TEM).

Για τα πειράματα αυτά, έγινε συλλογή νεοεκδυθέντων θηλυκών εντόμων (2 – 4 ώρες από τη στιγμή της έκδυσης), τα οποία ακτινοβολήθηκαν για 5 ημέρες συνεχόμενα (120 ώρες) με βάση ασύρματου τηλεφώνου. Συνολικά απομονώθηκαν, εγκλείστηκαν σε εποξεικές ρητίνες και ελήφθησαν λεπτές τομές από 6 ωοθήκες ανά συνθήκη (μάρτυρες και ακτινοβολημένα έντομα).

Αθροιστικά, έγινε παρατήρηση 30 ωοθυλακίων σταδίου 13 – 14 από τις ωοθήκες των μαρτύρων και 30 από τα ακτινοβολημένα δείγματα. Παρατηρήθηκαν αλλοιώσεις στη δομή του ωοκυττάρου και συγκεκριμένα κάποιες ευμεγέθεις δομές που μοιάζουν με κυστίδια κάτω από τη βιτελλινική μεμβράνη (Εικόνα 3.51Α-Δ). Καταμέτρηση των αλλοιωμένων ωοθυλακίων έδειξε ότι στους μάρτυρες ο αριθμός τους ήταν 15 στα 30, ενώ στα ακτινοβολημένα έντομα τα ωοθυλάκια που έφεραν τις συγκεκριμένες αλλοιώσεις ήταν 27 στα 30.

Σημαντικό αποτελεί το γεγονός ότι κενά κυστίδια παρατηρήθηκαν και σε προχοριογεννετικά στάδια και μάλιστα στο στάδιο 8, όπου ξεκινά η βιτελλογένεση (Εικόνα 3.52A και Β). Ωστόσο, η μεγάλη συσσώρευση των αλλοιώσεων που ομοιάζουν μορφολογικά με κυστίδια εντοπίστηκε, κυρίως, σε αναπτυξιακά στάδια μεγαλύτερα του 12. Οι παρατηρηθείσες αλλοιώσεις ήταν τόσο ευμεγέθεις, που διακρίνονταν και στο οπτικό μικροσκόπιο (Εικόνα 3.53Α-Δ).



Εικόνα 3.51: Χαρακτηριστικές ηλεκτρονιοφωτογραφίες από τομές ωοθυλακίων Α-Β. που απομονώθηκαν από. έντομα – μάρτυρες (Α και Β) και ακτινοβολημένα έντομα (Γ και Δ). Στην κάτω σειρά φωτογραφιών (Γ και Δ) φαίνονται ευκρινώς οι αλλοιώσεις κάτω από τη βιτελλινική μεμβράνη (βέλη). Οι λεπτές τομές ΤΕΜ παρατηρήθηκαν μετά από χρώση με οξεικό ουρανύλιο και κιτρικό μόλυβδο. Ράβδοι μεγέθυνσης = 100 μm (ΩK = ωοκύτταρο και ΘK = θυλακοκύτταρα).



Εικόνα 3.52: Χαρακτηριστικές ηλεκτρονιοφωτογραφίες από λεπτές τομές ωοθυλακίων, προχοριογεννετικών σταδίων, που απομονώθηκαν από (A) έντομο – μάρτυρα (στάδιο 9) και (B) ακτινοβολημένο έντομο (στάδιο 9). Και στις δύο φωτογραφίες, διακρίνονται τα
βιτελλινικά σωμάτια, με εμφανή όμως κάποια κυστιδιακή αλλοίωση στο ακτινοβολημένο ωοθυλάκιο (σύγκρινε ορθογώνια). Η παρατήρηση των λεπτών τομών έγινε μετά από χρώση με οξεικό ουρανύλιο και κιτρικό μόλυβδο. Ράβδοι μεγέθυνσης = 80 μm (ΩK = ωοκύτταρο και ΘK = θυλακοκύτταρο).



Εικόνα 3.53: Φωτογραφίες οπτικού μικροσκοπίου ημι-λεπτών τομών μετά από χρώση με μπλε της τολουϊδίνης. Στις εικόνες Α και Β απεικονίζονται τομές από μάρτυρες, ενώ οι εικόνες Γ και Δ. αντιστοιχούν σε ωοθυλάκια που απομονώθηκαν από ακτινοβολημένα θηλυκά έντομα. Τα βέλη δείχνουν τα χαρακτηριστικά κυστίδια περιφερειακά μεταξύ ωοκυτάρου και βιτελλινικής ,μεμβράνης. Ράβδοι μεγέθυνσης = 1 μm.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στη συγκεκριμένη Διδακτορική Διατριβή, προκειμένου να μελετηθεί η *in vivo* επίδραση της μη ιονίζουσας ακτινοβολίας στους έμβιους οργανισμούς, χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο βιολογικό σύστημα το Δίπτερο έντομο Drosophila melanogaster. Ως πηγές ακτινοβόλησης επιλέχθηκαν πηγές καθημερινής χρήσης συγκριτικά με γεννήτρια ραδιοσυχνοτήτων. Το οξειδωτικό στρες μελετήθηκε σε σωματικούς, αλλά και γαμετικούς ιστούς, σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια κατά την ωογένεση και σε συνάρτηση με την *in vivo* γήρανση. Υπήρξε προσπάθεια συσχέτισης του οξειδοαναγωγικού φορτίου με τη βιωσιμότητα των εντόμων. Παράλληλα, εξετάσθηκε η επίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στο αποπτωτικό δυναμικό κατά την ωογένεση και, τελικά, ελέγχθηκε πιθανή διαφοροποίηση στο πρότυπο γονιδιακής έκφρασης κατά τη συγκεκριμένη διαδικασία.

4.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΟΞΥΓΟΝΟΥ (ROS)

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), όπως η ρίζα υδροξυλίου (O2'), αποτελούν φυσικά παρα-προϊόντα του μεταβολισμού των αερόβιων οργανισμών και παράγονται κυρίως κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση (Squier, 2001). In vitro πειράματα έχουν δείξει ότι ποσοστό περίπου 1-3% του οξυγόνου που χρησιμοποιείται από τα μιτοχόνδρια μετατρέπεται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) (Sastre et al., 2000). Ωστόσο, ROS δημιουργούνται και μετά από επίδραση εξωγενών παραγόντων, όπως η υψηλή θερμοκρασία, η υπεριώδης ακτινοβολία (UV) η ιονίζουσα ακτινοβολία, το κάπνισμα, διάφορα φάρμακα κ.λπ. (Kikusato et al., 2015; Kim and Johnson, 2014; Azzam et al., 2012; Kim et al., 2014). Τα τελευταία χρόνια έχει ενοχοποιηθεί και η μη ιονίζουσα ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία (ΗΜΑ) για την αύξηση των δραστικών μορφών οξυγόνου και πολλές μελέτες διεθνώς έχουν εστιάσει σε αυτό, καθώς και στη διαταραχή του οξειδοαναγωγικού δυναμικού των κυττάρων μετά από επίδραση της συγκεκριμένης ακτινοβολίας. Ωστόσο, στην πλειονότητα των ερευνών έχουν χρησιμοποιηθεί γεννήτριες ραδιοσυχνοτήτων για την ακτινοβόληση του βιολογικού δείγματος / υλικού που απλώς προσομοιάζουν την ακτινοβολία που εκπέμπεται από τις συσκευές ασύρματης τεχνολογίας, καθημερινής χρήσης, ενώ ταυτόχρονα έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα πρωτόκολλα ακτινοβόλησης με διαφορετικές συχνότητες, εντάσεις και διαμορφώσεις, και ίσως για αυτό ποικίλες έρευνες δίνουν διαφορετικά αποτελέσματα. Κατά συνέπεια, στην παρούσα Διατριβή, γρησιμοποιήθηκαν πρωτίστως συσκευές καθημερινής γρήσης (ασύρματο δίκτυο, κινητό και ασύρματο τηλέφωνο), αλλά και γεννήτρια ραδιοσυχνοτήτων, και μετρήθηκαν τα επίπεδα των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) στους σωματικούς ιστούς αρσενικών και θηλυκών εντόμων αλλά και στον ωοθηκικό ιστό, με σκοπό τη μελέτη των πιθανών επιπτώσεων στο Δίπτερο έντομο Drosophila melanogaster όσον αφορά στο οξειδωτικό δυναμικό μετά από έκθεση σε ΗΜΑ (της περιοχής συχνοτήτων ραδιοκυμάτων και μικροκυμάτων).

4.1.1 ΧΡΟΝΟ- ΚΑΙ ΦΥΛΟ-ΕΙΔΙΚΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΑΛΜΙΚΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΒΑΣΗΣ ΑΣΥΡΜΑΤΟΥ ΤΗΛΕΦΩΝΟΥ DECT ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ROS ΤΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΝΕΑΡΩΝ ΑΡΣΕΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΘΗΛΥΚΩΝ ΦΥΣΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ΕΝΤΟΜΩΝ

Μετά από συνεχή, in vivo ακτινοβόληση ενήλικων αρσενικών και θηλυκών φυσικού τύπου εντόμων με παλμική ακτινοβολία, χαμηλής ενέργειας, εκπεμπόμενη από βάση ασύρματου τηλεφώνου DECT, διάρκειας μισής και μίας ώρας, δεν παρατηρήθηκε αύξηση στα επίπεδα των ROS. Αντίθετα, τόσο στα αρσενικά όσο και στα θηλυκά έντομα παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση μετά από διαστήματα συνεχούς ακτινοβόλησης, μεγαλύτερα των 6 ωρών. Σημαντικό ήταν το γεγονός ότι στα αρσενικά έντομα διαστήματα έκθεσης μεγαλύτερα των 6 ωρών δεν προκάλεσαν περαιτέρω αύξηση στα επίπεδα των ROS, τα οποία φάνηκε να σταθεροποιούνται. Αντίθετα, στα θηλυκά έντομα τα επίπεδα φάνηκε να αυξάνονται προϊόντος του αυξανόμενου χρόνου ακτινοβόλησης. Ωστόσο, στατιστική επεξεργασία μεταξύ 24, 96 και 120 ωρών δεν έδειξε ότι υπήρξε στατιστική διαφορά ανάμεσα στα συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. Κατά συνέπεια και στα δύο φύλα παρουσιάστηκε κορεσμός στην αύξηση των ROS. Αντίστοιγα αποτελέσματα καταγράφηκαν στην έρευνα των Lu et al. (2012), όπου έκθεση σε ηλεκτρομαγνητικό πεδίο συγνότητας 900 MHz προκάλεσε αύξηση στα ενδογενή επίπεδα των ROS σε μονοπύρηνα περιφερικού αίματος, τα οποία εκτέθηκαν για 1, 2, 4, 6 και 8 ώρες στη συγκεκριμένη ακτινοβολία. Οι τιμές των δραστικών μορφών οξυγόνου αυξάνονταν παράλληλα με την αύξηση των ωρών ακτινοβόλησης μέχρι τις 6 ώρες. Ωστόσο, μετά από 8 ώρες ακτινοβόλησης η αύξηση ήταν μικρότερη όχι μόνο από την αντίστοιχη που επέφεραν οι 6 ώρες, αλλά και από αυτή των 2 ωρών. Το φαινόμενο αυτό πιθανά οφείλεται στην ενεργοποίηση αντιοξειδωτικών μηχανισμών, τους οποίους διαθέτουν τα κύτταρα, για την αντιμετώπιση της αύξησης των ROS, η οποία μπορεί να καταστεί επιβλαβής για την ομοιόστασή τους.

Τα αποτελέσματα των σωματικών ιστών έδειξαν ότι η αύξηση των ROS στα θηλυκά έντομα ήταν μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των αρσενικών, αποκαλύπτοντας μία φυλο-ειδική, πλειοτροπική απάντηση στην ακτινοβολία. Το γεγονός αυτό πιθανά οφείλεται στις αυξημένες μεταβολικές και ενεργειακές ανάγκες των θηλυκών εντόμων, λόγω της διαδικασίας της ωογένεσης, η οποία αποτελεί μία συνεχή και δυναμική διαδικασία με στόχο την αδιάκοπη παραγωγή καινούριων αυγών προς γονιμοποίηση. Μελέτες έχουν δείξει ότι η αναπαραγωγή καθώς και η συμβίωση με τα αρσενικά έντομα, μπορούν να προκαλέσουν μείωση στη βιωσιμότητα και στην αντοχή των θηλυκών εντόμων στο οξειδωτικό στρες (*Partridge et al., 1987; Salmon et al., 2001*). Η μειωμένη αντοχή στο οξειδωτικό στρες, λόγω των δύο συγκεκριμένων παραγόντων, σε συνδυασμό με τα υψηλότερα επίπεδα ROS, που ούτως ή άλλως διαθέτουν τα θηλυκά έντομα, πιθανά να είναι οι λόγοι που οδήγησαν και στη μεγαλύτερη αύξηση αυτών μετά την επίδραση της ακτινοβολίας.

4.1.2 ΙΣΤΟ-ΕΙΔΙΚΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΑΛΜΙΚΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ROS ΤΩΝ ΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΙΣΤΩΝ ΝΕΑΡΩΝ ΑΡΣΕΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΘΗΛΥΚΩΝ ΦΥΣΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ΕΝΤΟΜΩΝ

Η πιθανή διαφορική επίδραση συναρτήσει του ιστού αποτέλεσε επίσης κομμάτι έρευνας της συγκεκριμένης Διατριβής, και για το λόγο αυτό εξετάσθηκαν ξεχωριστά τα κεφάλια, τα οποία αποτελούνται κυρίως από νευρικό ιστό, μυς και εξωσκελετό, και ξεγωριστά τα σώματα που αποτελούνται επίσης από μυς, γαστρεντερικό ιστό, εξωσκελετό και αιμολέμφο. Ακτινοβόληση με βάση ασύρματου τηλεφώνου για 96 ώρες συνεγόμενα οδήγησε σε στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη αύξηση των ROS στα κεφάλια των αρσενικών, αλλά και των θηλυκών εντόμων σε σχέση με τα σώματα. Το γεγονός αυτό δείχνει μία ιστο-ειδική ευαισθησία στα κεφάλια απέναντι στο στρεσογόνο παράγοντα της ακτινοβολίας, έναντι των υπόλοιπων σωματικών ιστών των εντόμων. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα ενισχύονται και από άλλες μελέτες που έχουν δείξει ότι στη D. melanogaster η ενεργότητα του 26S πρωτεασώματος είναι μικρότερη στα κεφάλια συγκρινόμενη με την κοιλιά θηλυκών εντόμων. Ειδικότερα, 6 από τις 7 α-υπομονάδες του 20S πυρήνα παρουσιάζουν χαμηλότερα επίπεδα στα κεφάλια συγκριτικά με την κοιλιά. Στην ίδια μελέτη εντοπίστηκε στα κεφάλια χαμηλότερη έκφραση κρίσιμων μοριακών συνοδών, όπως οι Hsp26, Hsp22, Hsp70 και Hsc70s (Fredriksson et al., 2012). Γενικά, είναι επίσης γνωστό ότι υπάρχει ιστο-ειδική διαφορική έκφραση και του αντιοξειδωτικού ενζύμου καταλάση, με τον εγκέφαλο να διαθέτει πολύ γαμηλά επίπεδα βιοδραστικότητας (Dringen et al., 2014).

Η φυλο-ειδική απόκριση στην ακτινοβολία, όπως αναλύθηκε στην ενότητα 4.1.1, επιβεβαιώθηκε και στα συγκεκριμένα πειράματα, καθώς τα θηλυκά ακτινοβολημένα έντομα εμφάνισαν μεγαλύτερο οξειδωτικό φορτίο έναντι των αρσενικών όσον αφορά στα κεφάλια. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκαν θηλυκά έντομα για τη μελέτη της επίδρασης του ασύρματου δικτύου, συναρτήσει του πρωτοκόλλου έκθεσης, στο οξειδωτικό δυναμικό του συγκεκριμένου ιστού.

Στα εν λόγω πειράματα φάνηκε ότι οι δραστικές μορφές οξυγόνου αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά μόνο στην περίπτωση της συνεχόμενης πενθήμερης ακτινοβόλησης. Η καθημερινή ακτινοβόληση μισής ώρας δεν επέφερε καμία αλλαγή στις ROS, ενώ η σύντομη εφάπαξ ακτινοβόληση προκάλεσε αύξηση, η οποία όμως οριακά δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν τα αντίστοιχα που προέκυψαν από τη βάση ασύρματου τηλεφώνου, όσον αφορά στην ικανότητα αντίδρασης των σωματικών ιστών απέναντι στο στρεσογόνο παράγοντα της ακτινοβολίας, καθώς δείχνουν ότι οι 24 ώρες ανάμεσα στις 30λεπτες ακτινοβολήσεις αποτελούν ικανοποιητικό διάστημα για να επανέλθουν οι ROS σε φυσιολογικά επίπεδα, ώστε, τελικά, να μη σημειωθεί αύξηση των επιπέδων τους. Από την άλλη, επιβεβαιώνουν τη μεγαλύτερη ευαισθησία έναντι της συγκεκριμένης ακτινοβολίας που παρουσιάζουν τα κεφάλια συγκριτικά με τα σώματα, καθώς η σύντομη εφάπαξ 30λεπτη ακτινοβόληση, που στην περίπτωση του DECT δεν προκάλεσε αύξηση στους σωματικούς ιστούς, στο ιστικό / κυτταρικό περιβάλλον των κεφαλιών φαίνεται να δημιουργεί μία διαταραχή του οξειδωτικού δυναμικού.

4.1.3 ΜΕΓΑΛΥΤΕΡΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΤΟΥ ΩΟΘΗΚΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ ΕΝΑΝΤΙ ΤΗΣ ΠΑΛΜΙΚΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΒΑΣΗΣ ΑΣΥΡΜΑΤΟΥ ΤΗΛΕΦΩΝΟΥ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ROS

Η επίδραση της παλμικής ακτινοβολίας DECT στον ωοθηκικό ιστό ήταν άμεση, καθώς οι ROS αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά μετά από σύντομη 30λεπτη και 60λεπτη έκθεση, σε αντίθεση με το σωματικό ιστό, ο οποίος επηρεάστηκε μετά από 6 ώρες συνεχούς έκθεσης. Διαχωρισμός των ωοθυλακίων πριν και μετά το στάδιο 10 έδειξε ότι στατιστικά σημαντική αύξηση των ROS προκλήθηκε στα στάδια της πρώιμης και μέσης ωογένεσης και όχι στα μεταγενέστερα, καθιστώντας τα προ-χοριογενετικά στάδια περισσότερο ευάλωτα στην παλμική, μη ιονίζουσα ακτινοβολία.

Τα αποτελέσματα αυτά πιθανά εξηγούνται από το γεγονός ότι η ωογένεση αποτελεί μία δυναμική και αδιάκοπη διαδικασία, η οποία έχει υψηλούς μεταβολικούς ρυθμούς και μεγάλο ενεργειακό κόστος, ιδιαίτερα κατά τη βιτελλογένεση (*Baum et al., 2005*). Άρα, τα προχοριογενετικά στάδια αντιμετωπίζουν μεγαλύτερο μεταβολικό στρες, και αυξημένες ενεργειακές ανάγκες, γεγονός που οδηγεί και σε αυξημένο οξειδωτικό φορτίο.

4.1.4 ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΑΝΑΚΑΜΨΗΣ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ROS ΜΕΤΑ ΤΟ ΠΕΡΑΣ ΤΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΣΗΣ ΣΤΟΥΣ ΣΩΜΑΤΙΚΟΥΣ ΚΑΙ ΓΑΜΕΤΙΚΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ ΦΥΣΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ΕΝΤΟΜΩΝ

Για την περαιτέρω μελέτη της εμφάνισης κορεσμού στα επίπεδα των ROS, μετά από κάποιες ώρες συνεχούς ακτινοβόλησης διακόπηκε εντελώς η έκθεση των εντόμων στην ΗΜΑ, και πραγματοποιήθηκε καταγραφή των επιπέδων τους (ROS) σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα μετά τη διακοπή. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης, των διαφορετικών στιγμιοτύπων μετά το πέρας της ακτινοβόλησης, έδειξαν ότι τα επίπεδα των ROS επανήλθαν σε φυσιολογικές τιμές 24 ώρες μετά το τέλος της ακτινοβόλησης. Κατά συνέπεια, το φαινόμενο της αύξησης του οξειδωτικού φορτίου φαίνεται να είναι αντιστρεπτό, όταν απομακρυνθεί ο παράγοντας της ακτινοβολίας, γεγονός που πιθανά οφείλεται στην ενεργοποίηση των μηγανισμών που διαθέτουν τα κύτταρα για την αντιμετώπιση της αύξησης των ROS. Πράγματι, πολλές μελέτες έχουν δείξει αλλαγές στα επίπεδα των ενζυμικών και μη μηχανισμών μετά από έκθεση σε μη ιονίζουσα HMA (Ayata et al., 2004; Balci et al., 2007; Dasdag et al., 2009; Al-Damegh, 2012), ενώ ταυτόχρονα έχει δειχτεί και η επαναφορά των φυσιολογικών επιπέδων μετά από διακοπή της ακτινοβόλησης. Συγκεκριμένα, έρευνα σε αρουραίους, οι οποίοι ακτινοβολούνταν για 2 ώρες καθημερινά συνολικά για 45 ημέρες με σήμα GSM 900 MHz, κατέγραψε αυξημένα επίπεδα δισμουτάσης και γλουταθειόνης, τα οποία όμως επανήλθαν σε φυσιολογικά επίπεδα 15 ημέρες μετά το τέλος της περιόδου ακτινοβόλησης (Aydin et al., 2012). Τέλος, αναστροφή των αρνητικών επιπτώσεων έγει φανεί να συμβαίνει και σε άλλες βιολογικές

διεργασίες πέραν του οξειδωτικού στρες. Έρευνα των Franzellitti et al. (2010), σε ανθρώπινη κυτταρική σειρά τροφοβλαστών (HTR-8/SVneo cells) κατέγραψε αναστροφή στη βλάβη του DNA 2 ώρες μετά από το τέλος της ακτινοβόλησης διάρκειας 4, 16 ή 24 ωρών με κύμα διαμόρφωσης GSM και συχνότητας 1,8 GHz. Αναστροφή της επιβλαβούς επίδρασης της HMA έχει καταγραφεί και στην περίπτωση της μνημονικής διαδικασίας. Συγκεκριμένα, μετά από διακοπή της ακτινοβόλησης για ένα μήνα υπήρξε αναστροφή της ακτινο-επαγόμενης διαταραχής της μνήμης μυών (Mus musculus) (Ntzouni et al., 2012).

Στον ωοθηκικό ιστό, παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων ROS 4 ώρες μετά το τέλος της 30λεπτης έκθεσης (από 46% αύξηση μειώθηκε στο 16%) και της 60λεπτης έκθεσης (από 142% μειώθηκε στο 30%), σε αντίθεση με το σωματικό ιστό των θηλυκών εντόμων, όπου δε σημειώθηκε πτώση στα επίπεδα μετά από τα αντίστοιγα γρονικά διαστήματα απουσίας του παράγοντα της ακτινοβολίας, γεγονός που υποδηλώνει τους εντονότερους αντιοξειδωτικούς μηγανισμούς που υπάρχουν στον αναπαραγωγικό ιστό (Tsakiri et al., 2013). Όπως προαναφέρθηκε λόγω του γεγονότος ότι η παραγωγή φυσιολογικών, ώριμων αυγών, ικανών για γονιμοποίηση και εκκόλαψη, είναι μία ενεργοβόρα διαδικασία, υπάρχουν σημεία ελέγχου, όπου τα ωοθυλάκια αποπίπτουν και δε συνεχίζουν το αναπτυξιακό πρόγραμμα της ωογένεσης, και έτσι υπάρχει έγκαιρη διακοπή σε περίπτωση εμφάνισης οποιασδήποτε ανωμαλίας με σκοπό την εξοικονόμηση ενέργειας (McCall, 2004). Το γεγονός ότι στον ωοθηκικό ιστό η πτώση των ROS σημειώνεται γρηγορότερα από το σωματικό πιθανά να εξηγείται από την αύξηση του ποσοστού των αποπτωτικών ωοθυλακίων που παρατηρείται στα δύο σημεία ελέγχου της ωογένεσης και ξεκινάει 2 ώρες από το τέλος της ακτινοβόλησης παρουσιάζοντας μέγιστο στις 4 – 5 ώρες μετά το τέλος αυτής (Sagioglou et al., 2014). Με άλλα λόγια, τα ωοθυλάκια στα οποία έχει επαχθεί το οξειδωτικό στρες οδηγούνται σε απόπτωση και τελικά απομακρύνονται αφήνοντας όσα ωοθυλάκια μένουν ανεπηρέαστα από την ακτινοβολία, ή καταφέρνουν να αντισταθμίσουν την αύξηση των δραστικών μορφών οξυγόνου, να συνεχίσουν να αναπτύσσονται προς ώριμα αυγά.

4.1.5 ΗΛΙΚΙΟ-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΑΛΜΙΚΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΒΑΣΗΣ ΑΣΥΡΜΑΤΟΥ ΤΗΛΕΦΩΝΟΥ ΣΤΟ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΟ ΔΥΝΑΜΙΚΟ ΤΩΝ ΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΙΣΤΩΝ – ΣΥΣΧΕΤΙΣΜΟΣ ΜΕ ΤΟ ΠΡΟΣΔΟΚΙΜΟ ΖΩΗΣ

Για τη διερεύνηση της επίδρασης της μη ιονίζουσας ΗΜΑ, συναρτήσει της *in vivo* γήρανσης, εξετάσθηκαν τα επίπεδα των ROS, οξειδωμένων πρωτεϊνών και λιπιδίων, καθώς και η αντιοξειδωτική ικανότητα των εντόμων τριών ηλικιακών κλάσεων: των νεαρών (5 ημερών ενήλικα έντομα), της μέσης ηλικίας (25 ημερών) και των γηρασμένων (55 ημερών) εντόμων. Μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει συσσώρευση οξειδωμένων μακρομορίων, καθώς και αυξημένων επιπέδων ROS συναρτήσει της γήρανσης. Σύμφωνα με τη θεωρία της γήρανσης λόγω ελευθέρων ριζών (free radical theory of aging), οι ελεύθερες ρίζες και τα οξειδωμένα μακρομόρια συσσωρεύονται κατά τη διάρκεια της ζωής (*Harman, 1956*). Όσον αφορά στη *Drosophila* υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ισχυρά τη συγκεκριμένη θεωρία (*Sohal and*

Sohal, 1991; Sohal et al., 1995). Στη συγκεκριμένη Διατριβή, επιβεβαιώθηκε η ηλικιακή συσσώρευση των ROS χωρίς ακτινοβόληση, τόσο στα αρσενικά όσο και στα θηλυκά έντομα, με σημαντική διαφορά ανάμεσα στα νεαρά έντομα και στις υπόλοιπες δύο ηλικιακές κλάσεις.

Η συνεχής πενθήμερη παρουσία παλμικής ακτινοβολίας βάσης ασύρματου τηλεφώνου στα νεαρά άτομα ηλικίας 0 - 5 ημερών, στα μέσης ηλικίας 20 - 25 ημερών και στα ηλικιωμένα 50 - 55 ημερών έδειξε στατιστικά σημαντικά αύξηση των ROS στα νεαρά και γηρασμένα αρσενικά έντομα και όχι στα μέσης ηλικίας. Αντίθετα, στην περίπτωση των θηλυκών εντόμων η αύξηση ήταν στατιστικά σημαντική σε όλες τις ηλικιακές κλάσεις. Η φυλο-ειδική ευαισθησία των θηλυκών ατόμων έχει ήδη εξηγηθεί από το αυξημένο μεταβολικό και ενεργειακό στρες που προκαλείται από τη διαδικασία της ωογένεσης. Η φαινομενική ανθεκτικότητα των αρσενικών εντόμων που καταγράφηκε συνάδει επίσης με τα αποτελέσμα των Parashar et al. (2008), οι οποίοι δεν παρατήρησαν, μετά από ακτινοβόληση με γ ακτινοβολία, μεγαλύτερη ευαισθησία στο οξειδωτικό φάρμακο paraquat στα αρσενικά έντομα ηλικίας 20 ημερών συγκριτικά με τα νεαρά έντομα 10 ημερών, τα οποία ήταν περισσότερο ευαίσθητα στο οξειδωτικό στρες που προκλήθηκε από τη χορήγηση του φαρμάκου. Η ανθεκτικότητα των αρσενικών εντόμων μέσης ηλικίας, έναντι των νεαρών και γηρασμένων, μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι στο συγκεκριμένο Δίπτερο η ενεργότητα του κυτταροπλασματικού ενζύμου δισμουτάση αυξάνει συνεχώς με την ηλικία, ενώ η καταλάση μειώνεται μετά το μέσο της ζωής του (Sohal and Orr 1995; Niedzwiecki et al., 1992). Η συνεχής αύξηση της μιτοχονδριακής δισμουτάσης οδηγεί σε μεγαλύτερη παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου, ενώ η απουσία καταλάσης οδηγεί σε συσσώρευση αυτού (Sohal and Sohal, 1991; Niedzwiecki et al., 1992).

Παράλληλα με την ηλικιο-εξαρτώμενη και ακτινο-επαγόμενη αύξηση των ROS, παρατηρήθηκε, επίσης, συσσώρευση οξειδωμένων λιπιδίων και πρωτεϊνών, ενώ τέλος υπήρξε και μείωση στη μη ενζυμική ολική αντιοξειδωτική ικανότητα των εντόμων. Μετά από 120 ώρες συνεχούς έκθεσης των εντόμων στην ακτινοβολία βάσης DECT παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων των οξειδωμένων πρωτεϊνών και λιπιδίων μόνο στα ακτινοβολημένα, γηρασμένα, αρσενικά και θηλυκά έντομα, καταδεικνύοντας την ανθεκτικότητα της D. melanogaster στο ακτινο-επαγόμενο οξειδωτικό στρες (Parashar et al. 2008). Το φαινόμενο της μεγαλύτερης δεκτικότητας των γηρασμένων εντόμων, ως προς το οξειδωτικό στρες, οφείλεται στη μείωση της αποδοτικότητας των αντιοξειδωτικών μηχανισμών, στη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, καθώς και στην παρατηρούμενη κατά τη γήρανση συσσώρευση ελευθέρων ριζών και οξειδωμένων προϊόντων (Sohal, 2002; Le Bourg, 2001; Vendelbo and Nair, 2011; Lane et al., 2015). Τέλος, η μη ενζυμική αντιοξειδωτική ικανότητα φάνηκε να μειώνεται στατιστικά σημαντικά και στα δύο φύλα στα γηρασμένα έντομα, στην ηλικία δηλαδή που χρειάζονταν τα αντιοξειδωτικά, όπως το ασκορβικό οξύ για να αντιμετωπιστεί η εμφανής επαγωγή οξειδωτικού στρες, μετά την επίδραση της ακτινοβολίας. Ωστόσο, στα αρσενικά έντομα υπήρξε και στατιστικά σημαντική μείωση σε σχέση με την ηλικία των νεαρών εντόμων, γεγονός που πιθανά εξηγεί και τη μικρότερη αύξηση στα ROS που εμφάνισαν τα αρσενικά (94%) νεαρά έντομα συγκριτικά με τα θηλυκά (247% αύξηση).

Έχοντας καταγράψει αύξηση του οξειδωτικού φορτίου των εντόμων, μετά από έκθεση σε παλμική ακτινοβολία μελετήθηκαν οι πιθανές επιπτώσεις της συγκεκριμένης επιβάρυνσης στη βιωσιμότητα των εντόμων.

Συνεχής ακτινοβόληση με βάση ασύρματου τηλεφώνου οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μείωση της βιωσιμότητας των αρσενικών και θηλυκών εντόμων. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τη συσσώρευση ROS και οξειδωμένων μακρομορίων, δείχνει ότι το μεγαλύτερο οξειδωτικό φορτίο που εντοπίζεται στα ακτινοβολημένα έντομα οδηγεί, τελικά, σε μείωση της βιωσιμότητάς τους.

Η διακοπτόμενη, δια βίου, ακτινοβόληση προκάλεσε μεγαλύτερη επιβάρυνση στο προσδόκιμο ζωής τόσο των αρσενικών όσο και των θηλυκών εντόμων. Η μέση επιβίωση στα αρσενικά που ακτινοβολούνταν συνεχώς ήταν οι 39 ημέρες, ενώ στα αρσενικά που ακτινοβολούνταν διακοπτόμενα ήταν οι 35 ημέρες. Αντίστοιγα αποτελέσματα παρουσίασαν και τα θηλυκά έντομα. Προς επιβεβαίωση, μελέτες που έχουν γίνει με άλλους στρεσογόνους παράγοντες δείχνουν, επίσης, μεγαλύτερη επιβάρυνση στη διακοπτόμενη έκθεση συγκριτικά με τη συνεχή (Amachree et al., 2014). Με σκοπό τη μείωση του συγκεκριμένου οξειδωτικού φορτίου υπερεκφράστηκε το αντιοξειδωτικό ένζυμο καταλάση, σε όλους τους σωματικούς ιστούς αρσενικών και θηλυκών εντόμων. Στα αρσενικά έντομα, η υπερέκφραση οδήγησε σε αντιστροφή της αρνητικής επίδρασης της ακτινοβολίας στη βιωσιμότητα, σε αντίθεση με τα θηλυκά έντομα που δεν προκάλεσε κάποια διαφοροποίηση, πιθανά λόγω της μεγαλύτερης συγκέντρωσης δραστικών μορφών οξυγόνου που καταγράφηκε στα θηλυκά έντομα, καθώς και του μεγαλύτερου ενεργειακού και μεταβολικού στρες που προέρχεται από τη διαδικασία της ωογένεσης, το οποίο συνυπάρχει με το ακτινο-επαγόμενο οξειδωτικό στρες. Με σκοπό τη μελέτη του ρόλου της p53 στην επιβίωση των εντόμων, παρουσία ακτινοβολίας, χρησιμοποιήθηκαν τα δύο πρωτόκολλα δια βίου έκθεσης και στο στέλεχος Dmp53^{-/-}. Τα ακτινοβολημένα αρσενικά έντομα εμφάνισαν στατιστικά σημαντικά καλύτερη επιβίωση και στα δύο πρωτόκολλα, δηλαδή υπήρξε αναστροφή της αρνητικής επίπτωσης της ακτινοβολίας. Τα ακτινοβολημένα θηλυκά μεταλλαγμένα έντομα εμφάνισαν και αυτά καλύτερη επιβίωση από τα φυσικού τύπου, καθώς δεν είγαν κάποια διαφορά από τους μάρτυρες, γεγονός που δείγνει ότι και σε αυτή την περίπτωση η απουσία της p53 είγε επίσης προστατευτικό ρόλο έναντι της ακτινοβολίας. Το αποτέλεσμα αυτό, σε συνδυασμό με το ότι στο μεταλλαγμένο στέλεχος δεν ανιχνεύθηκε κάποια αύξηση στις δραστικές μορφές οξυγόνου, υποδηλώνουν ότι ο μεταγραφικός παράγοντας p53 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο οξειδοαναγωγικό πρότυπο του εντόμου και στη ρύθμιση της βιωσιμότητας της Drosophila μετά από την επίδραση της συγκεκριμένης ακτινοβολίας. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο ρόλος της p53 είναι διττός, όσον αφορά στο οξειδωτικό στρες. Συγκεκριμένα, επάγει τη μεταγραφή αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως η μιτοχονδριακή δισμουτάση (SOD2) (Vurusaner et al., 2012), αλλά ταυτόχρονα μπορεί και να καταστείλει την έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στον αντιοξειδωτικό μηγανισμό, όπως ο μεταγραφικός παράγοντας Nrf2 (Liu and Xu, 2011), καθορίζοντας έτσι την απάντηση των κυττάρων στο οξειδωτικό στρες μέσω μίας δυναμικής ισορροπίας που ελέγχει τη συγκέντρωση των δραστικών μορφών οξυγόνου.

