



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ : ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΠΑΝΤΟΣ**

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΒΛΑΒΩΝ DNA ΣΕ ΣΩΜΑΤΙΚΑ ΥΓΡΑ, ΣΕ
ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΜΑΣΤΟΥ ΠΟΥ ΥΠΟΒΑΛΛΟΝΤΑΙ
ΣΕ ΑΚΤΙΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΟ ΒΑΘΜΟ ΤΗΣ
ΔΕΡΜΑΤΙΚΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ**

ΚΟΣΜΑΣ ΒΕΡΙΓΟΣ
Ιατρός, Ακτινοθεραπευτής - Ογκολόγος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Αθήνα, 2020

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το τμήμα της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει ότι αποδέχεται τις γνώμες του συγγραφέα.

(Νόμος 5343/1932, άρθρο 202, παράγραφος 2)

Στοιχεία διδακτορικής διατριβής

Θέμα: Ανίχνευση βλαβών DNA σε σωματικά υγρά, σε ασθενείς με καρκίνο μαστού που υποβάλλονται σε ακτινοθεραπεία. Συσχέτιση με το βαθμό της δερματικής τοξικότητας.

- Ημερομηνία υποβολής αίτησης: 14/03/2014
- Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 14/07/2014
- Ημερομηνία αίτησης για αντικατάσταση της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής (λόγω θανάτου του Καθηγητή Ν. Σιταρά και αφυπηρέτησης της κ.α Καθηγήτριας Χριστίνας Αντωνίου): 06/07/2018

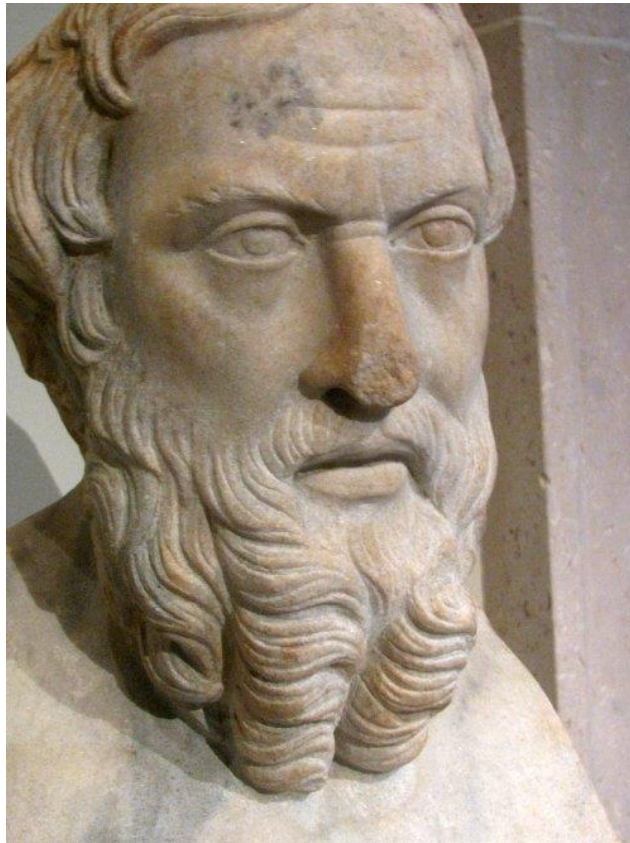
Η Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

1. **Δημήτριος Τραφαλής**, Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας, Ιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ, Επιβλέπων Μέλος
2. **Κωνσταντίνος Πάντος**, Καθηγητής Φαρμακολογίας, Ιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ
3. **Ιορδάνης Μουρούζης**, Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας, Ιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ

- Ημερομηνία ορισμού θέματος της διδακτορικής διατριβής: 23/09/2015

Πρόεδρος της Ιατρικής Σχολής Αθηνών: Καθηγητής Πέτρος Σφηκάκης

« [3.133.1] Ἐν χρόνῳ δὲ ὀλίγῳ μετὰ ταῦτα τάδε ἄλλα συνήνεικε γενέσθαι: Ἀτόσση τῆ Κύρου μὲν θυγατρί, Δαρείου δὲ γυναικὶ ἐπὶ τοῦ μαστοῦ ἔφυ φῦμα, μετὰ δὲ ἐκραγὲν ἐνέμετο πρόσω. ὅσον μὲν δὴ χρόνον ἦν ἔλασσον, ἡ δὲ κρύπτουσα καὶ αἰσχνομένη ἔφραζε οὐδενί, ἐπεὶ δὲ ἐν κακῷ ἦν, μετεπέμψατο τὸν Δημοκῆδεα καὶ οἱ ἐπέδεξε. [3.133.2] ὁ δὲ φὰς ὑγιέα ποιήσειν ἐξορκοῖ μιν ἢ μὲν οἱ ἀντυποργήσειν ἐκείνην τοῦτο τὸ ἂν αὐτῆς δεηθῆ, δεήσεσθαι δὲ οὐδενὸς τῶν ὅσα ἐς αἰσχύνην ἐστὶ φέροντα. [3.134.1] ὡς δὲ ἄρα μιν μετὰ ταῦτα ἰώμενος ὑγιέα ἀπέδεξε, ...»



ΗΡΟΔΟΤΟΣ (484 – 410 π.Χ.)

Στην Πανωραία, στο Μανώλη, στην Αναστασία
Στους γονείς μου

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η ανακάλυψη της αντικαρκινικής δράσης της ακτινοβολίας οδήγησε στην ανάπτυξη της ακτινοθεραπείας η οποία αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα όπλα στην καταπολέμηση του καρκίνου, αναλαμβάνοντας το μεγαλύτερο ποσοστό ογκολογικών περιστατικών από κάθε άλλη ογκολογική ειδικότητα. Βασική αρχή της ακτινοθεραπείας είναι η χορήγηση υψηλής και εντοπισμένης δόσης ακτινοβολίας ώστε να καταστραφεί ο όγκος, προστατεύοντας συγχρόνως τους υγιείς ιστούς που περιβάλλουν την ακτινοβοληθείσα περιοχή. Όπως οι περισσότερες μορφές θεραπείας, η ακτινοθεραπεία μπορεί να προκαλέσει και σειρά παρενεργειών. Μία από τις συχνότερες είναι η ακτινική δερματίτιδα, η οποία παρατηρείται σε υψηλό ποσοστό ασθενών, με συμπτώματα να κυμαίνονται από μέτρια ως ιδιαίτερα σοβαρά.

Στην ακτινοθεραπεία, η συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη ιονίζουσα ακτινοβολία είναι οι ακτίνες X και γάμμα. Έχει διαπιστωθεί πώς κατά την επίδραση της ιονίζουσας ακτινοβολίας επέρχεται ραδιόλυση του H₂O και ενεργοποίηση της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (NOS), οδηγώντας στην παραγωγή των δραστικών ενώσεων οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS), αντιστοίχως. Εξαιτίας της υψηλής δραστηριότητας, οι ROS και RNS ενώσεις προσβάλλουν το DNA με αποτέλεσμα την παραγωγή προϊόντων όπως είναι η 8-υδροξυδεοξυγουανίνη (8-OHdG) και 8-νιτρογουανίνη (8-NG). Στον αντίποδα, ο αντιοξειδωτικός παράγοντας GSH προστατεύει τον οργανισμό από την οξειδωτική δράση των ROS και RNS οι οποίες παράγονται κατά την έκθεση σε ακτινοβολία. Μολονότι, οι δείκτες οξειδωτικής βλάβης του DNA, 8-OHdG και 8-NG, είναι απόρροια της αντίδρασης των ROS και RNS με το DNA κατά την επίδραση της ιονίζουσας ακτινοβολίας, δεν έχει αποδειχθεί μέχρι στιγμής η παραγωγή τους σε ασθενείς που υπόκεινται σε ακτινοθεραπεία καθώς και εάν διαθέτουν προγνωστική αξία για την εμφάνιση ακτινικής δερματίτιδας η οποία αποτελεί μία από τις πιο συνήθεις παρενέργειες.

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι να διερευνήσει το σχηματισμό των προϊόντων βλαβών DNA, 8-OHdG και 8-NG, και να εκτιμήσει τα επίπεδα του αντιοξειδωτικού παράγοντα GSH στο πλάσμα ακτινοβοληθέντων ασθενών με καρκίνο του μαστού όπως επίσης και να συσχετίσει τη μεταβολή των επιπέδων τους με τις χορηγηθείσες δόσεις και το χρόνο ακτινοθεραπείας καθώς και με μια σειρά κλινικών παραμέτρων, ιδιαίτερα με την προκληθείσα ακτινική δερματίτιδα.

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής Αθηνών υπό την επίβλεψη και συνεχή υποστήριξη του αναπληρωτή Καθηγητή Φαρμακολογίας, Ιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ, κυρίου Τραφαλή Δημητρίου.

Με την ευκαιρία αυτή θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κο Τραφαλή Δημήτριο για την αμέριστη συμπαράσταση, την ουσιαστική καθοδήγησή του, το χρόνο που έχει διαθέσει καθόλη τη διάρκεια, από την έναρξη μέχρι την ολοκλήρωση της διατριβής αυτής, καθώς και την εμπιστοσύνη που μου δείχνει όλα αυτά τα χρόνια.

Ακόμα θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου, στα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, Καθηγητή Κωσταντίνο Πάντο και αναπληρωτή Καθηγητή Φαρμακολογίας κύριο Ιορδάνη Μουρούζη, για τις στοχευμένες επιστημονικές παρεμβάσεις τους και την γενικότερη αρωγή τους.

Δεν θα μπορούσα να αφήσω εκτός στις ευχαριστίες μου, τον εκλιπόντα Καθηγητή Νικόλαο Σιταρά, που ήταν αυτός που μου επέτρεψε να ξεκινήσω την παρούσα διατριβή και από την πρώτη στιγμή στάθηκε κοντά μου σαν δάσκαλος και φίλος.