Για τη μελέτη της βιωσιμότητας, χρησιμοποιήθηκε, επίσης, η συσκευή Wi-Fi και η δια βίου ακτινοβόληση των φυσικού τύπου εντόμων ήταν διακοπτόμενη. Τα αποτελέσματα επαναλήφθηκαν και στην περίπτωση της συγκεκριμένης συσκευής ασύρματης τεχνολογίας. Στην περίπτωση, όμως, του Wi-Fi, εκτός από την πλήρη θερμιδικά τροφή τα έντομα καλλιεργήθηκαν και σε τροφή στην οποία είχαν αφαιρεθεί τα αντιοξειδωτικά συστατικά και κατά συνέπεια ήταν χαμηλότερη σε θερμιδική αξία. Σε αυτή την περίπτωση, η ακτινοβολία φάνηκε να παίζει ευεργετικό ρόλο, καθώς το ήπιο οξειδωτικό στρες που προκαλεί στα νεαρά έντομα οδηγεί στη μετέπειτα ανθεκτικότητα τους ως προς το στρεσογόνο παράγοντα της τροφής. Το συγκεκριμένο φαινόμενο έχει καταγραφεί και από άλλη μελέτη, στην οποία χρησιμοποιήθηκε μικρή συγκέντρωση του φαρμάκου paraquat σε διαγονιδιακό στέλεχος Drosophila, στο οποίο είχε γίνει αποσιώπηση της πρωτεΐνης parkin και η οποία μελέτη έδειξε αύξηση του προσδόκιμου ζωής των θηλυκών εντόμων μετά από την παρατεταμένη έκθεση των εντόμων στο ήπιο οξειδωτικό στρες (Bonilla-Ramirez et al., 2013).

4.1.6 ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ p53 ΣΤΗΝ ΑΚΤΙΝΟ-ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΥΞΗΣΗ ΤΩΝ ROS

Για τη μελέτη του ρόλου της p53 στην επίδραση της μη ιονίζουσας ΗΜΑ προτιμήθηκε ο ωοθηκικός ιστός, καθώς στους σωματικούς ιστούς η πρωτεΐνη εκφράζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα (Waskar et al., 2009). Επίσης, χρησιμοποιήθηκε μεταλλαγμένο στέλεχος, στο οποίο απουσιάζει ο μεταγραφικός παράγοντας. Ακτινοβόληση του Dmp53^{-/-} στελέχους προκάλεσε αύξηση των ROS κατά 30% στα προ-χοριογενετικά στάδια. Ωστόσο, η αύξηση αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική, σε αντίθεση με το φυσικού τύπου στέλεγος στο οποίο η αύξηση που καταγράφηκε στα συγκεκριμένα στάδια ήταν 60% και η διαφορά με τους μάρτυρες ήταν στατιστικά σημαντική. Γενικά, μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει ανάμεσα στα επίπεδα των ROS και την p53 μία δυναμική ισσοροπία και αμφίδρομη ρύθμιση του ενός από τα επίπεδα του άλλου, με αποτέλεσμα πλειοτροπικές κυτταρικές αποκρίσεις (διακοπή του κυτταρικού κύκλου, απόπτωση, επιδιόρθωση των βλαβών του DNA) (Liu et al., 2008). Πιο συγκεκριμένα, έχει δειγθεί ότι σε προεργόμενο από ιονίζουσα ακτινοβολία οξειδωτικό στρες περίπου το 2% της p53 μετακινείται στα μιτοχόνδρια, με τη μετακίνηση αυτή να προηγείται της αντίστοιχης στον πυρήνα των κυττάρων (Essmann et al. 2005). Η μετακίνηση αυτή οδηγεί στη σύνδεση της p53 με τη μιτογονδριακή SOD, προκαλώντας περαιτέρω αύξηση των ROS (Zhao et al., 2005). Στη συγκεκριμένη Διατριβή φάνηκε ότι ο παράγοντας της ακτινοβολίας προάγει τη δημιουργία των δραστικών μοφών οξυγόνου ωστόσο η μεγαλύτερη αύξηση που παρατηρήθηκε στο φυσικού τύπου στέλεγος πιθανά να δημιουργείται κατωρροϊκά της μετακίνησης της p53 στα μιτογόνδρια.

4.1.7 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΟ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΔΥΝΑΜΙΚΟ ΤΟΥ ΩΟΘΗΚΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ ΕΞΑΡΤΑΤΑΙ ΑΠΟ ΤΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΟΠΩΣ Η ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ, Η ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΚΑΙ Η ΕΝΤΑΣΗ

Θέλοντας να διερευνηθεί περαιτέρω η βιοδραστικότητα των χαρακτηριστικών της ακτινοβολίας δημιουργήθηκαν πρωτόκολλα in vivo ακτινοβόλησης και η επίδραση αξιολογήθηκε μέσω της μέτρησης των ROS στις ωοθήκες, λόγω της μεγαλύτερης ευαισθησίας που κατέδειξαν έναντι της συγκεκριμένης ακτινοβολίας. Αρχικά, τα πειράματα αυτά αποκάλυψαν ότι η επίδραση εξαρτάται από τον τύπο της διαμόρφωσης του κύματος. Τα συνεγή κύματα (Continuous Waves) δεν επέφεραν κάποια διαφοροποίηση στα επίπεδα των ROS, ενώ τα κύματα με διαμόρφωση συχνότητας (Frequency Modulated) προκάλεσαν μία αύξηση της τάξης του 15%, η οποία, όμως, δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Στατιστικά σημαντική αύξηση, στην περίπτωση συγνότητας 1800 MHz και έντασης 1 V/m, σημειώθηκε μόνο μετά από επίδραση παλμικού κύματος, το οποίο προεργόταν από βάση ασύρματου τηλεφώνου, αποδεικνύοντας έτσι τη μεγαλύτερη βιοδραστικότητα των παλμικών κυμάτων. Κατά συνέπεια, τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν την ανάγκη γρήσης καθημερινών πηγών ασύρματης τεγνολογίας για τη μελέτη των επιπτώσεων της μη ιονίζουσας ΗΜΑ και όχι γεννήτριες ραδιοσυχνοτήτων με απλή προσομοίωση των κυματομορφών που εκπέμπονται από τις συσκευές ασύρματης τεγνολογίας. Γενικά, υπάργουν μελέτες που βρίσκονται σε συμφωνία με τα εν λόγω αποτελέσματα και που δείχνουν τη μεγαλύτερη επίπτωση των διαμορφωμένων κυμάτων έναντι των συνεχών. Συγκεκριμένα, CW έκθεση συγνότητας 1748 MHz για 15 λεπτά και SAR 5 W/Kg δεν προκάλεσε επαγωγή του σχηματισμού μικροπυρήνων σε ανθρώπινα περιφερικά λεμφοκύτταρα, σε αντίθεση με την έκθεση των κυττάρων σε GMSK διαμορφωμένο κύμα (d'Ambrosio et al., 2002). Επίσης, δύο έρευνες προερχόμενες από την ίδια ερευνητική ομάδα έδειξαν αύξηση των ROS στα ακτινοβολημένα δείγματα, συγκριτικά με τα «εικονικής ακτινοβόλησης», μετά από έκθεση σε GSM-DTX διαμορφωμένα κύματα, και καμία επίδραση μετά από έκθεση σε ακτινοβολία CW σε τρία διαφορετικά είδη κυττάρων (Lantow et al., 2006a; 2006b). Καθώς δεν υπάρχει ακόμα κάποιος μηγανισμός που να εξηγεί τη μεγαλύτερη βιοδραστικότητα της παλμικής ακτινοβολίας, μπορεί απλά να υποτεθεί ότι η διακοπτόμενη έκθεση (εκπομπή παλμών) στον παράγοντα ακτινοβολία προκαλεί μεγαλύτερη επιβάρυνση στους ομοιοστατικούς μηγανισμούς. Ωστόσο, υπάρχουν, επίσης, έρευνες που δείχνουν ότι ακόμα και τα CW κύματα είναι ικανά να προκαλέσουν αρνητικές επιπτώσεις στην έμβια ύλη (Ilhan et al., 2004; De Iuliis et al., 2009; Burlaka et al., 2014), γεγονός που δείχνει ότι εξίσου σημαντικό ρόλο στη βιοδραστικότητα της ακτινοβολίας διαδραματίζουν, εκτός από τη διαμόρφωση, η συχνότητα και η ένταση. Το συγκεκριμένο συμπέρασμα ενισχύεται και από τα αποτελέσματα της παρούσας Διατριβής. Αναλυτικότερα, ακτινοβόληση με συνεχή κύματα συχνότητας 900 MHz και 100 MHz, έντασης 1 V/m, προκάλεσαν στατιστικά σημαντική αύξηση των ROS σε αντίθεση με τα συνεχή κύματα 1800 MHz, που όπως προαναφέρθηκε δεν είγαν κάποια επίπτωση στο οξειδωτικό πρότυπο των ωοθηκών. Επίσης, η συγνότητα των 900 MHz φάνηκε να επηρεάζει διαφορετικά τα επίπεδα των

ROS, ανάλογα με την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου που εφαρμοζόταν κάθε φορά. Τα τελευταία πειράματα που αφορούσαν το ρόλο της έντασης έδειξαν ότι πολύ μικρότερες εντάσεις από τα «όρια ασφαλείας» που έχουν θεσπιστεί νομοθετικά, για την προφύλαξη του γενικού πληθυσμού από την ασύρματη ακτινοβολία ραδιοκυμάτων και μικροκυμάτων, είναι ικανές να προκαλέσουν διαταραχή του οξειδωτικού δυναμικού των κυττάρων. Επίσης, σημαντικό εύρημα αποτέλεσε το γεγονός ότι η επίδραση δεν αυξάνει αναλογικά με την αύξηση της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου, αλλά φτάνει σε επίπεδο κορεσμού. Τέλος, φάνηκε ότι μικρότερες εντάσεις μπορεί να προκαλέσουν μεγαλύτερη διαφοροποίηση στην εκάστοτε υπό μελέτη παράμετρο, γεγονός που έχει δειχθεί και σε μελέτες μη ιονίζουσας ακτινοβολίας (*Persson et al., 1997*) αλλά και σε κάποιες έρευνες για τις επιδράσεις της ιονίζουσας ακτινοβολίας (*Mancuso et al., 2015; Pannkuk et al., 2015; Suman et al., 2015*).

4.2 Η *IN VITRO* ΕΚΘΕΣΗ ΣΤΗΝ ΠΑΛΜΙΚΗ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ ΚΙΝΗΤΟΥ ΤΗΛΕΦΩΝΟΥ ΕΠΑΓΕΙ ΤΟ ΣΤΡΕΣ ΤΟΥ ΕΝΔΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟΥ ΔΙΚΤΥΟΥ (ΕΔ ΣΤΡΕΣ – ER STRESS)

Εκτός από την επαγωγή του οξειδωτικού στρες, που φάνηκε ότι ενεργοποιείται από την παλμική ακτινοβολία προερχόμενη από συσκευές ασύρματης τεχνολογίας καθημερινής χρήσης, στη συγκεκριμένη Διατριβή, ανιχνεύθηκε και η ενεργοποίηση του ΕΔ στρες μετά από *in vitro* ακτινοβόληση σιελογόνων αδένων διαγονιδιακού στελέχους, το οποίο επιτρέπει την ανίχνευση του μεταγραφικού παράγοντα Xbp-1 στον πυρήνα, ο οποίος με την κατωρροϊκή ενεργοποίηση της μεταγραφής συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων προάγει την κυτταρική απάντηση για την αντιμετώπιση του ER stress. Το συγκεκριμένο στρες δεν έχει ακόμα μελετηθεί διεθνώς στην περίπτωση της ακτινοβολίας ραδιοκυμάτων και μικροκυμάτων. Υπάρχουν, ωστόσο, μελέτες που δείχνουν ακτινο-επαγώμενη διαταραχή στην ομοιόσταση των κυττάρων, η οποία θα μπορούσε να οδηγήσει στην επαγωγή του ER stress. Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάριου ασβεστίου (*Cig and Nazıroglu, 2015*), καθώς και συσσώρευση ROS και οξειδωμένων πρωτεϊνών (*Avci et al., 2012; Dasdaq et al., 2012*), αποτελέσματα που βρέθηκαν και στη συγκεκριμένη Διατριβή. Η αύξηση των οξειδωμένων πρωτεϊνών μπορεί να οδηγήσει σε «πρωτεοτοξικό» στρες (proteotoxic stress) και τελικά σε ενεργοποίηση του στρες του Ενδοπλασματικού Δικτύου.

4.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΣΗΣ ΕΝΗΛΙΚΩΝ ΕΝΤΟΜΩΝ ΣΤΗΝ ΕΠΑΓΩΓΗ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΩΟΓΕΝΕΣΗ

Η μελέτη αφορούσε πηγές καθημερινής χρήσης, όπως το κινητό τηλέφωνο, συγκριτικά με γεννήτρια παραγωγής ραδιοσυχνοτήτων. Η ωοθήκη της *D. melanogaster* αποτελεί ένα ιδανικό μοντέλο ιστού για τη μελέτη των γενετικών παραγόντων, αλλά και των κυτταρικών μονοπατιών και μηχανισμών που εμπλέκονται στον κυτταρικό θάνατο, καθώς έχουν εντοπιστεί μέχρι στιγμής πέντε τύποι κυτταρικού θανάτου, συμπεριλαμβανομένων των αποπτωτικών και μη, οι οποίοι

λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της ωογένεσης (Jenkins et al., 2013). Μάλιστα, ο κυτταρικός θάνατος στο συγκεκριμένο ιστό είναι και αναπτυξιακά ρυθμιζόμενος στα στάδια 11 – 14 αλλά και σποραδικός στο γερμάριο και στα στάδια 7 – 9 της πρώιμης και μέσης ωογένεσης, αντίστοιχα (Nezis et al., 2000; 2009; Velentzas et al., 2007a). Στα στάδια αυτά, παρατηρείται κυτταρικός θάνατος σποραδικά και σε υγιή άτομα και το ποσοστό αποπτωτικών ωοθυλακίων που έχει αναφερθεί κυμαίνεται από 1,5 - 2,5% (Giorgi and Deri, 1976). Τα στάδια του γερμαρίου και της μέσης ωογένεσης αποτελούν τα σημεία ελέγχου της διαδικασίας, η οποία στα σημεία αυτά διακόπτεται, μέσω κυτταρικού θανάτου, αν αυτό καταστεί αναγκαίο (McCall, 2004). Μελέτες έγουν δείζει ότι σε περιπτώσεις εξωγενών παραγόντων, όπως η συσσώρευση τοξικών γημικών (Sang and King, 1961) και τα μειωμένα θρεπτικά συστατικά (Drummond-Barbosa and Spradling, 2001), το ποσοστό των αποπτωτικών ωοθυλακίων αυξάνεται στα συγκεκριμένα σημεία ελέγγου. Κατά συνέπεια, η ωογένεση αποτελεί ένα πρότυπο σύστημα μελέτης της επίδρασης εξωγενών παραγόντων, και για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη Διατριβή για τη μελέτη της μη ιονίζουσας ΗΜΑ, η οποία έχει ενοχοποιηθεί ότι επάγει την απόπτωση σε διάφορα μοντέλα μελέτης (Sehitoglu et al., 2015; Azadi Oskouyi et al., 2015; Dogan et al., 2012).

4.3.1 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΟ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟ ΔΥΝΑΜΙΚΟ ΤΟΥ ΩΟΘΗΚΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ ΕΞΑΡΤΑΤΑΙ ΑΠΟ ΤΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ, ΟΠΩΣ Η ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ, Η ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ, Η ΕΝΤΑΣΗ ΚΑΙ Η ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΣΗΣ

Όπως και στην περίπτωση των επιπέδων των δραστικών μορφών οξυγόνου, έτσι και στην περίπτωση του κυτταρικού θανάτου, τα διαμορφωμένα κύματα φάνηκαν περισσότερο βιοδραστικά συγκριτικά με τα συνεχή, κάτι που όπως προαναφέρθηκε έχει δειχθεί και από άλλες μελέτες (d'Ambrosio et al., 2002; Lantow et al., 2006a; 2006b). Σημαντική διαφορά σημειώθηκε στην επίδραση των συνεχών κυμάτων στο οξειδωτικό και αποπτωτικό δυναμικό. Όσον αφορά στην απόπτωση, υπήρξε στατιστικά σημαντική επαγωγή της ακόμα και μετά από έκθεση των θηλυκών εντόμων στα συνεχή κύματα συχνότητας 1800 MHz, σε αντίθεση με το οξειδωτικό δυναμικό που δεν επηρεάστηκε από τη συγκεκριμένη κυματομορφή. Το γεγονός αυτό αφενός καταδεικνύει την ευαισθησία του συστήματος απέναντι στους βλαπτικούς, εξωγενείς παράγοντες (Pritchett et al., 2009) και αφετέρου δείχνει ότι η ακτινο-επαγόμενη απόπτωση, κατά την ωογένεση, δεν εξαρτάται μόνο από την εμφάνιση οξειδωτικού στρες στα ωοθυλάκια, αλλά μπορεί να συμβεί και ανεξάρτητα έχοντας ενεργοποιηθεί από κάποιον άλλο μηχανισμό. Διαφορετική επίδραση εντοπίστηκε και στα πειράματα που αφορούσαν στη συχνότητα. Στην περίπτωση των ROS, τα 1800 MHz δεν είχαν προκαλέσει κάποια αύξηση, ωστόσο στα πειράματα που αφορούν στην απόπτωση ακόμα και αυτή η συχνότητα οδήγησε σε αύξηση του αριθμού των ατρησικών ωοθυλακίων. Τέλος, τα πειράματα που σχετίζονταν με την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, ανέδειξαν για μία ακόμα φορά την ευαισθησία του συστήματος, καθώς ακόμα και η μικρότερη ένταση των 0,3 V/m, που δε μετέβαλε τα επίπεδα των ROS, κατάφερε να

προκαλέσει επαγωγή της απόπτωσης. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν επίσης, τη σημαντικότητα της επιλογής κατάλληλου βιολογικού συστήματος για τις μελέτες βιοδοσιμετρίας, καθώς οι παράμετροι που μελετώνται επηρεάζονται διαφορετικά, και μπορεί εύκολα να αναχθούν συμπεράσματα που μπορεί να είναι εσφαλμένα ή τουλάχιστον να μην είναι καθολικά. Τέλος, η ευαισθησία του αναπτυξιακού μηχανισμού της ωογένεσης προκύπτει και από τα πειράματα με διαφορετικά πρωτόκολλα ακτινοβόλησης. Συγκεκριμένα, φάνηκε ότι η εφάπαξ ακτινοβόληση 6 λεπτών είναι το ίδιο βιοδραστική με την 60λεπτη ακτινοβόληση και, κατά συνέπεια, συμπεραίνεται ότι ακόμα και σύντομη έκθεση μπορεί να προκαλέσει διαταραχή της διαδικασίας της ωογένεσης.

4.3.2 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ p53 ΣΤΗΝ ΑΚΤΙΝΟ-ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΠΟΠΤΩΣΗ

Το μεταλλαγμένο στέλεχος Dmp53^{-/-} εμφάνισε χαμηλότερα ποσοστά αποπτωτικών ωοθυλακίων συγκριτικά με το φυσικού τύπου στέλεχος μετά από 6λεπτη και 30λεπτη ακτινοβόληση με κινητό τηλέφωνο. Στην προσπάθεια να βρεθεί η αιτία της συγκεκριμένης διαφοράς, μελετήθηκαν ξεχωριστά τα ποσοστά των αποπτωτικών γερμαρίων και τα αντίστοιχα της μέσης ωογένεσης (σταδίων 7 – 9). Μετά από τη συγκεκριμένη ανάλυση, βρέθηκε ότι η διαφορά μεταξύ των δύο στελεχών προκύπτει στο στάδιο του γερμαρίου. Συγκεκριμένα, στα φυσικού τύπου έντομα μετά από την 6λπετη ακτινοβόληση τα αποπτωτικά γερμάρια αυξήθηκαν κατά 3,3 φορές, ενώ μετ΄από την 30λεπτη ακτινοβόληση αυξήθηκαν 2,8 φορές. Αντίθετα, στα Dmp53^{-/-} ακτινοβολημένα έντομα δεν υπήρξε κάποια αύξηση, σε κανένα από τα δύο πρωτόκολλα. Παρόλα αυτά, στην περίπτωση των σταδίων 7 – 9 τα ποσοστά αυξήθηκαν σχεδόν 2 φορές και στα δύο στελέχη. Συμπερασματικά, φαίνεται πως η απόπτωση, η οποία επάγεται από τη συγκεκριμένη ακτινοβολία, είναι ανεξάρτητη της p53 στα στάδια της μέσης ωογένεσης και p53-εξαρτώμενη στο στάδιο του γερμαρίου. Κατά συνέπεια, υπάρχει ένας διαφορετικός μηγανισμός κυτταρικής εκκαθάρισης μεταξύ των δύο αναπτυξιακών σταδίων. Τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν με τη διαφορετική ρύθμιση της απόπτωσης που έχει δειχθεί και σε άλλη μελέτη, στην οποία η κινάση DmChk2 (Checkpoint kinase 2), και όχι η p53, ελέγχει την απόπτωση κατά τη μέση ωογένεση, ενώ αντίθετα υπερέκφραση της p53 φαίνεται να οδηγεί σε στείρα θηλυκά χωρίς ωοθήκες, πιθανά λόγω μαζικής απώλειας των βλαστοκυττάρων της γαμετικής σειράς στο στάδιο του γερμαρίου (Bakhrat et al., 2010), Μία πιο πρόσφατη μελέτη εντόπισε την p53 μόνο στα γαμετικά κύτταρα του γερμαρίου, μετά από έκθεση των θηλυκών εντόμων σε ιονίζουσα ακτινοβολία (Wylie et al., 2014).

4.4 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΩΟΓΕΝΕΣΗ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ ΠΑΛΜΙΚΗ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ ΚΙΝΗΤΟΥ ΤΗΛΕΦΩΝΟΥ

Οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί με στόχο την ανίχνευση αλλαγών στη γονιδιακή έκφραση είναι περιορισμένες και εν πολλοίς αντικρουόμενες (Belyaev et al. 2006, Gurisik et al., 2006; Whitehead et al., 2006; Zhao et al., 2007; Paparini et al., 2008; Sekijima et al., 2010).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα έρευνα, μελετήθηκε η επίδραση της παλμικής ακτινοβολίας ραδιοκυμάτων κινητού τηλεφώνου στο πρότυπο γονιδιακής έκφρασης του ωοθηκικού ιστού και συγκεκριμένα των ωοθυλακίων μέχρι σταδίου 12. Το πλεονέκτημα των τεχνικών τύπου "omics", που εξετάζουν ολιστικά και συστημικά το μεταγράφωμα, το πρωτέωμα ή το μεταβόλωμα, είναι ο μεγάλος όγκος πληροφοριών που μπορούν να εξαγθούν από αυτές. Διαπιστώθηκε, ότι μετά από σύντομη, 30λεπτη ακτινοβόληση και 2 ώρες αναμονή μετά το τέλος της ακτινοβόλησης, 168 γονίδια, τα οποία συμμετέχουν σε πολλές και σημαντικές κυτταρικές διεργασίες (βλ. Εικόνες 3.38-3.40), διαφοροποίησαν τη μεταγραφική έκφρασή τους. Μάλιστα, το 9% αυτών των γονιδίων σχετίζονται με το στρες και το 6% με τον κυτταρικό θανατο. Ανάμεσα στα 15 γονίδια σχετιζόμενα με το στρες, βρέθηκε να υπερεκφράζεται στα ακτινοβολημένα έντομα και το γονίδιο Gclm (Glutamate-Cysteine Ligase, Modifier Subunit), το προϊόν του οποίου είναι ρυθμιστής της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης ενός σημαντικού μη ενζυμικού αντιοξειδωτικού μορίου καθώς και το γονίδιο της μοριακής συνοδού CG5001, η οποία σχετίζεται με ανορθόδοξα αναδιπλωμένες πρωτεΐνες. Τα γονίδια αυτά ενισχύουν την εμφάνιση οξειδωτικού και πρωτεοτοξικού στρες, το οποίο θα μπορούσε να οδηγήσει σε ER stress, στα ωοθυλάκια πρώιμης και μέσης ωογένεσης. Τέλος, σημαντικό εύρημα αποτελεί το γεγονός ότι 6 γονίδια σχετίζονται με την απόκριση του κυττάρου σε βλάβη του DNA και την επιδιόρθωσή του. Δεδομένου ότι η συγκεκριμένη ακτινοβολία δε διαθέτει την απαραίτητη ενέργεια για να προκαλέσει σπάσιμο των δεσμών στην αλυσίδα του DNA, μελέτες έχουν δείξει ότι οι βλάβες που έχουν παρατηρηθεί, μετά από έκθεση στη μη ιονίζουσα ΗΜΑ, είναι απόρροια οξειδωτικής βλάβης (Diem et al., 2005; De Iuliis et al., 2009; Güler et al., 2014), κάτι που θα μπορούσε να λάβει χώρα λόγω της παρατηρούμενης ακτινο-επαγόμενης αύξησης των ROS. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί και το γονίδιο bendless (Ben) (βλ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ), το οποίο κωδικοποιεί μια E2 λιγάση ουβικουιτίνης της πρωτεΐνης dTRAF2 (TNF Receptor-associated factor 2), ρυθμίζει θετικά δια μέσου του μονοπατιού μεταγωγής σήματος των JNK κινασών τον κυτταρικο θάνατο, την αντοχή στο οξειδωτικό στρες και την επιμύκυνση της βιωσιμότητας της Drosophila και βρέθηκε υπερεκφρασμένο στα ακτινοβολημένα δείγματα. Οι Lee et al. (2008) έδειξαν αύξηση των ROS και ενεργοποίηση των JNK στα ωοθυλάκια της D. melanogaster μετά από έκθεση σε γεννήτρια ραδιοσυγνοτήτων κινητής τηλεφωνίας. Το αποτέλεσμα αυτό, σε συνδυασμό με: (A) γονίδια που βρέθηκαν να υπερεκφράζονται και να εμπλέκονται στην αυτοφαγία, ένα μηχανισμό θανάτου που έχει εντοπιστεί στην ωοθήκη (Nezis et al., 2009) και (B) γονίδια που σχετίζονται με τη φαγοκύτωση, τον τρόπο με τον οποίο, στην ωοθήκη, πραγματοποιείται η εκκαθάριση των νεκρών τροφοκυττάρων από τα γειτονικά θυλακοκύτταρα (Velentzas et al., 2007a), φαίνεται να ενισχύουν το φαινότυπο της απόπτωσης που παρατηρείται στα σημεία ελέγχου της ωογένεσης. Ανάμεσα στα γονίδια αυτά πρέπει να αναφερθεί και το γονίδιο Draper (Drpr), το οποίο αποτελεί μεμβρανικό υποδοχέα που ρυθμίζει την εγκόλπωση των κυττάρων της γαμετικής σειράς από τα θυλακοκύτταρα και ενεργοποιεί το JNK σηματοδοτικό μονοπάτι (Etchegaray et al., 2012) και βρέθηκε να υπερεκφράζεται στα ακτινοβολημένα δείγματα. Τέλος, η επαλήθευση με real time PCR των αυξημένων επιπέδων των mRNA δύο γονιδίων (RIC και CG40178) που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες και τριών γονιδίων (Anon87Ab, Claret και Eip93F) που σχετίζονται με τον

κυτταρικό θάνατο, ενισχύουν τα δεδομένα που αφορούσαν αντίστοιχους φαινοτύπους και ελήφθησαν με άλλες προσεγγίσεις. Κατά συνέπεια, τα αποτελέσματα των γονιδιακών μικροσυστοιχιών σε συνδυασμό με τη διαταραχή στο οξειδωτικό και αποπτωτικό δυναμικό που βρέθηκε στα προ-χοριογενετικά στάδια οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η ακτινοβολία ασύρματης τεχνολογίας αποτελεί ένα στρεσογόνο παράγοντα ή/και έναν καθοριστικό εκκινητή του κυτταρικού θανάτου όσον αφορά στην ωογένεση του Διπτέρου εντόμου Drosophila.

Επιπλέον, η ανάλυση των γονιδιακών δεδομένων αποκάλυψε ότι διαφορικά εκφρασμένα γονίδια συμμετέχουν σε σημαντικές κυτταρικές διεργασίες που αφορούν στη διαδικασία της ωογένεσης και συγκεκριμένα στην υποβοηθούμενη από κυστίδια μεταφορά (vesicle-mediated transportation) (16 γονίδια), την οργάνωση και εγκόλπωση μεμβρανών (14 γονίδια) και την ενδοκύττωση (13 γονίδια), διεργασίες οι οποίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του ωοκυττάρου. Η ενδοκύτωση είναι μία επιλεκτική διαδικασία εσωτερικοποίησης μορίων με την οποία το έντομο μπορεί να αποθηκεύσει σε κάθε αυγό αποθέματα λεκιθοπρωτεϊνών, ώστε να υποστηρίξουν τη σωστή ανάπτυξη του εμβρύου πριν η προνύμφη μπορέσει να τραφεί μόνη της. Έτσι, οι λεκιθοπρωτεΐνες που αποτελούν την κύρια θρεπτική πηγή της εμβρυογένεσης ξεκινούν να συντίθενται κατά την ωογένεση από το στάδιο 8 που είναι η αρχή της βιτελλογένεσης (Brennan et al., 1982). Η πλειονότητα των λεκιθοπρωτεϊνών συντίθεται στο λιπαρό σωμάτιο που περιβάλλει το αναπαραγωγικό όργανο (Postlethwait and Giorgi, 1985) και εκκρίνονται στην αιμολέμφο απ' όπου μεταφέρονται στο ωοκύτταρο με τη διαδικασία της ενδοκύττωσης που ονομάζεται EMY (ενδοκύτωση με μεσολάβηση υποδοχέων- Receptor-mediated endocytosis) (DiMario and Mahowald, 1987). Η εσωτερικοποίηση των λεκιθοπρωτεϊνών γίνεται μέσω σύνδεσή τους με τον υποδοχέα Yokless, ο οποίος ανακυκλώνεται στη μεμβράνη μέσω εσωτερικών μεμβρανών. Η διαταραχή της διαδικασίας αυτής από την ακτινοβολία μπορεί να έχει δυσμενείς επιπτώσεις στην εμβρυογένεση. Έτσι, τα γονιδιακά αυτά δεδομένα προσφέρουν εξήγηση για τη μειωμένη αναπαραγωγική ικανότητα που έχει δειχθεί από την ομάδα μας (Chavdoula et al., 2010; Margaritis et al., 2014). Τέλος, τα αποτελέσματα αυτά προσφέρουν εξήγηση για τις μορφολογικές αλλοιώσεις που παρατηρήθηκαν στα ακτινοβολημένα ωοθυλάκια γοριογενετικών σταδίων. Παρά το γεγονός ότι η δομή της βιτελλινικής μεμβράνης ήταν παρούσα σε όλα τα ωοθυλάκια που παρατηρήθηκαν με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης, η πλειονότητα των ακτινοβολημένων δειγμάτων (27 από τα 30 ωοθυλάκια που παρατηρήθηκαν) έφεραν δομές που ομοιάζουν με συσσωρευμένα ευδιάκριτα σε μέγεθος κυστίδια περιμετρικά του ωοκυττάρου κάτω από τη βιτελλινική μεμβράνη, τα οποία δομικά προσομοιάζουν τα βιτελλινικά σωμάτια που εναποτίθενται προς σχηματισμό της βιτελλινικής μεμβράνης. Οι παρατηρήσεις αυτές ενισχύουν την υπόθεση διαταραχής του εκκριτικού και ενδοκυτικού μηχανισμού κατά την ωογένεση γεγονός που πιθανά επηρεάζει στη συνέχεια και την εμβρυογένεση του εντόμου.

4.5 ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στη συγκεκριμένη Διδακτορική Διατριβή επιχειρήθηκε η αποσαφήνιση καίριων θεμάτων Ηλεκτρομαγνητικής Βιολογίας, τα οποία αποτελούν σημεία αιχμής για τη διαλεύκανση της επικινδυνότητας ή όχι των συσκευών ασύρματης τεχνολογίας. Επειδή οι περισσότερες μελέτες χρησιμοποιούν γεννήτριες συχνοτήτων με προσομοίωση των συμβατικών συσκευών με διαφορετικές συγνότητες, εντάσεις και πρωτόκολλα ακτινοβόλησης ,θεωρήθηκε ότι αυτό εξηγεί σε μεγάλο βαθμό την εξαγωγή αντικρουόμενων αποτελεσμάτων. Έτσι, χρησιμοποιήθηκαν συσκευές καθημερινής χρήσης, όπως το ασύρματο και κινητό τηλέφωνο και το ασύρματο δίκτυο, με σκοπό την καλύτερη προσομοίωση της έκθεσης του γενικού πληθυσμού στη συγκεκριμένη ακτινοβολία, σε ένα πρότυπο βιολογικό σύστημα, όπως το Δίπτερο έντομο Drosophila melanogaster. Συγκεκριμένα, ακτινοβολώντας ενήλικα άτομα για διαφορετικούς χρόνους, εντάσεις και διαμορφώσεις ανιχνεύθηκαν στους σωματικούς ιστούς αλλαγές στα επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου, συσσώρευση οξειδωμένων μακρομορίων κατά την in vivo γήρανση, επαγωγή στρες του Ενδοπλασματικού Δικτύου, καθώς και αλλαγές στη βιωσιμότητα των εντόμων (Εικόνα 4.1). Παράλληλα στους γαμετικούς ιστούς των θηλυκών εντόμων, ανιγνεύθηκαν αλλαγές στα επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου, αύξηση του αριθμού των αποπτωτικών ωοθυλακίων, τροποποίηση της έκφρασης γονιδίων κατά την ωογένεση και αλλοιώσεις στη μορφολογία των ωοθυλακίων (Εικόνα 4.2).



Εικόνα 4.1: Η επίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στους σωματικούς ιστούς των θηλυκών και αρσενικών εντόμων προκάλεσε διαταραχή στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό, καθώς αυξήθηκε το οξειδωτικό φορτίο (ROS, οξειδωμένα λιπίδια και πρωτεΐνες), ενώ ταυτόχρονα μειώθηκε η

αντιοζειδωτική ικανότητά τους. Η διαταραχή αυτή οδήγησε σε μείωση της βιωσιμότητάς τους. Απουσία του μεταγραφικού παράγοντα Dmp53 παρατηρήθηκε αναστροφή του φαινομένου των αυζημένων ROS και της μειωμένης βιωσιμότητας, καθιστώντας τον, ως εκ τουτού, κεντρικό ρυθμιστή του οζειδοαναγωγικού δυναμικού της Drosophila.

Τα αποτελέσματα αυτά οδήγησαν στα εξής γενικά συμπεράσματα: (1) Η ακτινοβολία αυτή δεν μπορεί να θεωρηθεί στοχευμένη, λόγω της ιδιότητάς της να απορροφάται συναρτήσει της αγωγιμότητας του ιστού, και όχι με βάση τις οπτικές ιδιότητές της, όπως συμβαίνει για παράδειγμα με το ορατό φάσμα, και συνεπώς δεν μπορεί να προσβάλλει συγκεκριμένα βιομόρια, όπως DNA, πρωτεΐνες, λιπίδια ή συγκεκριμένα οργανίδια (π.γ. μιτογόνδρια, ΕΔ, πυρήνα κ.λπ.), αλλά έγει μη μεμονωμένη, ολιστική και πολύ-επίπεδη επίδραση στα κύτταρα. (2) Οι μέγρι τώρα μελέτες, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης Διατριβής, υποδηλώνουν ότι οι παλμικές ιδιότητες της ακτινοβολίας ασύρματης τεχνολογίας (με διάρκεια παλμού μερικά κλάσματα msec και έντασης πολύ μεγαλύτερης από τη μέση τιμή που μετράται συνήθως) προκαλούν αύξηση στα επίπεδα των ROS, τροποποιώντας την περιστροφή (spin) των ηλεκτρονίων (Bioinitiative report, 2010), προκαλώντας διαταραχή στους ομοιοστατικούς μηγανισμούς και ιδιαίτερα στο οξειδοαναγωγικό σύστημα των κυττάρων. Αυτό, σε συνδυασμό με τη δυνατότητα διαταραχής της συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου, που έχει δειχθεί ότι συμβαίνει μετά από επίδραση της συγκεκριμένης ακτινοβολίας (Cig and Naziroglu, 2015), μας επιτρέπουν να προτείνουμε ότι οι ηλεκτρομαγνητικές ιδιότητες των κυμάτων επηρεάζουν, στο συγκεκριμένο πρότυπο βιολογικό σύστημα, την ισορροπία της συγκέντρωσης των δραστικών μορφών οξυγόνου, οι οποίες στη συνέχεια και ενδεχόμενα με τη συμμετοχή των ιόντων ασβεστίου προκαλούν τις διαταραχές που ανιχνεύτηκαν (π.χ. επίπεδα μεταγράφων, ΕΔ στρες, αύξηση απόπτωσης, μείωση βιωσιμότητας, κ.λπ.) και μάλιστα σε επίπεδα έντασης ακτινοβολίας συμβατά με τα «όρια ασφαλείας» που ισχύουν Διεθνώς. Εάν και κατά πόσον οι εν λόγω αλλαγές στις συγκεκριμένες συνθήκες μπορούν να έχουν επιπτώσεις σε άτομα που εκτίθενται είτε σε ακτινοβολία ασύρματου και κινητού τηλεφώνου είτε σε ακτινοβολία ασύρματου δικτύου παραμένει προς διερεύνηση. Ωστόσο, προτείνεται η εφαρμογή της «Αργής της Προφύλαξης» για την χρήση των συσκευών αυτών από το γενικό πληθυσμό και ιδιαίτερα από τις ευπαθείς ομάδες όπως τα παιδιά και οι έγκυες. Η «Αρχή της Προφύλαξης» ενσωματώθηκε στο Ευρωπαϊκό Κοινοτικό Δίκαιο (Άρθρο 130, παράγραφος 2 της Συνθήκης του Μάαστριχτ, 1992 / Άρθρο 174 της Συνθήκης του Άμστερνταμ, 1997), και ισχύει στην Ελλάδα σύμφωνα με το Άρθρο 28 περί Κανόνων του Διεθνούς Δικαίου και Διεθνών Οργανισμών.



Εικόνα 4.2: Η μη ιονίζουσα ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία αυξάνει το οξειδωτικό φορτίο των ωθυλακίων, γεγονός που οδηγεί σε τροποποίηση της γονιδιακής έκφρασής τους. Γονίδια που σχετίζονται με την απόκριση στο στρες βρέθηκαν υπερεκφρασμένα στα ακτινοβολημένα δείγματα.

Υπερέκφραση εντοπίστηκε και σε γονίδια που εμπλέκονται με τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Συνεπώς, η ανικανότητα των ωοθυλακίων να αντιμετωπίσουν το ακτινο-επαγόμενο οξειδωτικό στρες οδηγεί σε ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού. Τέλος, τροποποιήθηκε και η έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στο μηχανισμό σύνθεσης και μεταφοράς των βιομορίων, όπως οι πρωτεΐνες. Τα αποτελέσματα αυτά συνδέονται με τις δομικές αλλοιώσεις που εντοπίστηκαν στα ωοθυλάκια που αναπτύχθηκαν παρουσία ακτινοβολίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

5.1 ΔΙΕΘΝΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF, George RA, Lewis SE, Richards S, Ashburner M, Henderson SN, Sutton GG, Wortman JR, Yandell MD, Zhang Q, Chen LX, Brandon RC, Rogers YH, Blazej RG, Champe M, Pfeiffer BD, Wan KH, Doyle C, Baxter EG, Helt G, Nelson CR, Gabor GL, Abril JF, Agbayani A, An HJ, Andrews-Pfannkoch C, Baldwin D, Ballew RM, Basu A, Baxendale J, Bayraktaroglu L, Beasley EM, Beeson KY, Benos PV, Berman BP, Bhandari D, Bolshakov S, Borkova D, Botchan MR, Bouck J, Brokstein P, Brottier P, Burtis KC, Busam DA, Butler H, Cadieu E, Center A, Chandra I, Cherry JM, Cawley S, Dahlke C, Davenport LB, Davies P, de Pablos B, Delcher A, Deng Z, Mays AD, Dew I, Dietz SM, Dodson K, Doup LE, Downes M, Dugan-Rocha S, Dunkov BC, Dunn P, Durbin KJ, Evangelista CC, Ferraz C, Ferriera S, Fleischmann W, Fosler C, Gabrielian AE, Garg NS, Gelbart WM, Glasser K, Glodek A, Gong F, Gorrell JH, Gu Z, Guan P, Harris M, Harris NL, Harvey D, Heiman TJ, Hernandez JR, Houck J, Hostin D, Houston KA, Howland TJ, Wei MH, Ibegwam C, Jalali M, Kalush F, Karpen GH, Ke Z, Kennison JA, Ketchum KA, Kimmel BE, Kodira CD, Kraft C, Kravitz S, Kulp D, Lai Z, Lasko P, Lei Y, Levitsky AA, Li J, Li Z, Liang Y, Lin X, Liu X, Mattei B, McIntosh TC, McLeod MP, McPherson D, Merkulov G, Milshina NV, Mobarry C, Morris J, Moshrefi A, Mount SM, Moy M, Murphy B, Murphy L, Muzny DM, Nelson DL, Nelson DR, Nelson KA, Nixon K, Nusskern DR, Pacleb JM, Palazzolo M, Pittman GS, Pan S, Pollard J, Puri V, Reese MG, Reinert K, Remington K, Saunders RD, Scheeler F, Shen H, Shue BC, Sidén-Kiamos I, Simpson M, Skupski MP, Smith T, Spier E, Spradling AC, Stapleton M, Strong R, Sun E, Svirskas R, Tector C, Turner R, Venter E, Wang AH, Wang X, Wang ZY, Wassarman DA, Weinstock GM, Weissenbach J, Williams SM, WoodageT, Worley KC, Wu D, Yang S, Yao QA, Ye J, Yeh RF, Zaveri JS, Zhan M, Zhang G, Zhao Q, Zheng L, Zheng XH, Zhong FN, Zhong W, Zhou X, Zhu S, Zhu X, Smith HO, Gibbs RA, Myers EW, Rubin GM, Venter JC. The genome sequence of Drosophila melanogaster. Science. 2000 Mar 24;287(5461):2185-95.

Agarwal A, Desai NR, Makker K, Varghese A, Mouradi R, Sabanegh E, Sharma R. Effects of radiofrequency electromagnetic waves (RF-EMW) from cellular phones on human ejaculated semen: an in vitro pilot study. Fertil Steril. 2009 Oct;92(4):1318-25.

Al-Damegh MA. Rat testicular impairment induced by electromagnetic radiation from a conventional cellular telephone and the protective effects of the antioxidants vitamins C and E. Clinics (Sao Paulo). 2012 Jul;67(7):785-92.

Amachree D, Moody AJ, Handy RD. Comparison of intermittent and continuous exposures to inorganic mercury in the mussel, Mytilus edulis: accumulation and sub-lethal physiological effects. Ecotoxicol Environ Saf. 2014 Nov;109:133-42.

Atkey MR, Lachance JF, Walczak M, Rebello T, Nilson LA. Capicua regulates follicle cell fate in the Drosophila ovary through repression of mirror. Development. 2006 Jun;133(11):2115-23.

Atli E, Unlü H. The effects of microwave frequency electromagnetic fields on the development of Drosophila melanogaster. Int J Radiat Biol. 2006 Jun;82(6):435-41.

Avci B, Akar A, Bilgici B, Tunçel ÖK. Oxidative stress induced by 1.8 GHz radio frequency electromagnetic radiation and effects of garlic extract in rats. Int J Radiat Biol. 2012 Nov;88(11):799-805.

Ayata A, Mollaoglu H, Yilmaz HR, Akturk O, Ozguner F, Altuntas I. Oxidative stress-mediated skin damage in an experimental mobile phone model can be prevented by melatonin. J Dermatol. 2004 Nov;31(11):878-83.

Azadi Oskouyi E, Rajaei F, Safari Variani A, Sarokhani MR, Javadi A. Effects of microwaves (950 MHZ mobile phone) on morphometric and apoptotic changes of rabbit epididymis. Andrologia. 2015 Aug;47(6):700-5.

Azzam EI, Jay-Gerin JP, Pain D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. Cancer Lett. 2012 December 31; 327(0): 48–60.

Back SH, Schröder M, Lee K, Zhang K, Kaufman RJ. ER stress signaling by regulated splicing: IRE1/HAC1/XBP1. Methods. 2005 Apr;35(4):395-416.

Bahadorani S, Bahadorani P, Phillips JP, Hilliker AJ. The effects of vitamin supplementation on Drosophila life span under normoxia and under oxidative stress. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2008 Jan;63(1):35-42.

Bakhrat A, Pritchett T, Peretz G, McCall K, Abdu U. Drosophila Chk2 and p53 proteins induce stage-specific cell death independently during oogenesis. Apoptosis. 2010 Dec;15(12):1425-34.

Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. Cell. 2005 Feb 25;120(4):483-95.

Balci, M., Devrim, E., Durak, I. (2007). Effects of mobile phones on oxidant/antioxidant balance in cornea and lens of rats. Curr. Eye Res. 32:21–25.

Barrio L, Dekanty A, Milán M. MicroRNA-mediated regulation of Dp53 in the Drosophila fat body contributes to metabolic adaptation to nutrient deprivation. Cell Rep. 2014 Jul 24;8(2):528-41.

Barth JM, Szabad J, Hafen E, Köhler K. Autophagy in Drosophila ovaries is induced by starvation and is required for oogenesis. Cell Death Differ. 2011 Jun;18(6):915-24.

Bastock R, St Johnston D. Drosophila oogenesis. Curr Biol. 2008 Dec 9;18(23):R1082-7.

Baum JS, Arama E, Steller H, McCall K. The Drosophila caspases Strica and Dronc function redundantly in programmed cell death during oogenesis. Cell Death Differ. 2007 Aug;14(8):1508-17.

Baum JS, St George JP, McCall K (2005) Programmed cell death in the germline. Semin Cell Dev Biol 16:245–259

Becalska AN, Gavis ER. Lighting up mRNA localization in Drosophila oogenesis. Development. 2009 Aug;136(15):2493-503.

Belyaev, I. Dependence of non-thermal biological effects of microwaves on physical and biological variables: implications for reproducibility and safety standards. European Journal of Oncology - Library Non-Thermal Effects and Mechanisms of Interaction Between Electromagnetic Fields and Living Matter. An ICEMS Monograph. L. Giuliani and M. Soffritti. Bologna, Italy, Ramazzini Institute, http://www.icems.eu/papers.htm?f=/c/a/2009/12/15/MNHJ1B49KH.DTL. (2010) Vol. 5:187-218.

Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, Vidal MN, Nakano K, Bartrons R, Gottlieb E, Vousden KH. TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. Cell. 2006 Jul 14;126(1):107-20.

Benzie IF, Strain JJ. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods Enzymol. 1999;299:15-27.

Bialecka-Fornal M, Makushok T, Rafelski SM. A Review of Fluorescent Proteins for Use in Yeast. Methods Mol Biol. 2016;1369:309-46.

BioInitiative report: a rationale for a biologically-based public exposure standard for electromagnetic fields (ELF and RF). http://www.bioinitiative.org

Bonilla-Ramirez L, Jimenez-Del-Rio M, Velez-Pardo C. Low doses of paraquat and polyphenols prolong life span and locomotor activity in knock-down parkin Drosophila melanogaster exposed to oxidative stress stimuli: implication in autosomal recessive juvenile parkinsonism. Gene. 2013 Jan 10;512(2):355-63.

Brand AH, Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. Development. 1993 Jun;118(2):401-15.

Brennan MD, Weiner AJ, Goralski TJ, Mahowald AP. The follicle cells are a major site of vitellogenin synthesis in Drosophila melanogaster. Dev Biol. 1982 Jan;89(1):225-36.

Brescia F, Sarti M, Massa R, Calabrese ML, Sannino A, Scarfi MR. Reactive oxygen species formation is not enhanced by exposure to UMTS 1950 MHz radiation and co-exposure to ferrous ions in Jurkat cells. Bioelectromagnetics. 2009 Oct;30(7):525-35.

Brodsky MH, Weinert BT, Tsang G, Rong YS, McGinnis NM, Golic KG, Rio DC, Rubin GM. Drosophila melanogaster MNK/Chk2 and p53 regulate multiple DNA repair and apoptotic pathways following DNA damage. Mol Cell Biol. 2004 Feb;24(3):1219-31.

Burlaka A, Selyuk M, Gafurov M, Lukin S, Potaskalova V, Sidorik E. Changes in mitochondrial functioning with electromagnetic radiation of ultra high frequency as revealed by electron paramagnetic resonance methods. Int J Radiat Biol. 2014 May;90(5):357-62.

Burlaka A, Tsybulin O, Sidorik E, Lukin S, Polishuk V, Tsehmistrenko S, Yakymenko I. Overproduction of free radical species in embryonal cells exposed to low intensity radiofrequency radiation. Exp Oncol. 2013 Sep;35(3):219-25.

Campisi A, Gulino M, Acquaviva R, Bellia P, Raciti G, Grasso R, Musumeci F, Vanella A, Triglia A. Reactive oxygen species levels and DNA fragmentation on astrocytes in primary culture after acute exposure to low intensity microwave electromagnetic field. Neurosci Lett. 2010 Mar 31;473(1):52-5.

Campos-Ortega, J.A. and V. Hartenstein. 1985. The Embryonic Development of Drosophila melanogaster. Springer-Verlag, Berlin.

Cao SS, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in cell fate decision and human disease. Antioxid Redox Signal. 2014 Jul 20;21(3):396-413.

Chatgilialoglu C, O'Neill P. Free radicals associated with DNA damage. Exp. Gerontol. 2001;36:1459–1471.

Chavdoula ED, Panagopoulos DJ, Margaritis LH. Comparison of biological effects between continuous and intermittent exposure to GSM-900-MHz mobile phone radiation: Detection of apoptotic cell-death features. Mutat Res. 2010 Jul 19;700(1-2):51-61.

Çiğ B, Nazıroğlu M. Investigation of the effects of distance from sources on apoptosis, oxidative stress and cytosolic calcium accumulation via TRPV1 channels induced by mobile phones and Wi-Fi in breast cancer cells. Biochim Biophys Acta. 2015 Oct;1848(10 Pt B):2756-65.

Commoner B, Townsend J, Pake GE. Free radicals in biological materials. Nature. 1954 Oct 9;174(4432):689-91.

Csala M, Margittai E, Bánhegyi G. Redox control of endoplasmic reticulum function. Antioxid Redox Signal. 2010 Jul 1;13(1):77-108.

d'Ambrosio G, Massa R, Scarfi MR, Zeni O. Cytogenetic damage in human lymphocytes following GMSK phase modulated microwave exposure. Bioelectromagnetics. 2002 Jan;23(1):7-13.

Dasdag S, Akdag MZ, Kizil G, Kizil M, Cakir DU, Yokus B. Effect of 900 MHz radio frequency radiation on beta amyloid protein, protein carbonyl, and malondialdehyde in the brain. Electromagn Biol Med. 2012 Mar;31(1):67-74.

Dasdag S, Akdag MZ, Ulukaya E, Uzunlar AK, Ocak AR. Effect of mobile phone exposure on apoptotic glial cells and status of oxidative stress in rat brain. Electromagn Biol Med. 2009;28(4):342-54.

Dasdag S, Zulkuf Akdag M, Aksen F, Yilmaz F, Bashan M, Mutlu Dasdag M, Salih Celik M. Whole body exposure of rats to microwaves emitted from a cell phone does not affect the testes. Bioelectromagnetics. 2003 Apr;24(3):182-8.

De Iuliis GN, Newey RJ, King BV, Aitken RJ. Mobile phone radiation induces reactive oxygen species production and DNA damage in human spermatozoa in vitro. PLoS One. 2009 Jul 31;4(7):e6446.

Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. Biochem. J. 1997;324:1–18.

Del Vecchio G, Giuliani A, Fernandez M, Mesirca P, Bersani F, Pinto R, Ardoino L, Lovisolo GA, Giardino L, Calzà L. Effect of radiofrequency electromagnetic field exposure on in vitro models of neurodegenerative disease. Bioelectromagnetics. 2009 Oct;30(7):564-72.

Demirel S, Doganay S, Turkoz Y, Dogan Z, Turan B, Firat PG. Effects of third generation mobile phone-emitted electromagnetic radiation on oxidative stress parameters in eye tissue and blood of rats. Cutan Ocul Toxicol. 2012 Jun;31(2):89-94.

<u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>

Deng W, Lin H. Asymmetric germ cell division and oocyte determination during Drosophila oogenesis. Int Rev Cytol. 2001;203:93-138.

Denton D, Xu T, Kumar S. Autophagy as a pro-death pathway. Immunol Cell Biol. 2015 Jan;93(1):35-42.

Diem E, Schwarz C, Adlkofer F, Jahn O, Rüdiger H. Non-thermal DNA breakage by mobilephone radiation (1800 MHz) in human fibroblasts and in transformed GFSH-R17 rat granulosa cells in vitro. Mutat Res. 2005 Jun 6;583(2):178-83.

DiMario PJ, Mahowald AP. Female sterile (1) yolkless: a recessive female sterile mutation in Drosophila melanogaster with depressed numbers of coated pits and coated vesicles within the developing oocytes. J Cell Biol. 1987 Jul;105(1):199-206.

Dogan M, Turtay MG, Oguzturk H, Samdanci E, Turkoz Y, Tasdemir S, Alkan A, Bakir S. Effects of electromagnetic radiation produced by 3G mobile phones on rat brains: magnetic resonance spectroscopy, biochemical, and histopathological evaluation. Hum Exp Toxicol. 2012 Jun;31(6):557-64.

Dringen R, Brandmann M, Hohnholt MC, Blumrich EM. Glutathione-Dependent Detoxification Processes in Astrocytes. Neurochem Res. 2014 Nov 27. [Epub ahead of print]

Drummond-Barbosa D, Spradling AC. Stem cells and their progeny respond to nutritional changes during Drosophila oogenesis. Dev Biol. 2001 Mar 1;231(1):265-78.

Edge R, McGarvey DJ, Truscott TG. The carotenoids as antioxidants– A review. J Photochem Photobiol B 1997, 41:189–200.

El Kholy SE, El Husseiny EM. Effect of 60 minutes exposure to electromagnetic field on fecundity, learning and memory, speed of movement and whole body protein of the fruit fly Drosophila melanogaster. J Egypt Soc Parasitol. 2012 Dec;42(3):639-48.

Eletto D, Chevet E, Argon Y, Appenzeller-Herzog C. Redox controls UPR to control redox. J Cell Sci. 2014 Sep 1;127(Pt 17):3649-58.

Espinosa-Diez C, Miguel V, Mennerich D, Kietzmann T, Sánchez-Pérez P, Cadenas S, Lamas S. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. Redox Biol. 2015 Jul 21;6:183-197.

Essmann F, Pohlmann S, Gillissen B, Daniel PT, Schulze-Osthoff K, Jänicke RU. Irradiationinduced translocation of p53 to mitochondria in the absence of apoptosis. J Biol Chem. 2005 Nov 4;280(44):37169-77.

Etchegaray JI, Timmons AK, Klein AP, Pritchett TL, Welch E, Meehan TL, Li C, McCall K. Draper acts through the JNK pathway to control synchronous engulfment of dying germline cells by follicular epithelial cells. Development. 2012 Nov;139(21):4029-39.

Fagotto F. Regulation of yolk degradation, or how to make sleepy lysosomes. J Cell Sci. 1995 Dec;108 (Pt 12):3645-7.

Falzone N, Huyser C, Fourie F, Toivo T, Leszczynski D, Franken D. In vitro effect of pulsed 900 MHz GSM radiation on mitochondrial membrane potential and motility of human spermatozoa. Bioelectromagnetics. 2008 May;29(4):268-76.

Fang YZ, Yang S, Wu GY. Free radicals, antioxidants, and nutrition. Nutrition 2002, 18:872–879.

Fedtke N, Boucheron JA, Walker VE, Swenberg JA. Vinyl chloride-induced DNA adducts. 2. Formation and persistence of 7-2'-oxoethylguanine and n2, 3-ethenoguanine in rat-tissue DNA. Carcinogenesis 1990, 11:1287–1292.

Ferreira AR, Bonatto F, de Bittencourt Pasquali MA, Polydoro M, Dal-Pizzol F, Fernández C, de Salles AA, Moreira JC. Bioelectromagnetics. 2006a Sep;27(6):487-93.

Ferreira AR, Knakievicz T, Pasquali MA, Gelain DP, Dal-Pizzol F, Fernández CE, de Salles AA, Ferreira HB, Moreira JC. Life Sci. 2006b Dec 3;80(1):43-50. Epub 2006 Aug 23.

Ultra high frequency-electromagnetic field irradiation during pregnancy leads to an increase in erythrocytes micronuclei incidence in rat offspring.

Oxidative stress effects on the central nervous system of rats after acute exposure to ultra high frequency electromagnetic fields.

Fink SP, Reddy GR, Marnett LJ. Mutagenicity in Escherichia coli of the major DNA adduct derived from the endogenous mutagen malondialdehyde. Proc Natl Acad Sci USA 1997, 94:8652–8657.

Fischer JA, Giniger E, Maniatis T, Ptashne M. GAL4 activates transcription in Drosophila. Nature. 1988 Apr 28;332(6167):853-6.

Franzellitti S, Valbonesi P, Ciancaglini N, Biondi C, Contin A, Bersani F, Fabbri E. Transient DNA damage induced by high-frequency electromagnetic fields (GSM 1.8 GHz) in the human trophoblast HTR-8/SVneo cell line evaluated with the alkaline comet assay. Mutat Res. 2010 Jan 5;683(1-2):35-42.

Fredriksson Å, Johansson Krogh E, Hernebring M, Pettersson E, Javadi A, Almstedt A, Nyström T. Effects of aging and reproduction on protein quality control in soma and gametes of Drosophila melanogaster. Aging Cell. 2012 Aug;11(4):634-43.

Friedman J, Kraus S, Hauptman Y, Schiff Y, Seger R. Mechanism of short-term ERK activation by electromagnetic fields at mobile phone frequencies. Biochem J. 2007 Aug 1;405(3):559-68.

Fu XL, Gao DS. Endoplasmic reticulum proteins quality control and the unfolded protein response: the regulative mechanism of organisms against stress injuries. Biofactors. 2014 Nov-Dec;40(6):569-85.

Fuchs Y, Steller H. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. Nat Rev Mol Cell Biol. 2015 Jun;16(6):329-44.

Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Nuñez G, Peter ME, Piacentini M, Rubinsztein DC, Shi Y, Simon HU, Vandenabeele P, White E, Yuan J, Zhivotovsky B, Melino G, Kroemer G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. Cell Death Differ. 2012 Jan;19(1):107-20.

Giorgi F, Deri P. Cell death in ovarian chambers of Drosophila melanogaster. J Embryol Exp Morphol. 1976 Jun;35(3):521-33.

Glorieux C, Zamocky M, Sandoval JM, Verrax J, Calderon PB. Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. Free Radic Biol Med. 2015 Jun 25;87:84-97.

González-Reyes A, Elliott H, St Johnston D. Oocyte determination and the origin of polarity in Drosophila: the role of the spindle genes. Development. 1997 Dec;124(24):4927-37.

Görlach A, Dimova EY, Petry A, Martínez-Ruiz A, Hernansanz-Agustín P, Rolo AP, Palmeira CM, Kietzmann T. Reactive oxygen species, nutrition, hypoxia and diseases: Problems solved? Redox Biol. 2015 Aug 28;6:372-385.

Griffiths HR, Lunec J. Ascorbic acid in the 21st century - more than a simple antioxidant. Environ Toxicol Pharmacol. 2001 Sep;10(4):173-82.

Grotto D, Santa Maria L, Valentini J, Paniz C, Schmitt G, Garcia CS, Pomblum VJ, Rocha JB, Farina M. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. Quim Nova, Vol. 32, No. 1, 169-174, 2009.

Gurisik E, Warton K, Martin DK, Valenzuela SM. 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. 2006 Oct;30(10):793-9. Epub 2006 Jun 30.

Güler G, Tomruk A, Ozgur E, Sahin D, Sepici A, Altan N, Seyhan N. The effect of radiofrequency radiation on DNA and lipid damage in female and male infant rabbits. Int J Radiat Biol. 2012 Apr;88(4):367-73.

Gupta P, Kumar PR. (2000) The capacity of wireless networks. IEEE Transactions on Information Theory, vol. IT-46, no. 2, pp. 388-404.

Guzy RD, Schumacker PT. (2006). Oxygen sensing by mitochondria at complex III: The paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. Exp. Physiol. 91:807–819.

Harman DJ. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. J Gerontol. 1956 Jul;11(3):298-300.

He Y, Jasper H. Studying aging in Drosophila. Methods. 2014 Jun 15;68(1):129-33. doi: 10.1016/j.ymeth.2014.04.008. Epub 2014 Apr 18.

Helfand SL, Rogina B. Genetics of aging in the fruit fly, Drosophila melanogaster. Annu Rev Genet. 2003;37:329-48.

Hook GJ, Spitz DR, Sim JE, Higashikubo R, Baty JD, Moros EG, Roti Roti JL. Evaluation of parameters of oxidative stress after in vitro exposure to FMCW- and CDMA-modulated radiofrequency radiation fields. Radiat Res. 2004 Nov;162(5):497-504.

Hou Q, Wang M, Wu S, Ma X, An G, Liu H, Xie F. Oxidative changes and apoptosis induced by 1800-MHz electromagnetic radiation in NIH/3T3 cells. Electromagn Biol Med. 2015 Mar;34(1):85-92.

Hou YC, Chittaranjan S, Barbosa SG, McCall K, Gorski SM. Effector caspase Dcp-1 and IAP protein Bruce regulate starvation-induced autophagy during Drosophila melanogaster oogenesis. J Cell Biol. 2008 Sep 22;182(6):1127-39.

Huynh JR, St Johnston D. The origin of asymmetry: early polarisation of the Drosophila germline cyst and oocyte. Curr Biol. 2004 Jun 8;14(11):R438-49.

ICNIRP. Guide lines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic and electromagnetic fields (up to 300 GHz). Health Phys. 199874:494–522.

Ilhan A, Gurel A, Armutcu F, Kamisli S, Iraz M, Akyol O, Ozen S. Ginkgo biloba prevents mobile phone-induced oxidative stress in rat brain. Clin Chim Acta. 2004 Feb;340(1-2):153-62.

Inoue, M., Sato, E. F., Nishikawa, M., et al. (2003). Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. Curr. Med. Chem. 10:2495–2505.

Jenkins VK, Timmons AK, McCall K. Diversity of cell death pathways: insight from the fly ovary. Trends Cell Biol. 2013 Nov;23(11):567-74.

Jin S, Martinek S, Joo WS, Wortman JR, Mirkovic N, Sali A, Yandell MD, Pavletich NP, Young MW, Levine AJ. Identification and characterization of a p53 homologue in Drosophila melanogaster. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Jun 20;97(13):7301-6.

Jing J, Yuhua Z, Xiao-qian Y, Rongping J, Dong-mei G, Xi C. The influence of microwave radiation from cellular phone on fetal rat brain. Electromagn Biol Med. 2012 Mar;31(1):57-66.

Kahya MC, Nazıroğlu M, Çiğ B. Selenium reduces mobile phone (900 MHz)-induced oxidative stress, mitochondrial function, and apoptosis in breast cancer cells. Biol Trace Elem Res. 2014 Aug;160(2):285-93.

Kang KA, Lee HC, Lee JJ, Hong MN, Park MJ, Lee YS, Choi HD, Kim N, Ko YG, Lee JS. Effects of combined radiofrequency radiation exposure on levels of reactive oxygen species in neuronal cells. J Radiat Res. 2014 Mar 1;55(2):265-76.

Kapelnikov A, Zelinger E, Gottlieb Y, Rhrissorrakrai K, Gunsalus KC, Heifetz Y. Mating induces an immune response and developmental switch in the Drosophila oviduct. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Sep 16;105(37):13912-7.

Kapuscinski J, Darzynkiewicz Z. Spectral properties of fluorochromes used in flow cytometry. Methods Cell Biol. 1990;33:655-69.

Kaufman RJ, Malhotra JD. Calcium trafficking integrates endoplasmic reticulum function with mitochondrial bioenergetics. Biochim Biophys Acta. 2014 Oct;1843(10):2233-9.

Kesari KK, Kumar S, Behari J. 900-MHz microwave radiation promotes oxidation in rat brain. Electromagn Biol Med. 2011 30(4):219-34.

Khalil AM, Abu Khadra KM, Aljaberi AM, Gagaa MH, Issa HS. Assessment of oxidant/antioxidant status in saliva of cell phone users. Electromagn Biol Med. 2014 Jun;33(2):92-7. doi: 10.3109/15368378.2013.783855. Epub 2013 Jun 19.

Kikusato M, Yoshida H, Furukawa K, Toyomizu M. Effect of heat stress-induced production of mitochondrial reactive oxygen species on NADPH oxidase and heme oxygenase-1 mRNA levels in avian muscle cells. J Therm Biol. 2015 Aug;52:8-13.

Kim M, Han CH, Lee MY. NADPH oxidase and the cardiovascular toxicity associated with smoking. Toxicol Res. 2014 Sep;30(3):149-57.

Kim MJ, Johnson WA. ROS-mediated activation of Drosophila larval nociceptor neurons by UVC irradiation. BMC Neurosci. 2014 Jan 16;15:14.

King RC. Origin and development of the egg chamber within the adult ovarioles. In: Ovarian Development in Drosophila melanogaster. London: Academic Press, New York, pp. 35-84, 1970.

Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G; Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Cell Death Differ. 2009 Jan;16(1):3-11.

Kugler JM, Lasko P. Localization, anchoring and translational control of oskar, gurken, bicoid and nanos mRNA during Drosophila oogenesis. Fly (Austin). 2009 Jan-Mar;3(1):15-28.

Kupsco A, Schlenk D. Oxidative stress, unfolded protein response, and apoptosis in developmental toxicity. Int Rev Cell Mol Biol. 2015;317:1-66.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.

Lane RK, Hilsabeck T, Rea SL. The role of mitochondrial dysfunction in age-related diseases. Biochim Biophys Acta. 2015 Nov;1847(11):1387-400.

Lantow M, Lupke M, Frahm J, Mattsson MO, Kuster N, Simko M. ROS release and Hsp70 expression after exposure to 1,800 MHz radiofrequency electromagnetic fields in primary human monocytes and lymphocytes. Radiat Environ Biophys. 2006a May;45(1):55-62.

Lantow M, Schuderer J, Hartwig C, Simkó M. Free radical release and HSP70 expression in two human immune-relevant cell lines after exposure to 1800 MHz radiofrequency radiation. Radiat Res. 2006b Jan;165(1):88-94.

Laundrie B, Peterson JS, Baum JS, Chang JC, Fileppo D, Thompson SR, McCall K. Germline cell death is inhibited by P-element insertions disrupting the dcp-1/pita nested gene pair in Drosophila. Genetics. 2003 Dec;165(4):1881-8.

Le Bourg E. Oxidative stress, aging and longevity in Drosophila melanogaster. FEBS Lett. 2001 Jun 8;498(2-3):183-6.

Lee KS, Choi JS, Hong SY, Son TH, Yu K. Mobile phone electromagnetic radiation activates MAPK signaling and regulates viability in Drosophila. Bioelectromagnetics. 2008 Jul;29(5):371-9.

Lefevre GJr, Jonsson UB. Sperm Transfer, Storage, Displacement, and Utilization in Drosophila Melanogaster. Genetics. 1962 December; 47(12): 1719–1736.

LeMosy EK. Pattern formation: the eggshell holds the cue. Curr Biol. 2003 Jul 1;13(13):R508-10.

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Methods Enzymol. 1990;186:464-78.

Levine RL, Stadtman ER. Oxidative modification of proteins during aging. Exp. Gerontol. 2001;36:1495–1502.

Liu B, Chen Y, St Clair DK. ROS and p53: a versatile partnership. Free Radic Biol Med. 2008 Apr 15;44(8):1529-35.

Liu C, Duan W, Xu S, Chen C, He M, Zhang L, Yu Z, Zhou Z. Exposure to 1800 MHz radiofrequency electromagnetic radiation induces oxidative DNA base damage in a mouse spermatocyte-derived cell line. Toxicol Lett. 2013 Mar 27;218(1):2-9.