Ένα ακόμα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου, για την αμέριστη συμπαράστασή και συνεχή υποστήριξη καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

2D	δισδιάστατη (two dimensional)
3D	τρισδιάστατη (three dimensional)
3DCRT	τρισδιάστατη σύμμορφη ακτινοθεραπεία (three dimensional conformal radiation therapy)
8-OHdG	8-υδροξυ-2-δεοξυγουανοσίνη (8-hydroxy-2-deoxyguanosine)
8-oxodG	8-οξο-7,8-διϋδρο-2-δεοξυγουανοσίνη (8-oxo-2'-deoxyguanosine)
8-NG	8-νιτρογουανίνη (8-nitroguanine)
AP	αλκαλική φωσφατάση (Alkaline Phosphatase)
ABTS	2-2'-αζινο-δι-(3-αιθυλοβενζοθειαζολίνη-6-σουλφονικό οξύ (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
BMI	δείκτης μάζας σώματος (Body Mass Index)
BSA	επιφάνεια σώματος (Body Surface Area)
BSO	βουθειονίνη σουλφοξιμίνη (l-Buthionine sulfoximine)
CBCT	Cone Beam Computed Tomography
COX-2	κυκλοοξυγονάση 2 (Cyclooxygenase-2)
cGy	centigray
CT	αξονική τομογραφία (commuted tomography)
CTGFs	αυξητικοί παράγοντες συνδετικών ιστών (Connective Tissue Growth Factors)
dGTP	τριφωσφορική δεοξυγουανοσίνη (Deoxyguanosine triphosphate)
DSB	διπλή θραύση αλυσίδας (Double Strand Break)
D0, D14	ημέρα 0, ημέρα 14 (Day-0, Day-14)
D28, D56	ημέρα 28, ημέρα 56 (Day-28, Day-56)
EDTA	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (Ethylenediaminetetraacetic acid)

eNOS	ενδοθηλιακή συνθάση μονοξειδίου του αζώτου (Endothelial Nitric Oxide Synthase)
EPIC	European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition
GFR	Glomerular Filtration Rate
GPx	υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Glutathione Peroxidase)
GRX	γλουταρεδοξίνη (Glutaredoxins)
Gy	gray
GSH	γλουταθειόνη (Glutathione)
GCL	λιγάση της γλουταμυλ-κυστεΐνης (Glutamate Cysteine Ligase)
GCLC	καταλυτική υπομονάδα της λιγάσης της γλουταμυλ-κυστεΐνης (Catalytic subunit of Glutamate Cysteine Ligase)
GCLM	τροποποιητική υπομονάδα της λιγάσης της γλουταμυλ-κυστεΐνης (Modifier subunit of Glutamate Cysteine Ligase)
GSSG	δισουλφίδιο γλουταθειόνης (glutathione disulfide)
GS	συνθετάση της γλουταθειόνης (Glutathione Synthetase)
GST	S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (Glutathione S-transferase)
GTV	Gross Tumor Volume
HCT	αιματοκρίτης (Hematocrit)
HRP	υπεροξειδάση (horseradish peroxidase)
IGF-1	ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας-1 (Insulin-like growth factor 1)
IL -1	ιντερλευκίνη-1 (Interleukin-1)
IL-6	ιντερλευκίνη-6 (Interleukin-6)
IL-8	ιντερλευκίνη-8 (Interleukin-8)
IL-10	ιντερλευκίνη-10 (Interleukin-10)
IL-13	ιντερλευκίνη-13 (Interleukin-13)
IL-33	ιντερλευκίνη-33 (Interleukin-33)

iNOS	επαγωγήμη συνθάση μονοξειδίου του αζώτου (cytokine-Inducible Nitric Oxide Synthase)
IMRT	ακτινοθεραπεία με δέσμη διαμορφούμενης έντασης (Intensity-modulated radiotherapy)
IGRT	καθοδηγούμενη από απεικόνιση ακτινοθεραπεία (Image-guided radiation therapy)
LET	γραμμική ενέργεια μεταφοράς (Linear Energy Transfer)
MMPs	μεταλλοπρωτεάσες (Matrix Metalloproteinases)
mM	millimolar
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NF-κB	πυρηνικός παράγοντας κάπα β (Nuclear factor-kappa B)
NCI CTCAE	National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events
NO	μονοξείδιο του αζώτου (Nitric Oxide)
NOS	συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (Nitric Oxide Synthase)
nNOS	νευρωνική συνθάση μονοξειδίου του αζώτου (Neuronal Nitric Oxide Synthase)
nNPP	φωσφορικό ρ-νιτροφαινύλιο (p-nitrophenyl phosphate)
NPSH	μη πρωτεϊνικά συνδεδεμένα σουλφυδρύλια (nonprotein sulfhydryl groups)
OPD	Ο-φαινυλ-διαμίνη-διϋδροχλωρίδιο (ortho-phenyldiamine-dihydrochloride)
PBS	διάλυμα φωσφορικών ιόντων (Phosphate Buffered Saline)
PTV	Planning Target Volume
RISRs	δερματικές αντιδράσεις επαγόμενες από ακτινοβολία (radiation-induced skin reactions)
ROS	δραστικές ενώσεις οξυγόνου (Reactive Oxygen Species)
RNS	δραστικές ενώσεις αζώτου (Reactive Nitrate Species)
SBRT	στερεοτακτική ακτινοθεραπεία σώματος (Stereotactic body radiotherapy)

SEER	Surveillance, Epidemiology and End Results
SSB	μονή θραύση αλυσίδας (Single Strand Break)
TGF-β	αυξητικός μεταμορφωτικός παράγοντας (Transforming Growth Factor-beta)
TIMPs	αναστολείς των MMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases)
TNF-α	παράγοντας νέκρωσης όγκων (Tumor Necrosis Factor-alpha)
TNBC	τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού (Triple Negative Breast Cancer)
TMB	3,3', 5,5'-τετραμεθυλβενζιδίνη (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)
[8-OHdG]	συγκέντρωση της 8-OHdG
[8-NG]	συγκέντρωση της 8-NG
[GSH]	συγκέντρωση της GSH
G(-H)•	γουανυλική ρίζα
G•+	γουανυλικό κατιόν
H ₂ O	νερό
H ₂ O ₂	υπεροξείδιο του υδρογόνου
•OH	ανιόν υδροξυλίου
O ₂ •	ανιόν σουπεροξειδίου
O ₃	όζον
¹ O ²	οξυγόνο
ONOO ⁻	υπεροξυνιτρίτης
HOCl	υποχλωριώδες οξύ
•NO	ρίζα του νιτρικού οξειδίου
NO ₂ •	ανιόν του διοξειδίου του αζώτου
RO ₂ •	περοξυλικές ρίζες
ROOH	υδροξυπεροξείδιο
RO•	αλκοξύλιο

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.....	Error! Bookmark not defined.
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	v
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	vii
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ	xvi
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ	xx
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	1
Κεφάλαιο 1°.....	2
1.1. Η ακτινοθεραπεία ως θεραπευτική στρατηγική στη θεραπεία του καρκίνου	2
1.1.1. Είδη ακτινοβολιών και τρόποι χορήγησης	3
1.1.1.1. Οι ακτίνες X και γάμμα στην ακτινοθεραπεία	3
1.1.1.2. Ακτινοβολίες σωματιδίων στην ακτινοθεραπεία: δέσμες ηλεκτρονίων, πρωτονίων και νετρονίων	4
1.1.1.3. Τρόποι χορήγησης ακτινοβολίας.....	5
1.1.2. Τεχνικές προσεγγίσεις ακτινοθεραπείας	5
1.1.2.1. Κλασματοποίηση ακτινοβολίας	5
1.1.2.2. Τεχνολογικές εξελίξεις στην ακτινοθεραπεία	7
1.1.2.2.1. Τρισδιάστατη σύμμορφη ακτινοθεραπεία (3DCRT).....	7
1.1.2.2.2. Ακτινοθεραπεία με δέσμη διαμορφούμενης έντασης (IMRT)	9
1.1.2.2.3. Ακτινοθεραπεία καθοδηγούμενη από εικόνες (IGRT)	10
1.1.2.2.4. Στερεοτακτική ακτινοθεραπεία σώματος (SBRT)	12
1.1.3. Ο επαγόμενος από την ιονίζουσα ακτινοβολία κυτταρικός θάνατος	13
1.1.3.1.1. Πρώτος μηχανισμός κυτταρικού θανάτου: Απόπτωση	14
1.1.3.1.2. Δεύτερος μηχανισμός κυτταρικού θανάτου: Ο μιτωτικός κυτταρικός θάνατος ή μιτωτική καταστροφή.....	15
1.1.3.1.3. Τρίτος μηχανισμός κυτταρικού θανάτου: Αυτοφαγία.....	15
1.1.3.1.4. Τέταρτος μηχανισμός κυτταρικού θανάτου: Νέκρωση.....	15
1.1.3.1.5. Πέμπτος μηχανισμός κυτταρικού θανάτου: Κυτταρική γήρανση	16
1.1.3.2. Ενδοκυττάρια μονοπάτια ενεργοποιούν τους διάφορους τύπους κυτταρικού θανάτου.....	16
1.2. Η βιολογική επίδραση της ακτινοθεραπείας	17
1.2.1. Η παραγωγή ελευθέρων ριζών ως αποτέλεσμα της ακτινοθεραπείας.....	17
1.2.1.1. Η εναπόθεση της ενέργειας στα βιομόρια	19
1.2.1.2. Σχηματισμός δραστικών ενώσεων οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS)	22
1.2.1.2.1. Οι δραστικές ενώσεις οξυγόνου (ROS).....	22
1.2.1.2.1.1. Το ανιόν του σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$).....	23
1.2.1.2.1.2. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2).....	23

1.2.1.2.1.3. Το ανιόν του υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$) και η βιολογική του επίδραση στο DNA	24
1.2.1.2.2. Οι δραστικές ενώσεις αζώτου (RNS)	26
1.2.1.2.2.1. Το μονοξείδιο του αζώτου (NO)	26
1.2.1.2.2.2. Ο υπεροξυνιτρίτης (ONOO^-)	27
1.2.1.2.2.3. Το ανιόν του διοξειδίου του αζώτου ($\text{NO}_2\bullet$)	27
1.2.1.3. Προϊόντα βλαβών DNA: η 8-υδροξυ-2-γουανασίνη και η 8-νιτρογουανίνη .	28
1.2.1.3.1. Η γουανίνη "στόχος" των δραστικών ενώσεων ROS και RNS	29
1.2.1.3.2. Η παραγωγή των ROS ενώσεων κατά την έκθεση σε ακτινοβολία	30
1.2.1.3.3. Η 8-υδροξυ-2-δεοξυγουανασίνη (8-OHdG)	33
1.2.1.3.3.1. Η 8-υδροξυ-2-δεοξυγουανασίνη (8-OHdG) και ROS ενώσεις	33
1.2.1.3.3.2. 8-OHdG και καρκίνος	34
1.2.1.3.4. Παραγωγή των RNS κατά την έκθεση σε ακτινοβολία	35
1.2.1.3.5. 8-νιτρογουανίνη	36
1.2.1.3.5.1. 8-νιτρογουανίνη και RNS ενώσεις	36
1.2.1.3.5.2. 8-NG και καρκίνος	38
1.2.2. Ο ρόλος της γλουταθειόνης στην ακτινοθεραπεία	40
1.2.2.1. Ο μηχανισμός βιοσύνθεσης της GSH	40
1.2.2.2. Οι μορφές και διαμερισματοποίηση της GSH	41
1.2.2.3. Η GSH <<ασπίδα>> απέναντι στις ROS και RNS	42
1.3. Ακτινοθεραπεία και τοξικότητα	46
1.3.1. Ακτινοθεραπεία και παρενέργειες	46
1.3.1.1. Πρώιμες και όψιμες παρενέργειες ακτινοθεραπείας	46
1.3.2. Ακτινοθεραπεία και δερματική τοξικότητα	47
1.3.2.1. Κλίμακα ταξινόμησης δερματικών αντιδράσεων (RISRs)	47
1.3.2.2. Ακτινοθεραπεία και τραυματισμός επιθηλίου	48
1.3.2.3. Παράγοντες ‘‘κλειδιά’’ στην παθογενή επούλωση δερματικής βλάβης: κυτταρική απόπτωση, ινοβλάστες, MMPs, μικροαγγειακές βλάβες και υποξία ιστών	51
1.3.2.4. Η αναγεννητική ικανότητα στα διάφορα είδη ιστών	53
1.3.3. Μηχανισμοί της επαγόμενης από την ακτινοβολία δερματικής τοξικότητας	53
1.3.3.1. Οι μηχανισμοί των δερματικών αντιδράσεων από ακτινοθεραπεία: φλεγμονώδης αντίδραση και οξειδωτικό στρες	53
1.3.3.1.1. Η δερματική φλεγμονώδης αντίδραση	54
1.3.3.1.2. Ο ρόλος του NLRP3 φλεγμονοσώματος στη δερματική φλεγμονώδη αντίδραση	55
1.3.3.1.3. Η ίνωση του δέρματος στη φλεγμονώδη αντίδραση	55
1.3.3.1.4. Οξειδωτικό στρες και δερματικές αντιδράσεις	56
1.4. Ο καρκίνος του μαστού	58