Liu D, Xu Y. p53, oxidative stress, and aging. Antioxid Redox Signal. 2011 Sep 15;15(6):1669-78.

Liu Y, Fiskum G, Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. J Neurochem. 2002 Mar;80(5):780-7.

Lu J, Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system. Free Radic Biol Med. 2014 Jan;66:75-87.

Lu YS, Huang BT, Huang YX. Reactive oxygen species formation and apoptosis in human peripheral blood mononuclear cell induced by 900 MHz mobile phone radiation. Oxid Med Cell Longev. 2012;2012:740280.

Luukkonen J, Hakulinen P, Mäki-Paakkanen J, Juutilainen J, Naarala J. Enhancement of chemically induced reactive oxygen species production and DNA damage in human SH-SY5Y neuroblastoma cells by 872 MHz radiofrequency radiation. Mutat Res. 2009 Mar 9;662(1-2):54-8.

Luukkonen J, Juutilainen J, Naarala J. Combined effects of 872 MHz radiofrequency radiation and ferrous chloride on reactive oxygen species production and DNA damage in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. Bioelectromagnetics. 2010 Sep;31(6):417-24. doi: 10.1002/bem.20580.

Lynch JA, Roth S. The evolution of dorsal–ventral patterning mechanisms in insects. Genes Dev. 2011 January 15; 25(2): 107–118.

Maier CM, Chan PH. Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. Neuroscientist. 2002 Aug;8(4):323-34.

Mailankot M, Kunnath AP, Jayalekshmi H, Koduru B, Valsalan R. 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). 2009;64(6):561-5.

Mancuso M, Pasquali E, Braga-Tanaka Iii I, Tanaka S, Pannicelli A, Giardullo P, Pazzaglia S, Tapio S, Atkinson MJ, Saran A. Acceleration of atherogenesis in ApoE-/- mice exposed to acute or low-dose-rate ionizing radiation. Oncotarget. 2015 Oct 13;6(31):31263-71.

Margaritis LH. Structure and physiology of the eggshell. In: Comprehensive Insect Biochemistry, Physiology and Pharmacology. (Gilbert LI, Kerkut, G.A. ed.). Oxford and New York: Pergammon Press, pp. 151-230. 1985.

Margaritis L.H. The eggshell of Drosophila melanogaster. New staging characteristics and fine structural analysis of choriogenesis. Canadian Journal of Zoology: 2152-2175. 1986.

Margaritis LH, Kafatos FC, Petri WH. The eggshell of Drosophila melanogaster. I. Fine structure of the layers and regions of the wild-type eggshell. J Cell Sci. 1980 Jun;43:1-35.

Margaritis LH, Manta AK, Kokkaliaris KD, Schiza D, Alimisis K, Barkas G, Georgiou E, Giannakopoulou O, Kollia I, Kontogianni G, Kourouzidou A, Myari A, Roumelioti F, Skouroliakou A, Sykioti V, Varda G, Xenos K, Ziomas K. Drosophila oogenesis as a bio-marker responding to EMF sources. Electromagn Biol Med. 2014 Sep;33(3):165-89.

Margolis J, Spradling A. Identification and behavior of epithelial stem cells in the Drosophila ovary. Development. 1995 Nov;121(11):3797-807.

Marjanovic AM, Pavicic I, Trosic I. Cell oxidation-reduction imbalance after modulated radiofrequency radiation. Electromagn Biol Med. 2015 Dec;34(4):381-6.

Marnett LJ, Riggins JN, West JD. Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. J Clin Invest. 2003 Mar;111(5):583-93.

Marnett LJ. Lipid peroxidation – DNA damage by malondialdehyde. Mut Res Fund Mol Mech Mutagen 1999, 424:83–95

Masella R, Di Benedetto R, Varì R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. J Nutr Biochem. 2005 Oct;16(10):577-86.

Mazzalupo S, Cooley L. Illuminating the role of caspases during Drosophila oogenesis. Cell Death Differ. 2006 Nov;13(11):1950-9.

McCall K Eggs over easy: cell death in the Drosophila ovary. Dev Biol. 2004 Oct 1;274(1):3-14.

McGuire SE, Roman G, Davis RL. Gene expression systems in Drosophila: a synthesis of time and space. Trends Genet. 2004 Aug;20(8):384-91.

McLaughlin JM, Bratu DP. Drosophila melanogaster Oogenesis: An Overview. Methods Mol Biol. 2015;1328:1-20.

Meena R, Kumari K, Kumar J, Rajamani P, Verma HN, Kesari KK. Therapeutic approaches of melatonin in microwave radiations-induced oxidative stress-mediated toxicity on male fertility pattern of Wistar rats. Electromagn Biol Med. 2014 Jun;33(2):81-91.

Mehrotra S, Maqbool SB, Kolpakas A, Murnen K, Calvi BR. Endocycling cells do not apoptose in response to DNA rereplication genotoxic stress. Genes Dev. 2008 Nov 15;22(22):3158-71.

Monks J, Bharghavan V, Hwu WM. A power controlled multiple access protocol for wireless packet networks, in Proceedings of the IEEE Infocom, Anchorage, Alaska, USA, IEEE. 2001.
Motawi TK, Darwish HA, Moustafa YM, Labib MM. Biochemical modifications and neuronal damage in brain of young and adult rats after long-term exposure to mobile phone radiations. Cell Biochem Biophys. 2014 Nov;70(2):845-55.

Nazıroğlu M, Ciğ B, Doğan S, Uğuz AC, Dilek S, Faouzi D. 2.45-Gz wireless devices induce oxidative stress and proliferation through cytosolic Ca²⁺ influx in human leukemia cancer cells. Int J Radiat Biol. 2012 Jun;88(6):449-56.

Nezis IP, Lamark T, Velentzas AD, Rusten TE, Bjørkøy G, Johansen T, Papassideri IS, Stravopodis DJ, Margaritis LH, Stenmark H, Brech A. Cell death during Drosophila melanogaster early oogenesis is mediated through autophagy. Autophagy. 2009 Apr;5(3):298-302.

Nezis IP, Shravage BV, Sagona AP, Johansen T, Baehrecke EH, Stenmark H. Autophagy as a trigger for cell death: autophagic degradation of inhibitor of apoptosis dBruce controls DNA fragmentation during late oogenesis in Drosophila. Autophagy. 2010 Nov;6(8):1214-5.

Nezis IP, Stravopodis DJ, Margaritis LH, Papassideri IS. Autophagy is required for the degeneration of the ovarian follicular epithelium in higher Diptera. Autophagy. 2006b Oct-Dec;2(4):297-8.

Nezis IP, Stravopodis DJ, Margaritis LH, Papassideri IS. Chromatin condensation of ovarian nurse and follicle cells is regulated independently from DNA fragmentation during Drosophila late oogenesis. Differentiation. 2006a Jul;74(6):293-304.

Nezis IP, Stravopodis DJ, Papassideri I, Robert-Nicoud M, Margaritis LH. Dynamics of apoptosis in the ovarian follicle cells during the late stages of Drosophila oogenesis. Cell Tissue Res. 2002 Mar;307(3):401-9.

Nezis IP, Stravopodis DJ, Papassideri I, Robert-Nicoud M, and Margaritis LH: Stage-specific apoptotic patterns during Drosophila oogenesis. Eur J Cell Biol 79: 610-620, 2000.

Ni S, Yu Y, Zhang Y, Wu W, Lai K, Yao K. Study of oxidative stress in human lens epithelial cells exposed to 1.8 GHz radiofrequency fields. PLoS One. 2013 Aug 26;8(8):e72370.

Niedzwiecki A, Reveillaud I, Fleming JE. Changes in superoxide dismutase and catalase in aging heat-shocked Drosophila. Free Radic Res Commun. 1992;17(6):355-67.

Niu Y, Zhang X, Zheng Y, Zhang R. XRCC1 deficiency increased the DNA damage induced by γ -ray in HepG2 cell: Involvement of DSB repair and cell cycle arrest. Environ Toxicol Pharmacol. 2013 Sep;36(2):311-9.

Ntzouni MP, Skouroliakou A, Kostomitsopoulos N, Margaritis LH. Transient and cumulative memory impairments induced by GSM 1.8 GHz cell phone signal in a mouse model. Electromagn Biol Med. 2013 Mar;32(1):95-120.

Ollmann M, Young LM, Di Como CJ, Karim F, Belvin M, Robertson S, Whittaker K, Demsky M, Fisher WW, Buchman A, Duyk G, Friedman L, Prives C, Kopczynski C. Drosophila p53 is a structural and functional homolog of the tumor suppressor p53. Cell. 2000 Mar 31;101(1):91-101.

Panagopoulos DJ, Chavdoula ED, Nezis IP, Margaritis LH. Cell death induced by GSM 900-MHz and DCS 1800-MHz mobile telephony radiation. Mutat Res. 2007 Jan 10;626(1-2):69-78.

Panagopoulos DJ, Karabarbounis A, Margaritis LH. Effect of GSM 900MHz mobile phone radiation on the reproductive capacity of Drosophila Melanogaster. Electromagn. Biol. Med. 2004 23:29-43

Pannkuk EL, Laiakis EC, Authier S, Wong K, Fornace AJ Jr. Global Metabolomic Identification of Long-Term Dose-Dependent Urinary Biomarkers in Nonhuman Primates Exposed to Ionizing Radiation. Radiat Res. 2015 Aug;184(2):121-33.

Paparini A, Rossi P, Gianfranceschi G, Brugaletta V, Falsaperla R, De Luca P, Romano Spica V. No evidence of major transcriptional changes in the brain of mice exposed to 1800 MHz GSM signal. Bioelectromagnetics. 2008 May;29(4):312-23.

Papassideri IS, Margaritis LH, Gulik-Krzywicki T. The eggshell of Drosophila melanogaster. VIII. Morphogenesis of the wax layer during oogenesis. Tissue Cell. 1993 Dec;25(6):929-36.

Papassideri IS, Margaritis LH. The eggshell of Drosophila melanogaster: IX. Synthesis and morphogenesis of the innermost chorionic layer. Tissue Cell. 1996 Aug;28(4):401-9.

Papassideri IS, Trougakos IP, Leonard KR, Margaritis LH. Crystalline yolk spheroids in Drosophila melanogaster oocyte: freeze fracture and two-dimensional reconstruction analysis. J Insect Physiol. 2007 Apr;53(4):370-6.

Parashar V, Frankel S, Lurie AG, Rogina B. The effects of age on radiation resistance and oxidative stress in adult Drosophila melanogaster. Radiat Res. 2008 Jun;169(6):707-11.

Partridge L, Green AW, Fowler K. Effects of egg-production and of exposure to males on female survival in Drosophila melanogaster. J. Insect Physiol. Vol. 33, No. 10, pp. 145-749, 1987

Persson BR, Salford LG, Brun A. Blood-brain barrier permeability in rats exposed to electromagnetic fields used in wireless communication. Wireless Networks 3:455–461, 1997.

Peterson JS, Barkett M, McCall K. Stage-specific regulation of caspase activity in drosophila oogenesis. Dev Biol. 2003 Aug 1;260(1):113-23.

Peterson JS, Bass BP, Jue D, Rodriguez A, Abrams JM, McCall K. Noncanonical cell death pathways act during Drosophila oogenesis. Genesis. 2007 Jun;45(6):396-404.

Peterson JS, McCall K. Combined inhibition of autophagy and caspases fails to prevent developmental nurse cell death in the Drosophila melanogaster ovary. PLoS One. 2013 Sep 30;8(9):e76046.

Petri WH, Wyman AR, Kafatos FC. Specific protein synthesis in cellular differentiation. III. The eggshell proteins of Drosophila melanogaster and their program of synthesis. Dev Biol. 1976 Mar;49(1):185-99.

Pilla AA. Electromagnetic fields instantaneously modulate nitric oxide signaling in challenged biological systems. Biochem Biophys Res Commun. 2012 Sep 28;426(3):330-3.

Postlethwait JH, Giorgi F. Vitellogenesis in insects. Dev Biol (N Y 1985). 1985;1:85-126.

Poulletier de Gannes F, Haro E, Hurtier A, Taxile M, Ruffié G, Billaudel B, Veyret B, Lagroye I. Effect of exposure to the edge signal on oxidative stress in brain cell models. Radiat Res. 2011 Feb;175(2):225-30.

Pritchett TL, McCall K. Role of the insulin/Tor signaling network in starvation-induced programmed cell death in Drosophila oogenesis. Cell Death Differ. 2012 Jun;19(6):1069-79.

Pritchett TL, Tanner EA, McCall K. Cracking open cell death in the Drosophila ovary. Apoptosis. 2009 Aug;14(8):969-79.

Rainbolt TK, Saunders JM, Wiseman RL. Stress-responsive regulation of mitochondria through the ER unfolded protein response. Trends Endocrinol Metab. 2014 Oct;25(10):528-37.

Reiter LT, Potocki L, Chien S, Gribskov M, Bier E. A systematic analysis of human diseaseassociated gene sequences in Drosophila melanogaster. Genome Res. 2001 Jun;11(6):1114-25.

Rubin T, Huynh JR. Mosaic Analysis in the Drosophila melanogaster Ovary. Methods Mol Biol. 2015;1328:29-55.

Sagioglou NE, Manta AK, Giannarakis IK, Skouroliakou AS, Margaritis LH. Apoptotic cell death during Drosophila oogenesis is differentially increased by electromagnetic radiation depending on modulation, intensity and duration of exposure. Electromagn Biol Med. 2015 Aug 21:1-14.

Saikhedkar N, Bhatnagar M, Jain A, Sukhwal P, Sharma C, Jaiswal N. Effects of mobile phone radiation (900 MHz radiofrequency) on structure and functions of rat brain. Neurol Res. 2014 Dec;36(12):1072-9.

Salmon AB, Marx DB, Harshman LG. A cost of reproduction in Drosophila melanogaster: stress susceptibility. Evolution. 2001 Aug;55(8):1600-8.

Sang JH, King RC. Nutritional requirements of axenically cultured Drosophila melanogaster adults. J. Exp. Biol., 38 (1961), pp. 793–809

Sastre J, Pallardó FV, Viña J. Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. IUBMB Life. 2000 May;49(5):427-35.

Schwartz NU, Zhong L, Bellemer A, Tracey WD. Egg laying decisions in Drosophila are consistent with foraging costs of larval progeny. PLoS One. 2012;7(5):e37910.

Sefidbakht Y, Moosavi-Movahedi AA, Hosseinkhani S, Khodagholi F, Torkzadeh-Mahani M, Foolad F, Faraji-Dana R. Effects of 940 MHz EMF on bioluminescence and oxidative response of stable luciferase producing HEK cells. Photochem Photobiol Sci. 2014 Jul;13(7):1082-92.

Sehitoglu I, Tumkaya L, Kalkan Y, Bedir R, Cure MC, Zorba OU, Cure E, Yuce S. Biochemical and histopathological effects on the rat testis after exposure to electromagnetic field during fetal period. Arch Esp Urol. 2015 Jul-Aug;68(6):562-8.

Sekijima M, Takeda H, Yasunaga K, Sakuma N, Hirose H, Nojima T, Miyakoshi J. 2-GHz band CW and W-CDMA modulated radiofrequency fields have no significant effect on cell proliferation and gene expression profile in human cells. J Radiat Res. 2010;51(3):277-84.

Sena LA, Chandel NS. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. Mol Cell.

Shahin S, Singh VP, Shukla RK, Dhawan A, Gangwar RK, et al. 2.45 GHz microwave irradiation-induced oxidative stress affects implantation or pregnancy in mice, Mus musculus. Appl. Biochem. Biotechnol. 2013 169(5):1727–1751.

Shen X, Zhang K, Kaufman RJ. The unfolded protein response--a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum. J Chem Neuroanat. 2004 Sep;28(1-2):79-92.

Sies H, Oxidative stress: introductory remarks, in: H. Sies (Ed.), Oxidative Stress, Academic Press, London, 1985, pp. 1–8.

Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. Redox Biol. 2015;4:180-3.

Singh PK, Krishnan S. Vitamin E Analogs as Radiation Response Modifiers. Evid Based Complement Alternat Med. 2015;2015:741301.

Singh R, Leuratti C, Josyula S, Sipowicz MA, Diwan BA, Kasprzak KS, Schut HA, Marnett LJ, Anderson LM, Shuker DE. Lobe-specific increases in malondialdehyde DNA adduct formation in the livers of mice following infection with Helicobacter hepaticus. Carcinogenesis. 2001 Aug;22(8):1281-7.

Slack JMW. Essential Developmental Biology. 2nd Edittion. John Wiley & Sons, Mar 12th, 2009

Sohal RS, Orr WC, 1995. Is oxidative stress a causal factor in aging? In: Esser, K., Martin, G.M. (Eds.), Molecular Aspects of Aging. Wiley, Chichester, pp. 107–127.

Sohal RS, Sohal BH, Orr WC. Mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide generation, protein oxidative damage, and longevity in different species of flies. Free Radic Biol Med. 1995 Oct;19(4):499-504.

Sohal RS, Sohal BH. Hydrogen peroxide release by mitochondria increases during aging. Mech Ageing Dev. 1991 Feb;57(2):187-202.

Sohal RS. Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. Free Radic Biol Med. 2002 Jul 1;33(1):37-44.

Sokolovic D, Djindjic B, Nikolic J, Bjelakovic G, Pavlovic D, Kocic G, Krstic D, Cvetkovic T, Pavlovic V. Melatonin reduces oxidative stress induced by chronic exposure of microwave radiation from mobile phones in rat brain. J Radiat Res. 2008 Nov;49(6):579-86.

Sommer B, Oprins A, Rabouille C, Munro S. The exocyst component Sec5 is present on endocytic vesicles in the oocyte of Drosophila melanogaster. J Cell Biol. 2005 Jun 20;169(6):953-63.

Southall TD, Elliott DA, and Brand A.H. The GAL4 System: A Versatile Toolkit for Gene Expression in Drosophila. CSH Protoc. 2008 Jul 1;2008:pdb.top49.

Squier TC. Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. Exp Gerontol. 2001 Sep;36(9):1539-50.

Stronach BE, Perrimon N. Stress signaling in Drosophila. Oncogene. 1999 Nov 1;18(45):6172-82.

Suman S, Khan Z, Zarin M, Chandna S, Seth RK. Radioresistant Sf9 insect cells display efficient antioxidant defence against high dose γ -radiation. Int J Radiat Biol. 2015 Jul 8:1-10.

Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008 Mar;9(3):231-41.

Tsakiri EN, Sykiotis GP, Papassideri IS, Gorgoulis VG, Bohmann D, Trougakos IP. Differential regulation of proteasome functionality in reproductive vs. somatic tissues of Drosophila during aging or oxidative stress. FASEB J. 2013 Jun;27(6):2407-20.

Tufail M, Takeda M. Molecular characteristics of insect vitellogenins. J Insect Physiol. 2008 Dec;54(12):1447-58.

Trougakos IP, Papassideri IS, Waring GL, Margaritis LH. Differential sorting of constitutively co-secreted proteins in the ovarian follicle cells of Drosophila. Eur J Cell Biol. 2001 Apr;80(4):271-84.

Velentzas AD, Nezis IP, Stravopodis DJ, Papassideri IS, and Margaritis LH: Mechanisms of programmed cell death during oogenesis in Drosophila virilis. Cell Tissue Res 327: 399-414, 2007a.

Velentzas AD, Nezis IP, Stravopodis DJ, Papassideri IS, Margaritis LH. Apoptosis and autophagy function cooperatively for the efficacious execution of programmed nurse cell death during Drosophila virilis oogenesis. Autophagy. 2007b Mar-Apr;3(2):130-2.

Vendelbo MH, Nair KS. Mitochondrial longevity pathways. Biochim Biophys Acta. 2011 Apr;1813(4):634-44.

Ventura G, Furriols M, Martín N, Barbosa V, Casanova J. closca, a new gene required for both Torso RTK activation and vitelline membrane integrity. Germline proteins contribute to Drosophila eggshell composition. Dev Biol. 2010 Aug 1;344(1):224-32.

Vurusaner B, Poli G, Basaga H. Tumor suppressor genes and ROS: complex networks of interactions. Free Radic Biol Med. 2012 Jan 1;52(1):7-18.

Wagner JR, Hu C-C, Ames BN. Endogenous oxidative damage of deoxycytidine in DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1992;89:3380–3384.

Wang SL, Hawkins CJ, Yoo SJ, Müller HA, Hay BA. The Drosophila caspase inhibitor DIAP1 is essential for cell survival and is negatively regulated by HID. Cell. 1999 Aug 20;98(4):453-63.

Wang X, Sharma RK, Gupta A, George V, Thomas AJ, Falcone T, Agarwal A. Alterations in mitochondria membrane potential and oxidative stress in infertile men: a prospective observational study. Fertil Steril. 2003 Sep;80 Suppl 2:844-50.

Warmerdam DO, Freire R, Kanaar R, Smits VA. Cell cycle-dependent processing of DNA lesions controls localization of Rad9 to sites of genotoxic stress. Cell Cycle. 2009 Jun 1;8(11):1765-74.

Waskar M, Landis GN, Shen J, Curtis C, Tozer K, Abdueva D, Skvortsov D, Tavaré S, Tower J. Drosophila melanogaster p53 has developmental stage-specific and sex-specific effects on adult life span indicative of sexual antagonistic pleiotropy. Aging (Albany NY). 2009 Oct 27;1(11):903-36.

Weisbrot D, Lin H, Ye L, Blank M, Goodman R. Effects of mobile phone radiation on reproduction and development in Drosophila melanogaster. J Cell Biochem. 2003 May 1;89(1):48-55.

West JD, Marnett LJ. Endogenous reactive intermediates as modulators of cell signaling and cell death. Chem Res Toxicol. 2006 Feb;19(2):173-94.

Whitehead TD, Moros EG, Brownstein BH, Roti Roti JL. 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. 2006 Jun;165(6):626-35.

Wilson T, Carlini AR. Size of the Detector in Confocal Imaging. Opt. Lett. 1987;12(4):227-9.

Wilson T, Sheppard CJ.R. Scanning Optical Microscopy. Academic Press 1984.

Wilson T. Optical Sectioning in confocal fluorescent microscopes. J.Microsc. 1989.

Wylie A, Lu WJ, D'Brot A, Buszczak M, Abrams JM. p53 activity is selectively licensed in the Drosophila stem cell compartment. Elife. 2014 Mar 11;3:e01530.

Yamamoto D, Koganezawa M. Genes and circuits of courtship behaviour in Drosophila males. Nat Rev Neurosci. 2013 Oct;14(10):681-92.

Zhang K, Kaufman RJ. The unfolded protein response: a stress signaling pathway critical for health and disease. Neurology. 2006 Jan 24;66(2 Suppl 1):S102-9.

Zhang Y, Billington CJ Jr, Pan D, Neufeld TP. Drosophila target of rapamycin kinase functions as a multimer. Genetics. 2006 Jan;172(1):355-62.

Zhao TY, Zou SP, Knapp PE. Exposure to cell phone radiation up-regulates apoptosis genes in primary cultures of neurons and astrocytes. Neurosci Lett. 2007 Jan 22;412(1):34-8.

Zhao Y, Chaiswing L, Velez JM, Batinic-Haberle I, Colburn NH, Oberley TD, St Clair DK. p53 translocation to mitochondria precedes its nuclear translocation and targets mitochondrial oxidative defense protein-manganese superoxide dismutase. Cancer Res. 2005 May 1;65(9):3745-50.

Zhukova MV, Kiseleva E. The virulent Wolbachia strain wMelPop increases the frequency of apoptosis in the female germline cells of Drosophila melanogaster. BMC Microbiol. 2012 Jan 18;12 Suppl 1:S15.

Zmyślony M, Politanski P, Rajkowska E, Szymczak W, Jajte J. Acute exposure to 930 MHz CW electromagnetic radiation in vitro affects reactive oxygen species level in rat lymphocytes treated by iron ions. Bioelectromagnetics. 2004 Jul;25(5):324-8.

5.2 ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Μεσσήνη-Νικολάκη Ν. «Ωογένεση στη *Drosophila melanogaster*. Συμβολή στη μελέτη της βιτελλογένεσης και χοριογένεσης». Διδακτορική διατριβή. Πανεπιστήμιο Αθηνών. 1982.

Νόμος 3431 «Περί Ηλεκτρονικών Επικοινωνιών και άλλες διατάξεις». 3431, ΦΕΚ 13/Α/3-2-2006

5.3 ΔΙΑΔΙΚΤΥΑΚΕΣ ΠΗΓΕΣ

http://blog.restek.com/?p=4664

http://conocimientosiptelephony.blogspot.com/2010_07_01_archive.html

http://flybase.org/

http://geneontology.org/

http://mol-biol4masters.masters.grkraj.org/html/Developmental_Biology1-Drosophila.htm

http://pantherdb.org/

http://ph277.edu.physics.uoc.gr/files/Electron_Microscopy_Notes_VBinas2.pdf.

http://projects.nfstc.org/pdi/Subject03/pdi_s03_m05_07_a.htm

http://www.ansys.com/staticassets/ANSYS/staticassets/resourcelibrary/techbrief/ab-modeling-specific-absorption -rate-smartphone.pdf

http://www.bio-scientist.com

http://www.ce-mag.com/archive/03/01/images/0301CE31.jpg

http://www.ces.fau.edu/nasa/module-2/radiation-sun.php

http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem_ATP.htm

http://www.ebi.ac.uk/interpro/

http://www.genome.jp/kegg/

http://www.ingenuity.com/

http://www.upf.edu/sct/_img/microscopia/clsm5.gif

https://david.ncifcrf.gov/

https://www.ualberta.ca/~pogosyan/teaching/ASTRO_122/lect3/lecture3.html

КЕФАЛАІО 6 ПАРАРТНМА

Πίνακας 6.1: Στον Πίνακα παρουσιάζονται τα 168 σημαντικά διαφοροποιημένα (≥ 1,25, p<0,05), ως προς τα επίπεδα μεταγραφικής έκφρασής τους, γονίδια που ανιχνεύθηκαν στα ακτινοβολημένα δείγματα, μετά από 30λεπτη έκθεση σε κινητό τηλέφωνο και 2 ώρες αναμονή. Η διαφορά, συγκριτικά με τους μάρτυρες, δίνεται ως λόγος και οι τιμές μεγαλύτερες της μονάδας αντιστοιχούν σε υπερέκφραση, ενώ οι τιμές που είναι μικρότερες από τη μονάδα αντιστοιχούν σε υποέκφραση

ΚΩΔΙΚΟΣ FLYBASE	ΟΝΟΜΑ ΓΟΝΙΔΙΟΥ	ΣΥΜΒΟΛΟ ΓΟΝΙΔΙΟΥ	ΑΝΑΛΟΓΙΚΗ ΑΥΞΗΣΗ / ΜΕΙΩΣΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ (Fold)	TIMH p	ΑΝΑΦΟΡΕΣ (GO, INTERPRO, FLYBASE KAI DAVID KNOWLEDGEBASE)	ΟΡΘΟΛΟΓΑ (Homo sapiens)
FBgn0036398		CG9007	2,16	0,002	Ακετυλάση της χρωματίνης και ρύθμιση της ωογένεσης	MLL5
FBgn0040765	luna	luna	2,11	0,046	Ρύθμιση διαχωρισμού DNA στο εμβρυϊκό στάδιο του συγκύτιο	KLF6
FBgn0058298		CG40298	2,06	0,031	Καμία αναφορά	
FBgn0033087		CG3194	1,88	0,029	Ενεργότητα επιμεράσης, δρα στα παράγωγα βιοσύνθεσης των γλυκοζαμινών	GLCE
FBgn0046114	Glutamate- cysteine ligase modifier subunit	Gclm	1,79	0,026	Απόκριση σε βλάβη του DNA	GCLM
FBgn0040017		CG17684	1,78	0,016	Πεπτιδάση σερίνης	DPP4
FBgn0058178		CG40178	1,78	0,038	Ομοιόσταση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού	
FBgn0030648		CG6340	1,78	0,010	Πρωτεΐνη πρόσδεσης στο RNA	RSRC2

FBgn0260742	anon-87Ab	CG12213	1,75	<0,001	Θετική ρύθμιση του JAK / STAT σηματοδοτικού μονοπατιού	
FBgn0017549	Ras-related which interacted with Calmodulin	Ric	1,74	0,030	Απόκριση στο οξειδωτικό στρες	RIT1
FBgn0037918		CG6791	1,74	0,043	Περιέχει δάκτυλο ψευδαργύρου	
FBgn0040056		CG17698	1,74	<0,001	Εξαρτώμενη από καλμοντουλίνη κινάση σερίνης / θρεονίνης	CAMKK1
FBgn0031814	real-time	retm	1,73	0,029	Μεταφορέας φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης	SEC14L1
FBgn0037518		CG2641	1,71	0,027	Δομικά ομοιάζει με ανοσοσφαιρίνη Ε	
FBgn0038748		CG12378	1,68	0,048	Καμία αναφορά	
FBgn0040010		CG17493	1,66	0,014	Πρόσδεση με ιόντα ασβεστίου	
FBgn0259785	putzig	pzg	1,65	0,013	Μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζει τα EcR και JAK / STAT σηματοδοτικά μονοπάτια	ZNF423
FBgn0000247	claret	са	1,64	0,015	Ρύθμιση αυτοφαγίας και αποθήκευση λιπιδίων	ATP2A1
FBgn0033990		CG10265	1,63	0,049	Καμία αναφορά	
FBgn0052155		CG32155	1,62	0,026	Ενεργότητα ωμέγα πεπτιδάσης	GGH
FBgn0038321		CG1732	1,61	0,036	Απόκριση σε μηχανικό ερέθισμα	
FBgn0038619		CG7685	1,59	0,010	Ενεργότητα άλφα 1,4- γλυκοζιδάσης	PRKCSH
FBgn0259227	CG14713	CG42327	1,58	0,040	Φωσφατάση τυροσίνης	PTPN5

FBgn0034219	methuselah- like 4	mthl4	1,57	0,015	Απόκριση στο στρες	
FBgn0013948	Eip93F	Eip93F	1,57	0,015	Ενεργοποίηση κασπασών και κυτταρικού θανάτου μέσω αυτοφαγίας	LCOR
FBgn0038118	timeout	timeout	1,54	0,029	Απόκριση σε βλάβη του DNA	TIMELESS
FBgn0027621	6-phospho- fructo-2- kinase	Pfrx	1,53	0,007	Ενεργότητα κινάσης της 6-φωσφορικής φρουκτόζης	PFKFB1
FBgn0037963	Cad87A	Cad87A	1,53	0,047	Κυτταρική προσκόλληση μέσω καδερινών	
FBgn0034059		CG8320	1,52	0,022	Καμία αναφορά	TMEM208
FBgn0038721		CG16718	1,52	0,043	Ασβεστο-εξαρτώμενη ενεργότητα καναλιού	ANO7
FBgn0015372	chrowded	chrw	1,51	0,027	Ενεργότητα GTΡάσης κατά τη μεταφορά μέσω κυστιδίων	RAB24
FBgn0034966		CG13563	1,51	0,001	Καμία αναφορά	
FBgn0034304		CG5742	1,51	0,049	Συσχετισμός με νευρογένεση	ANKRD13C
FBgn0000709	flightless	flil	1,51	0,028	Γαστριδίωση για την επέκταση της γαμετικής σειράς	FLII
FBgn0029152	Makorin 1	Mkrn1	1,51	0,004	Ενεργότητα τρανσφεράσης	MKRN1
					της συρικουτιτης	

FBgn0035769	CTCF	CTCF	1,50	0,048	Μεταγραφικός παράγοντας	CTCF
FBgn0261016	CG12928	clos	1,49	0,011	Συμετοχή στη σύνθεση της βιτελλινικής μεμβράνης	
FBgn0031054		CG14216	1,49	0,010	Αποφωσφορυλίωση της RNA πολυμεράσης ΙΙ στο καρβοξυτελικό άκρο	SSU72
FBgn0001085	frizzled	fz	1,49	0,022	Υποδοχέας ενεργοποίησης του Wnt σηματοδοτικού μονοπατιού, μετανάστευση συνοριακών κυττάρων	FZD1
FBgn0261259	CG32030	Fhos	1,48	0,011	Θετική ρύθμιση της κυτταρικής μετανάστευσης	FHOD1
FBgn0000114	bruno	aret	1,47	0,004	Διατήρηση των βλαστοκυττάρων της γαμετικής σειράς και αρνητική ρύθμιση της μετράφασης του <i>oskar</i> mRNA	CELF1
FBgn0030243		CG2186	1,47	0,014	Καμία αναφορά	
FBgn0039061	Drosophila inward rectifier	Ir	1,47	0,046	Ρύθμιση μεμβρανικού δυναμικού	KCNJ1
FBgn0033915		CG8485	1,46	0,039	Κινάση σερίνης / θρεονίνης	
FBgn0035896		CG6983	1,46	0,012	Καμία αναφορά	AC106886.1
FBgn0029685		CG2938	1,46	0,036	Πλευρική αναστολή	CASD1
FBgn0005596	yemanuclein- alpha	yemalpha	1,46	0,028	Παραγωγή γαμετών	UBN1
FBgn0031362		CG17646	1,45	0,048	Διαμεμβρανικός μεταφορέας με ενεργότητα ΑΤΡάσης, μεταβολισμός τριγλυκεριδίων	
FBgn0029763		CG4165	1,45	0,012	Ενεργότητα πρωτεάσης της ουβικουιτίνης	USP16

FBgn0005771	Scutoid	пос	1,45	0,039	Μειορρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης	ZNF503
FBgn0039137		CG13604	1,45	0,046	Ενεργότητα φωσφατάσης	UBASH3A
FBgn0029861		CG3815	1,45	0,009	Μεταγραφικός παράγοντας	PHF12
FBgn0261261	pollux	plx	1,44	0,011	Κυτταρική προσκόλληση μέσω ιντεγκρινών	TBC1D1
FBgn0030890		CG7536	1,44	0,020	Καμία αναφορά	XPR1
FBgn0017561	Open rectifier K[+] channel 1	Ork1	1,44	0,049	Δίαυλος καλίου	KCNK15
FBgn0030582		CG14411	1,44	0,028	Απάντηση σε βακτήρια αρνητικά κατά Gram	MTMR10
FBgn0035824		CG8281	1,44	0,049	Καμία αναφορά	
FBgn0023515		CG14814	1,43	0,048	Καμία αναφορά	ACRC
FBgn0013717	nonstop	not	1,42	0,023	Πεπτιδάση ουβικουιτίνης	USP22
FBgn0033993		CG8089	1,42	0,015	Εμπεριέχει δάκτυλο ψευδαργύρου	
FBgn0053526	PNUTS	PNUTS	1,42	0,017	Ρύθμιση μεταγραφής και φαγοκύτωσης	PPP1R10
FBgn0035713		CG10107	1,41	0,044	Πρωτεόλυση των SUMO – πρωτεϊνών	SENP6
FBgn0030574		CG9413	1,41	0,021	Διαμεμβρανικός μεταφορέας αμινοξέων	SLC7A9
FBgn0011232	scattered	scat	1,41	0,009	Ενδοκύτωση	VPS54
FBgn0011285	p90 ribosomal S6 kinase	S6kII	1,40	0,019	S6 ριβοσωμική κινάση	RPS6KA1
FBgn0034569	CG3221	dgt3	1,39	0,028	Οργάνωση μιτωτικής ατράκτου	