1.4.1. Αίτια και παθοφυσιολογία καρκίνου του μαστού	58
1.4.1.1. Αίτια εμφάνισης καρκίνου του μαστού.....	59
1.4.1.1.1. Γονιδιακό προφίλ καρκίνου του μαστού	59
1.4.1.1.2. Ο ρόλος των ορμονών στον καρκίνο του μαστού	60
1.4.1.1.3. Ατομικά χαρακτηριστικά ασθενούς	61
1.4.1.1.4. Περιβαλλοντικοί παράγοντες	62
1.4.1.2. Παθοφυσιολογία καρκίνου του μαστού	63
1.4.2. Μοριακοί υπότυποι καρκίνου του μαστού	66
1.4.3. Η ακτινοθεραπεία στον καρκίνο του μαστού	67
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	69
ΣΚΟΠΟΣ.....	70
Κεφάλαιο 2 ^ο : Υλικά και Μέθοδοι	72
2.1. Υλικά.....	72
2.1.1. Κλινικά δείγματα ασθενών.....	72
2.1.2. Αντιδραστήρια.....	74
2.2. Μέθοδοι.....	76
2.2.1. Θεραπευτικό σχήμα μετεγχειρητικής ακτινοθεραπείας	76
2.2.2. Δειγματοληψία βιολογικών δειγμάτων	76
2.2.3. Εργαστηριακός έλεγχος βιολογικών δειγμάτων αίματος	77
2.2.3.1. Η μέθοδος ELISA.....	77
2.2.4. Ποσοτική εκτίμηση της 8-OHdG	80
2.2.4.1. Προετοιμασία βιολογικών δειγμάτων	80
2.2.4.2. Προετοιμασία Αντιδραστηρίων του OxiSelect™ Oxidative DNA Damage ELISA Kit (8-OHdG Quantitation)	81
2.2.4.3. Προετοιμασία πρότυπων δειγμάτων της 8-OHdG	82
2.2.4.4. Πειραματικό Πρωτόκολλο	83
2.2.4.5. Πρότυπη καμπύλη 8-OHdG.	84
2.2.5. Ποσοτική εκτίμηση της 8-NG	85
2.2.5.1. Προετοιμασία βιολογικών δειγμάτων	85
2.2.5.2. Προετοιμασία Αντιδραστηρίων του OxiSelect™ Nitrosative DNA/RNA Damage ELISA kit	85
2.2.5.3. Προετοιμασία Πρότυπων δειγμάτων της 8-NG.	86
2.2.5.4. Πειραματικό Πρωτόκολλο	87
2.2.5.5. Πρότυπη καμπύλη 8-NG.	88
2.2.6. Ποσοτική εκτίμηση GSH	89
2.2.6.1. Προετοιμασία βιολογικών δειγμάτων	89
2.2.6.2. Προετοιμασία αντιδραστηρίων Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Glutathione (GSH).....	89

2.2.6.3. Προετοιμασία πρότυπων δειγμάτων της GSH	90
2.2.6.4. Πειραματικό πρωτόκολλο	91
2.2.6.5. Πρότυπη καμπύλη GSH	92
2.3. Έλεγχος Τοξικότητας του δέρματος.....	92
2.4 Μαθηματικές εξισώσεις κλινικών παραμέτρων	93
2.5. Στατιστική ανάλυση και επεξεργασία	94
Κεφάλαιο 3 ^ο : Αποτελέσματα.....	95
3.1. Αποτελέσματα εκτίμησης της [8-OHdG] καθώς και μεταβολής της [8-OHdG] κατά το χρόνο και τη δόση ακτινοβολίας, συσχέτιση της [8-OHdG] με κλινικές παραμέτρους (BMI, BSA, HCT, GFR και ηλικία) καθώς και με το βαθμό εμφάνισης ακτινικής δερματίτιδας. 95	
3.1.1. Καμπύλη προσαρμογής του δείκτη 8-OHdG	95
3.1.2. Οι μεταβολές [8-OHdG] στο χρόνο και στη δόση ακτινοβολίας	96
3.1.3. Συσχέτιση [8-OHdG] με τις υπό μελέτη κλινικές παραμέτρους	97
3.1.4. Συσχέτιση των πηλίκων [8-OHdG]/BMI και [8-OHdG]/BSA με το βαθμό ακτινικής δερματίτιδας	98
3.1.5. Συσχέτιση του πηλίκου μεταβολής [8-OHdG] με τις υπό μελέτη κλινικές παραμέτρους.....	99
3.1.6. Συσχέτιση των σχετικών μεταβολών [8-OHdG] με τις υπό μελέτη κλινικές παραμέτρους.....	100
3.1.7. Συσχέτιση των % μεταβολών [8-OHdG] με το βαθμό ακτινικής δερματίτιδας	101
3.1.8. Συσχέτιση των % μεταβολών [8-OHdG] ως προς το συντελεστή συσχέτισης r με την πρόκληση ακτινικής δερματίτιδας	102
3.2. Αποτελέσματα εκτίμησης της [8-NG] καθώς και μεταβολής της [8-NG] κατά το χρόνο και τη δόση ακτινοβολίας, συσχέτιση της [8-NG] με κλινικές παραμέτρους (BMI, BSA, HCT, GFR και ηλικία) καθώς και με το βαθμό εμφάνισης ακτινικής δερματίτιδας.	103
3.2.1. Καμπύλη προσαρμογής του δείκτη 8- NG	103
3.2.2. Η μεταβολή [8-NG] κατά το χρόνο και τις δόσεις ακτινοβολίας	104
3.2.3. Συσχέτιση των επιπέδων [8-NG] με τις υπό μελέτη κλινικές παραμέτρους κατά τη χορήγηση των διαφόρων δόσεων ακτινοβολίας	105
3.2.4. Συνολική παρουσίαση του εύρους συσχετίσεων των επιπέδων [8-NG] με τις υπό μελέτη κλινικές παραμέτρους.....	106
3.2.5. Συσχέτιση του πηλίκου μεταβολής [8-NG] με τις εξεταζόμενες κλινικές παραμέτρους.....	107
3.2.6. Συσχέτιση των σχετικών μεταβολών των επιπέδων [8-NG] με τις υπό μελέτη κλινικές παραμέτρους.....	108
3.2.7. Συσχέτιση των % μεταβολών [8-NG] με την πρόκληση ακτινικής δερματίτιδας	109
3.2.8. Συσχέτιση του πηλίκου [8-NG] ως προς BMI και BSA με το βαθμό ακτινικής δερματίτιδας	110
3.2.9. Γραμμική σχέση των % μεταβολών [8-NG] με το βαθμό της προκληθείσας ακτινικής δερματίτιδας	111

3.2.10. Συσχετίσεις του πηλίκου των σχετικών μεταβολών των επιπέδων [8-NG] και [8-OHdG] ως προς BMI με το βαθμό της προκληθείσας ακτινικής δερματίτιδας	112
3.3. Αποτελέσματα εκτίμησης της [GSH] καθώς και των μεταβολών της [GSH] με το χρόνο και τη δόση ακτινοβολίας, συσχέτιση της [GSH] με κλινικές παραμέτρους (BMI, BSA, HCT, GFR, ηλικία και βαθμό ακτινικής δερματίτιδας) καθώς και πολυπαραγοντική συσχέτιση των [8-OHdG], [8-NG] και [GSH] με το βαθμό της ακτινικής δερματίτιδας.	113
3.3.2. Μεταβολή των επιπέδων [GSH] κατόπιν χορηγήσεως των διαφόρων δόσεων ακτινοβολίας.....	114
3.3.3. Συσχέτιση των επιπέδων [GSH] με κλινικές παραμέτρους.....	115
3.3.4. Συσχέτιση των % επιπέδων [GSH] με το βαθμό εμφανιζόμενης ακτινικής δερματίτιδας	116
3.3.5. Ολοκληρωμένη συσχέτιση [8-NG], [8-OHdG] και [GSH] καθώς και των μεταβολών των συγκεντρώσεών τους με το βαθμό της ακτινικής δερματίτιδας	117
Κεφάλαιο 4 ^ο : Συζήτηση.....	118
Συμπεράσματα.....	131
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	133
SUMMARY	134
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ	135

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

	Σελ
Εικόνα 1.1. Το φάσμα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας	4
Εικόνα 1.2. Σχεδιασμός ακτινοθεραπείας	8
Εικόνα 1.3. Σύγκριση πλάνων ακτινοθεραπείας πρωτονίων και φωτονίων	10
Εικόνα 1.4. Επικεντρωμένη εφαρμογή ακτινοθεραπείας μέσω της IGRT σε ενακτινοβόληση όγκου με αποφυγή επιβάρυνσης νωτιαίου μυελού	11
Εικόνα 1.5. Στερεοτακτική ακτινοθεραπεία – ακτινοχειρουργική	13
Εικόνα 1.6. Διαγραμματική απεικόνιση άμεσης και έμμεσης δράσης στο DNA με κοινή κατάληξη τον κυτταρικό θάνατο	14
Εικόνα 1.7. Μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου και αντίστοιχων μονοπατιών που οδηγούν σε απόπτωση	17
Εικόνα 1.8. Τα βιολογικά αποτελέσματα της άμεσης και έμμεσης δράσης της ιονίζουσας ακτινοβολίας	19
Εικόνα 1.9. Η εναπόθεση της ενέργειας στο μόριο του DNA με τη μορφή “σπινθήρων” (<100 eV), “σταγόνων” (100 -500 eV) ή “μικρών διαδρομών” (500 -5000 eV)	20
Εικόνα 1.10. Αντιδράσεις άμεσης και έμμεσης επίδρασης στο DNA	21
Εικόνα 1.11. Διαδοχικές χημικές αντιδράσεις σχηματισμού των ενδιάμεσων προϊόντων O_2^- , H_2O_2 και $\cdot OH$	23
Εικόνα 1.12. Διατάραξη της ακεραιότητας της διπλής έλικας του DNA από ROS ενώσεις	25
Εικόνα 1.13. Άμεσες και έμμεσες κυτταρικές συνέπειες της ιονίζουσας ακτινοβολίας σε διάφορα μακρομόρια συμπεριλαμβανομένου και του DNA	29
Εικόνα 1.14. Διαγραμματική απεικόνιση παραγωγής των ROS ενώσεων	32
Εικόνα 1.15. Βιολογικές δομές της 8-OHdG και των αναλόγων της	34
Εικόνα 1.16. Αντιδράσεις απαμίνωσης και νίτρωσης των πουρινικών βάσεων του DNA	37
Εικόνα 1.17. Ο πιθανός μηχανισμός μεταλλαξιγένεσης μέσω της 8-NG	39
Εικόνα 1.18. Βήματα βιοσύνθεσης της GSH	41
Εικόνα 1.19. Διαδικασία παραγωγής και αποτοξίνωσης των παραγόμενων ROS ενώσεων	44
Εικόνα 1.20. Κυτταρικές και ιστικές βλάβες μετά από έκθεση σε ακτινοβολία	47
Εικόνα 1.21. Ασθενείς με δερματικές αντιδράσεις διαφόρων κατηγοριών	48
Εικόνα 1.22. Ερύθημα μετά από ακτινοθεραπεία	49
Εικόνα 1.23. Ξηρή απολέπιση μετά από την επίδραση της ακτινοθεραπείας	50
Εικόνα 1.24. Ξηρή απολέπιση κατόπιν ακτινοθεραπείας	50

Εικόνα 1.25 Τηλαγγειεκτασία ως παρενέργεια ακτινοθεραπείας	50
Εικόνα 1.26. Τα τρία βασικά στάδια επούλωσης δερματικής βλάβης: φλεγμονή, πολλαπλασιασμός και αναδιαμόρφωση	51
Εικόνα 1.27. Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στις RISRs: φλεγμονώδης αντίδραση και οξειδωτικό στρες	56
Εικόνα 1.28. Λοβιακό in situ νεόπλασμα	64
Εικόνα 1.29. Περιπτώσεις πορογενούς νεοπλασματος μαστού	65
Εικόνα 2.1. Μικροπλάκα 96 πηγαδίων για ELISA μέθοδο όπου απεικονίζεται η προκύπτουσα οπτική αλλαγή της ενζυμικής αντιδράσεως	78
Εικόνα 2.2 .Διάφορες κατηγορίες ELISA	80
Εικόνα 2.3. Διαδοχικές αραιώσεις των πρότυπων δειγμάτων της 8-OHdG	82
Εικόνα 2.4. Πρότυπη καμπύλη για τον ποσοτικό προσδιορισμό της 8-OHdG στα δείγματα πλάσματος	84
Εικόνα 2.5. Διαδοχικές αραιώσεις των πρότυπων δειγμάτων της 8-NG	87
Εικόνα 2.6. Πρότυπη καμπύλη για τον ποσοτικό προσδιορισμό της 8-NG στα δείγματα πλάσματος	88
Εικόνα 2.7. Διαδοχικές αραιώσεις των πρότυπων δειγμάτων της GSH	91
Εικόνα 2.8. Πρότυπη καμπύλη για τον ποσοτικό προσδιορισμό της GSH στα δείγματα πλάσματος	92
Εικόνα 3.1. Καμπύλη προσαρμογής του δείκτη 8-OHdG	95
Εικόνα 3.2. Καμπύλη υπολογισμού των μεταβολών [8-OHdG] στο πλάσμα των ακτινοβοληθέντων ασθενών ανάλογα με το χρόνο και τη δόση ακτινοβολίας	96
Εικόνα 3.3. Ο συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson r με βάσει τον οποίο συσχετίζεται η [8-OHdG] με τις εξεταζόμενες κλινικές παραμέτρους	97
Εικόνα 3.4. Συσχέτιση του πηλίκου [8-OHdG]/BMI και [8-OHdG]/BSA με το βαθμό ακτινικής δερματίτιδας σε σχέση με το χρόνο και τη δόση ακτινοβολίας	98
Εικόνα 3.5. Συσχέτιση του πηλίκου της συνολικής μεταβολής [8-OHdG] με τις κλινικές παραμέτρους κατά το χρόνο και τη δόση ακτινοθεραπείας	99
Εικόνα 3.6. Οι σχετικές μεταβολές της [8-OHdG] στο πλάσμα ασθενών σε συσχέτιση με τις εξεταζόμενες κλινικές παραμέτρους κατά το χρόνο και δόση ακτινοθεραπείας	100
Εικόνα 3.7. Γραμμική συσχέτιση των % μεταβολών των επιπέδων [8-OHdG] στο πλάσμα ασθενών με το βαθμό ακτινικής δερματίτιδας	101

Εικόνα 3.8. Οι % μεταβολές [8-OHdG] ως προς το συντελεστή συσχέτισης r με την ανάπτυξη ακτινικής δερματίτιδας	102
Εικόνα 3.9. Καμπύλη προσαρμογής του δείκτη 8-NG όπου απεικονίζεται η καμπύλη του γραμμικού καθώς και αλλομετρικού μαθηματικού μοντέλου	103
Εικόνα 3.10. Πολυωνυμικό μοντέλο προσαρμογής κατά το οποίο όπου συσχετίζεται η [8-NG] με το χρόνο και τη δόση ακτινοβολίας	104
Εικόνα 3.11. Συσχέτιση των επιπέδων [8-NG] ως προς το συντελεστή συσχέτισης (r) με τις εξεταζόμενες κλινικές παραμέτρους (BMI, BSA, GFR, HCT και ακτινική δερματίτιδα)	105
Εικόνα 3.12. Εύρος συσχετίσεων [8-NG] ως προς το συντελεστή συσχέτισης (r) με τις εξεταζόμενες κλινικές παραμέτρους	106
Εικόνα 3.13. Συσχέτιση του ηλικίου συνολικής μεταβολής [8-NG] ως προς το συντελεστή συσχέτισης r με τις κλινικές παραμέτρους σε σχέση με το χρόνο και τη δόση της ακτινοβολίας	107
Εικόνα 3.14. Συσχέτιση των σχετικών μεταβολών των επιπέδων [8-NG] κατά το χρόνο και δόση ακτινοβολίας με κλινικές παραμέτρους	108
Εικόνα 3.15. Συσχέτιση του ηλικίου των % μεταβολών [8-NG] ως προς το συντελεστή συσχέτισης r με την πρόκληση ακτινικής δερματίτιδας	109
Εικόνα 3.16. Συσχέτιση του ηλικίου [8-NG] ως προς BMI και BSA με το βαθμό ακτινικής δερματίτιδας στο χρόνο και στη δόση ακτινοβολίας	110
Εικόνα 3.17. Γραμμική σχέση των % μεταβολών [8-NG] με το βαθμό εμφανιζόμενης ακτινικής δερματίτιδας	111
Εικόνα 3.18. Συσχετίσεις του ηλικίου των σχετικών μεταβολών των επιπέδων [8-NG] και [8-OHdG] ως προς BMI με το βαθμό της προκληθείσας ακτινικής δερματίτιδας	112
Εικόνα 3.19. Γραμμική και εκθετική προσαρμογή των μεταβολών των επιπέδων [GSH] σε σχέση με τη δόση και το χρόνο ακτινοθεραπείας	113
Εικόνα 3.20. Μεταβολή [GSH] στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο του μαστού κατά τη χορήγηση των διαφόρων δόσεων του ακτινοθεραπευτικού σχήματος	114
Εικόνα 3.21. Συσχέτιση των επιπέδων [GSH] ως προς το συντελεστή συσχέτισης r με το βαθμό ακτινικής δερματίτιδας	115
Εικόνα 3.22. Γραμμική συσχέτιση της % μείωσης [GSH] με το βαθμό εμφανιζόμενης ακτινικής δερματίτιδας	116
Εικόνα 3.23. Πολυπαραγοντική συσχέτιση των % μεταβολών των επιπέδων [8-OHdG]	117

και [8-NG] ως προς % μεταβολές [GSH] με το βαθμό εμφάνισης ακτινικής
δερματίτιδας στις διάφορες δόσεις ακτινοβολία

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

	Σελ
Πίνακας 2.1. Κλινικά δεδομένα ασθενών που συμμετείχαν στην παρούσα μελέτη	73
Πίνακας 2.2. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση της 8-OHdG	74
Πίνακας 2.3. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση της 8-NG	75
Πίνακας 2.4. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση της GSH	75
Πίνακας 2.5. Ημέρες δειγματοληψίας των βιολογικών δειγμάτων των συμμετεχόντων	77
Πίνακας 2.6. Διαδοχικές αραιώσεις που ακολουθήθηκαν ώστε να παρασκευαστούν τα πρότυπα δείγματα της 8-OHdG	82
Πίνακας 2.7. Διαδοχικές αραιώσεις που ακολουθήθηκαν ώστε να παρασκευαστούν τα πρότυπα δείγματα της 8-NG	86
Πίνακας 2.8. Διαδοχικές αραιώσεις που ακολουθήθηκαν ώστε να παρασκευαστούν τα πρότυπα δείγματα της GSH	90
Πίνακας 2.9. Κλινικά συμπτώματα που παρουσιάζονται ανά κλίμακα δερματικής τοξικότητας	93

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1^ο

1.1. Η ακτινοθεραπεία ως θεραπευτική στρατηγική στη θεραπεία του καρκίνου

Η ακτινοβολία είναι ένας φυσικός παράγοντας, που χρησιμοποιείται ευρέως για την καταστροφή καρκινικών κυττάρων. Αρχικά, ως ιονίζουσα ακτινοβολία ορίζεται η ακτινοβολία η οποία οδηγεί στη δημιουργία ιόντων και εναποθέτει την ενέργειά της στα νεοπλασματικά κύτταρα μέσα από τα οποία διέρχεται. Η εναποτεθείσα ενέργεια είναι αυτή η οποία εξουδετερώνει τα καρκινικά κύτταρα ή προκαλεί γενετικές αλλαγές, οι οποίες θα οδηγήσουν τα κύτταρα σε κυτταρικό θάνατο. Η ιονίζουσα ακτινοβολία είναι υψηλής ενέργειας και μπορεί να προκαλέσει βλάβες στο γενετικό υλικό των κυττάρων, παρεμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο την ικανότητά τους για περαιτέρω διαίρεση και πολλαπλασιασμό (Jackson and Bartek, 2009).

Η ακτινοθεραπεία είναι μια ιδιαίτερα αποτελεσματική μέθοδος, η οποία εφαρμόζεται συνήθως σε συνδυασμό με άλλες μορφές θεραπείας όπως είναι η χειρουργική επέμβαση, η χημειοθεραπεία ή ανοσοθεραπεία. Σε περίπτωση όπου η χειρουργική επέμβαση κρίνεται απαραίτητη, η ακτινοθεραπεία μπορεί να γίνει πριν ή μετά την επέμβαση. Εάν εφαρμοσθεί πριν από την χειρουργική επέμβαση, η ακτινοθεραπεία συρρικνώνει τον όγκο ή μειώνει τα ποσοστά τοπικής υποτροπής ενώ κατόπιν χειρουργικής επεμβάσεως, χαρακτηρίζεται ως επικουρική και εξουδετερώνει εναπομείναντα καρκινικά κύτταρα (Baskar *et al.*, 2012).

Η ακτινοβολία καταστρέφει τόσο τα νεοπλασματικά κύτταρα όσο και τα φυσιολογικά. Στόχος της ακτινοθεραπείας είναι η μεγιστοποίηση της δόσης της ακτινοβολίας στα καρκινικά κύτταρα, ελαχιστοποιώντας συγχρόνως την έκθεση των φυσιολογικών κυττάρων, τα οποία μπορεί να είναι είτε κοντά στο νεοπλασματικό ιστό, είτε στην πορεία της ακτινοβολίας. Τα φυσιολογικά κύτταρα μπορούν να αποκατασταθούν ταχύτερα και να διατηρήσουν τη λειτουργικότητά τους, σε καλύτερο βαθμό από ότι τα καρκινικά κύτταρα. Ωστόσο, και τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να αποκαταστήσουν μια βλάβη που έχει προκληθεί από την έκθεση τους στην ακτινοβολία το ίδιο αποτελεσματικά με τα φυσιολογικά, επαναποικίζοντας την πάσχουσα περιοχή (Begg *et al.*, 2011).