FBgn0026318	TNF-receptor- associated factor 2	Traf6	1,39	0,015	Κυτταρικός θάνατος, ρύθμιση αυτοφαγίας, στρεσο-επαγόμενη ενεργοποίηση κατωρροϊκού καταρράκτη κινασών	TRAF6
FBgn0261385	scraps	scra	1,39	0,022	Ρύθμιση της ωογένεσης	ANLN
FBgn0015240	Hormone receptor-like in 96	Hr96	1,38	0,013	Ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκόγονου και της ομοιόστασης της χοληστερίνης	
FBgn0039381	SPP-like protein 3	CG17370	1,38	0,049	Ενεργότητα ενδοπεπτιδάσης ασπαρτικού	AC069214.1
FBgn0034063		CG8389	1,37	0,012	Διαμεμβρανικός μεταφορέας	
FBgn0027780	U26	U26	1,37	0,019	Μεταβολισμός λιπιδίων	AASDH
FBgn0000242	Beadex	Bx	1,37	0,030	Φαγοκύτωση	LMO1
FBgn0030010		CG10959	1,37	0,016	Εμπεριέχει δάκτυλο ψευδαργύρου	AP001350.3
FBgn0036053	CG6718	iPLA2-VIA	1,37	0,031	Μεταβολισμός λιπαρών οξέων	PLA2G6
FBgn0038233	HtrA2	HtrA2	1,37	0,046	Απόπτωση	HTRA1
FBgn0051156		CG31156	1,37	0,049	Μεταβολισμών νουκλεοσιδίων	SRBD1
FBgn0035551		CG7465	1,36	0,009	Καμία αναφορά	
FBgn0039581	Моса-сур	Моса-сур	1,36	0,029	Αναδίπλωση πρωτεϊνών	NKTR
FBgn0030646		CG9203	1,36	0,020	Απόκριση σε βλάβη του DNA	C1orf124
FBgn0031384		CG4238	1,35	0,032	Πρωτεόλυση μέσω ουβικουιτινυλίωσης	KIAA0317
FBgn0001202	hook	hk	1,35	0,035	Ενδοκύτωση	НООК1

FBgn0086683	CG17540	Spf45	1,35	0,018	Απόκριση σε βλάβη του DNA	RBM17
FBgn0030631		CG6227	1,35	0,045	Επιδιόρθωση του DNA	DDX46
FBgn0033973	HPS	HPS1	1,35	0,050	Φαγοκύτωση	HPS1
FBgn0052732		CG32732	1,34	0,010	Πλευρική αναστολή	SETD3
FBgn0000173	bendless	ben	1,34	0,020	Θετική ρύθμιση κυτταρικού θανάτου	UBE2N
FBgn0031190		CG12576	1,34	0,008	Καμία αναφορά	
FBgn0040285	anon-fast- evolving-1F7	Scamp	1,34	0,034	Μεταφορά πρωτεϊνών – Εξωκύτωση	SCAMP2
FBgn0053969		CG33969	1,34	0,033	Καμία αναφορά	FBXW4
FBgn0035901		CG6745	1,34	0,015	Σύνθεση ψευδοουριδίνης	PUS7
FBgn0086908	eggless	egg	1,33	0,029	Μεθυλίωση των ιστονών Η3 στη θέση Κ9 κατά την ωογένεση	SETDB1
FBgn0036763	CG7441	CG7441	1,33	0,006	Ενεργότητα λιγάσης του tRNA της τρυπτοφάνης	
FBgn0036999		CG5976	1,33	0,010	Βιοσύνθεση του πεπτιδυλο- πυρογλουταμικού οξέος	QPCT
FBgn0050085		CG30085	1,32	0,014	Rif1 πρωτεΐνη σχετιζόμενη με τα τελομερή	RIF1
FBgn0050466		CG30466	1,32	0,037	Πρωτεόλυση μέσω της οδού ουβικουιτίνης – πρωτεασώματος	
FBgn0015331	abstract	abs	1,32	0,032	Απόπτωση	DDX41
FBgn0037109	Mediator complex subunit 1	MED1	1,32	0,013	Συμπαράγοντας της RNA πολυμεράσης ΙΙ	MED1
FBgn0025866	Calpain B	CalpB	1,32	0,038	Μετανάστευση συνοριακών κυττάρων	CAPN1

FBgn0031773	CG9144	Fbw5	1,32	0,047	Πρωτεόλυση μέσω της οδού ουβικουιτίνης – πρωτεασώματος	FBXW5
FBgn0052627	Drosophila Nna1 ortholog	NnaD	1,31	0,036	Οργάνωση μιτοχονδρίου, πρωτεόλυση	AGBL2
FBgn0037655		CG11984	1,31	0,032	Κανάλι καλίου	KCMF1
FBgn0038860		CG10825	1,31	0,017	Καμία αναφορά	
FBgn0030439		CG12716	1,31	0,044	Σχηματισμός χορίου	
FBgn0027594	draper	drpr	1,31	0,023	Εκκαθάριση αποπτωτικών κυττάρων	MEGF10
FBgn0035851	Mediator complex subunit 24	MED24	1,31	0,033	Θετική ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου	MED24
FBgn0033884		CG13344	1,31	0,027	Ενεργότητα μεταφορέα ουβικουιτίνης	RNF25
FBgn0086370	sarah	sra	1,31	0,017	Ωογένεση	RCAN1
FBgn0030314		CG11696	1,31	0,039	Πρωτεόλυση μέσω της οδού ουβικουιτίνης – πρωτεασώματος	
FBgn0038098		CG7381	1,31	0,029	Εμπεριέχει δάκτυλο ψευδαργύρου	
FBgn0002787	Mov34	Mov34	1,30	0,033	Πρωτεόλυση μέσω της οδού ουβικουιτίνης – πρωτεασώματος	PSMD7
FBgn0031114	cactin	cactin	1,30	0,002	Καθορισμός ραχιαίου – κοιλιακού άξονα	C19orf29
FBgn0032259		CG6144	1,30	0,035	Ενεργότητα αναγωγάσης	ALKBH6
FBgn0061469	Drosophila Angelman syndrome	Ube3a	1,30	0,010	Πρωτεόλυση μέσω της οδού ουβικουιτίνης – πρωτεασώματος	UBE3A
FBgn0032486		CG5705	1,30	0,001	Λήξη μετάφρασης	MTRF1
FBgn0036240		CG6928	1,30	0,036	Διαμεμβρανικός μεταφορέας θείου	SLC26A11

FBgn0032775		CG17544	1,30	0,015	Δραστικότητα ακετυλο- συνενζύμου Α, β-οξείδωση λιπαρών οξέων	ACOX3
FBgn0034025	polypeptide GalNAc transferase 1	GalNAc-T1	1,30	0,042	Μεταφορέας Ν-ακετυλο- γαλακτοζαμινών	GALNT12
FBgn0033495		CG12214	1,30	0,003	Θετική ρύθμιση του αποπολυμερισμού / αποδιοργάνωσης των μικροσωληνίσκων	TBCEL
FBgn0037554	DNApol-iota	DNApol-iota	1,29	0,006	Επιδιόρθωση του DNA, κυτταρική απάντηση στο στρες	POLI
FBgn0036368		CG10738	1,29	0,033	Θετική ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της μίτωσης	
FBgn0027835	Drosophila dodeca- satellite- binding protein 1	Dp1	1,29	0,041	Θετική ρύθμιση της μεταγραφής	
FBgn0004406	DNA polymerase gamma	tam	1,29	0,032	Προσδιορισμός της διάρκειας ζωής των ενήλικων εντόμων	POLG
FBgn0026208	multiprotein bridging factor 1	mbf1	1,29	0,002	Θετική ρύθμιση της μεταγραφής μέσω της RNA πολυμεράσης ΙΙ	EDF1
FBgn0034217	Lethal hybrid rescue	Lhr	1,29	0,029	Ρύθμιση του διαχωρισμού των αδερφών χρωματίδων και διατήρηση τελομερών	
FBgn0016693	EH domain containing protein	Past1	1,29	0,039	Ενδοκύτωση κατά την ωογένεση	EHD1
FBgn0032290		CG17118	1,29	0,020	Μεταγραφικός παράγοντας	
FBgn0032988	Tif-IA	Tif-IA	1,29	0,009	Βιοσύνθεση ριβοσωμάτων και ρύθμιση της μεταγραφής μέσω RNA πολυμεράσης Ι	AC092375.1
FBgn0033122		CG17002	1,28	0,009	Καμία αναφορά	GPS2
FBgn0034270		CG6401	1,28	0,011	Μεταφορέας της φωσφατιδυλο-ινοσιτολ-Ν- ακετυλογλυκοζαμίνης	PIGA

FBgn0035833		CG7565	1,28	0,015	Δραστικότητα χιτινάσης	KIAA0319
FBgn0004643	Zeste-White 10	mit(1)15	1,28	0,035	Μιτωτική πυρηνική διαίρεση	
FBgn0034618		CG9485	1,28	0,018	Ενεργότητα αμυλο-άλφα- 1,6-γλυκοζιδάσης	
FBgn0036291		CG10681	1,28	0,020	Καμία αναφορά	C19orf50
FBgn0038870		CG5871	1,28	0,014	Επεξεργασία Ν-γλυκάνης	MGEA5
FBgn0039004	Nucleoporin 133	Nup133	1,28	0,043	Έξοδος των mRNA από τον πυρήνα	NUP133
FBgn0033206	P62 DYNACTIN	CG12042	1,28	0,028	Κίνηση βασιζόμενη σε αναδιάταξη μικροσωληνίσκων	DCTN4
FBgn0031322		CG5001	1,27	0,038	Πρόσδεση σε ανορθόξα αναδιπλωμένες πρωτεΐνες	DNAJB1
FBgn0030343	ATP7	ATP7	1,27	0,032	Κυτταρική ομοιόσταση ιόντων χαλκού	ΑΤΡ7Α
FBgn0030432		CG4404	1,27	0,021	Πρόσδεση στο DNA	
FBgn0033890		CG13350	1,27	0,039	DNA ενδοδιπλασιασμός	WDHD1
FBgn0027605	CG6842	Vps4	1,27	0,012	Σύντηξη αυτοφαγικών κυστιδίων, οργάνωση κυτταροσκελετού ακτίνης, φαγοκύτωση και αρνητική ρύθμιση του Notch σηματοδοτικού μονοπατιού	VPS4A
FBgn0052091		CG32091	1,27	0,017	Διαμεμβρανικός μεταφορέας με ενεργότητα ΑΤΡάσης	
FBgn0037855		CG6621	1,27	0,041	Καμία αναφορά	TTC14
FBgn0034392		CG15094	1,27	0,032	Διαμεμβρανική μεταφορά ιόντων νατρίου	
FBgn0038301		CG6654	1,26	0,001	Πρόσδεση στο DNA	ZNF205
FBgn0035153		CG3371	1,26	0,006	Θετική ρύθμιση του Wnt σηματοδοτικού μονοπατιού	
FBgn0024510	Vanaso	dlt	1,26	0,044	Καμία αναφορά	CDAN1

FBgn0039056	centaurin beta 1A	cenB1A	1,26	0,034	Φαγοκύτωση	ACAP1
FBgn0039640		CG14516	1,25	0,029	Πρωτεόλυση, ενεργότητα μεταλλοπρωτεϊνάσης	AC010282.1
FBgn0037900		CG5276	1,25	0,016	Ασβεστο-εξαρτώμενη ενεργότητα φωσφατάσης	CANT1
FBgn0035036		CG4707	1,25	0,005	Πρόσδεση σε νουκλεϊκά οξέα	
FBgn0034345		CG5174	0,80	0,044	Καμία αναφορά	TPD52
FBgn0013325	Ribosomal protein L11	RpL11	0,79	0,049	Δομικό συστατικό της μεγάλης υπομονάδας του ριβοσώματος	RPL11
FBgn0031115		CG11710	0,77	0,040	Πρόσδεση σε πυρηνικό υποδοχέα, ρύθμιση μεταγραφής	TRIP4
FBgn0002626	r-protein 49	RpL32	0,77	0,015	Δομικό συστατικό της μεγάλης υπομονάδας του ριβοσώματος	RPL32
FBgn0003274	Temporal- protein-1	RpLP2	0,75	0,023	Δομικό συστατικό της μεγάλης υπομονάδας του ριβοσώματος	RPLP2
FBgn0034138	Ribosomal protein S15	RpS15	0,75	0,026	Δομικό συστατικό της μικρής υπομονάδας του ριβοσώματος	RPS15
FBgn0031501		CG17261	0,75	0,029	Καμία αναφορά	
FBgn0066084	putative noncoding RNA 005:2R	RpL41	0,74	0,028	Δομικό συστατικό της μεγάλης υπομονάδας του ριβοσώματος	
FBgn0030347		CG15739	0,68	0,006	Ενεργότητα αλκαλικής φωσφατάσης	PDXP
FBgn0053276		CG33276	0,68	0,041	Προαγωγή οξειδωτικού στρες	URM1

FBgn0025680	cryptochrome	cry	0,67	0,028	Αρνητική ρύθμιση της βιοσύνθεσης νουκλεοτιδίων	CRY1
FBgn0033130	tetraspanin 42E	Tsp42Ei	0,66	0,005	Καμία αναφορά	
FBgn0053054		CG33054	0,65	0,048	Καμία αναφορά	C6orf130
FBgn0005666	Projectin	bt	0,61	0,040	Ενεργότητα κινάσης σερίνης / θρεονίνης	OBSCN
FBgn0010381	drosomycin	Drs	0,17	0,030	Φυσική ανοσία	

Mobile-phone Radiation-induced Perturbation of Gene-expression Profiling, Redox Equilibrium and Sporadic-apoptosis Control in the Ovary of *Drosophila melanogaster*

Areti K. Manta¹, Deppie Papadopoulou², Alexander P. Polyzos², Adamantia F. Fragopoulou^{1,#}, Aikaterini S. Skouroliakou³, Dimitris Thanos², Dimitrios J. Stravopodis^{1,¶,*} and Lukas H. Margaritis^{1,¶,*}

¹Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

²Basic Research Center, Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens, Athens, Greece

³Department of Energy Technology Engineering, Technological Educational Institute of Athens, Athens, Greece

[#]Current Address: Department of Neuroscience, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

[¶]Equal Senior Authorship

*Corresponding Authors: <u>dstravop@biol.uoa.gr; lmargar@biol.uoa.gr</u>

Identification of Critical Cytopathic Subroutines Orchestrated by Non Ionizing Electromagnetic Fields in *Drosophila melanogaster* during Development and Aging

Areti K. Manta¹, Athanassios D. Velentzas¹, Aikaterini S. Skouroliakou², Issidora S. Papassideri¹, Lukas H. Margaritis^{1,3,4} and Dimitrios J. Stravopodis^{1,3,4}

¹Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

²Department of Energy Technology Engineering, Technological Educational Institute of Athens, Athens, Greece

³Equal Senior Authorship

⁴Corresponding Authors: <u>lmargar@biol.uoa.gr</u>; <u>dstravop@biol.uoa.gr</u>

Electromagn Biol Med, Early Online: 1–14 © 2013 Informa Healthcare USA, Inc. DOI: 10.3109/15368378.2013.791991

ORIGINAL ARTICLE

Reactive oxygen species elevation and recovery in Drosophila bodies and ovaries following short-term and long-term exposure to DECT base EMF

Areti K. Manta, Dimitrios J. Stravopodis, Issidora S. Papassideri, and Lukas H. Margaritis

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

Abstract

The objective of this study was to approach the basic mechanism(s) underlying reported ovarian apoptotic cell death and fecundity decrease induced by nonionizing radiation (NIR) in Drosophila melanogaster. ROS (Reactive Oxygen Species) levels were measured in the bodies and the ovaries of (sexually mature) 4-day-old flies, following exposure for 0.5, 1, 6, 24 and 96 h to a wireless DECT (Digital Enhanced Cordless Telephone) base radiation (1.88–1.90 GHz). Electrical field intensity was 2.7 V/m, measured within the fly vials and calculated SAR (Specific Absorption Rate) value = 0.009 W/Kg. Male and female bodies showed twofold increase in ROS levels (p < 0.001) after 6 h of exposure, slightly increasing with more irradiation (24 and 96 h). Ovaries of exposed females had a quick response in ROS increase after 0.5 h (1.5-fold, p < 0.001), reaching 2.5-fold after 1 h with no elevation thereafter at 6, 24 and 96 h. ROS levels returned to normal, in the male and the female bodies 24 h after 6 h of exposure of the flies (p < 0.05) and in the ovaries 4 h after 1 h exposure of the females (p < 0.05). It is postulated that the pulsed (at 100 Hz rate and 0.08 ms duration) idle state of the DECT base radiation is capable of inducing free radical formation albeit the very low SAR, leading rapidly to accumulation of ROS in a levelsaturation manner under continuous exposure, or in a recovery manner after interruption of radiation, possibly due to activation of the antioxidant machinery of the organism.

Introduction

The last few decades a serious concern is expressed about the biological effects of the electromagnetic fields (EMFs) of nonionizing radiation (NIR), which are constantly growing with the development of telecommunication systems. Although the number of users and the amount of radiofrequency (RF) and microwave (MW) applications are expanding exponentially, along with the increase in relevant scientific papers, nevertheless the results from this research field remain still controversial. Predominant devices of everyday use include the mobile phones and the wireless DECT (Digital Enhanced (European) Cordless Telephones) at home and at work. To ensure the smooth operation of the system, a DECT base device transmits signals continuously (Figure 1) to enable synchronization with the handset. For this reason, cordless DECT phones are being criticized for their contribution to the accumulation of electromagnetic pollution and for increasing the concern about their potential in causing health hazards. In fact, that was the main reason we have included this source in our EMF repertoire, exploring the effects on mice

Keywords

Drosophila melanogaster, electromagnetic fields, oogenesis, oxidative stress, reactive oxygen species, ROS recovery, wireless DECT, wireless DECT base

informa

healthcare

History

Received 21 December 2012 Revised 26 February 2013 Accepted 30 March 2013 Published online 19 June 2013

(Fragopoulou et al., 2012) and in Drosophila (Margaritis et al., 2013) as well as in this study.

So far, various *in vitro* and *in vivo* studies have shown many effects after exposure of biological material to RF (radio frequencies); DNA breaks (Diem et al., 2005) and apoptosis (Guler et al., 2011), alterations in gene expression (Czyz et al., 2004; Pacini et al., 2002) and also in protein expression (Fragopoulou et al., 2012; Nylund & Leszczynski, 2006) and memory impairments (Fragopoulou et al., 2010; Ntzouni et al., 2011, 2012), to mention just a few examples. In addition, a considerable number of reports have focused on the induction of oxidative stress and triggering of the stress response in biological systems after exposure to EMFs.

Oxidative stress in general involves the imbalance of free radicals, which are byproducts of normal metabolism. Aerobic organisms produce energy in mitochondria via the respiratory chain during which reactive oxygen species (ROS), such as $O2^{-7}$, are also produced. ROS can react with macromolecules causing protein conformational changes (Dean et al., 1997; Stadtman, 1992) and also structural alterations as shown recently on calf thymus DNA exposed to EMF (Hekmat et al., 2012) at very low E-field intensity (15 V/m) and SAR value (0.04 W/Kg).

Besides, ROS key molecules that are normally investigated for a possible oxidative stress event involve

Address correspondence to Lukas H. Margaritis, Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, Athens University, Panepistimiopolis, 15784 Athens, Greece. E-mail: Loukas.Margaritis@ biol.uoa.gr

Figure 1. A: The DECT frequency spectrum showing 10 RF channels in the 1880–1900 MHz band. Each channel occupies 2 MHz. (DECT base radiation emission recorded with the NARDA SRM 3000 spectrum analyzer). B: Wireless DECT base emission under zero span and 400 ms sweep rate, showing the 100 Hz repeat rate (40 peaks for 400 ms = 10 ms repeat rate which corresponds to 100 Hz). (Recorded with Rohde & Schwarz FSH8 spectrum analyzer).



1875000000 1880000000 1885000000 1890000000 1895000000 190000000 1905000000



malon-di-aldehyde (MDA) implicated in lipid peroxidation, catalase (CAT) breaking down hydrogen peroxide and the specific antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px).

A large number of publications have studied the possible link between oxidative stress and EMF exposure using various sources, SAR levels and biological systems at exposure carrier frequencies around 900 MHz, Irmak et al. (2002) in rabbits, Ilhan et al. (2004) and Yurekli et al. (2006) in rats' brain as well as in blood tissue and the brain of guinea pigs (Meral et al., 2007). Seyhan's group from Ankara Gazi University has extensively demonstrated the oxidative potential of EMFs in various model systems and under various exposure conditions; Kismali et al. (2009) used a commercial mobile phone having a SAR value of 0.81 W/Kg and exposed guinea pigs for 10 min per day for 7 d; increased MDA levels were found in the plasma. A year later Ozgur et al. (2010), from the same group, using also guinea pigs, showed induction of MDA, nitric oxide (NOx) levels and decrease in GSH-Px in the liver after 10 and 20 min daily exposure for System 7 d to а 1800 MHz Global for Mobile Communications (GSM) modulated signal (SAR value of 0.38 W/Kg). Esmekaya et al. (2011) found oxidative stress induction in heart, lung, testis and liver tissues in male Wistar albino rats (pulse-modulated 900 MHz, SAR 1.2 W/Kg,

20 min/day for 3 weeks). Guler et al. (2010, 2012) used 13month-old non-pregnant and pregnant New Zealand white rabbits exposed for 15 min per day for 7 d at 1800 MHz (average E-field intensity = 14 V/m) and revealed increased levels of MDA and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) in their brain, while same results were detected in the liver of female infants (1 month old) under identical exposure conditions.

Studies on individual cells have shown that exposure to RF radiation, applying different SAR values, can provoke oxidative stress in various cell types. An increase in ROS levels has been reported by Lantow et al. (2006a) in blood cells after exposure to 1.8 GHz RF signal, both continuously and intermittently (SAR = 2 W/Kg). Lens epithelial cells exposed to mobile phone radiation (1.8 GHz for 24 h at a SAR value of 4 W/Kg) reacted by increasing the intracellular ROS levels and causing DNA damage (Wu et al., 2008; Yao et al., 2008).

It is worth mentioning that links between ROS increase and sperm damage through RF exposure have gained research interest as reviewed recently (Kesari et al., 2012). This theory was firstly put forward by Agarwal et al. (2009), who found increased ROS levels concomitant with low sperm motility and viability after irradiation with a mobile phone GSM 850 MHz in talk mode (SAR 1.6 W/Kg) for 60 min. In a similar study, it was shown that exposed human spermatozoa also produced significantly higher amounts of ROS than background levels after exposure to a continuous wave (CW) signal of 1800 MHz and that the mitochondria were involved in this process (De Iuliis et al., 2009).

However, several studies did not generally reveal any association of ROS/oxidative factors with NIR exposure; Ferreira et al. (2006) irradiated rats with a cellular phone (SAR values between 0.55 and 1.23 W/Kg) during embryogenesis and showed no alterations in any oxidative parameter tested. In fact, cell culture studies have given the most contradictory results suggesting that the effects of EMFs upon oxidative stress may vary depending not only on the exposure protocol but also on the cell type. No effects were observed on some types of blood cells, like Jurkat (IL-2-producing immortalized T lymphocytes) after exposure to a continuous wave (CW) 1950 MHz signal at SAR 0.5 and 2 W/Kg (Brescia et al., 2009) and on lymphocytes and Mono Mac 6 after various types of signals and SAR values after exposure to 1800 MHz radiofrequency radiation (Lantow et al., 2006b; Simkó et al., 2006). In addition, just recently, Hong et al. (2012) using single or multiple frequencies (837 and 1950 MHz) on human MCF10A mammary epithelial cells at a high SAR value of 4 W/Kg for 2 h did not observe any changes either in ROS or in the related oxidant and antioxidant molecules, while Kismali et al. (2012) observed no change in MDA and lipid peroxidation levels in the blood of pregnant and non-pregnant rabbits after exposure to a GSM-like 1800 MHz signal for 15 min per day for 7 d.

In the fruit-fly, the induction of stress by an external stimulus was observed for the first time in early 1960, when larvae of D. melanogaster exposed overnight showed, due to incorrect handling at high temperature, a different pattern of gene expression in their salivary gland chromosomes, which led to the discovery of heat shock proteins (HSPs) (Ritossa, 1962). Nowadays, Drosophila is a well-established model organism for studies of development and oxidative stress, not only due to the short-life cycle, but also because its antioxidant enzyme systems are fully characterized and are similar to other vertebrates. The first studies, using Drosophila as a model organism for RF exposure, were more or less simultaneously initiated in our laboratory (Panagopoulos et al., 2000) and that of R. Goodman and M. Blank in Columbia University. In the latter case, Weisbrot et al. (2003) showed a significant increase in hsp70 levels in larvae exposed to emissions from a commercial GSM mobile phone. Subsequently, Lee et al. (2008) observed in Drosophila cells increased levels of intracellular ROS and hsp70 and also activation of ERK (Extracellular signal-Regulated Kinases) and JNK (c-Jun Nterminal Kinases) pathway after exposure of adult flies to 835 MHz at SAR values of 1.6 (highest permissible) and 4 W/ Kg (above the limit) for 12 and 18 h continuously.

The objective of this study was to explore at the molecular level the possible mechanism(s) underlying our so far findings that RF radiation has a negative impact on insect's oogenesis and reproductive capacity. Specifically, using various EMF sources including cell phone with pulse modulated carrier frequencies of both 900 and 1800 MHz, wireless DECT phone at 1880–1900 MHz, microwave oven at 2440–2480 MHz, Wi-Fi router at 2440–2480 MHz, Blue tooth device at 2440– 2480 MHz, baby monitor at 27 MHz and FM signal at

100 MHz, we have observed a decrease in fecundity and an increase in the number of ovarian apoptotic follicles during oogenesis, mostly in two stages; the germarium and stages 7/ 8 (middle-oogenesis) (Chavdoula et al., 2010; Margaritis et al., 2013; Skouroliakou et al., 2012). Observation of increased apoptotic follicles at these particular stages has shown that RF/MW electromagnetic radiation is a hazardous environmental factor. Therefore, this study aims in the exploration of the basic mechanism(s) underlying the induction of apoptotic cell death and the decrease in fecundity in a model organism, the fruit-fly D. melanogaster. We chose to study the levels of ROS in the units of reproduction, that is, the ovaries of flies subjected to wholebody irradiation by a wireless DECT base radiation having very specific pulsed characteristics at the 1880-1900 MHz frequency band (Figures 1-3) and at moderate power/SAR levels. For comparative purposes, we also investigated ROS levels in the bodies of female and male flies following whole-body DECT exposure under various conditions. After obtaining data demonstrating ROS levels increase by DECT irradiation, we considered of utmost importance to investigate the possibility of recovery mechanisms functioning after stopping the exposure in order to explore the effectiveness of the antioxidant mechanism(s) on a time scale.

Materials and methods

Fly culture

All the experiments were performed with the dipteran flies D. melanogaster, Oregon R, wild type. All flies reared on same diet containing agar, rice flour, tomato paste, sugar, yeast and propionic acid. The adults from the stock population were removed from the culture bottles (12 cm height and 6 cm diameter). Newly emerged flies were collected using diethyl ether within 4-6h of eclosion and maintained at a density of 30 flies per vial (15 males and 15 females per vial of 3 cm diameter and 8 cm height) for 96 h, till the fourth day of their adult life, when they were sacrificed for ROS detection. Fourday-old flies are considered to be sexually and reproductively mature for egg-laying and their ovaries consist of all stages (1-14B) of developmental follicles from germarium to mature egg (stage 14B) (Margaritis, 1986). Control flies were kept at 25 °C in a culture room, totally protected from electromagnetic radiation, with standard 12:12 h light/dark cycle and 50% relative humidity. Sham Exposed and Exposed flies were kept in a separate room but cultured under similar conditions as the Control group, 12:12h light/dark cycle and 50% relative humidity.

Exposure system

Groups of 4-day-old flies were exposed either shortly for 0.5 and 1 h or for longer periods of 6, 24, or 96 h to a DECT base radiation (Figure 2), which consists of 10 channels of sequential scanning each one having 2 MHz range and pulsed at 100 Hz with a 0.08 pulse duration (Figure 3B). The average E-field value of 2.7 V/m for 6 min, according to ICNIRP (1998), under the allocated band of 1.88–1.90 GHz was measured with the FSH8 Rohde & Schwarz Spectrum Analyzer (Munich, Germany) using the Near Field Probe

Figure 2. A: DECT base emission at 1880– 1900 MHz depicting maximum (Max), maximum average (MxA) and average (Avg) – 6 min electrical field intensity values. B: Dominant frequencies of the spectrum shown in A, according to their average (MxA) and the maximum values (Max). For each frequency there is a nearly 10-fold difference between average and maximum electrical field intensities recorded at a 6 min period. (Spectrum analysis made with NARDA SRM3006).



Set HZ-15. All measurements were made by inserting the probe within an identical fly-culture vial with food as those used for the maintenance and irradiation of the flies. According to the formula SAR = $\sigma E^2/\rho$ and the values of σ and ρ proposed by Lee et al. (2008) for flies (electrical conductivity (σ) = 1.19 Siemens/m and mass density (ρ) = 1.000 kg/m³), the SAR value for the measured electrical field intensity of 2.7 V/m was estimated to be 0.009 W/Kg, assuming that the E-field value of 2.7 V/m measured in the air within the vials is the same within the flies. No fantom construction was possible to verify this assumption due to the size of the biological specimen. No exposure was performed having the DECT base in communication with a handset.

The spectrum and pulse characteristics of DECT base idle emission are shown in Figures 1–3. NARDA instruments SRM 3000 and SRM 3006 (Narda Safety solutions, Inc, Germany) and Rohde & Schwarz FSH8 spectrum analyzer were used to record the spectra.

Measuring of ROS Levels

ROS levels were measured using $10 \,\mu$ M of the oxidantsensitive fluorescent acetyl ester CM-H₂DCFDA (5-(and-6)chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate) dissolved in DMSO. CM-H₂DCFDA is a general oxidative stress indicator that can enter cells by penetrating the cell membrane through passive diffusion. Inside the cell its acetate groups are cleaved by intracellular esterases and oxidation by ROS lead to the formation of fluorescent DCF product, which can be detected via fluorometry.

Female and male flies' bodies were prepared after light anesthesia, with diethyl ether, to remove their wings (plus ovaries from the females) and collected in tubes containing 200 µl PBS. The ovaries were removed from the females after dissection in Ringer's solution and were separately analyzed for ROS levels. After their collection, flies' bodies or ovaries were incubated continuously for 30 min with CM-H₂DCFDA at 24 °C in the dark. Then, the ester was removed and incubation followed for 20 min in PBS. Subsequently, samples were washed three times and homogenized in 200 µl 1% NP 40. The quantification of fluorescence was made at the supernatant VersaFluor™ Fluorometer System (Bio-Rad, 170-2402, Hercules, CA) with excitation filter at 490 nm and emission at 520 nm. For the recovery experiments, various time points were tested as trials before finalizing the most promising values. In every set of experiments, duplicated samples were used for the exposed samples and the same run included control and sham-exposed flies. Fifteen bodies and pairs of ovaries from 15 females were used in every sample.



Figure 3. A: Wireless DECT base emission under zero span and 4 ms sweep rate, showing the pulse on the right during idle operation (duration of 0.08 ms) and the pulse on the left during pairing of base and hand set (duration 0.38 ms) (see also Figure 1B). B: 3-D spectrogram demonstrating the discontinuous (pulsed) intensities in DECT base emission profile at a pulse duration at 0.08 ms in just a single frequency of 1890.333 MHz. Horizontal axis (left to right) shows full-scale sweep time (SWT) corresponding to 30 ms as shown in the display on top. Vertical axis on upper half panel represents intensity. The 3rd dimension represented in the lower half panel corresponds to the time scale and shows nearly 30 vertically arranged rows of horizontal lanes the length of each one corresponding to the duration of each pulse (0.08 ms). (Spectrogram recorded with Rohde & Schwarz FSH8 spectrum analyzer).

In total, 307 different samples were measured and were analyzed by SPSS statistics.

Statistical analysis

All data were analyzed by SPSS v.21.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL). Differences in mean scores were analyzed using

one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the LSD post hoc statistics.

Results

To explore if there is any connection between ROS increase and EMF exposure to pulsed radiation deriving from a domestic



wireless DECT apparatus when in idle operation, young adult *D. melanogaster* flies were used as a model system. We chose to investigate this possibility on the male/female bodies and also on the ovarian tissue because we have previously reported induction of apoptotic cell death during oogenesis and reduction of fecundity by various sources of NIR.

Effect of short-term and long-term radiation on ROS levels of *D. melanogaster*

ROS levels in male bodies

Exposure of newly emerged adult 4-day-old male flies to wireless DECT base radiation for either short-term (0.5 or 1 h) or long-term (6, 24 or 96 h) resulted in a nearly twofold increase in ROS levels at the 6 h sample. Longer exposure (24 and 96 h) provoked no further major alteration in ROS values, whereas short exposure of 30 and 60 min did not raise ROS levels in the male bodies (Table 1, Figure 4). Statistical analysis by one-way ANOVA, LSD post hoc, revealed that ROS levels in male bodies rose gradually and reached a plateau. More specifically, the increase observed after 6 h exposure was statistically significant (p < 0.001) compared to control and sham-exposed samples (Figure 4B). The 24 h exposure led to higher levels of ROS, which were statistically significant compared not only to control and sham-exposed

RIGHTSLINK()

flies (p < 0.001), but also to the 6 h sample (p < 0.05). However, the values recorded at 96 h had no significant difference (p > 0.05) with those measured after 6 and 24 h, respectively (Figure 4B), but were of course higher at a statistical significant manner compared to the control and sham exposed samples (p < 0.001).

ROS levels in female bodies

Exposure of newly emerged adult 4-day-old female flies to wireless DECT base radiation either for short-term (0.5 or 1 h) or for long-term (6, 24 or 96 h) resulted in a nearly 2.5-fold increase in the bodies' ROS levels at the 24 h sample which was maintained in the flies irradiated for 96 h. Smaller but statistically significant increase (p < 0.05)

Table 1. Male bodies. Normalized averaged ROS values of male bodies in percentage, compared to the control values (C) for each experiment, for males sham-exposed flies (SE) and those exposed for 0.5, 1, 6, 24, or 96 h to a wireless DECT base radiation at 2.7 V/m average electrical field intensity (AVG = average, SDV = standard deviation, SER = standard error).

	С	SE	0.5	1	6	24	96
AVG	98.539	100.438	83.609	81.542	174.698	204.248	182.270
SDV	14.703	22.951	42.104	14.453	18.285	26.729	35.125
SER	3.209	4.190	21.052	7.227	7.465	9.450	13.276



Figure 4. A: Bar graph showing the ROS levels, normalized in percentage compared to the control values for each experiment, in the male bodies of the control (C) and the sham-exposed (SE) flies. The numbers 0.5, 1, 6, 24 and 96 denote hours of exposure of flies to DECT radiation before the ROS assay which was carried out immediately after the end of the exposure. Short exposures of 0.5 and 1 h did not raise the ROS levels but the 6 h sample showed a twofold increase, a value that was slightly raised 18 h later (24 h sample) and remained unaltered 3 d later (96 h exposed flies). B: One-way analysis of variance (ANOVA), LSD statistics comparing all experimental groups revealed statistically significant increased ROS levels at the 6 h exposure (p < 0.001). Values of ROS continued to increase from 6 to 24 h (p = 0.024), whereas at 96 h the values show no significant difference (p > 0.05) compared to those of 6 and 24 h of exposure duration.

was observed after 6 h exposure while short exposure of 30 and 60 min did not alter ROS levels (Table 2, Figure 5). Statistical analysis by one-way ANOVA, LSD post hoc, revealed that ROS levels in female bodies increased gradually from 6 to 96 h and reached a plateau as in the case of the male bodies. ROS levels observed after 6 h exposure increased significantly (p < 0.001) compared to control and sham-exposed samples. The 24 and 96 h exposure resulted in a statistically significant increase in ROS levels compared to 6 h (p < 0.001), but the increase observed between them was not statistically significant (p > 0.05) (Figure 5B).

ROS levels in whole ovaries

Exposure of newly emerged adult 4-day-old female flies to wireless DECT base radiation for short periods of 0.5 and 1 h and for long periods of 6, 24 and 96 h resulted in a nearly 1.5fold ROS increase (p < 0.001) in the ovaries after 0.5 h and a 2.5-fold increase after 1 h exposure (Table 3, Figure 6). It seems that ROS accumulation values peak at a duration of 1 h exposure (p < 0.001), and unlike ROS levels recorded from the flies' bodies, these levels were more or less maintained at the 6, 24 and 96 h samples (Figure 7). Statistical analysis by one-way ANOVA, LSD post hoc, revealed that ROS levels in ovaries increased significantly after 0.5 and 1 h radiation compared to those observed in control and sham-exposed samples. Six hours exposure led to statistically significant lower levels compared to those recorded after short-term exposure, while the 24 and 96 h samples showed no further significant alteration in ROS levels (p > 0.05) compared to the 6 h sample (Figure 6B).

Recovery effect of ROS increase after stopping radiation exposure of flies

To investigate whether there are cellular recovery mechanisms eliminating the observed immediate or gradual ROS increase as a result of wireless DECT base irradiation of *D*.

Table 2. Female bodies. Normalized averaged ROS values of female bodies in percentage compared to the control values (C) for each experiment for female sham-exposed flies (SE) and those exposed for 6, 24 or 96 h to a wireless DECT base radiation at 2.7 V/m average electrical field intensity (AVG = average, SDV = standard deviation, SER = standard error).

	С	SE	0.5	1	6	24	96
AVG	108.796	110.225	100.376	112.179	159.047	250.294	269.794
SDV	22.646	22.877	35.748	24.159	30.5796	48.954	57.367
SER	6.537	5.907	14.594	8.541	11.558	19.986	23.420



Figure 5. A: Bar graph showing the ROS level, normalized in percentage compared to the control values for each experiment, in the female bodies of the control (C) and the sham-exposed (SE) flies. The numbers 0.5, 1, 6, 24 and 96 denote hours of exposure to DECT radiation before the ROS assay which was carried out immediately after the end of irradiation. B: One-way analysis of variance (ANOVA), LSD statistics comparing all experimental groups revealed statistical significant (p < 0.05) increase of ROS levels in female bodies from 1 to 6 h and from 6 to 24 h but no significant change (p > 0.05) from 24 to 96 h of exposure.

8 A. K. Manta et al.

melanogaster flies, we measured ROS levels at various time points after stopping the exposure. Before initiation of these experiments, endogenous ROS levels, physiologically existing at the bodies of control or sham-exposed flies, were measured before and after a 24 h period and no change was observed (Figure 8).

ROS recovery in the bodies of 4-day-old exposed flies: 6 h exposure followed by ROS detection immediately, after 1, 4 and 24 h

Having detected that adult flies exposed for 6 h exhibit a statistically significant increase in the levels of ROS (see Figures 4A, 5A), we designed experimental samples

Table 3. Ovaries. Normalized averaged ROS values of ovaries in percentage compared to the control values (C) for each experiment for female sham-exposed flies' ovaries (SE) and those exposed for 0.5, 1, 6, 24 or 96 h to a wireless DECT base radiation at 2.7 V/m average electrical field intensity (AVG = average, SDV = standard deviation, SER = standard error).

	С	SE	0.5	1	6	24	96
AVG	100.305	98.231	155.023	255.836	192.950	228.620	203.756
SDV	7.601	23.974	38.752	56.682	15.013	78.497	46.538
SER	1.900	5.361	12.255	18.894	6.129	39.248	18.999

with various time points to test for ROS recovery, that is, return of the fluorescence signal to the initiation value before starting the exposure. It was found that a gradual decrease of the elevated ROS values occurs as a function of time in both male and female bodies (Tables 4 and 5, Figures 9 and 10, respectively). In male bodies 1 and 4 h post-exposure period did not decrease ROS levels significantly (p > 0.05). However, 24 h without exposure, ROS levels returned to baseline values (Figure 9A) showing a decrease statistically significant (p < 0.001)compared to the 6h exposure value (Figure 9B), dropping down from 174.698 ± 7.465 for the zero time recovery to 101.834 ± 4.102 for the 24 h recovery (Table 4). The same ROS recovery behavior was seen in the female bodies under the same exposure and post-exposure conditions (Figure 10A, B), dropping down from 159.047 ± 12.484 for the zero time recovery to 100.743 ± 9.683 for the 24 h recovery (Table 5).

ROS recovery in the ovaries of 4-day-old exposed flies: 30 or 60 min exposure followed by dissection and ovarian ROS detection either immediately or after 4 h

Having detected that adult flies receiving a single exposure to DECT radiation for 0.5 and 1 h exhibit a statistically significant gradual increase in the levels of ROS of their



Figure 6. A: Bar graph showing the ROS level normalized in percentage compared to the control values for each experiment, in the ovaries of the control (C) and the sham-exposed (SE) flies. The numbers 0.5, 1, 6, 24 and 96 denote hours of exposure to DECT radiation before the ROS assay which was carried out immediately after the end of irradiation by dissecting the females and removing the ovaries. B: One-way analysis of variance (ANOVA), LSD statistics comparing all experimental groups revealed statistical significant increased ROS levels in the ovaries at the 0.5, 1, 6, 24, and 96 h exposed females compared to the control and sham-exposed samples (p < 0.05). Values of ROS rose after short-term radiation (0.5 and 1 h) having a high value at the 1 h sample (p < 0.001) which was more or less maintained in lower levels in the 6, 24 and 96 h exposure of the flies (p = 0.001 between 1 and 6 h samples, p = 0.128 between 6 and 24 h samples and p = 0.284 between 24 and 96 h samples).



Figure 7. Comparative line-graph showing ROS levels, normalized in percentage compared to the control values, both in the bodies and the ovaries of the flies after various exposure periods. The rapid increase of ROS levels following radiation exposure of 1 h is evident in the ovarian sample.



Figure 8. Bar graph showing the endogenous ROS levels, during a 24 h time period, normalized in percentage compared to the control values, in the bodies of the flies (C = control, SE = sham-exposed).

 116.393 ± 9.69

 113.347 ± 11.12

Table 4. ROS recovery males' bodies. Normalized averaged ROS values in percentage compared to the control values (C) for each experiment for male sham-exposed flies (SE) and those exposed for 6 h and then left for 0, 1, 4, 24 h without radiation (AVG = average, SDV = standard deviation, SER = standard error).

day 2

 94.114 ± 3.57

Table 5. ROS recovery females' bodies. Normalized averaged ROS							
values in percentage compared to the control values (C) for each							
experiment for female sham-exposed (SE) flies and those exposed for 6 h							
and then left for 0, 1, 4, 24 h without radiation (AVG = average,							
SDV = standard deviation, SER = standard error).							

 119.871 ± 7.57

	С	SE	6/0	6/1	6/4	6/24
AVG	115.144	120.503	174.698	172.874	151.548	101.834
SDV	40.534	26.853	18.285	17.946	36.026	10.0473
SER	14.331	9.494	7.465	6.345	12.737	4.102

	С	SE	6/0	6/1	6/4	6/24
AVG	108.579	107.557	159.047	173.307	160.857	100.743
SDV	12.177	34.135	30.580	14.197	23.697	19.366
SER	4.971	13.935	12.484	6.349	8.378	9.683



Figure 9. A: Bar graph showing ROS recovery levels, normalized in percentage compared to the control values, measured at various time points after the end of the irradiation. Male flies were exposed to a wireless DECT base for 6 h continuously. (C = control, SE = sham-exposed, 6/n = 6 h exposure/ n hours after the end of the exposure, n = 0 h, 1 h, 4 h, 24 h). ROS values tend to return to pre-irradiation levels 24 h later. B: One-way analysis of variance (ANOVA), LSD statistics comparing all experimental groups in male bodies at 6 h sample revealed that ROS values tend to decrease gradually with a statistically significant manner (p < 0.001) 24 h after the end of the exposure.

ovaries (see Figure 6A), we designed experimental samples to test for ROS recovery after 4 h post-exposure period. Short (30 or 60 min) exposure of the female flies has an effect on raising the ROS levels immediately which is more pronounce in the 60 min sample (Figure 11A). Follow-up measurement after stopping the exposure for 4 h did reveal that the increased ROS values tend to decrease more considerably and statistically significantly at the 60 min exposure sample (p = 0.004) (Figure 11B), dropping down from 253.307 ± 35.274 to 178.484 ± 21.315 (Table 6).

Discussion

The production of ROS is mainly the result of reactions of living organisms in an aerobic environment and the continuous need for oxygen in order for energy to be produced. Superoxide radical $(O2 \cdot)$ is a physiological byproduct of cells' metabolism and is produced in the respiratory chain via the reduction of molecular oxygen (Squier, 2001). *In vitro* experiments have revealed that 1–3% of the oxygen consumed by mitochondria is converted, in mammals, to hydrogen peroxide (Sastre et al., 2000). However, ROS can be also produced by exogenous factors such as high temperature or UV radiation.

In this study we showed that continuous low-energy pulsed radiofrequency emitted from a wireless DECT base, average E-field density 2.7 V/m and SAR value 0.009 W/Kg calculated according to Lee et al. (2008) increased the levels of ROS in 4-day-old flies of D. melanogaster. Both female and male bodies were sensitive to long-term (6, 24 and 96 h) but not to short-term exposure (30 and 60 min), unlike ovaries which showed increased ROS levels already after 30 min of exposure and a peak in ROS values accumulation after 1 h of irradiation. Thus, the organ that seems from this study to have a more severe response to RF radiation is the ovary of the female flies. Sensitivity of the ovary, upon RF radiation, compared to whole body was also demonstrated by Lee et al. (2008). Both bodies and ovaries presented a plateau in ROS levels after certain exposure period. The bodies reached a plateau at 24 h and the levels were maintained at the 96h of exposure, while in ovaries ROS levels were approximately the same at 6, 24 and 96 h samples. These findings are consistent with the study of Lu et al. (2012) who reported that ROS levels increased in human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) after 1, 2 and 4 h exposure to 900 MHz (SAR value 0.4 W/Kg) and reached a maximum value at 6h and then declined with the passage of irradiation time. The plateau shown in our study at the ROS levels implies possible defensive mechanisms towards the impact of radiation. To further investigate this hypothesis, exposed flies were left for various time points without irradiation. In both male and female

RIGHTSLINK()

(A)

6/4

6/24

ROS RECOVERY IN FEMALE BODIES (6hrs exposure, 1hr, 4hrs, 24hrs no exposure)



Figure 10. A: Bar graph showing ROS recovery levels in female bodies, normalized in percentage compared to the control values for each experiment, measured at various time points after the end of the irradiation. Female flies were exposed to a wireless DECT base continuously for 6h. (C = control, SE = sham-exposed, 6/n = 6 h exposure/n hours after the end of the exposure, n = 0 h, 1 h, 4 h, 24 h). ROS values tend to return to pre-irradiation levels 24 h later. B: One-way analysis of variance (ANOVA), LSD statistics comparing all experimental groups in female bodies at 6 h sample revealed that ROS values tend to decrease although no statistical significantly till 24 h (p < 0.001) after the end of the exposure as was the case in the male bodies (see Figure 9B).

0.887

0.001

0.380

0.000

bodies, ROS levels returned to basal levels 24 h after ceasing the exposure. In the ovaries, ROS values tend to return to normal values after 4 h at the 60 min exposure sample. Recent data of our group also showed a recovery phenomenon in mice memory following interruption of mobile phone exposure (Ntzouni et al., 2012). In addition, Franzellitti et al. (2010) exposing human trophoblast HTR-8/SVneo cells for 4, 16 or 24 h with 1.8 GHz, GSM signal have reported DNA damage to be rapidly recovering within 2 h in the absence of irradiation.

0.000

0.624

0.000

0.670

So far studies, which are orientated to the hypothesis that nonionizing electromagnetic radiation affects the intracellular redox mechanism and have demonstrated ROS increase, are mainly performed in individual cells, including those of Agarwal et al. (2009) and De Iuliis et al. (2009). These authors detected increase in ROS levels of human spermatozoa after exposure to a cellular telephone in talk mode (SAR 1.46 W/Kg) emitting at 850 MHz frequency and to a CW 1.8 GHz signal, respectively. Wu et al. (2008) and Yao et al. (2008) measured elevated intracellular ROS levels in lens epithelial cells, irradiated for 24 h with a mobile phone 1800 MHz at a SAR value 4 W/Kg, while the same research group (Yao et al., 2008) after exposing the same cell type at a pulse-modulated GSM signal 1.8 GHz (SAR 2, 3 and 4 W/Kg) for 2 h showed also increased ROS levels. Interestingly, the same authors observed that when RF was superposed with $2\,\mu$ T electromagnetic noise could block RF-induced ROS increase and DNA damage. However, there are also studies with no effect on ROS values using either CW- or pulse-modulated signals; Luukkonen et al. (2010) irradiated neuroblastoma cells (SH-SY5Y) with a CW- or pulse-modulated 872 MHz signal (5 W/Kg), while Poulletier et al. (2011) used an EDGE signal 1800 MHz (SAR 2 and 10 W/Kg) for 1 and 24 h on three human brain cell lines (SH-SY5Y, U87 and CHME5), as well as on primary cortical neuron cultures.

0.000

0.000

RIGHTSLINKA)

ROS can cause at the cellular level a wide range of responses, from proliferation to cell death. The effect observed depends on the cell type, the intensity and duration of the stimulus. More specifically, low levels of ROS are mitogenic and induce cell proliferation; higher levels cause either permanent or transient cell cycle arrest, while even higher ones lead to cell death through either necrosis or apoptosis (Benhar et al., 2002; Martindale & Holbrook 2002; Rothstein & Lucchesi, 2005). Overproduction of ROS can damage cellular components, mainly lipids in membranes, nucleic acids and proteins, can lead to cell death (Valko et al., 2006) and distortion in spermatozoa in mobile phone-exposed rats (Kesari & Behari, 2012). Lee et al., (2008) showed in parallel with the increased ROS values activation of JNK at a SAR value of 4 W/Kg or ERK pathway (SAR 1.6 W/Kg).
(A)

1/4

ROS RECOVERY IN OVARIES



Figure 11. A: Bar graph showing ROS levels of the ovaries, normalized in percentage compared to the control values for each experiment. Female flies were exposed to a wireless DECT base for 0.5 or 1 h and their ovaries were tested for ROS levels either immediately or 4 h later. The numbers 0.5/0 and 0.5/4 denote 0.5 h exposure followed by ROS analysis either immediately or 4 h later, respectively. The same holds for the numbers 1/0 and $\frac{1}{4}$, respectively. ROS levels were also measured in control (C) and sham-exposed (SE) flies under similar timing. B: One-way analysis of variance (ANOVA), LSD statistics comparing all experimental groups revealed a downward trend in ROS values 4 h after interrupting the exposure regardless of its duration. However, statistically significant decrease was observed only in the case of 1 h exposure – 4 h post exposure period (p = 0.004).

0.296

0.004

Table 6. ROS recovery ovaries. Normalized averaged ROS values in percentage compared to the control values (C) for each experiment for sham-exposed (SE) flies' ovaries and those exposed for 0.5 and 1 h and then left for 0 and 4 h without radiation (AVG = average, SDV = standard deviation, SER = standard error).

0.004

0.004

	С	SE	0.5/0	1/0	0.5/4	1/4
AVG	103.721	104.610	152.619	253.307	128.268	178.464
SDV	16.747	28.432	35.390	86.403	28.266	52.212
SER	6.837	11.607	14.448	35.274	11.540	21.315

Friedman et al. (2007) have also shown in cultured cells induction of ERK cascade within 5 min and a peak at 10– 15 min at a power density of 0.005 W/cm². These findings imply that cells perceive immediately the electromagnetic radiation as a stress factor and trigger mechanisms, namely ERK cascade mentioned above, to overcome ROS increase and to activate the transcription of genes responsible for their survival. The products of these genes are members of the antioxidant mechanism, including antioxidant enzymes (SOD, CAT, GSH-Px) or heat shock proteins. Such data may explain our recovery results; whereas as reported by Aydin & Akar, (2011), irreversible oxidative damage has been observed after long-term exposure (2 h daily for 45 d) in the major lymphoid organs of rats.

0.046

In conclusion, our results indicate that even with very low SAR value ROS activation takes place possibly due to the pulsed and high max value characteristics of the DECT radiation (see Figure 2). Our data, suggestive for a possible recovery mechanism and the plateau observed after continuous exposure, strongly supports the case that an intracellular antioxidant mechanism is induced upon radiation mediated by ROS increase in the bodies of the flies and within the ovaries. However, if the cells cannot overcome the damage caused by ROS, then apoptotic signals are induced. As we have previously shown RF radiation emitted by a commercial cellular phone (Chavdoula et al., 2010), and RF radiation exposure given daily by a DECT base (Margaritis et al., 2013) induces cell death in the check points of oogenesis, that is, developmental stages of germarium and mid-oogenesis (stages 7, 8) and the apoptotic follicles were not created immediately at the end of the exposure but 3-4h later. The current findings of the immediate ROS increase (within 30-60 min), in relation to the above-mentioned results, indicate that DNA damage, observed after RF exposure, may not be direct but through oxidative stress caused by electromagnetic radiation.

However, oxidative DNA damage and the role of the antioxidant machinery merit further investigation.

Authors contribution

The results presented herein were performed in the laboratory of electromagnetic biology utilizing the established protocol of insect culture and EMF exposure setup. All experiments have independently been replicated and only those fulfilling the statistical criteria have been used. Authors' contribution is as follows: A. K. Manta is a PhD student, performed all experiments on fly culture and ROS assay-spectroscopy and gathered most of the literature, contributed to the design of the experiments, the writing of the manuscript and making the bar-graphs. D. J. Stravopodis contributed to the design of the experiments, the evaluation of the data, the critical reading of the discussion and the revision. I. S. Papassideri contributed to the evaluation of the data and the final revision. L. H. Margaritis, designed and conceived most of the experiments, gathered the data, made the statistics, the EMF measurements and the dosimetry and assembled the final manuscript.

Acknowledgements

The authors sincerely thank ROHDE & SCHWARZ Hellas for kindly providing the R&S FSH8 spectrum analyzer and the near field probes for performing EMF measurements and Prof. A. Skouroliakou (TEI of Athens) for providing the NARDA SRM 3000 spectrum analyzer to evaluate the dosimetry throughout the course of this work. They also thank ACTA Ltd, Greece, for donating NARDA SRM 3006 spectrum analyzer and the Assistant Professor I. P. Trougakos for providing the ROS measurement equipment.

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

This research has been co-financed by the European Union (European Social Fund – ESF) and Greek national funds through the Operational Program "Education and Lifelong Learning" of the National Strategic Reference Framework (NSRF) – Research Funding Program: THALIS–UOA–MIS-375784: "*Biological effects of non-ionizing electromagnetic radiation: a multidisciplinary approach*" grant coordinated by L. H. Margaritis. A. K. Manta is supported by this grant for PhD fulfillment.

References

- Agarwal, A., Desai, N. R., Makker, K., et al. (2009). Effects of radiofrequency electromagnetic waves (RF–EMW) from cellular phones on human ejaculated semen: an *in vitro* pilot study. *Fertil. Steril.* 92:1318–1325.
- Aydin, B., Akar, A. (2011). Effects of a 900-MHz electromagnetic field on oxidative stress parameters in rat lymphoid organs, polymorphonuclear leukocytes and plasma. *Arch. Med. Res.* 42:261–267.
- Benhar, M., Engelberg, D., Levitzki, A. (2002). ROS, stress-activated kinases and stress signaling in cancer. EMBO Rep. 3:420–425.
- Brescia, F., Sarti, M., Massa, R., et al. (2009). Reactive oxygen species formation is not enhanced by exposure to UMTS1950 MHz radiation and co-exposure to ferrous ions in Jurkat cells. *Bioelectromagnetics*. 30:525–535.

- 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. *Mutat. Res.* 700:51–61.
- Czyz, J., Guan, K., Zeng, Q., et al. (2004). High frequency electromagnetic fields (GSM signals) affect gene expression levels in tumor suppressor p53-deficient embryonic stem cells. *Bioelectromagnetics*. 25:296–307.
- 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.
- Dean, R. T., Fu, S., Stocker, R., Davies, M. J. (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.* 324: 1–18.
- Diem, E., Schwarz, C., Adlkofer, F., et al. (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.* 583:178–183.
- Esmekaya, M. A., Ozer, C., Seyhan, N. (2011). 900 MHz pulsemodulated radiofrequency radiation induces oxidative stress on heart, lung, testis and liver tissues. *Gen. Physiol. Biophys.* 30:84–89.
- Ferreira, A. R., Knakievicz, T., Pasquali, M. A., et al. (2006). Ultra high frequency-electromagnetic field irradiation during pregnancy leads to an increase in erythrocytes micronuclei incidence in rat offspring. *Life Sci.* 80:43–50.
- Fragopoulou, A. F., Miltiadous, P., Stamatakis, A., et al. (2010). Whole body exposure with GSM 900 MHz affects spatial memory in mice. *Pathophysiology*. 17:179–187.
- Fragopoulou, A. F., Samara, A., Antonelou, M. H., et al. (2012). Brain proteome response following whole body exposure of mice to mobile phone or wireless DECT base radiation. *Electromagn. Biol. Med.* 31: 250–274.
- Franzellitti, S., Valbonesi, P., Ciancaglini, N., et al. (2010). Transient DNA damage induced by high-frequency electromagnetic fields (GSM 1.8 GHz) in the human trophoblast HTR-8/SVneo cell line evaluated with the alkaline comet assay. *Mutat. Res.* 683:35–42.
- Friedman, J., Kraus, S., Hauptman, Y., et al. (2007). Mechanism of shortterm ERK activation by electromagnetic fields at mobile phone frequencies. *Biochem. J.* 405:559–568.
- 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.
- Guler, G., Ozgur, E., Keles, H., et al. (2011). Apoptosis resulted by radiofrequency radiation exposure on pregnant rabbits and their infants. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*. 55:127–134.
- Guler, G., Tomruk, A., Ozgur, E., et al. (2012). The effect of radiofrequency radiation on DNA and lipid damage in female and male infant rabbits. *Int. J. Radiat. Biol.* 88:367–373.
- Hekmat, A., Saboury, A. A., Moosavi-Movahedi, A. A. (2012). The toxic effects of mobile phone radiofrequency (940 MHz) on the structure of calf thymus DNA. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 88:35–41.
- Hong, M. N., Kim, B. C., Ko, Y. G., et al. (2012). Effects of 837 and 1950 MHz radiofrequency radiation exposure alone or combined on oxidative stress in MCF10A cells. *Bioelectromagnetics*. 33: 604–611.
- ICNIRP. (1998). Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic and electromagnetic fields (up to 300 GHz). *Health Phys.* 74:494–522.
- Ilhan, A., Gurel, A., Armutcu, F., et al. (2004). Ginkgo biloba prevents mobile phone-induced oxidative stress in rat brain. *Clin. Chim. Acta.* 340:153–162.
- Irmak, M. K., Fadillioğlu, E., Güleç, M., et al. (2002). Effects of electromagnetic radiation from a cellular telephone on the oxidant and antioxidant levels in rabbits. *Cell Biochem. Funct.* 20:279–283.
- Kesari, K. K., Behari, J. (2012). Evidence for mobile phone radiation exposure effects on reproductive pattern of male rats: Role of ROS. *Electromagn. Biol. Med.* 31:213–222.
- Kesari, K. K., Kumar, S., Nirala, J., et al. (2012). Biophysical evaluation of radiofrequency electromagnetic field effects on male reproductive pattern. *Cell Biochem. Biophys.* 65:85–96.
- Kismali, G., Ozgur, E., Sayiner, S., et al. (2009). The effects of Epigallocatechin Gallate and N-acetylcysteine on mobile phoneinduced oxidative stress in guinea pigs. J. Anim. Vet. Adv. 8: 959–961.

14 A. K. Manta et al.

- Kismali, G., Ozgur, E., Güler, G., et al. (2012). The influence of 1800 MHz GSM-like signals on blood chemistry and oxidative stress in non-pregnant and pregnant rabbits. *Int. J. Radiat. Biol.* 88:414–419.
- Lantow, M., Schuderer, J., Hartwig, C., Simkó, M. (2006a). Free radical release and HSP70 expression in two human immune-relevant cell lines after exposure to 1800 MHz radiofrequency radiation. *Radiat. Res.* 165:88–94.
- Lantow, M., Lupke, M., Frahm, J., et al. (2006b). ROS release and Hsp70 expression after exposure to 1800 MHz radiofrequency electromagnetic fields in primary human monocytes and lymphocytes. *Radiat. Environ. Biophys.* 45:55–62.
- Lee, K. S., Choi, J. S., Hong, S. Y., et al. (2008). Mobile phone electromagnetic radiation activates MAPK signaling and regulates viability in Drosophila. *Bioelectromagnetics*. 29:371–379.
- 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.* 740280. 14 June 2012. [Epub ahead of print].
- Luukkonen, J., Juutilainen, J., Naarala, J. (2010). Combined effects of 872 MHz radiofrequency radiation and ferrous chloride on reactive oxygen species production and DNA damage in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Bioelectromagnetics*. 31:417–424.
- Margaritis, L. H. (1986). The eggshell of *Drosophila melanogaster*. New staging characteristics and fine structural analysis of choriogenesis. *Can. J. Zool.* 64:2152–2175.
- Margaritis, L. H., Manta, A. K., Kokkaliaris, C. D., et al. (2013). Drosophila as a bio-marker responding to EMF sources. *Electromagn. Biol. Med.* in press.
- Martindale, J. L., Holbrook, N. J. (2002). Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. J. Cell. Physiol. 192:1–15.
- Meral, I., Mert, H., Mert, N., et al. (2007). Effects of 900-MHz electromagnetic field emitted from cellular phone on brain oxidative stress and some vitamin levels of guinea pigs. *Brain Res.* 169:120–124.
- Ntzouni, M. P., Stamatakis, A., Stylianopoulou, F., Margaritis, L. H. (2011). Short-term memory in mice is affected by mobile phone radiation. *Pathophysiology*. 18:193–199.
- Ntzouni, M. P., Skouroliakou, K., Kostomitsopoulos, N., Margaritis L. H. (2012). Transient and cumulative memory impairments induced by GSM 1.8 GHz cell phone signal in a mouse model. *Electromagn. Biol. Med.* 32:95–120.
- Nylund, R., 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.
- Ozgur, E., Guler, 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: 935–945.

- Pacini, S., Ruggiero, M., Sardi, I., et al. (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.
- Panagopoulos, D. J., Messini, N., Karabarbounis, A., et al. (2000). Radio Frequency Electromagnetic Radiation within "safety levels" Alters the Physiological Function of Insects, In: Kostarakis, P., Stavroulakis, P., eds., *Millennium International Workshop on Biological Effects of Electromagnetic Fields*, Proceedings, Heraklion, Crete, Greece, 169– 175, ISBN: 960-86733-0-5.
- Poulletier de Gannes, F., Haro, E., Hurtier, A., et al. (2011). Effect of exposure to the edge signal on oxidative stress in brain cell models. *Radiat. Res.* 175:225–230.
- Ritossa, F. (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in Drosophila. *Experientia*. 18:571–573.
- Rothstein, E. C., Lucchesi, P. A. (2005). Redox control of the cell cycle: a radical encounter. *Antioxid. Redox Signal.* 7:701–703.
- Sastre, J., Pallardo, F. V., Vina, J. (2000). Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. *Life*. 49:427–435.
- Simkó, M., Hartwig, C., Lantow, M., et al. (2006). Hsp70 expression and free radical release after exposure to non-thermal radio-frequency electromagnetic fields and ultrafine particles in human Mono Mac 6 cells. *Toxicol. Lett.* 161:73–82.
- Skouroliakou, A. S., Sagioglou, N. E., Fragopoulou, A. F., et al. (2012). Insight into the biological effects of non-ionizing radiation through the properties of the electromagnetic waves. J. Sci. Technol. 7:41–52.
- Squier, T. C. (2001). Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Exp. Gerontol.* 36:1539–1550.
- Stadtman, E. R. (1992). Protein oxidation and aging. Science 257: 1220–1224.
- Yurekli, A. I., Ozkan, M., Kalkan, T., et al. (2006). GSM base station electromagnetic radiation and oxidative stress in rats. *Electromagn. Biol. Med.* 25:177–188.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncola, J., et al. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160:1–40.
- Weisbrot, D., Lin, H., Ye, L., et al. (2003). Effects of mobile phone radiation on reproduction and development in *Drosophila melanoga*ster. J. Cell Biochem. 89:48–55.
- Wu, W., Yao, K., Wang, K. J., et al. (2008). Blocking 1800 MHz mobile phone radiation-induced reactive oxygen species production and DNA damage in lens epithelial cells by noise magnetic fields. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 37:34–38.
- Yao K., Wu W., Wang K., et al. (2008). Electromagnetic noise inhibits radiofrequency radiation-induced DNA damage and reactive oxygen species increase in human lens epithelial cells. *Mol. Vis.* 14: 964–969.



Electromagn Biol Med, Early Online: 1–14 © 2014 Informa Healthcare USA, Inc. DOI: 10.3109/15368378.2014.971959

ORIGINAL ARTICLE

AND MEDICINE

BIOLOGY

ELECTROMAGNETIC

Apoptotic cell death during *Drosophila* oogenesis is differentially increased by electromagnetic radiation depending on modulation, intensity and duration of exposure

Niki E. Sagioglou¹*, Areti K. Manta¹*, Ioannis K. Giannarakis¹, Aikaterini S. Skouroliakou², and Lukas H. Margaritis¹

¹Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, Athens, Greece and ²Department of Energy Technology Engineering, T.E.I. of Athens, Agiou Spyridonos, Aigaleo, Athens, Greece

Abstract

Present generations are being repeatedly exposed to different types and doses of non-ionizing radiation (NIR) from wireless technologies (FM radio, TETRA and TV stations, GSM and UMTS phones/base stations, Wi-Fi networks, DECT phones). Although there is controversy on the published data regarding the non-thermal effects of NIR, studies have convincingly demonstrated bioeffects. Their results indicate that modulation, intensity, exposure duration and model system are important factors determining the biological response to irradiation. Attempting to address the dependence of NIR bioeffectiveness on these factors, apoptosis in the model biological system Drosophila melanogaster was studied under different exposure protocols. A signal generator was used operating alternatively under Continuous Wave (CW) or Frequency Modulation (FM) emission modes, at three power output values (10 dB, 0, -10 dB), under four carrier frequencies (100, 395, 682, 900 MHz). Newly emerged flies were exposed either acutely (6 min or 60 min on the 6th day), or repeatedly (6 min or 60 min daily for the first 6 days of their life). All exposure protocols resulted in an increase of apoptotic cell death (ACD) observed in egg chambers, even at very low electric field strengths. FM waves seem to have a stronger effect in ACD than continuous waves. Regarding intensity and temporal exposure pattern, EMF-biological tissue interaction is not linear in response. Intensity threshold for the induction of biological effects depends on frequency, modulation and temporal exposure pattern with unknown so far mechanisms. Given this complexity, translating such experimental data into possible human exposure guidelines is yet arbitrary.

Introduction

More and more devices in our modern society generate and make use of electromagnetic fields (EMFs): cellular phones (GSM-Global System for Mobile Communications) or smartphones (3G/UMTS-Universal Mobile Telecommunications System), digital enhanced cordless telecommunications (DECT) wireless telephones, tablets, i-pads, i-pods, laptops, notebooks and netbooks. In some cases such a device can be equipped with three different communication systems requiring three different transmitters and antennas, i.e. smartphones with cellular, Bluetooth and Wi-Fi (Wireless-Fidelity) connections simultaneously. Human exposure to these artificial sources can be higher than the corresponding from natural fields of the earth, the sun and space.

Therefore, the possible risks of EMFs for human health have become a growing concern for our society. For example,

Keywords

Apoptosis, continuous wave, *Drosophila melanogaster*, frequency generator, frequency modulation, frequency window, oogenesis, radiofrequencies

informa

healthcare

History

Received 17 August 2014 Revised 27 September 2014 Accepted 29 September 2014 Published online 20 October 2014

a maximal whole-body absorbed energy (in units of Specific Absorption Rate (SAR) expressed in terms of W/kg) of 0.08 W/kg and a maximal peak average power of 1.6 mW in 1 g of tissue over a 30-min period were imposed as an exposure limit in the USA by the Federal Communications Commission. SAR is defined as the time rate of energy absorbed in an incremental mass, divided by that mass and is an important parameter for characterizing exposure to microwaves (MW).

In spite of the enormous efforts of research groups, controversy remains over the possibility of adverse health effects from exposure to low-level EM fields, such as those associated with the use of the above-mentioned devices, daily and constantly used with exponentially increasing numbers, over the entire population on the globe. This controversy is fuelled in part by the lack of an established non-thermal interaction mechanism.

Electromagnetic exposures differ largely based on the characteristics of the emitted microwaves, i.e. frequency, modulation, intensity, etc. However, whether those characteristics influence in bio-effectiveness has not yet been clarified.

Frequency modulation (FM) is a form of analog angle modulation which conveys information over a carrier wave by

^{*}These authors contributed equally to this work.