1.1.1. Είδη ακτινοβολιών και τρόποι χορήγησης

Όπως προαναφέρθηκε, σκοπός της ακτινοθεραπείας είναι η καταστροφή του όγκου ή η συρρίκνωση του ή η εξάλειψη των εναπομεινάντων καρκινικών κυττάρων, με τη χρήση ιονίζουσας ακτινοβολίας. Τα είδη ακτινοβολιών τα οποία χρησιμοποιούνται στα ακτινοθεραπευτικά σχήματα είναι κυρίως ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία (ακτίνες X και γάμμα) αλλά και σωματιδιακή ακτινοβολία ηλεκτρονίων, νετρονίων και πρωτονίων (Masuda and Kamiya, 2012).

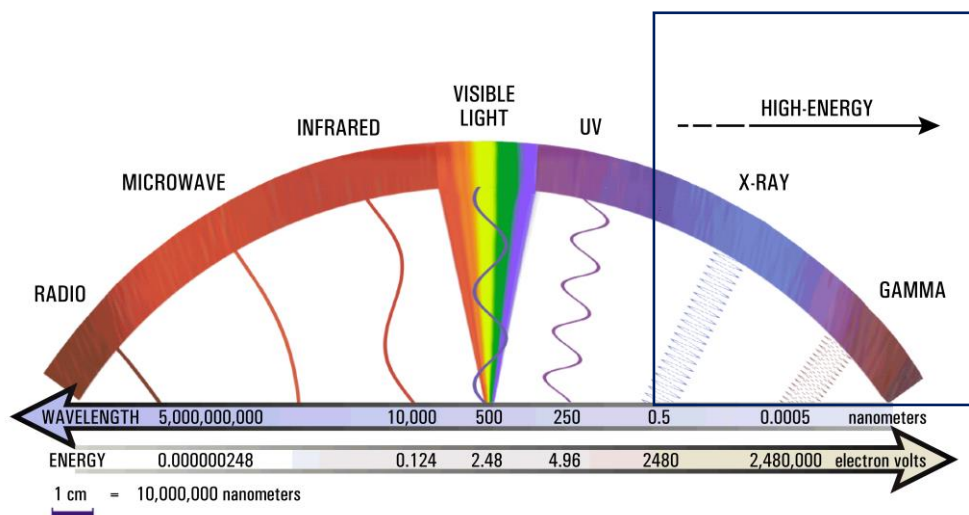
1.1.1.1. Οι ακτίνες X και γάμμα στην ακτινοθεραπεία

Ο όρος ακτινοβολία αφορά την εκπομπή και τη διάδοση της ενέργειας μέσω του χώρου ή ενός υλικού. Σε ένα γενικότερο πλαίσιο, η ακτινοβολία διαχωρίζεται σε ηλεκτρομαγνητική και σωματιδιακή ακτινοβολία όπου η δεύτερη θα συζητηθεί αργότερα.

Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία χαρακτηρίζεται από ταλαντευόμενα ηλεκτρικά και μαγνητικά πεδία και εμφανίζει διττή φύση. Οι ακτίνες X και γάμμα αποτελούν τις δύο κύριες μορφές ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας που χρησιμοποιούνται στην ακτινοθεραπεία (Εικόνα 1.1.). Οι ακτίνες X παράγονται όταν ηλεκτρόνια υψηλής ταχύτητας προσκρούουν σε υλικό υψηλού ατομικού αριθμού όπως είναι το βολφράμιο ή το μολυβδαίνιο, στην άνοδο ενός σωλήνα ακτίνων X ενώ οι ακτίνες γάμμα παράγονται ως αποτέλεσμα πυρηνικής διάσπασης. Η δέσμη φωτονίων αποτελεί την κύρια θεραπευτική μέθοδο στην ακτινοθεραπεία, εξαιτίας του υψηλού κόστους και των πολλαπλών τεχνικών προβλημάτων της χρήσης σωματιδιακής ακτινοβολίας (Seibert, 2004).

Όταν μία δέσμη ακτίνων X ή γάμμα διαπερνά ένα μέσο, φωτόνια και ύλη αλληλεπιδρούν με αποτέλεσμα η ενέργεια να μεταφέρεται στο μέσο. Η δέσμη των φωτονίων μπορεί να εξασθενίσει, να απορροφηθεί, να μεταδοθεί ή να σκεδαστεί. Οι τρεις κύριες μορφές αλληλεπίδρασης της ακτινοβολίας με την ύλη, οι οποίες έχουν κλινική σημασία για την ακτινοθεραπεία είναι α) το φαινόμενο Compton, β) το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο και γ) η δίδυμη γένεση. Μεταξύ των τριών, το πιο σημαντικό στη σύγχρονη ακτινοθεραπεία είναι το φαινόμενο Compton όπου τα φωτόνια αλληλοεπιδρούν με τα ελεύθερα ηλεκτρόνια και εναποθέτουν ένα μέρος της ενέργειάς τους σε αυτά (Seibert, 2004). Ακόμη, η γωνία σκέδασης του φωτονίου, η ενέργεια που μεταδίδεται από το φωτόνιο στο ηλεκτρόνιο και η ενέργεια την οποία κατά επέκταση το φωτόνιο χάνει, είναι στοιχεία τα οποία αλληλοσυνδέονται. Τέλος, η μεταβολή του μήκους κύματος δεν εξαρτάται ούτε από το υλικό το οποίο ακτινοβολείται ούτε από την ενέργεια της ακτινοβολίας αλλά από τη γωνία μέσω της οποίας η ακτινοβολία

σκεδιάζεται, δημιουργώντας σημαντικές επιπτώσεις στο σχεδιασμό της ακτινοπροστασίας (Mehta *et al.*, 2010).



Εικόνα 1.1. Το φάσμα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (MPE : High-Energy Astrophysics - What is High-Energy?, 2020)

1.1.1.2. Ακτινοβολίες σωματιδίων στην ακτινοθεραπεία: δέσμες ηλεκτρονίων, πρωτονίων και νετρονίων

Η σωματιδιακή ακτινοβολία αναφέρεται στην ενέργεια που μεταδίδεται από σωματίδια, όπως είναι τα πρωτόνια, τα νετρόνια και τα ηλεκτρόνια, με συγκεκριμένη μάζα, καθορισμένη ορμή και θέση οποιαδήποτε στιγμή (Amols, 2008).

Οι δέσμες ηλεκτρονίων είναι η πιο κοινή μορφή σωματιδιακής ακτινοθεραπείας και εφαρμόζεται ιδιαίτερα στη θεραπεία όγκων που είναι εντοπισμένοι στην επιφάνεια του σώματος και δεν έχουν διεισδύσει βαθιά στους ιστούς. Εξωτερική σωματιδιακή ακτινοβολία γίνεται και με βαρύτερα σωματίδια όπως νετρόνια που παράγονται από γεννήτριες νετρονίων, πρωτόνια που παράγονται από κυκλοτρόνια και συγχροτρόνια και βαρέα ιόντα (ήλιο, άνθρακας, άζωτο, αργό και νέον) που παράγονται από συγχροτρόνια.

Οι δέσμες πρωτονίων είναι μια νεότερη μορφή ακτινοβολίας δέσμης σωματιδίων που χρησιμοποιείται στη θεραπεία του καρκίνου. Η ακτινοθεραπεία με τη χρήση πρωτονίων μπορεί να επιφέρει καλύτερη κατανομή της δόσης λόγω του προφίλ απορρόφησής τους από τους ιστούς, γνωστή και ως κορυφή του Bragg, επιτρέποντας την εναπόθεση της μέγιστης ενέργειας στον όγκο, ελαχιστοποιώντας τυχόν βλάβες σε υγιείς ιστούς που βρίσκονται εντός της πορείας

των δεσμών πρωτονίων. Η συγκεκριμένη δέσμη χρησιμοποιείται ιδιαίτερα σε παιδιατρικούς όγκους αλλά και σε όγκους ενηλίκων όπως για παράδειγμα του νωτιαίου μυελού και βάσης κρανίου (Laramore, 2009).

Οι δέσμες νετρονίων έχουν υψηλή γραμμική ενέργεια μεταφοράς (LET-μέση εναποτιθέμενη ενέργεια ανά μονάδα μήκους της τροχιάς του φορτισμένου σωματιδίου) και μπορούν να προκαλέσουν περισσότερη βλάβη στο DNA από ότι τα φωτόνια.

Η ακτινοβολία σωματιδίων έχει υψηλότερη τιμή γραμμικής ενέργειας μεταφοράς (LET) από ότι τα φωτόνια, με υψηλότερη βιολογική αποτελεσματικότητα. Συμπερασματικά, αυτές οι μορφές ακτινοβολίας είναι πιο αποτελεσματικές για σαρκώματα, νεοπλάσματα νεφρικών κυττάρων, μελάνωμα και γλοιοβλάστωμα (Schulz-Ertner and Tsujii, 2007). Ωστόσο, ο εξοπλισμός για την παραγωγή ακτινοβολίας σωματιδίων είναι σημαντικά πιο κοστοβόρος από ότι των φωτονίων ενώ πιθανή μείωση κόστους παραγωγής των κυκλοτρονίων μπορεί να οδηγήσει σε ευρύτερη χρήση της θεραπείας με δέσμες πρωτονίων στο μέλλον (Ma and Maughan, 2006).

1.1.1.3. Τρόποι χορήγησης ακτινοβολίας

Υπάρχουν δύο κύριες μορφές ακτινοθεραπείας, εξωτερική ακτινοθεραπεία και βραχυθεραπεία. Στην εξωτερική ακτινοθεραπεία, ένας γραμμικός επιταχυντής παράγει δέσμη ακτινοβολίας (ακτίνες-X), με ηλεκτρικό δυναμικό από 4 μέχρι 20 MV, που κατευθύνεται στην περιοχή του όγκου. Πρόκειται για υψηλής ενέργειας ακτινοβολία και αποτελεί την πιο κοινή προσέγγιση στο κλινικό περιβάλλον. Αντίθετα η εσωτερική ακτινοβολία γνωστή και ως βραχυθεραπεία, εκπέμπεται από πηγές ακτινοβολίας γάμμα όπως είναι τα ραδιενεργά ισότοπα ^{60}Co and ^{137}Cs και είναι ραδιενεργές πηγές εισάγονται μέσα στο σώμα του ασθενούς. Μέσω της εσωτερικής ακτινοθεραπείας, παρέχονται υψηλές δόσεις εστιασμένης ακτινοβολίας με ενέργειες από 0.6 έως 1 MeV. Η εσωτερική ακτινοθεραπεία εφαρμόζεται κυρίως σε γυναικολογικούς καρκίνους, και στον καρκίνο του προστάτη (Patel and Arthur, 2006 ; Baskar *et al.*, 2012).