Address correspondence to Lukas H. Margaritis, Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, Athens University, Panepistimiopolis, 15784 Athens, Greece. E-mail: Loukas.Margaritis @biol.uoa.gr

varying its instantaneous frequency. It is commonly used in radio, telemetry, radar, earthquake prediction, for broadcasting music and speech, two-way radio systems, magnetic taperecording systems and some video-transmission systems. In contrast, a continuous wave (CW) is an electromagnetic wave of constant amplitude and frequency of infinite duration in which a carrier wave is switched on and off. Information is carried in the varying duration of the on and off periods of the signal.

There are several studies that compare bio-effectiveness of CW signals with modulated ones and especially of the pulsed types used in wireless technology devices.

Cell death, particularly apoptosis, may occur after MW exposure. Some *in vitro* studies concerning radiofrequency (RF)-induced apoptosis were made using different cell types (Capri et al., 2004a,b; Caraglia et al., 2005; Hook et al., 2004; Maeda et al., 2004). These studies did not give the same results, indicating that sensitivity to MW may be different according to the cell type. For example, no apoptosis was induced by RF-exposure in human peripheral blood mononuclear cells (Capri et al., 2004a), in human lymphocytes (Capri et al., 2004b), or in lymphoblastoid cells (Hook et al., 2004), whereas human colon cancer cells (Maeda et al., 2004) and human epidermoid cancer cells (Caraglia et al., 2005) were forced into apoptosis by MW treatment.

Cell-dependent response to RF-EMFs was also shown by two studies of the same research group using originally a cell line as a model system and then primary cells. Specifically, human neuroblastoma cell line exposed to 900 MHz for 24 h did not reveal any apoptosis in either CW (SAR: 2 W/kg) or GSM exposure (SAR: 0.25 W/kg) (Joubert et al., 2006). However, these authors showed subsequently that CW exposure of rat primary neuronal cultures, under the same as above conditions, revealed a significant increase in apoptosis (Joubert et al., 2008).

Furthermore, exposure to 900 MHz CW or GSM-modulated signal (SAR: 0.4, 2.0 and 3.6 W/kg), did not significantly increase the expression of stress proteins HSP70 and HSP27 in human leukocytes (Lim et al., 2005). Comparing CW and pulsed waves at 2.45 GHz with a wide range of high SAR values 5, 10, 20, 50 and 100 W/kg, Komatsubara et al. (2005) did not find statistically significant differences in chromosomal aberrations in mouse m5S cells after 2 h of exposure.

Again, no detectable changes in cell proliferation kinetics after CW exposure, but a statistically significant increase in micronucleus induction after Gaussian minimum shift keying (GMSK) phase modulated irradiation of human peripheral blood cultures were found at 1.748 GHz, for 15 min with a maximum SAR of 5 W/kg (d'Ambrosio et al., 2002).

One more *in vitro* report studied comparatively the bioeffects of CW and amplitude modulated signals. Franzellitti et al. (2010) exposed human trophoblasts (HTR-8/SVneo cell line) to either continuous or amplitude-modulated (GSM-217, GSM-Talk, i.e. intermittently: 5 min field on, 10 min field off), 1800 MHz signal at SAR 2 W/kg. Exposure duration was 4, 16 and 24 h. There was a significant increase in DNA damage and/or strand breaks after the exposure to the amplitude modulation (AM) signal, while the CW exposure was found to be ineffective.

Another aspect studied by Salford's research group was the correlation of EMF strength (or SAR values) with actual bioeffect and CW/modulated signals. In this *in vivo* study, it was found that low SAR exposure of rats (\sim 1 mW/kg) had the strongest effect on the disruption of blood brain barrier (BBB) at modulation of 8–50 Hz (carrier frequency 915 MHz) and the weakest effects after CW exposure (Persson et al., 1997). However, at higher SAR values (>10 mW/kg) the damage was less, regarding pulse modulation exposure and interestingly the difference between the bioactivity of CW and modulated signals varied among the diverse SAR levels examined.

Different tissues of the same animals responded differently in an assay for enzyme activity after exposure to CW or to 50 Hz amplitude modulated (50/50% on, off) waves (2.45 GHz, 100 min per day); in the liver tissues, an increase was found after both CW and modulated signals, whereas in the brain a decrease was detected after CW exposure and noeffect after the modulated signal exposure (Kubinyi et al., 1996). In this study, *in utero* exposure of mice was applied with relatively high power density values (3 mW/cm², SAR: 4.23 W/kg). AminoAcyl-Transferase activity was measured at post-natal day 24 of the offspring.

Concerning studies in humans, reduced reaction speed and increased accuracy in a working-memory task of 24 healthy volunteers was found after pulse-modulated exposure, while CW had no impact on the performance of these cognitive tasks. The exposure lasted for 30 min, at 900 MHz with calculated SAR value of 1 W/kg (Regel et al., 2007).

Analyzing these publications superficially we may come to wrong conclusion that they are controversial or conflicting. However, this may not be the case if all parameters of each experiment are to be taken into account. To pursue this issue further and to find out whether the final bioeffect is dependent on (a) SAR, (b) duration scheme, (c) model system and (d) frequency, we examined apoptosis in a biological system, very well established as an EMF biological marker (Margaritis et al., 2014), namely, oogenesis in Drosophila melanogaster. During this process, apoptotic cell death occurs physiologically in order to compensate for environmental stress factors reducing the number of vital eggs (Drummond-Barbosa and Spradling, 2001; McCall, 2004; Nezis et al., 2000, 2001, 2002). Normally, a small percentage ($\sim 2-4\%$) of the egg chambers within the ovaries, at developmental stages up to 10 exhibit apoptotic features with condensed, fragmented nurse cell and follicle cell nuclei and disorganized actin network (Nezis et al., 2006). Such phenotypes are detectable after dissection of the flies, removing the ovaries and stain with acridine orange which binds to fragmented DNA and then fluoresces (Hayashi et al., 1983). Using a fluorescent microscope the number of apoptotic egg chambers compared to the normal ones within the ovaries removed by a certain number of flies, can be measured. Using this model system of which the developmental biology we have studied extensively (Margaritis, 1985, 1986; Margaritis et al., 1980), we have been exposing the flies mainly with mobile phone radiation and have detected a raise in apoptotic cell death as well as a decrease in fecundity (Chavdoula et al., 2010; Margaritis et al., 2014; Panagopoulos and Margaritis, 2010). In addition, reactive oxygen species (ROS) increase has



Figure 1. Emission spectra and spectrographs under 1 MHz span and 87 ms sweep rate of the CW (A) and FM/50 kHz (B) modes of the signal generator as recorded by the FSL/6 ROHDE AND SCHWARZ spectrum analyzer. CW: Continuous Wave, FM: Frequency Modulation. The time-dependent characteristics of the FM signal is demonstrated in lower half of the right image, compared with the uniform lane of the CW signal (left image).

been found to be associated with pulsed DECT exposures (Manta et al., 2014). Recently, by applying a variety of EMF sources we came across the conclusion that *Drosophila* oogenesis can be used as a biomarker in EMF studies (Margaritis et al., 2014).

In the present work, in order to answer the above addressed questions we have applied four different frequencies that are of special interest, (i) 100 MHz used by broadcast FM stations, (ii) 395 MHz, used in TETRA communication, (iii) 682 MHz, used in TV broadcasting and finally (iv) 900 MHz widely used in mobile telephony. We applied CW (constant, non-modulated carrier waves) and 50 kHz FM modulated signals through a signal generator, in three largely different intensities; power output of 10 dB, 0 dB and -10 dB. Corresponding E-field intensities as measured by spectrum analyzers were far below existing guidelines. For 100 MHz: 4.8 V/m, 1.5 V/m and 0.47 V/m, for 395 MHz: 9.2 V/m, 3.1 V/m and 1.1 V/m, for 682 MHz: 5.7 V/m, 1.5 V/m and 0.48 V/m and for 900 MHz: 3 V/m, 0.8 V/m and 0.23 V/m, respectively.

Materials and methods

Model biological system-culturing of D. melanogaster

The experiments were performed with the dipteran flies *D. melanogaster* (Diptera, Drosophilidae) Oregon R, wild type. Control insects were kept in a 25 °C culture room, totally protected from electromagnetic radiation, with 50–70% relative humidity and 12:12 h light/dark cycle. Exposed flies were kept in a separate room (for long-term exposure) but cultured under similar conditions as the control group, 12:12 h light/dark cycle, 50% relative humidity and temperature of 23–25 °C. Newly emerged flies (approximately 4 h after eclosion) were collected and separated in groups with light anesthesia. Each group consisted of five males and five females. Control and exposed flies were fed on a standard diet (agar, yeast, sugar, rice flour, tomato paste, ethanol and

propionic acid) and kept in plastic culture tubes (8 cm height and 3 cm diameter).

Exposure system

Flies were exposed from the side of the culture tube to the near field of a multi-directional antenna (14.5 cm long) that was placed in between two of them. A signal generator (Agilent-HP 8924E Mobile Communications Test Set 30–1000 MHz, Palo Alto, CA) was used, emitting either CW or FM/50 kHz deviation signals (Figure 1) in various frequencies, intensities and durations. The distance of the antenna to the fly samples was approximately 0.5-3 cm, depending on the position of the free moving flies. The environment temperature was fixed at 23–25 °C.

We used the following exposure scenarios in newly emerged flies:

- (A) Acute exposure for 6 min at the 6th day of their adult life
- (B) Acute exposure for 60 min at the 6th day of their adult life
- (C) Repeated exposure for 6 min per day starting from the first day of their lives
- (D) Repeated exposure for 60 min per day starting from the first day of their lives

Frequencies used:

- (i) 100 MHz (corresponding to an FM radio station)
- (ii) 395 MHz (corresponding to TETRA station communication)
- (iii) 682 MHz (corresponding to TV broadcasts)
- (iv) 900 MHz (corresponding to GSM900 communication)

The output power of the signal generator was set at 10, 0 and $-10 \,\text{dB}$. Spectra were recorded by the FSL/6 ROHDE AND SCHWARZ (Munich, Germany) spectrum analyzer. The corresponding electrical field intensity in each experimental setup was measured for 6 min time period according to ICNIRP (1998) guidelines with the NARDA SRM3000 (NardaSafety Test Solutions, Inc., Pfullingen, Germany)

Table 1. Presenting E-field intensities (V/m) at the various frequencies used, under CW and FM/50 KHz, as measured with the NARDA SRM3000 spectrum analyzer at the position of the fly vials during exposure and at the three power settings of the generator (10, 0 and -10 dB).

Frequency	100	MHz	395	MHz	682	MHz	900	MHz
Modulation	CW	FM	CW	FM	CW	FM	CW	FM
Output power				10	dB			
E-Field (V/m) SAR (W/kg)	4.790 0.027	4.584 0.025	9.253 0.102	9.270 0.102	5.777 0.040	5.590 0.037	3.000 0.011	3.067 0.011
Output power				0	dB			
E-Field (V/m) SAR (W/kg)	1.510 0.003	1.530 0.003	2.954 0.010	3.152 0.012	1.479 0.003	1.525 0.003	0.922 0.001	0.800 0.001
Output power				-10	0 dB			
E-Field (V/m) SAR (W/kg)	0.477 0.0003	0.480 0.0003	0.975 0.0011	1.100 0.0014	0.481 0.0003	0.454 0.0002	0.262 0.0001	0.232 0.0001

Values were confirmed with near field probes inserted within the vials and measured with the FSL/6 Rohde & Schwarz spectrum analyzer. Specific absorption rate (SAR) was calculated in W/kg for the flies with electrical conductivity $\sigma = 1.19$ S/m and mass density $\rho = 1000$ kg/m³ values according to Lee et al. (2008). CW: Continuous Wave, FM: Frequency Modulation.

spectrum analyzer (Table 1). SAR values were calculated with electric conductivity and mass density values defined for insects by Lee et al. (2008) ($\sigma = 1.19$ S/m, $\rho = 1000$ kg/m³). Control flies were kept protected from electromagnetic radiation in their culture room.

Acridine orange stain

Apoptosis was estimated through acridine orange (AO) staining, which has been used as a fluorescent stain indicator of apoptosis in *Ceratitis* and *Drosophila* (Abrams et al., 1993; Velentzas et al., 2007; White et al., 1994). In previous studies of ours, the results derived from AO staining were also confirmed with TUNEL assay and the percentage of ovarian apoptosis, compared to control samples, was found to be the same between the two assays used (Chavdoula et al., 2010).

Four to 5 h after the last irradiation, female flies were cryoanesthetized in ice and rapidly dissected in Ringer's solution and their ovaries were removed under fiber optics cold illumination. The 4-5 h post-irradiation timing has been found as optimum for the ovarian tissue to exhibit the maximum number of apoptotic follicles (Chavdoula et al., 2010). Ovaries were then separated into individual egg chambers and incubated in 200 µl 1.6 µM Acridine Orange dye (Invitrogen, Carlsbad, CA) in Ringer's solution for 5 min in the dark with constant shake. They were washed in 200 µl Ringer's solution for 5 min in the dark and immediately mounted onto Vidal glass slides in fresh Ringer's solution. Elapsed time from dissection to the end of the viewing was restricted to 20 min in order to maintain good fluorescence activity. Samples were then examined at a Nikon Eclipse TE-2000U fluorescent microscope (Nikon Instruments, Tokyo, Japan).

Egg chambers from germarium to stage 10b showing positive acridine orange staining signal (DNA fragmentation) were counted compared to the total number of the unstained (negative) normal, non-apoptotic follicles.

Statistical analysis

All data from AO fluorescent images were gathered on Excel spreadsheet and were analyzed by SPSS v.22.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL). Statistical evaluation was performed

using the one-Way analysis of variance (ANOVA) followed by the least significant difference (LSD) *post-hoc* statistics. Differences were considered significant at $*p \le 0.05$ and $**p \le 0.01$.

Results

A signal generator was used operating alternatively under CW or FM emission modes and three power output values 10 dB, $0 \, dB$ and $-10 \, dB$ under four carrier frequencies (100, 395, 682, 900 MHz). The corresponding E-field values and SAR is shown in Table 1. Newly emerged flies were exposed either acutely (6 min or 60 min at the 6th day of their adult life) or repeatedly (6 min or 60 min daily for the first 6 days of life). In every exposure protocol more than three independent experiments were performed. Individual experiments were done in duplicates and every sample, for assaying apoptosis, consisted of five pairs of ovaries. Apoptotic follicles were detected due to their spotted fluorescence pattern following AO staining (representative fluorescent images are shown in Figure 2). The number of apoptotic follicles at stages below 10b compared to the total follicles denotes the percentage of apoptosis shown in Figures 3-6.

Acute exposure, of adult flies for 6 min or 60 min at the 6th day of their lives, or repeated exposure, for 6 min or 60 min daily for the first 6 days of life, resulted in an increase of apoptotic cell death, observed in egg chambers. Generally, frequency modulated waves seem to have a stronger effect in apoptotic cell death than continuous waves as described below. Statistically significant difference between CW and FM signals indicates that FM is more bioeffective. In cases where the opposite is true this is stated. For each of the four different frequencies used, under the three power settings and the four exposure scenarios, the detailed findings of the 96 experimental cases are as follows.

Exposure at 100 MHz

The overall data at this frequency are presented in Figure 3 and Table 2.

An acute exposure for 6 min, revealed a statistically significant increase $(p \le 0.001)$ in ovarian cell death



Figure 2. Representative fluorescent images, after AO staining, of ovarian egg chambers (follicles) derived either from control (A–B) or exposed (C–D) flies. Positive AO stained developmental stages 7–8 are present with DNA fragmentation (arrows). Scale Bars = $100 \,\mu$ m.

compared to control samples at all used intensities (10, 0 and -10 dB) in both wave forms. Comparing the two wave forms, CW and FM, there was a statistically significant difference between them at the low output power of -10 dB (p < 0.05) (Figure 3A).

A 60-min acute exposure, resulted in a statistically significant increase in apoptotic cell death compared to control samples, in both wave forms, CW or FM, at output power densities of 10 and $-10 \, \text{dB}$ with p < 0.001 and at 0 dB exposure with p < 0.05 (Table 2). Comparing the two wave forms, FM produced a statistically significant higher increase (p < 0.001) at the output power of 0 and $-10 \, \text{dB}$ (Figure 3B).

After repeated exposure for 6 min daily (for the first 6 days of life) to CW or FM signals, statistically significant increase (p < 0.05 for CW and p < 0.01 for FM), compared to control samples, was observed at power values of 10 and 0 dB. The lowest -10 dB output power had also a statistical significant increase in both waves (p < 0.001), but comparing the two wave forms CW and FM, no statistically significant difference was found in apoptotic cell death caused by any of the three exposure intensities (Figure 3C).

Repeated daily exposure to CW or FM waves for 60 min for 6 days led to a statistically significant increase ($p \le 0.001$) in ovarian cell death, at all power intensities in both wave

types compared to control (Table 2). Comparing the two wave forms, a statistically significant increase (p < 0.05) was detected only at the highest power of exposure (10 dB) (Figure 3D).

Exposure at 395 MHz

The overall data at this frequency are presented in Figure 4 and Table 3.

A statistically significant increase in ovarian cell death compared to control was noticed after acute exposure for 6 min, at the intensities of 10 dB (p < 0.001) and 0 dB (p < 0.001) in both wave forms. Exposure to the lowest intensity (-10 dB) had a statistically significant increase in ACD induced by CW (p < 0.05) but not by the FM signal. No statistically significant difference in apoptotic cell death increase was observed between the continuous and the modulated wave in any exposure intensity (Figure 4A).

A 60-min acute exposure, resulted in a statistically significant increase (p < 0.001) in apoptotic cell death compared to control samples, at all power outputs used, in both wave forms, CW or FM. The ACD percentage between CW and FM exposure was statistically significant at 10, 0 ($p \le 0.05$) and $-10 \, \text{dB}$ (p < 0.001), respectively (Figure 4B).

RIGHTSLINKA)



Figure 3. Bar graph presentation of the ACD percentage mean values. SEM measured at the exposed and the control samples. The frequency of exposure was set at 100 MHz with two wave forms (CW and FM), three output power levels of 10, 0 and -10 dB and four exposure scenarios applied to the *Drosophila* flies: (A) Acute exposure for 6 min at the 6th day of their adult life; (B) Acute exposure for 60 min at the 6th day of their adult life; (C) Repeated exposure for 6 min per day starting from the first day of their lives; (D) Repeated exposure for 60 min per day starting from the first day of their lives; (D) Repeated exposure for 60 min per day starting from the first day of their lives. All of the exposure schemes, either CW or FM mode created a statistically significant increase in the apoptotic cell death percentage compared to controls. Between the two wave forms, FM versus CW, a statistically significant difference was found after exposure at 10 dB in the cases of repeated 60 min exposure, at 0 dB after acute 60 min exposure and finally, at -10 dB after acute exposure of 6 and 60 min (* $p \le 0.05$, ** $p \le 0.01$). CW: Continuous Wave, FM: Frequency Modulation.



Figure 4. Bar graph presentation of the ACD percentage mean values. SEM measured at the exposed and the control samples. The frequency of exposure was set at 395 MHz with two wave forms (CW and FM), three output power levels of 10, 0 and -10 dB and four exposure scenarios applied to the *Drosophila* flies: (A) Acute exposure for 6 min at the 6th day of their adult life; (B) Acute exposure for 60 min at the 6th day of their adult life; (C) Repeated exposure for 6 min per day starting from the first day of their lives; (D) Repeated exposure for 60 min per day starting from the first day of their lives; (D) Repeated exposure for 60 min per day starting from the first day of their lives Nearly all of the exposure schemes either to CW or to FM mode gave a statistically significant increase in the apoptotic cell death percentage compared to controls, except for the acute 6 min exposure at -10 dB. Between the two wave forms, a statistically significant difference was found after exposure: at 10 dB in all protocols except the acute 60 min exposure, at 0 dB after acute 60 min and repeated 60 min exposure and at -10 dB in all protocols except the acute 6 min exposure (* $p \le 0.05$, ** $p \le 0.01$). CW: Continuous Wave, FM: Frequency Modulation.

RIGHTSLINKA)



Figure 5. Bar graph presentation of the ACD percentage mean values. SEM measured at the exposed and the control samples. The frequency of exposure was set at 682 MHz with two wave forms (CW and FM), three output power levels of 10, 0 and -10 dB and four exposure scenarios applied to the *Drosophila* flies: (A) Acute exposure for 6 min at the 6th day of their adult life; (B) Acute exposure for 60 min at the 6th day of their lives; (D) Repeated exposure for 60 min per day starting from the first day of their lives; (D) Repeated exposure for 60 min per day starting from the first day of their lives; (D) Repeated exposure for 60 min per day starting from the first day of their lives; (D) Repeated exposure for 60 min per day starting from the first day of their lives; (D) Repeated exposure for 60 min per day starting from the first day of their lives; (D) Repeated exposure for 60 min per day starting from the first day of their lives; (D) Repeated exposure for 60 min per day starting from the first day of their lives; (D) Repeated exposure for 60 min per day starting from the first day of their lives; (D) Repeated exposure for 60 min per day starting from the first day of their lives; (D) Repeated exposure for 60 min per day starting from the first day of their lives; (D) Repeated exposure for 60 min per day starting from the first day of their lives; (D) Repeated exposure for 60 min per day starting from the first day of their lives; (D) Repeated exposure for 60 min per day starting from the first day of their lives; (D) Repeated exposure for 60 min per day starting from the first day of their lives; (D) Repeated exposure for 60 min per day starting from the first day of their lives; (D) Repeated exposure for 60 min at a love a significant difference was found: (a) at 10 dB in the cases of repeated 6 and 60 min exposure and (b) at 0 dB after acute 6 and 60 min and also after the repeated 60 min exposure. The power of -10 dB did not gave a significant difference between CW and FM exposure (* $p \le 0.05$,



Figure 6. Bar graph presentation of the ACD percentage mean values. SEM measured at the exposed and the control samples. The frequency of exposure was set at 900 MHz with two wave forms (CW and FM), three output power levels of 10, 0 and -10 dB and four exposure scenarios applied to the *Drosophila* flies: (A) Acute exposure for 6 min at the 6th day of their adult life; (B) Acute exposure for 60 min at the 6th day of their adult life; (C) Repeated exposure for 6 min per day starting from the first day of their lives; (D) Repeated exposure for 60 min per day starting from the first day of their lives; (D) Repeated exposure for 60 min per day starting from the first day of their lives. In nearly all exposure schemes either to CW or to FM mode gave a statistically significant increase in the apoptotic cell death percentage compared to controls, except for the CW -10 dB and 0 dB in all exposure protocols and at -10 dB only in the acute 60 min exposure (* $p \le 0.05$, ** $p \le 0.01$). CW: Continuous Wave, FM: Frequency Modulation.

Table 2. Statistical analysis (one-way ANOVA) of apoptotic follicles at a frequency of 100 MHz under three power values (10, 0 and -10 dB) and four exposure durations.

	Exposure at 100) MHz							
Output power	CONTROL/CW	CONTROL/FM	CW/FM						
Exposure duration	6 mir	6 min only the 6th day							
10 dB	**	**	>0.05						
0 dB	**	**	>0.05						
-10 dB	**	**	*						
Exposure duration	60 min only the 6th day								
10 dB	**	**	>0.05						
0 dB	*	*	**						
-10 dB	**	**	**						
Exposure duration	6 mi	n daily for 6 days							
10 dB	*	**	>0.05						
0 dB	*	**	>0.05						
-10 dB	**	**	>0.05						
Exposure duration	60 mi	in daily for 6 days							
10 dB	**	**	*						
0 dB	**	**	>0.05						
-10 dB	**	**	>0.05						

All of the exposed samples either to CW or to FM, showed statistically significant increase in apoptotic cell death percentage, compared to control samples (* $p \le 0.05$, ** $p \le 0.01$). The difference of the FM effect versus CW is significant in four out of the 12 cases. The samples that did not show any statistical significance are designated as >0.05. CW: Continuous Wave, FM: Frequency Modulation.

After repeated exposure for 6 min daily for 6 days to CW or FM signals, the exposed samples revealed a statistically significant increase in ovarian apoptosis (p < 0.001), compared to control samples at all three power intensities (Table 3). Comparing the two wave forms, a statistically significant difference between CW and FM with p < 0.05 was detected only at the lowest power of exposure (-10 dB), where CW was found to be more bioeffective unlike all other recorded cases. At the 10 dB intensity, a marginally statistically significant difference (p = 0.050) was found with FM having higher apoptotic potential on ovarian cell death than CW (Figure 4C; see also supplementary Table S1).

Daily repeated exposure for 60 min for 6 days to CW or FM signals, led to a statistically significant increase (p < 0.001) in ovarian cell death at all three power intensities for both wave types compared to the control samples. Also, a statistically significant difference in ACD increase was detected between the CW and FM exposure at the 10 and -10 dB power intensity with $p \le 0.001$ and at 0 dB with p < 0.05 (Figure 4D).

Exposure at 682 MHz

The overall data at this frequency are presented in Figure 5 and Table 4.

Exposing flies acutely for 6 min at the 6th day, resulted in a statistically significant increase ($p \le 0.01$) in ovarian cell death compared to control samples at all used intensities (10, 0 and $-10 \,\text{dB}$) in both wave forms. The comparison between the two wave forms disclosed a statistically significant increase only at the power of 0 dB (p < 0.01) (Figure 5A).

Table 3. Statistical analysis (one-way ANOVA) of apoptotic follicles at a frequency of 395 MHz under three power values (10, 0 and -10 dB) and four exposure durations.

	Exposure at 395	5 MHz						
Output power	CONTROL/CW	CONTROL/FM	CW/FM					
Exposure duration	6 min only the 6th day							
10 dB	**	**	>0.05					
$-10 \mathrm{dB}$	**	>0.05	>0.05 >0.05					
Exposure duration	60 min only the 6th day							
10 dB 0 dB 	** ** **	** ** **	* * **					
Exposure duration	6 min daily for 6 days							
10 dB 0 dB -10 dB	** ** **	** ** **	* >0.05 *					
Exposure duration	60 mi	in daily for 6 days						
10 dB 0 dB -10 dB	** ** **	** ** **	** * **					

All of the exposed samples either to CW or to FM, showed statistically significant increase in apoptotic cell death percentage, compared to control samples (* $p \le 0.05$, ** $p \le 0.01$) except of one sample exposed to very low power (-10 dB). The difference of the FM effect versus CW is significant in seven out of the 12 cases. The samples that did not show any statistical significance are designated as >0.05. CW: Continuous Wave, FM: Frequency Modulation.

Acute 60-min exposure at the 6th day, showed a statistically significant increase (p < 0.01) in apoptotic cell death compared to control samples, at all output powers, in both wave forms (CW or FM). No significant difference was found comparing the induction of apoptotic cell death between FM and CW except under the intensity of 0 dB (p < 0.01) (Figure 5B).

After repeated exposure for 6 min daily for 6 days to CW or FM signals, a statistically significant increase in ACD (p < 0.001), compared to control samples, was observed at all tested power values (Table 4). Comparing the two wave forms, in regard to ovarian apoptosis, the modulated wave provoked a larger increase (p < 0.001) at the highest power of exposure (10 dB) only (Figure 5C).

At the repeated exposure protocol to the frequency of 682 MHz for 60 min daily for 6 days, using either CW or FM waveform, led to a statistically significant increase (p < 0.001) in ovarian cell death at all three power intensities for both wave types compared to the control samples. Statistically significant difference in ACD was detected between the CW and FM exposure only at 10 and 0 dB power densities (p < 0.01) with the modulated signal to be more bioactive (Figure 5D).

Exposure at 900 MHz

The overall data at this frequency are presented in Figure 6 and Table 5.

Acute exposure for 6 min at the 6th day, revealed a statistically significant increase (p < 0.001) in ovarian cell

Table 4. Statistical analysis (one-way ANOVA) of apoptotic follicles at a frequency of 682 MHz under three power values (10, 0 and -10 dB) and four exposure durations.

	Exposure at 682	2 MHz						
Output power	CONTROL/CW	CONTROL/FM	CW/FM					
Exposure duration	6 min only the 6th day							
10 dB	**	**	>0.05					
0 dB	**	**	**					
$-10\mathrm{dB}$	**	**	>0.05					
Exposure duration	60 mi	n only the 6th day						
10 dB	**	**	>0.05					
0 dB	**	**	*					
-10 dB	**	**	>0.05					
Exposure duration	6 mi	n daily for 6 days						
10 dB	**	**	**					
0 dB	**	**	>0.05					
-10 dB	**	**	>0.05					
Exposure duration	60 m	in daily for 6 days						
10 dB	**	**	**					
0 dB	**	**	**					
-10 dB	**	**	>0.05					

All of the exposed samples either to CW or to FM, showed statistically significant increase in apoptotic cell death percentage, compared to control samples (* $p \le 0.05$, ** $p \le 0.01$). The difference of the FM effect versus CW is significant in five out of the 12 cases. The samples that did not show any statistical significance are designated as >0.05. CW: Continuous Wave, FM: Frequency Modulation.

death compared to control samples at the intensities of 10 and 0 dB in both wave forms. In the case of the lowest intensity (-10 dB) FM exposure had a statistically significant impact (p < 0.05), whilst CW exposure had no significant increase in ACD. The increase induced by FM wave was statistically significant, compared to CW at 10 dB (p < 0.001) and 0 dB (p < 0.05) (Figure 6A).

A 60-min acute exposure at the 6th day resulted in a statistically significant increase (p < 0.01) in apoptotic cell death after CW and FM exposure of the flies compared to control samples, at the output power densities of 10 and 0 dB. However, after using an output power of $-10 \, \text{dB}$, the increase in ACD was statistically significant only after exposure to the frequency modulated wave (p < 0.05). CW and FM comparison found to be statistically significant at all output power used (10, 0 and $-10 \, \text{dB}$) (p < 0.05 for 10 dB and p < 0.001 for 0 dB and $-10 \, \text{dB}$) (Figure 6B).

Repeated exposure for 6 min daily for 6 days to CW or FM wave provoked a statistically significant increase in ACD (p < 0.001) compared to control samples at power values of 10 and 0 dB, but at -10 dB output power the increase was statistically significant only in the case of the FM wave (p < 0.01). Statistical analysis between the two wave forms uncovered a statistically significant difference (p < 0.01) at 10 and 0 dB output intensities (Figure 6C).

After repeated exposure to CW or FM waves for 60 min daily for 6 days, ovarian cell death revealed a statistically significant increase (p < 0.001) for both wave types compared to control for all three power intensities (10, 0 and -10 dB). Comparing the CW and FM exposure, a statistically significant higher effect of the modulated signal in ACD was Table 5. Statistical analysis (one-way ANOVA) of apoptotic follicles at a frequency of 900 MHz under three power values (10, 0 and -10 dB) and four exposure durations.

	Exposure at 900) MHz						
Output power	CONTROL/CW	CONTROL/FM	CW/FM					
Exposure duration	6 min only the 6th day							
10 dB	**	**	**					
0 dB -10 dB	** >0.05	** *	* >0.05					
Exposure duration	60 min only the 6th day							
10 dB	**	**	*					
0 dB	**	**	**					
$-10 \mathrm{dB}$	>0.05	*	**					
Exposure duration	6 min daily for 6 days							
10 dB	**	**	**					
0 dB	**	**	**					
-10 dB	>0.05	**	>0.05					
Exposure duration	60 mi	in daily for 6 days						
10 dB	**	**	**					
0 dB	**	**	**					
-10 dB	**	**	>0.05					

All of the exposed samples either to CW or to FM, showed statistically significant increase in apoptotic cell death percentage, compared to control samples (* $p \le 0.05$, ** $p \le 0.01$) except of some samples exposed to very low power (-10 dB). The difference of the FM effect versus CW is significant in nine out of the 12 cases. The samples that did not show any statistical significance are designated as >0.05. CW: Continuous Wave, FM: Frequency Modulation.

found in 10 dB and 0 dB exposure intensity (p = 0.001) (Figure 6D).

Discussion

In the last few decades, a serious concern is expressed about the biological effects of the electromagnetic fields of nonionizing radiation, which are constantly growing with the development of telecommunication systems. The question of whether or not modulated waves are more bioactive than their CW counterparts remains open until now, since the available data offer controversial conclusions. Several factors may be responsible for the inconclusive research outcomes, as cell responses may vary according to the duration of the exposure and/or the signal characteristics, such as modulation scheme and waveform. In particular, the modulation of the emitted radiofrequency has been an object for investigation for many years (for a review see Juutilainen et al., 2011).

The present study having this issue as one of its goals has demonstrated that the vast majority of the experimental cases (discussed below) using frequency-modulated signals coming from a generator are indeed more bioactive under the specific conditions used; the model biological system and the exposure parameters. Thus, as shown in Tables 6 and 7, in 25 out of 48 experimental cases of our study there is a greater statistically significant bioeffect after FM exposure compared to CW exposure (the other conditions being the same). It is interesting to point out that nine of these cases come from exposure to 900 MHz denoting the greater bioactivity of this frequency band although the E-field and SAR values are very low (0.23–3.0 V/m and 0.1–11 mW/kg; see Table 1).

Table 6. Presentation of *p* values comparing ACD during oogenesis in *Drosophila*, between FM and CW exposure mode at all frequencies tested (100, 395, 682 and 900 MHz) and power values (+10 dB, 0 and -10 dB).

			Gener	ator pow	er 10 dB			Genera	tor pow	ver 0 dB		G	enerator	power	-10 dE	3	
One-way ANOVA (LSD)	Frequency (MHz)	100	395	682	900	Score	100	395	682	900	Score	100	395	682	900	Score	Total score
Acute exposure	6 min 60 min	0.299 0.250	0.226 0.050	0.205 0.591	<0.001 0.033	1 2	0.335 < 0.001	0.806 0.013	0.005 0.026	0.026 <0.001	2 4	0.050 <0.001	0.135 < 0.001	0.402 0.164	0.232 0.007	1 3	4 9
Repeated exposure	6 min 60 min Score	0.071 0.022 1	0.050 0.001 3	<0.001 0.007 2	0.001 0.001 4	3 4	0.147 0.372 1	0.164 0.013 2	0.221 0.008 3	0.001 0.001 4	1 3	0.209 0.299 2	0.041 <0.001 3	0.766 0.095 0	0.109 0.932 1	1 1	5 8
		Tot	al scor	e at 10 d	B: 10		Tota	l score	at 0 dE	B: 10		Total	score at	-10 d	B: 6		

Bold: Statistical significant values ($p \le 0.05$). Score or total score indicates how many values are statistically significant in every group, in relation with output power, frequency or duration tested.

Table 7. Representation of the FM versus CW effect in the various frequencies (100, 395, 682 and 900 MHz, respectively) and power levels (10, 0, -10 dB) at the various exposure conditions (acute 6 and 60 min at the 6th day, repeated 6 and 60 min daily for the first 6 days of their life).

			Acute e	exposure					Repeated	exposure			
		6 min			60 min			6 min			60 min		
Frequency	10 dB	0 dB	-10 dB	10 dB	0 dB	-10 dB	10 dB	0 dB	-10 dB	10 dB	0 dB	-10 dB	Score FM versus CW
100 MHz 395 MHz 682 MHz 900 MHz	0 0 0 +	0 0 + +	+ 0 0 0	0 + 0 +	+ + +	+ + 0 +	0 + + +	0 0 0 +	0 0 0	+ + + +	0 + + +	0 + 0 0	4-0 7-1 5-0 9-0

Score value indicates, after statistical analysis, whether FM is more bioactive than CW (+ sign) or less bio-effective (-sign) or finally if there is no difference between the two waveforms (0 sign).

Regarding the other frequencies used, eight of the cases for which FM is more bioactive than CW belong to the 395 MHz exposure, whereas 682 MHz results in five and 100 MHz in as low as four such cases. Thus, 900 MHz regardless of power and duration produces the largest difference in apoptotic effects between FM and CW (Table 7) in the biological system of *D. melanogaster* oogenesis. Overall, only in one case does the CW signal appear more bioeffective, statistically significant, than the FM one (395 MHz, repeated 6 min, 6 days, -10 dB; see Figure 4) the importance of which cannot be evaluated so far.

These results confirm other investigations which imply that modulated waves are more bioactive than continuous ones (d'Ambrosio et al., 2002; Guler et al., 2011; Juutilainen et al., 2011; Lai and Singh, 1997; Markkanen et al., 2004), although, there are studies supporting the opposite; that CW signals are more hazardous under certain exposure conditions (Persson et al., 1997; Salford et al., 1994).

Not having other data associated with these exposure conditions it is hard to explain why the modulated radiofrequency wave of a signal at 50 kHz (routinely used in FM broadcasting of speech and music) would be more bioactive than a CW one. We can only postulate that the target biological molecules (ion channel proteins, heat shock proteins, ROS creating molecules, etc.) react more readily to an oscillating (or pulsed) wave compared to a steady one as found in several publications using different model systems, frequencies and modulations (Capri et al., 2004b; d'Ambrosio et al., 2002; Franzellitti et al., 2010; Regel et al., 2007). In fact, our previous studies in *Drosophila* oogenesis have indicated ROS induction in ovaries following exposure to EMFs (Manta et al., 2014).

Another aspect that has been of concern to EMF scientists and also an objective of this work has to do with the actual intensity threshold at which modern techniques can detect biological changes. A number of controversial publications has studied this question and in some of them new exposure guidelines have been proposed (Fragopoulou et al., 2010). Supporting evidence to our data comes from Persson et al. (1997), who showed that exposed rats had their BBB affected by low-to-middle SAR values (1-10 mW/kg). Interestingly, our data show maximum apoptotic effect in Drosophila oogenesis (Figure 7) at similar SAR values (1-12 mW/kg, 0 dB power; see Table 1). Along the same rationale, as demonstrated in Figure 7, the pattern of apoptotic potential induced by the EMFs used (100, 395, 682 and 900 MHz) varies non-linearly with modulation (CW or FM), frequency, power intensity (or SAR) and exposure scenarios.

A more thorough survey of our results indicates that there is a differential impact between the various frequencies tested. It seems that in general the effect is more pronounced at 900 MHz followed by 395 MHz, 682 MHz and 100 MHz (Table 7). These observations of the different effect noted between the frequencies can indicate the possible presence of "frequency windows" concerning bioeffects of modulated signals in comparison to the CW signals. Thus, 900 MHz signals regardless of power and duration produces the larger difference in apoptotic effects between FM and CW.



Figure 7. Diagrammatic representation of the apoptotic fold-up, presented as a percentage (%) from control, induced by radiation related to exposure scenarios, generator output power in dB and frequency. At 100 MHz, there is no dramatic decrease of apoptosis as power goes 20 dB down. In fact two exposure setups (6 min acute and 6 min repeated) have raised apoptotic levels at the middle power of 0 dB. At 395 MHz, the correlation is similar to 100 MHz, whereas at 682 MHz there is practically the same effect in all three generator intensities (10, 0 and $-10 \,\text{dB}$) for all four exposure setups. At 900 MHz the major difference is that 60 min acute exposure shows the anticipated reduction of the effect by lowering the power of exposure. (The line 100% refers to the baseline ACD levels of the controls).

Dependence of bio-effectivity on intensity appears to be non-linear. An "expected" behavior (lower effect at lower intensity) is followed only in the longest exposure scenario (repeated exposure - 60 min/daily for 6 days) with the intensity lowered by 20 dB. In most cases (as shown in Figure 7) exposing the flies with 10 dB less power (i.e. from $10 \,dB$ to $0 \,dB$ or from $0 \,dB$ to $-10 \,dB$), apoptosis either remains the same or as in the case mentioned above, is rising (100 MHz, 395 MHz – acute exposures 6 min and 60 min and also 900 MHz acute 6 min - see Figures 7A, B and D, respectively). It is worth pointing out that all exposures at 682 MHz regardless of power and exposure scenario have the same moderate apoptotic fold-up (Figure 7C). The only case in which there is a clear reduction of effect by lowering the power is the 60-min acute exposure at 900 MHz (Figure 7D); in which case, however, FM exposure produces a statistically significant result of apoptosis above CW value (Figure 6B, Table 5).

Induction of ovarian apoptosis does not depend linearly on the duration of exposure (Figures 8 and 9). At the lowest generator power intensity (-10 dB) the effect is more pronounced at the repeated exposures, whilst higher intensities do not seem to present any motif between duration and the biological impact induced. Repeated 60-min exposure is more bio-effective than repeated 6 min, for the highest intensity used (10 dB), something that is not observed at lower intensities (0 dB, -10 dB). On the other hand, there is a correlation between the duration of irradiation and the bioactivity of FM signal in comparison to CW signals. Thus, the acute 6-min exposure produces 4+ score (FM versus CW), the acute 60-min exposure produces 9+ (Table 6). Also the repeated 6 min daily for 6 days exposure has 5+ scores, whereas the repeated 60 min for 6 days exposure produces 8+ scores (Table 6).

Finally, this work demonstrates that at the frequency of 900 MHz, an E-field as low as 250 mV/m can induce



Figure 8. Line graphs showing the correlation between the percentages (%) fold-up of ACD induced by CW exposure compared to controls, as a function of power, frequency and exposure scenarios applied to the *Drosophila* flies: (A) Acute exposure for 6 min at the 6th day of their adult life; (B) Acute exposure for 60 min at the 6th day of their adult life; (C) Repeated exposure for 6 min per day starting from the first day of their lives; (D) Repeated exposure for 60 min per day starting from the first day of their lives; (D) Repeated exposure for 60 min per day starting from the first day of their lives. An intensity window is revealed at 0 dB only after the acute 6 min-exposure at the lower frequencies of 100 and 395 MHz (A), not visible neither after acute 60 min-exposure (B) nor after the repeated protocols (C, D). This result could mean that low dose-short exposures do not allow the biological system to fire its defense mechanisms. In repeated exposure a stable more or less effect is found (although a frequency dependency is visible) regardless of the 10-fold reduction of EMF intensity (C, D). CW: Continuous Wave.



Figure 9. Line graphs showing the correlation between the percentages (%) fold-up of ACD induced by FM exposure compared to controls, as a function of power, frequency and exposure scenarios applied to the *Drosophila* flies: (A) Acute exposure for 6 min at the 6th day of their adult life; (B) Acute exposure for 60 min at the 6th day of their adult life; (C) Repeated exposure for 6 min per day starting from the first day of their lives; (D) Repeated exposure for 60 min per day starting from the first day of their lives. The intensity window seen under CW exposure (see Figure 8A) is also present under FM exposure conditions at nearly all frequencies (395, 682, 900 MHz), unlike the response of the system to the repeated 60 min which is nearly the same in all EMF intensities regardless of the 10-fold reduction (C and D). FM: Frequency Modulation.

Table 8. Percentage (%) fold up of apoptotic cell death of the CW exposed samples compared to the controls, as a function of power and frequency.

						Acute e	xposure	e				Repeated	exposu	re	
E-Field comp	E-Field compared to the output value					6 min 60 min			6 min			60 min			
10 dB	0 dB	-10 dB	Frequency of exposure	10 dB	0 dB	-10 dB	10 dB	0 dB	-10 dB	10 dB	0 dB	-10 dB	10 dB	0 dB	-10 dB
4.79 9.25 5.78 3.00	1.51 2.95 1.48 0.92	0.48 0.98 0.48 0.26	100 MHz 395 MHz 682 MHz 900 MHz	200 224 187 203	240 279 187 259	162 154 155 152	239 240 219 299	142 178 217 179	153 159 165 094	134 237 148 170	170 226 226 145	156 219 148 128	230 189 205 251	265 259 204 238	196 196 237 206

Table 9. Percentage (%) fold up of ACD of the FM-exposed samples compared to the controls, as a function of power and frequency.

					Acute exposure						Repeated	exposu	ire			
E-Field comp	E-Field compared to the output value					6 min 60 min			n	6 min				60 min		
10 dB	0 dB	-10 dB	Frequency of exposure	10 dB	0 dB	-10 dB	10 dB	0 dB	-10 dB	10 dB	0 dB	-10 dB	10 dB	0 dB	-10 dB	
4.58 9.27 5.59 3.07	1.53 3.15 1.53 0.80	0.48 1.10 0.45 0.23	100 MHz 395 MHz 682 MHz 900 MHz	223 203 206 288	223 274 238 313	195 120 168 196	274 291 229 341	221 216 232 294	206 214 144 132	164 276 211 249	210 252 255 278	172 181 152 153	291 274 257 338	286 325 246 331	221 262 265 204	

apoptotic cell death in the ovaries of *D. melanogaster* depending on the exposure duration (Tables 8 and 9, Figures 7–9). It is true then that, depending on the model, biological system used the threshold is different and it also depends on the exposure conditions. Therefore, the statement that "testing low SAR values would be indicated in cases of positive findings at high SAR" (Luukkonen et al., 2009) may not be correct and in fact it may have discouraged research at low SAR exposures.

In conclusion, our experiments reveal that there are intensity and frequency windows of bioeffects at certain values below and above which the effect is lower (Figure 7). This behavior suggests that EMF-biological tissue interaction is not linear in response and it seems plausible to propose at this point that translating such experimental data into possible human exposure guidelines is highly arbitrary and impossible using available scientific tools. This work also emphasizes the need for reconsideration of published data that are either inconclusive or controversial under the scope that different organisms, respond entirely differently under the same exposure conditions. It would be ideal for unraveling the mechanisms associated with EMF-living matter interaction to have the same model system studied under the same exposure conditions by different laboratories using complementary approaches through international, concerted research activities.

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

This research has been co-financed by the European Union (European Social Fund-ESF) and Greek national funds through the Operational Program "Education and Lifelong Learning" of the National Strategic Reference Framework (NSRF)-Research Funding Program: THALIS-MIS-375784: "Biological effects of non-ionizing electromagnetic radiation: a multidisciplinary approach" grant coordinated by L. H. Margaritis.

References

- Abrams J. M., White K., Fessler L. I., et al. (1993). Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis. *Development* 117: 29–43.
- Capri, M., Scarcella, E., Bianchi, E., et al. (2004a). 1800MHz 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.* 8:389–397.
- Capri, M., Scarcella, E., Fumelli, C., et al. (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.* 162:211–218.
- Caraglia, M., Marra, M., Mancinelli, F., et al. (2005). Electromagnetic fields at mobile phone frequency induce apoptosis and inactivation of the multi-chaperone complex in human epidermoid cancer cells. J. Cell. Physiol. 204:539–548.
- 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. *Mutat. Res.* 700:51–61.
- d'Ambrosio, G., Massa, R., Scarfi, M.-R., et al. (2002). Cytogenetic damage in human lymphocytes following GMSK phase modulated microwave exposure. *Bioelectromagnetics* 23:7–13.
- Drummond-Barbosa, D., Spradling, A. C. (2001). Stem cells and their progeny respond to nutritional changes during *Drosophila* oogenesis. *Dev. Biol.* 231:265–278.
- Fragopoulou, A., Grigoriev, Y., Johansson, O., et al. (2010). Scientific panel on electromagnetic field health risks: Consensus points, recommendations, and rationales. J. Rev. Environ. Health 25: 307–317.
- Franzellitti, S., Valbonesia, P., Ciancaglinia, N., et al. (2010). Transient DNA damage induced by high-frequency electromagnetic fields (GSM 1.8 GHz) in the human trophoblast HTR-8/SVneo cell line evaluated with the alkaline comet assay. *Mutat. Res.* 683:35–42.
- Guler, G., Ozgur, E., Keles, H., et al. (2011). Apoptosis resulted from radiofrequencies radiation exposure of pregnant rabbits and their infants. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*. 55:127–134.

- Hayashi, M., Sofuni, T., Ishidate Jr, M. (1983). An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutat. Res.* 120:241–247.
- Hook, G. J., Zhang, P., Lagroye I., et al. (2004). Measurement of DNA damage and apoptosis in Molt-4 cells after in vitro exposure to radio frequency radiation. *Radiat. Res.* 161:193–200.
- ICNIRP. (1998). Guide lines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic and electromagnetic fields (up to 300 GHz). *Health Phys.* 74:494–522.
- Joubert, V., Bourthoumieu, S., Leveque, P., et al. (2008). Apoptosis is induced by radiofrequency fields through the caspase-independent mitochondrial pathway in cortical neurons. *Radiat. Res.* 169:38–45.
- Joubert, V., Leveque, P., Rametti, A., et al. (2006). Microwave exposure of neuronal cells in vitro: Study of apoptosis. *Int. J. Radiat. Biol.* 82: 267–275.
- Juutilainen, J., Hoyto, A., Kumlin, T., et al. (2011). Review of possible modulation-dependent biological effects of radiofrequency fields. *Bioelectromagnetics* 32:511–534.
- Komatsubara, Y., Hirose, H., Sakurai, T., et al. (2005). Effect of highfrequency electromagnetic fields with a wide range of SARs on chromosomal aberrations in murine m5S cells. *Mutat. Res.* 587: 114–119.
- Kubinyi, G., Thuroczy, G., Bakos, J., et al. (1996). Effect of continuouswave and amplitude-modulated 2.45GHz microwave radiation on the liver and brain aminoacyl-transfer RNA synthetases of in utero exposed mice. *Bioelectromagnetics* 17:497–503.
- Lai, H., Singh, N. P. (1997). Melatonin and a Spin-Trap compound block radiofrequency electromagnetic radiation-induced DNA strand breaks in rat brain cells. *Bioelectromagnetics* 18:446–454.
- Lee, K.-S., Choi, J.-S., Hong, S.-Y., et al. (2008). Mobile phone electromagnetic radiation activates MAPK signaling and regulates viability in *Drosophila*. *Bioelectromagnetics* 29:371–379.
- Lim, H. B., Cook, G. G., Barker, A. T., et al. (2005). Effect of 900 MHz electromagnetic fields on nonthermal induction of heat-shock proteins in human leukocytes. *Radiat. Res.* 163:45–52.
- Luukkonen, J., Hakulinen, P., Maki-Paakkanen, J., et al. (2009). Enhancement of chemically induced reactive oxygen species production and DNA damage in human SH-SY5Y neuroblastoma cells by 872MHz radiofrequency radiation. *Mutat. Res.* 662:54–58.
- Maeda, K., Maeda, T., Qi, Y. (2004). In vitro and in vivo induction of human LoVo cells into apoptotic process by non-invasive microwave treatment: A potentially novel approach for physical therapy of human colorectal cancer. *Oncol. Rep.* 11:771–775.
- Manta, A. K., Stravopodis, D. J., Papassideri, I. S., et al. (2014). Reactive oxygen species elevation and recovery in *Drosophila* bodies and ovaries following short term and long term exposure to DECT base EMF. *Electromagn. Biol. Med.* 33:118–131.
- Margaritis, L. H. (1985). Structure and function of the insect egg-shell. In: Gilbert L. I., Kerkut, G. A. Comprehensive Insect Physiology,

Biochemistry and Pharmacology. Vol. 1, Chap. 6, Oxford and New York: Pergamon Press. pp. 151–230.

- Margaritis, L. H. (1986). The eggshell of *Drosophila melanogaster*. New staging characteristics and fine structural analysis of choriogenesis. *Can. J. Zool.* 64:2152–2175.
- Margaritis, L. H., Kafatos, F. C., Petri, W. H. (1980). The eggshell of *Drosophila melanogaster* I. The fine structure of the layers and regions of the wild type eggshell. J. Cell Sci. 43:1–35.
- Margaritis, L. H., Manta, A. K., Kokkaliaris, C. D., et al. (2014). Drosophila oogenesis as a bio-marker responding to EMF sources. Electromagn. Biol. Med. 33:165–189.
- Markkanen, A., Penttinen, P., Naarala, J., et al. (2004). Apoptosis induced by ultraviolet radiation is enhanced by amplitude modulated radiofrequency radiation in mutant yeast cells. *Bioelectromagnetics* 25:127–133.
- McCall, K. (2004). Eggs over easy: Cell death in the *Drosophila* ovary. *Dev. Biol.* 274:3–14.
- Nezis, I. P., Stravopodis, D. J., Margaritis, L. H., et al. (2006). Chromatin condensation of ovarian nurse and follicle cells is regulated independently from DNA fragmentation during *Drosophila* late oogenesis. *Differentiation* 74:293–304.
- Nezis, I. P., Stravopodis, D. J., Papassideri, I., et al. (2000). Stagespecific apoptotic patterns during *Drosophila* oogenesis. *Eur. J. Cell Biol.* 79:610–620.
- Nezis, I. P., Stravopodis, D. J., Papassideri, I., et al. (2001). Actin cytoskeleton reorganization of the apoptotic nurse cells during the late developmental stages of oogenesis in *Dacus oleae*. *Cell Motil. Cytoskel*. 48:224–233.
- Nezis, I. P., Stravopodis, D. J., Papassideri, I., et al. (2002). Dynamics of apoptosis in the ovarian follicle cells during the late stages of *Drosophila* oogenesis. *Cell Tissue Res.* 307:401–409.
- Panagopoulos, D. J., Margaritis, L. H. (2010). The effect of exposure duration on the biological activity of mobile telephony radiation. *Mutat. Res.* 699:17–22.
- Persson, B. R., Salford, L. G., Brun, A. (1997). Blood-brain barrier permeability in rats exposed to electromagnetic fields used in wireless communication. *Wireless Networks* 3:455–461.
- Regel, S. J., Gottselig, J. M., Schuderer, J., et al. (2007). Pulsed radio frequency radiation affects cognitive performance and the waking electroencephalogram. *Neuroreport* 18:803–807.
- Salford, L. G., Brun, A., Sturesson, K., et al. (1994). Permeability of the blood-brain barrier induced by 915 MHz electromagnetic radiation, continuous wave and modulated at 8, 16, 50, and 200 Hz. *Microsc. Res. Tech.* 27:535–542.
- Velentzas A. D., Nezis I. P., Stravopodis D. J., et al. (2007). Stagespecific regulation of programmed cell death during oogenesis of the medfly *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae). *Int. J. Dev. Biol.* 51: 57–66.
- White K., Grether M. E., Abrams J. M., et al. (1994). Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. Science 264:677–683.
- Supplementary material available online Supplementary Table S1.

Electromagn Biol Med, Early Online: 1–25 © 2013 Informa Healthcare USA, Inc. DOI: 10.3109/15368378.2013.800102

ORIGINAL ARTICLE

AND MEDICINE

BIOLOGY

Drosophila oogenesis as a bio-marker responding to EMF sources

Lukas H. Margaritis¹, Areti K. Manta¹, Constantinos D. Kokkaliaris¹, Dimitra Schiza¹, Konstantinos Alimisis¹, Georgios Barkas¹, Eleana Georgiou¹, Olympia Giannakopoulou¹, Ioanna Kollia¹, Georgia Kontogianni¹, Angeliki Kourouzidou¹, Angeliki Myari¹, Fani Roumelioti¹, Aikaterini Skouroliakou², Vasia Sykioti¹, Georgia Varda¹, Konstantinos Xenos¹, and Konstantinos Ziomas¹

¹Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, Athens, Greece and ²Department of Physics and Chemistry, T.E.I. of Athens, Agiou Spuridonos, Aigaleo, Athens, Greece

Abstract

The model biological organisms Drosophila melanogaster and Drosophila virilis have been utilized to assess effects on apoptotic cell death of follicles during oogenesis and reproductive capacity (fecundity) decline. A total of 280 different experiments were performed using newly emerged flies exposed for short time daily for 3–7 d to various EMF sources including: GSM 900/1800 MHz mobile phone, 1880–1900 MHz DECT wireless base, DECT wireless handset, mobile phone-DECT handset combination, 2.44 GHz wireless network (Wi-Fi), 2.44 GHz blue tooth, 92.8 MHz FM generator, 27.15 MHz baby monitor, 900 MHz CW RF generator and microwave oven's 2.44 GHz RF and magnetic field components. Mobile phone was used as a reference exposure system for evaluating factors considered very important in dosimetry extending our published work with D. melanogaster to the insect D. virilis. Distance from the emitting source, the exposure duration and the repeatability were examined. All EMF sources used created statistically significant effects regarding fecundity and cell death-apoptosis induction, even at very low intensity levels (0.3 V/m blue tooth radiation), well below ICNIRP's guidelines, suggesting that Drosophila oogenesis system is suitable to be used as a biomarker for exploring potential EMF bioactivity. Also, there is no linear cumulative effect when increasing the duration of exposure or using one EMF source after the other (i.e. mobile phone and DECT handset) at the specific conditions used. The role of the average versus the peak E-field values as measured by spectrum analyzers on the final effects is discussed.

Introduction

Wireless communication devices are widely used worldwide at nearly all human activities at home, for entertainment, for education and especially at work. The related devices include the well-known cell phones (nearly 6 billion users globally), the wireless DECT telephones (no records available but apparently their number is considered very high), the wireless local area network routers (no records available), iPads which are increasingly penetrating the market having only Wi-Fi (and not wired) internet access, not to mention the baby monitors and the also newly developed "smart meters". Apart from the above "electromagnetic pollution" sources, there is also direct or indirect radiation exposure of humans by FM and TV broadcast stations, cell phone network mast stations, TETRA police and fire department antennae and many more. Because people may be adversely affected by the environmental impact of such electromagnetic fields (EMFs), it is of great scientific and social interest to explore the

Keywords

Apoptosis, baby monitor, blue tooth, DECT base, DECT handset, Drosophila, EMFs, mobile phones, MW oven, reproduction, Wi-Fi

History

Received 31 August 2012 Revised 2 March 2013 Accepted 7 April 2013 Published online 31 July 2013

possible health hazards (Behari, 2010) potentially caused by this radiation spectrum. Major research is associated mainly with cell phones, while at the same time the other sources have been neglected with the exception of the epidemiological and partially clinical studies involving DECT phones (Hardell & Carlberg, 2009; Hardell et al., 2004, 2006, 2011; Khurana et al., 2010). Mobile phone-like radiation studies have been performed during the last decades investigating a variety of biological effects, in humans with clinical studies and experimental work with rodents, flies and cell cultures. Assessing the possible link between exposure to electromagnetic fields and genotoxic effects, a number of studies have reported DNA damage, cell malformations, apoptotic cell death, changes in chromatin conformation and micronucleus formation in different cell types or organisms (Lai & Singh, 1996; Lixia et al., 2006; Ruediger, 2009; Zhao et al., 2007). However, in other studies, no genotoxic effects from exposure to EMF were observed (Belyaev et al., 2006; Verschaeve, 2005).

Mobile phone radiation has been also found to cause broad changes in gene and protein expression in certain cell types (Belyaev et al., 2006; Nylund & Leszczynski, 2006; Nylund et al., 2009; Remondini et al., 2006). Our group using

Address correspondence to Lukas H. Margaritis, Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, Athens University, Panepistimiopolis, 15784 Athens, Greece. E-mail: Loukas.Margaritis@ biol.uoa.gr



ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ ΑΡΕΤΗ ΜΑΝΤΑ

BIOAOTOE (BSC, MSC)

Παρούσα επαγγελματική δραστηριότητα: Υποψήφια Διδάκτωρ του Τομέα Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής, Τμήματος Βιολογίας, Σχολής Θετικών Επιστημών, Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ)

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνομα: Αρετή Επώνυμο: Μαντά Διεύθυνση κατοικίας: Νυμφών 17, Γαλάτσι Αττικής, Αθήνα Τηλέφωνο εργασίας: +30 210 7274090

1. <u>ΣΠΟΥΔΕΣ:</u>

Κινητό τηλέφωνο: +30 6944584736 **Ημερομηνία γέννησης:** 13 / 08 /1985 **Φύλο:** Γυναίκα **Εθνικότητα:** Ελληνίδα **E-mail:** <u>aretimanda@biol.uoa.gr</u>

Δεκέμβριος 2011 – σήμερα	Υποψήφια Διδάκτωρ	Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Βιολογίας Κυπάρου & Βιοφυσικής
Σεπτἑμβριος 2009 – Οκτώβριος 2011	Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης Τίτλος: «Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική»	Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας και Ιατρική Σχολή
Απρίλιος – Οκτώβριος 2006	Πρακτική Άσκηση	Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Τμήμα Ζωικών Προτύπων Βιοϊατρικής Έρευνας, Μονάδα Διαγονιδιακής Τεχνολογίας
Νοέμβριος 2003 – Σεπτέμβριος 2009	Πτυχίο Βιολογίας	Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Βιολογίας

2. <u>ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ:</u>

Μάιος 2012 – Σεπτέμβριος 2015	Θέση Βιολόγου	Ερευνητικό πρόγραμμα ΘΑΛΗΣ MIS 375784, ΕΚΠΑ, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής
Ιούνιος 2011- Μάιος 2012	Θέση Βιολόγου	Ιδιωτική τράπεζα φύλαξης βλαστοκυττάρων, "Interbiobank", Χαΐδάρι Αττικής, Αθήνα

3. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

- Velentzas AD, Anagnostopoulos AK, Velentzas PD, Mpakou VE, Sagioglou NE, Tsioka MM, Katarachia S, <u>Manta AK</u>, Konstantakou EG, Papassideri IS, Tsangaris GT, Stravopodis DJ. Global Proteomic Profiling of Drosophila Ovary: A High-resolution, Unbiased, Accurate and Multifaceted Analysis. Cancer Genomics Proteomics. 2015 11-12;12(6):369-384.
- Sagioglou NE, <u>Manta AK</u>, Giannarakis IK, Skouroliakou AS, Margaritis LH. Apoptotic cell death during Drosophila oogenesis is differentially increased by electromagnetic radiation depending on modulation, intensity and duration of exposure. Electromagn Biol Med. 2015 Aug 21:1-14.
- Fasseas MK, Fragopoulou AF, <u>Manta AK</u>, Skouroliakou AS, Vekrelis K, Margaritis LH, Syntichaki P. Response of Caenorhabditis elegans to wireless devices radiation exposure. Int J Radiat Biol. 2015; 91(3):286-93.
- <u>Manta AK</u>, Stravopodis DJ, Papassideri IS, Margaritis LH. *Reactive oxygen* species elevation and recovery in Drosophila bodies and ovaries following short-term and long-term exposure to DECT base EMF. Electromagn Biol Med. 2014 Jun;33(2):118-31.
- Margaritis LH, <u>Manta AK</u>, Kokkaliaris KD, Schiza D, Alimisis K, Barkas G, Georgiou E, Giannakopoulou O, Kollia I, Kontogianni G, Kourouzidou A, Myari A, Roumelioti F, Skouroliakou A, Sykioti V, Varda G, Xenos K, Ziomas K. Drosophila oogenesis as a bio-marker responding to EMF sources. Electromagn Biol Med. 2014 Sep;33(3):165-89.
- Skouroliakou AS, Sagioglou NE, Fragopoulou AF, Giannarakis IK, <u>Manta AK</u>, Ntzouni MP, Margaritis LH. Insight Into the biological effects of non-ionizing Radiation through the properties of the electromagnetic waves. e- Journal of Science and Technology 2012; 3(7):41-52.

4. <u>ΣΥΝΕΔΡΙΑ</u>

Εθνικά (Αναρτημένες Δημοσιεύσεις):

- 37th Annual Conference of Hellenic Society for Biological Sciences (Volos, 2015). "Effect of electromagnetic radiation emitted from household and occupational wireless technology devices on the oogenesis of D. virilis and D. melanogaster". Kimousi GD, **Manta AK**, Skouroliakou AS, Margaritis LH. pp:163.
- 37th Annual Conference of Hellenic Society for Biological Sciences (Volos, 2015). "Ex vivo study of the effect of electromagnetic radiation emitted from household and occupational wireless technology devices on the human semen". Pantazopoulou MP, <u>Manta AK</u>, Selimou RP, Skouroliakou AS, Argyriou AA, Giannitsi PE, Margaritis LH. pp:299.
- 37th Annual Conference of Hellenic Society for Biological Sciences (Volos, 2015). "Mobile phone electromagnetic radiation impact on human skin". Stefi AL, Fragopoulou AF, <u>Manta AK</u>, Skouroliakou AS, Kyriazi M, Rallis M, Katsarou A, Margaritis LH. pp:373.
- 37th Annual Conference of Hellenic Society for Biological Sciences (Volos, 2015). "Alterations of hippocampal transcriptome profiling triggered by acute exposure of mice to gsm 1800 mhz mobile phone radiation". Fragopoulou AF, Papadopoulou D, Polyzos AP, <u>Manta AK</u>, Skouroliakou AS, Balafas E, Kostomitsopoulos N, Stravopodis DJ, Thanos D, Margaritis LH. pp:417.
- 35th Annual Conference of Hellenic Society for Biological Sciences (Nafplion, 2013). "Systemic study of the response of Drosophila at the EMF emitted from Wireless network (Wi-Fi) and cordless phone". <u>Manta AK</u>, Stravopodis DJ, Papasideri IS, Margaritis LH. pp:204-5.
- 35th Annual Conference of Hellenic Society for Biological Sciences (Nafplion, 2013). "Ex vivo study of effect of non ionizing electromagnetic radiation emitted from DECT base in human sperm". Selimou RP, <u>Manta AK</u>, Argyriou AA, Giannitsi PE, Margaritis LH. pp:316-7.
- 34th Annual Conference of Hellenic Society for Biological Sciences (Trikala, 2012). "Induction of antioxidant mechanisms after exposure to electromagnetic fields." **Manta AK** and Lukas H. Margaritis. pp:126-7.
- 33rd Annual Conference of Hellenic Society for Biological Sciences (Edessa, 2011). "ROS increase in ovaries and whole bodies of *D. melanogaster after* electromagnetic radiation exposure". **Manta A K**, Tsakiri EN, Trougakos IP and Margaritis LH. pp:172-3.

<u>Διεθνή (Αναρτημένες Δημοσιεύσεις):</u>

- BioEM2015 (Pacific Grove, 2015). "Gene expression profile changes in D. melanogaster induced by cell phone exposure of adult flies: a microarray analysis of ovarian tissue". <u>Manta AK</u>, Papadopoulou D, Polyzos AP, Fragopoulou AF, Skouroliakou AS, Papassideri IS, Thanos D, Stravopodis DJ, Margaritis LH. pp:27.
- BioEM2013 (Thessaloniki, 2013). "Comparative effects of CW and FM signals on apoptosis and oxidative stress in Drosophila". <u>Manta AK</u>, Sagioglou NE, Skouroliakou AS, Giannarakis IK, Stravopodis DJ, Margaritis LH. pp:89.
- BioEM2013 (Thessaloniki, 2013). "Exposure of flies to DECT or Wi-Fi radiation affects their learning and memory and induces oxidative stress". Margaritis LH, Kanellopoulos AK, **Manta AK**, Ntzouni MP. pp:95.
- *BioEM2013 (Thessaloniki, 2013). "Pulsed EM field characteristics and dosimetric relevance".* Skouroliakou AS, Giannarakis IK, Stefi A, Fragopoulou AF, **Manta AK**, Margaritis LH. *pp:51.*
- 5th International Conference on Oxidative Stress in Skin Biology and Medicine (Andros, 2011). "Oxidative stress in Drosophila ovaries and mouse brain caused by electromagnetic radiation". Maria PN, <u>Manta AK</u>, Margaritis LH.

Διεθνή (Προφορικές ομιλίες):

- ERR2014 (Rhodes, 2014). "Oxidative stress induced by non-ionizing radiation in Drosophila". <u>Manta AK</u>, Papassideri IS, Stravopodis DJ, Margaritis LH.
- BioEM2014 (Cape Town, 2014). "Differential impact of low level EMF on longevity, apoptosis, and oxidative profile of Drosophila melanogaster". <u>Manta</u> <u>AK</u>, Papasideri IS, Stravopodis DJ, Margaritis LH.
- 2nd Conference on Bio-Medical Instrumentation and related Engineering and Physical Sciences (Athens, 2013). "Effects on oogenesis and oxidative stress induction on the standard biological system D. melanogaster: comparison of non ionizing electromagnetic radiation emitted by a cellular phone and a frequency generator". <u>Manta AK</u>, Sagioglou NE, Skouroliakou AS, Fragopoulou AF, Giannarakis IK, Ntzouni MP, Margaritis LH.

5. <u>ΠΡΟΣΘΕΤΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ</u>

Α. Τεχνικές και Μέθοδοι

Μοριακές (DNA & RNA):	Απομόνωση, PCR, RT-PCR, qPCR, DNA Κλωνοποίηση
Μοριακές (πρωτεΐνες):	Έκφραση, Απομόνωση, Western blot
Ανοσολογικές:	FACS, FACS Aria, ELISA
Μικροσκόπια:	Φωτονικό, Φθορισμού, Συνεστιακό Σαρωτικό Laser (CLSM), Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης (Transmission Electron Microscopy, TEM)
Χειρισμός πειραματοζώων:	Δίπλωμα Ειδίκευσης LAS (Laboratory Animals Science) (Κατηγορίες Α, Β, C και D)

B. Languages

Ελληνικά: Μητρική γλώσσα

Αγγλικά: Άριστη γνώση, Michigan Proficiency

Γαλλικά: Βασική γνώση, DELF 2em Degré, unités A1-A6

Γ. Ηλεκτρονικοί Υπολογιστές

Πολύ καλή γνώση: MS-DOS Windows 98/XP/Vista/7.1 Αγγλικές και Ελληνικές Εκδόσεις, Σουίτα MS Office 2003/2007/2010 Αγγλικές και Ελληνικές Εκδόσεις, MS Internet Explorer 7 – 9, Photoshop, Corel Draw

6. <u>ΥΠΟΤΟΦΙΕΣ – ΒΡΑΒΕΙΑ</u>

- Υποτροφία του Κληροδοτήματος Παπαδάκη για Μεταπτυχιακές Σπουδές Α΄ και Β΄ κύκλου
- «Student Travel Support Award», χορηγηθείσα υποτροφία για το Διεθνές συνέδριο BioEM2014.
- «Student Travel Support Award», χορηγηθείσα υποτροφία για το Διεθνές συνέδριο BioEM2015.