1.1.2 Τεχνικές προσεγγίσεις ακτινοθεραπείας

1.1.2.1. Κλασματοποίηση ακτινοβολίας

Κατά την κλασματοποίηση ή αλλιώς κερματισμό της συνολικής δόσης ακτινοθεραπείας του όγκου, η συνολική θεραπευτική δόση δεν δίδεται εφάπαξ αλλά κατανέμεται σε πολλές ημερήσιες ισόποσες δόσεις. Η κλασματοποίηση της ακτινοβολίας βασίζεται στις ακτινοβιολογικές ιδιότητες τόσο των καρκινικών όσο και των φυσιολογικών

κυττάρων ενώ αξίζει να σημειωθεί πως δεν παρουσιάζουν όλοι οι όγκοι την ίδια ακτινοευαισθησία δεδομένου ότι δεν παρουσιάζουν ούτε την ίδια βιολογική συμπεριφορά ούτε τον ίδιο χρόνο διπλασιασμού. Μέσω της κλασματοποίησης της συνολικής δόσης επιτυγχάνεται μείωση των ακτινικών αντιδράσεων των φυσιολογικών ιστών, δίνεται χρόνος ανάνηψης βλαβών και κατά συνέπεια γρηγορότερη επανακάμψη. Συγχρόνως όμως, η κλασματοποίηση επιφέρει και ανεπιθύμητα αποτελέσματα όπως είναι ο επαναποικισμός του όγκου ή αποκατάσταση μέρους των καρκινικών κυττάρων κατά τα ενδιάμεσα των κλασμάτων διαστήματα. Συνεπώς, η κλασματοποίηση της ακτινοβολίας επιδιώκει την επιβίωση των φυσιολογικών έναντι των καρκινικών κυττάρων, δεδομένου ότι τα φυσιολογικά κύτταρα αποκαθιστούν την προκληθείσα από την ακτινοβολία βλάβη εξαιτίας του αργού ρυθμού διαίρεσής τους, ο οποίος τους παρέχει το κατάλληλο χρονικό περιθώριο για επιδιόρθωση πριν την αντιγραφή. Αντιθέτως, τα καρκινικά κύτταρα δεν προλαβαίνουν να αποκαταστήσουν τη βλάβη λόγω του ταχύτερου ρυθμού με τον οποίο διαιρούνται. Στην κλασική κλασματοποίηση, η συνολική δόση της ακτινοβολίας χορηγείται σε 1.8–2.0 Gy/ημέρα, 5 φορές την εβδομάδα και ο συνολικός χρόνος της ακτινοθεραπείας κυμαίνεται από 3 έως 7 εβδομάδες (Prasanna *et al.*, 2014). Η κλασματοποίηση της ακτινοβολίας ξεκίνησε τη δεκαετία του 1920, οδηγώντας στην ανάπτυξη κατάλληλων θεραπευτικών σχημάτων τα οποία διαφοροποιούνται ως προς τη συνολική δόση ακτινοβολίας, τον αριθμό κλασμάτων και το συνολικό χρονικό διάστημα της ακτινοθεραπείας (Bernier *et al.*, 2004).

Εκτός από την κλασική κλασματοποίηση, η συνολική δόση της ακτινοβολίας μπορεί να κερματισθεί με διάφορους τρόπους, μεταβάλλοντας είτε τη συνολική δόση του όγκου είτε το συνολικό χρόνο ακτινοθεραπείας. Οι 3 πιο σημαντικές παραλλαγές της κλασικής κλασματοποίησης είναι: α) η υπερκλασματοποίηση, β) η επιταχυνόμενη κλασματοποίηση και γ) η υποκλασματοποίηση (Patel and Arthur, 2006). Στην περίπτωση της υπερκλασματοποίησης ή υπερκερματισμού της δόσης, η συνολική δόση κλασματοποιείται σε μικρότερα ημερήσια κλάσματα, όπου η ημερήσια δόση χορηγείται σε δύο συνεδρίες, δόσης 110-130 cGy εκάστη. Το αποτέλεσμα είναι αύξηση της συνολικής δόσης κατά 15-30% η οποία χορηγείται στο ίδιο χρονικό διάστημα με της κλασικής κλασματοποίησης. Το θεραπευτικό αποτέλεσμα που απορρέει κατά την υπερκλασματοποίηση είναι αύξηση της κυτταροκτόνου δράσης με ταυτόχρονο περιορισμό των όψιμων αντιδράσεων σε παρακείμενους υγιείς ιστούς (Dögg *et al.*, 1996). Μία άλλη περίπτωση κλασματοποίησης είναι ο επιταχυνόμενος κερματισμός της δόσης όπου μειώνεται ο συνολικός χρόνος της θεραπείας ενώ η συνολική δόση του όγκου είναι όμοια με της κλασικής κλασματοποίησης. Οι χορηγούμενες δόσεις κυμαίνονται από 180-200 cGy ανά συνεδρία, λαμβάνουν χώρα 2-3 συνεδρίες την ημέρα ή 5 συνεδρίες την εβδομάδα ή 7 συνεδρίες εβδομαδιαίως. Συνεπώς, στην επιταχυνόμενη κλασματοποίηση, αυξάνεται σημαντικά η ημερήσια δόση και μειώνεται ο συνολικός χρόνος της ακτινοθεραπείας. Η μείωση του συνολικού χρόνου διάρκειας της θεραπείας οδηγεί σε μείωση του επαναποικισμού των

καρκινικών κυττάρων με αποτέλεσμα να ελέγχεται καλύτερα η πάσχουσα περιοχή. Ωστόσο, σε καρκίνους κεφαλής, τραχήλου και πνεύμονα εφαρμόστηκε το ακτινοθεραπευτικό σχήμα CHART το οποίο είναι γνωστό ως “συνεχόμενο υπερκλασματοποιημένο σχήμα ακτινοθεραπείας” και προκύπτει από συνδυασμό υπερκλασματοποιημένης και επιταχυνόμενης κλασματοποίησης (Dörr *et al.*, 1996). Μία ακόμη περίπτωση κλασματοποίησης είναι ο υποκερματισμός της δόσης ή αλλιώς υποκλασματοποίηση όπου η θεραπεία λαμβάνει χώρα μία ή δύο φορές την εβδομάδα, για διάστημα 5 έως 6 εβδομάδων. Κατά την υποκλασματοποίηση η συνολική δόση του όγκου κλασματοποιείται σε μεγαλύτερα ημερήσια κλάσματα και το απαιτούμενο θεραπευτικό σχήμα ολοκληρώνεται συντομότερα από ότι στην κλασική κλασματοποίηση της ακτινοβολίας (Dörr *et al.*, 1996 ; Patel and Arthur, 2006).

1.1.2.2. Τεχνολογικές εξελίξεις στην ακτινοθεραπεία

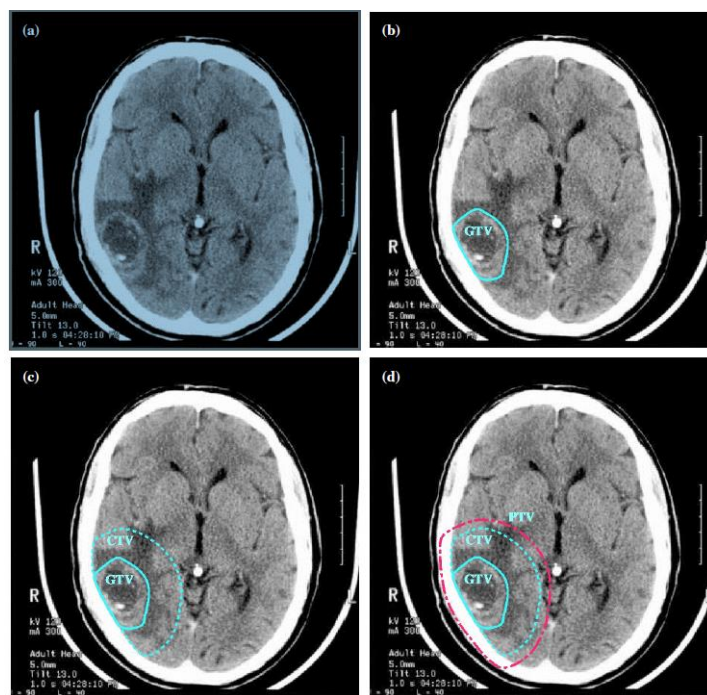
Δεδομένου ότι η ακτινοβολία μπορεί να καταστρέψει και φυσιολογικά κύτταρα, στόχος είναι να χορηγηθεί η μέγιστη δόση στον καρκινικό ιστό, προστατεύοντας συγχρόνως τα φυσιολογικά όργανα. Κατά επέκταση, οι νέες εξελίξεις στον τομέα της ακτινοθεραπείας αφορούν νέους τρόπους απεικόνισης, αποτελεσματικότερους υπολογιστές, καλύτερα λογισμικά καθώς και σύγχρονα συστήματα χορήγησης ακτινοβολίας όπως είναι οι γραμμικοί επιταχυντές (Baskar *et al.*, 2012).

1.1.2.2.1. Τρισδιάστατη σύμμορφη ακτινοθεραπεία (3DCRT)

Οι τεχνολογικές εξελίξεις στον τομέα της ακτινοθεραπείας έχουν οδηγήσει στην αντικατάσταση της διδιάστατης (2D) ακτινοθεραπείας από την τρισδιάστατη (3D) η οποία χρησιμοποιεί το σύστημα απεικόνισης μέσω αξονικής τομογραφίας (CT). Η τρισδιάστατη σύμμορφη ή προσαρμοσμένη ακτινοθεραπεία στηρίζεται στην ακριβή οριοθέτηση της ακτινοβληθείσας περιοχής καθώς και των ευαίσθητων οργάνων που την περιβάλλουν στις 3 διαστάσεις. Συνεπώς, η 3D-CRT παρέχει πλήρη εντοπισμό του όγκου και των φυσιολογικών οργάνων ώστε η δέσμη της ακτινοβολίας αφενός να κατευθύνεται με μεγαλύτερη ακρίβεια προς το πάσχον όργανο και αφετέρου να περιορίζεται στην πάσχουσα περιοχή (Prabhakar *et al.* 2009).

Αρχικά με ειδικό αξονικό τομογράφο λαμβάνονται εικόνες της πάσχουσας περιοχής σε θέση θεραπείας. Ο τρισδιάστατος σχεδιασμός απαιτεί υπολογιστική τομογραφία σε πολύ λεπτές τομές και στο κατάλληλο παράθυρο. Οι ληφθείσες εικόνες μεταφέρονται σε

εξειδικευμένο σχεδιαστικό πρόγραμμα. Η 3D εικόνα που σχηματίζεται από το πρόγραμμα αναδεικνύει με ακρίβεια τη θέση του όγκου καθώς και γύρω φυσιολογικών ιστών και οργάνων που πρέπει να προφυλαχθούν. Στη συνέχεια ο ακτινοθεραπευτής ογκολόγος καθορίζει με ακρίβεια τον στόχο και τις κρίσιμες δομές της περιοχής. (Prabhakar *et al.* 2009) Επιπρόσθετα, μέσω της 3D-CRT ακτινοθεραπείας καθορίζονται σημαντικά χαρακτηριστικά της ακτινοβοληθείσας περιοχής όπως είναι: α) η μακροσκοπική απεικόνιση του όγκου-στόχου (Gross tumor volume-GTV), β) η κλινική επέκταση του όγκου η οποία προκύπτει από τη μακροσκοπική εικόνα του όγκου-στόχου καθώς και από την πιθανή μικροσκοπική επέκταση του και γ) η περιοχή ασφαλείας γύρω από την ακτινοβοληθείσα περιοχή (PTV) η οποία προκύπτει από τη μακροσκοπική κλίμακα του όγκου, την κλινική επέκταση του όγκου και από το περιθώριο σφάλματος, κινήσεων οργάνων και πιθανών γεωμετρικών μεταβολών (Burnet *et al.*, 2004; Morgan-Fletcher, 2001) (Εικόνα 1.2.) Η 3D-CRT εφαρμόζεται κυρίως στις κακοήθειες του προστάτη, του πνεύμονα, του μαστού καθώς και σε κακοήθειες του εγκεφάλου, ορθού, νωτιαίου μυελού, στελέχους ή οπτικού χιάσματος (Perez *et al.*, 2004).

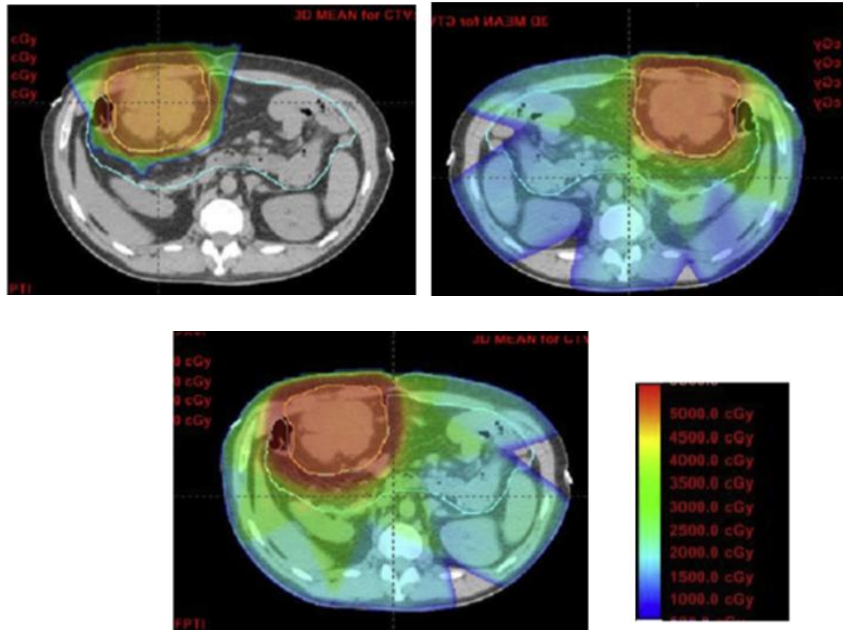


Εικόνα 1.2. Σχεδιασμός ακτινοθεραπείας σε ασθενή με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα (γλοίωμα Grade 4) σύμφωνα με το WHO, όπου: α) λήψη αξονικής με και χωρίς σκιαγραφικό, απεικονίζοντας καλύτερα τον όγκο-στόχο, β) GTV είναι ο ορατός όγκος, γ) CTV (clinical target volume) προστιθέμενο περιθώριο (margin) το οποίο περιλαμβάνει τη μικροσκοπική εξάπλωση του όγκου, και δ) το PTV (planning target volume) προστιθέμενο περιθώριο (margin) έχει προστεθεί έξω από το CTV για να αντισταθμίσει αβεβαιότητες όσον αφορά την μετακίνηση στόχου και την εκτέλεση της θεραπείας (Burnet *et al.*, 2004).

1.1.2.2.2. Ακτινοθεραπεία με δέσμη διαμορφούμενης έντασης (IMRT)

Η ακτινοθεραπεία με δέσμη διαμορφούμενης έντασης (IMRT) αποτελεί την προηγμένη μορφή της 3D-CRT ακτινοθεραπείας (Ding *et al.* 2009). Η IMRT ακτινοθεραπεία είναι πλέον διαθέσιμη σε πολλά κλινικά τμήματα, παράγεται από γραμμικούς επιταχυντές χρησιμοποιεί κατάλληλο υπολογιστικό πρόγραμμα μέσω του οποίου ρυθμίζεται η ένταση πολλαπλών δεσμών ακτινών (Feng *et al.*, 2007; Wang-Chesebro, *et al.*, 2006; Mundt *et al.*, 2002).

Η IMRT ακτινοθεραπεία επιτρέπει τη χορήγηση δόσεων ακτινοβολίας, οι οποίες προσαρμόζονται στο σχήμα του όγκου, προστατεύοντας συγχρόνως όργανα με κρίσιμη σημασία για τον οργανισμό (Feng *et al.*, 2007; Wang-Chesebro *et al.*, 2006; Mundt *et al.*, 2002). Η εφαρμογή της IMRT ακτινοθεραπείας επιτυγχάνει ομοιόμορφη κατανομή της δόσης ακτινοβολίας στον όγκο ενώ αποτρέπει την έκθεση υγιών ιστών σε αυτήν, αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο την ακρίβεια με την οποία χορηγείται η δόση της ακτινοβολίας. Κατά επέκταση, μέσω της IMRT ακτινοθεραπείας επιτυγχάνεται καλύτερος έλεγχος της νόσου. Η IMRT ακτινοθεραπεία στηρίζεται στον αντίστροφο σχεδιασμό της ακτινοθεραπείας όπου αρχικά ορίζονται τα δοσοπεριοριστικά όργανα και κατόπιν καθορίζεται η μέγιστη δόση που θα λάβουν. Το υπολογιστικό πρόγραμμα σχεδιασμού ακτινοθεραπείας περιλαμβάνει όλους τους πιθανούς περιορισμούς, υπολογίζοντας με ακρίβεια τη δόση κάθε μίας ξεχωριστής δέσμης. Η εν λόγω τεχνική εφαρμόζεται σε διάφορες περιπτώσεις όγκων, όπως ο καρκίνος της κεφαλής - τραχήλου, προστάτη και γυναικολογικών καρκίνων (Feng *et al.*, 2007; Wang-Chesebro *et al.*, 2006; Mundt *et al.*, 2002) (Εικόνα 1.3.).

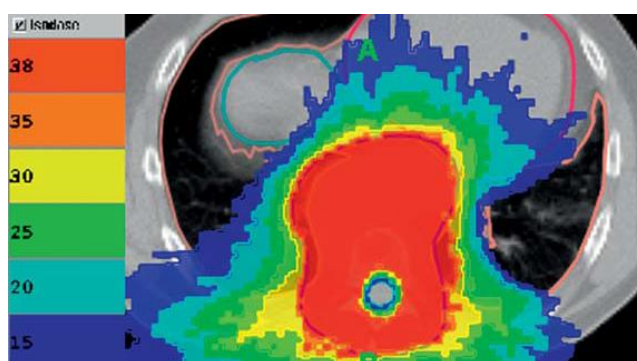


Εικόνα 1.3. Τομές αξονικού τομογράφου με ισοδοσιακές γραμμές σχεδιασμού πλάνου ακτινοθεραπείας οι οποίες συγκρίνουν την δόση που λαμβάνει το έντερο με 3D-CPT (πρωτόνια, επάνω αριστερά) , με IMRT (φωτόνια-επάνω δεξιά) και 3DCRT (κάτω αριστερά). Η 90% ισοδοσιακή (45 Gy) απεικονίζεται με πορτοκαλί χρώμα ενώ η 30% ισοδοσιακή (15 Gy) με ανοιχτό μπλε χρώμα. Η τυρκουάζ γραμμή βρίσκεται στην κορυφή της εικόνας και διαγράφει το περίγραμμα του χώρου του εντέρου (Swanson *et al.*, 2012).

1.1.2.2.3. Ακτινοθεραπεία καθοδηγούμενη από εικόνες (IGRT)

Προκειμένου να καθορίσει ο ακτινοθεραπευτής ογκολόγος την πάσχουσα περιοχή-στόχο, απαιτούνται διάφορες απεικονιστικές μέθοδοι όπως είναι η αξονική τομογραφία, μαγνητική τομογραφία, PET-CT και άλλες. (Sterzing *et al.*, 2011) Πριν τη δυνατότητα απεικόνισης, η περιοχή που θα ακτινοβολείτο ήταν μεγαλύτερη, εκθέτοντας συγχρόνως μεγαλύτερη έκταση υγιούς ιστού στην ακτινοβολία. Συνεπώς, προέκυπτε σφάλμα θέσης το οποίο οδηγούσε σε ‘‘ακούσια’’ ακτινοβόληση οργάνων ή ιστών που εντοπίζονται πολύ κοντά στον όγκο. Αντιθέτως, μέσω σύγχρονων απεικονιστικών μεθόδων κατά το σχεδιασμό της ακτινοθεραπείας τίθεται περιθώριο ασφαλείας γύρω από την περιοχή που πρόκειται να ακτινοβοληθεί, διασφαλίζοντας ότι ο όγκος που θα λάβει τη μέγιστη δόση θα βρίσκεται εντός της περιοχής θεραπείας ακόμα και αν σε μία συνεδρία ο όγκος ή το σώμα του ασθενούς είναι σε λίγο διαφορετική θέση από αυτήν που είχε κατά την αξονική τομογραφία σχεδιασμού. Επιπρόσθετα, η πιθανότητα μετατόπισης όγκου αυξάνεται λόγω μετακινήσεων οργάνων όπως είναι οι αναπνευστικές κινήσεις. (Webster *et al.*, 2009).

Η καθοδηγούμενη από απεικόνιση ακτινοθεραπεία (IGRT - image guided radiotherapy) είναι τεχνική απεικόνισης του ασθενούς στη θέση θεραπείας, σε πραγματικό χρόνο, πριν από την εκάστοτε συνεδρία ακτινοθεραπείας. Σκοπός της IGRT ακτινοθεραπείας είναι η αύξηση της ακρίβειας της θεραπείας και μείωση του σφάλματος κατά την τοποθέτηση του ασθενούς. Η απεικόνιση μπορεί να είναι είτε δυδιάστατη (ακτινογραφία) είτε πλέον τρισδιάστατη (αξονική τομογραφία- Cone Beam CT) με τον εξοπλισμό απεικόνισης να είναι τοποθετημένος μέσα στο χώρο θεραπείας ώστε να λαμβάνονται οι εικόνες της σάρωσης από τη θεραπευτική θέση στην οποία βρίσκεται ο ασθενής (Webster *et al.*, 2009) (Εικόνα 1.4.). Με την IGRT ακτινοθεραπεία επιτυγχάνεται μείωση του σφάλματος καθότι διορθώνεται η θέση του ασθενούς και εντοπίζεται ο όγκος με μεγάλη ακρίβεια ακόμα και εάν έχει υποστεί αλλαγές σε θέση, μέγεθος ή σχήμα. Επιπλέον, η μείωση των απαραίτητων περιθωρίων γύρω από τον όγκο αντισταθμίζει αβεβαιότητες της θεραπείας με αποτέλεσμα να μειώνεται το μέγεθος των πεδίων ακτινοβολίας, να μην εκτίθενται στην ακτινοβολία φυσιολογικοί ιστοί, περιορίζοντας τυχόν παρενέργειες. Συνεπώς, η IGRT ακτινοθεραπεία αυξάνει την ακρίβεια της ακτινοθεραπείας έτσι ώστε να μην υποδοσιάζεται ο όγκος ή υπερδοσιάζονται οι φυσιολογικοί ιστοί (Sterzing *et al.*, 2007). Η ενισχυμένη ακρίβεια της θέσης του όγκου κατέστησε εφικτή τη κλιμάκωση της δόσης με αποτέλεσμα να βελτιώνεται η θεραπευτική αναλογία σε διάφορες περιπτώσεις όγκων, όπως ο καρκίνος της κεφαλής, τραχήλου και προστάτη (Jaffray *et al.*, 2002; Gill *et al.*, 2011; Duma *et al.*, 2010; Barney *et al.*, 2011). Συμπερασματικά, η IGRT ακτινοθεραπεία παρέχει τη δυνατότητα παροχής της ακτινοβολίας με μεγαλύτερη ακρίβεια μειώνοντας την ένταση με την οποία θα ακτινοβοληθεί ο φυσιολογικός ιστός πλησίον του όγκου (Webster *et al.*, 2009).



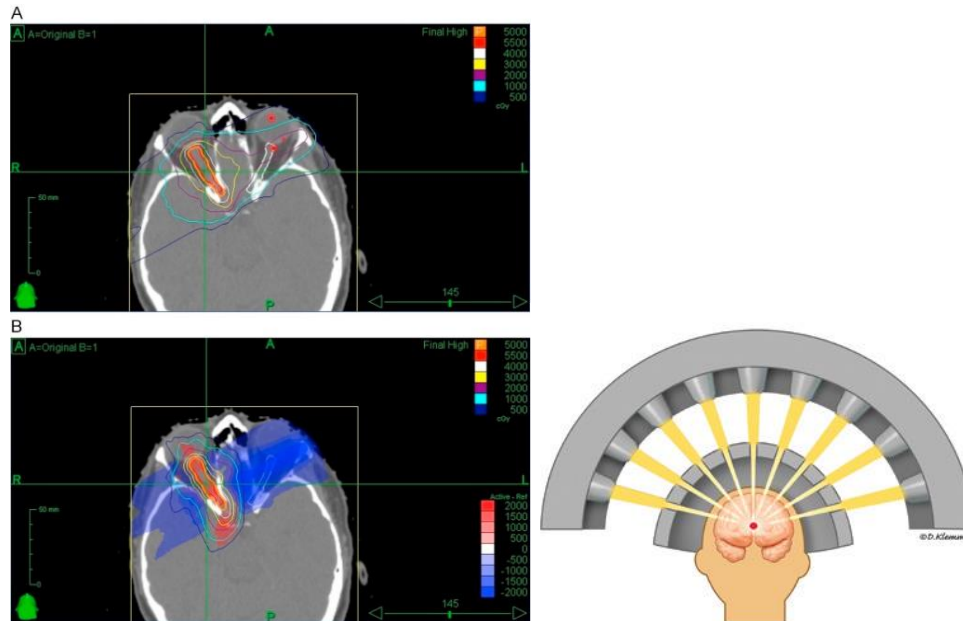
Εικόνα 1.4. Επικεντρωμένη εφαρμογή ακτινοθεραπείας μέσω της IGRT σε ενανακτινοβόληση όγκου με αποφυγή επιβάρυνσης νοτιαίου μυελού (Sterzing *et al.*, 2011).

1.1.2.2.4. Στερεοτακτική ακτινοθεραπεία σώματος (SBRT)

Οι παραπάνω τεχνολογικές εξελίξεις οδήγησαν στην ανάπτυξη της στερεοτακτικής ακτινοθεραπείας (SBRT) η οποία χρησιμοποιεί ακτίνες γ ή X γραμμικού επιταχυντή. Η SBRT παρέχει πολύ υψηλές δόσεις ακτινοβολίας κατά τη διάρκεια των συνεδριών, σε λίγα μόνο κλάσματα, πετυχαίνοντας την εξάλειψη, κυρίως μικρού μεγέθους, πρωτοπαθών και ολιγομεταστατικών όγκων (Lo *et al.*, 2010; Tipton *et al.*, 2011). Βέβαια η υψηλή δόση ακτινοβολίας που χρησιμοποιείται κατά τη SBRT είναι ικανή να καταστρέψει και φυσιολογικούς ιστούς πλησίον του όγκου, και γι' αυτό χρειάζεται μεγάλη εξειδίκευση και απόλυτος έλεγχος της θεραπείας. (Lo *et al.*, 2011).

Υπάρχουν διάφορες τεχνικές SBRT όπως είναι το «γ-knife» όπου πολλές δέσμες από πολλές κατευθύνσεις εστιάζονται στον όγκο και χρήζει εφαρμογής ειδικού μεταλλικού πλαισίου ακινητοποίησης κεφαλής. Άλλη περίπτωση SBRT τεχνικής είναι το <<X-knife>> όπου μέσω γραμμικού επιταχυντή κατανέμεται η ακτινοβολία τοξοειδώς γύρω από το στόχο-νόσο. Άλλη τεχνική SBRT είναι με το Cyberknife για μη επεμβατική (χωρίς ανάγκη εφαρμογής πλαισίου ακινητοποίησης κεφαλής) ακτινοβολία ενδοκρανιακών όγκων ενώ λόγω των δυνατοτήτων του επεκτάθηκε και στην ακτινοβολία εξωκρανιακών όγκων (Kondziolka, 2019). Το Cyberknife είναι σύστημα ακτινοχειρουργικής, με ρομποτική κεφαλή η οποία κινείται γύρω από το σώμα του ασθενούς. Η ακτινοβολία του όγκου-στόχου μέσω του Cyberknife επιτυγχάνεται με πολλαπλές δέσμες-δόσεις, από διαφορετικές κατευθύνσεις και προσαρμόζεται στις μικρές φυσιολογικές κινήσεις του ασθενούς όπως είναι για παράδειγμα οι αναπνευστικές (Εικόνα 1.5.). Ουσιαστικά, με το σύστημα Cyberknife δίδεται η δυνατότητα παρακολούθησης των κινήσεων του όγκου-στόχου. Στο συγκεκριμένο είδος ακτινοθεραπείας υπάρχουν διάφορα συστήματα ακινητοποίησης τα οποία διευκολύνουν την ακτινοβολία κινητών περιοχών του σώματος όπως είναι το κεφάλι ενώ παρεμποδίζουν την ακτινοβολία υγιών ιστών και οργάνων. (Nabavi *et al.*, 2014).

Οι θεραπευτικές δυνατότητες της SBRT ακτινοθεραπείας εμφανίζονται σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα αρχικού σταδίου όπου δεν ήταν εφικτή η χειρουργική επέμβαση. Τέλος, άλλες περιπτώσεις όγκων στις οποίες εφαρμόζεται η SBRT ακτινοθεραπεία είναι ο καρκίνος της κεφαλής και του τραχήλου, ο καρκίνος του ήπατος και νεφρών καθώς και στους ολιγομεταστατικούς καρκίνους σπονδυλικής στήλης και παγκρέατος (Wu *et al.*, 2008; National radiotherapy implementation group report, 2010; Freeman and King, 2011).



Εικόνα 1.5. Α) Μείωση θεραπευτικής δόσης στο οπτικό νεύρο με χρήση στερεοτακτικής ακτινοχειρουργικής (Ding *et al.*, 2018). Β) Εικόνα δεξιά Σχηματική απεικόνιση της στερεοτακτικής ακτινοθεραπείας όπου πολλαπλές δέσμες ακτίνων συγκλίνουν στον όγκο-στόχο (Gerber and Chan, 2008).

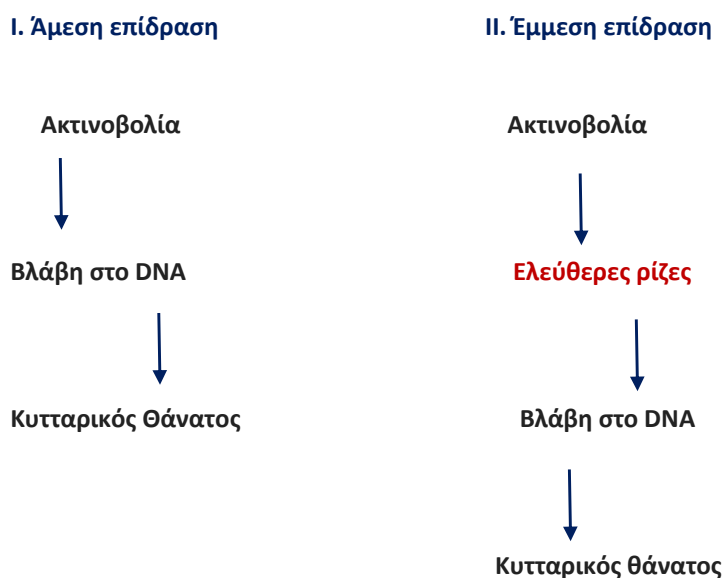
1.1.3. Ο επαγόμενος από την ιονίζουσα ακτινοβολία κυτταρικός θάνατος

Η ακτινοθεραπεία όπως και οι περισσότερες αντικαρκινικές θεραπείες επιτυγχάνουν το θεραπευτικό τους αποτέλεσμα, προκαλώντας τον κυτταρικό θάνατο μέσω ποικίλων οδών. Ωστόσο, διαμέσου της ακτινοθεραπείας τα καρκινικά κύτταρα δεν οδηγούνται άμεσα στο θάνατο αλλά απαιτούνται ώρες, ημέρες ή εβδομάδες θεραπείας ενώ ο κυτταρικός θάνατος διαρκεί για εβδομάδες έως μήνες μετά τη λήξη της ακτινοθεραπείας (Verheij,2008).

Ο ακριβής μηχανισμός μέσω του οποίου ένα κύτταρο οδηγείται στο θάνατο είναι ακόμα υπό διερεύνηση. Με βάσει τις διάφορες μελέτες, οι διπλές θραύσεις του DNA είναι η πιο σημαντική επίδραση της ακτινοβολίας σε κυτταρικό επίπεδο. Οι θραύσεις του DNA στερούν από το κύτταρο τη δυνατότητα να αναπαράγεται ακέραια και κατά επέκταση το κύτταρο οδηγείται στο θάνατο. Συνεπώς, ο βιολογικός στόχος της ιονίζουσας ακτινοβολίας στο κύτταρο είναι το DNA όπου υπάρχουν δύο περιπτώσεις επίδρασης: α) η άμεση δράση της ακτινοβολίας και β) η έμμεση δράση της ακτινοβολίας (Εικόνα 1.6.). Στην άμεση δράση, η ακτινοβολία επιδρά άμεσα με το DNA, προκαλώντας βλάβες ενώ στην έμμεση δράση οι βλάβες στο DNA οφείλονται στο σχηματισμό ελεύθερων ριζών που προέρχονται από τον ιονισμό ή διέγερση του υδατικού συστατικού των κυττάρων (Baskar *et al.*,2012). Ωστόσο, στην κλινική πράξη, η βλάβη προκαλείται κυρίως έμμεσα μέσω της παραγωγής ελεύθερων

δραστικών ριζών οι οποίες είναι ενδιάμεσες ενώσεις σχηματιζόμενες από την ραδιόλυση του ενδοκυττάρου νερού. Η ιονίζουσα ακτινοβολία μπορεί επίσης να επηρεάσει διαδικασίες του κυτταρικού κύκλου οι οποίες είναι απαραίτητες για την κυτταρική ανάπτυξη, γήρανση και απόπτωση (Joubert and Foray, 2007).

Καθώς η ακτινοβολία καταστρέφει το γενετικό υλικό των καρκινικών κυττάρων, αυτά στερούνται της ικανότητας πολλαπλασιασμού, καταλήγοντας στον κυτταρικό θάνατο. Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου όπως η απόπτωση, ο μιτωτικός κυτταρικός θάνατος, η αυτοφαγία, η νέκρωση και η κυτταρική γήρανση (Verheij,2008) (Εικόνα 1.7.).



Εικόνα 1.6. Διαγραμματική απεικόνιση άμεσης και έμμεσης δράσης στο DNA με κοινή κατάληξη τον κυτταρικό θάνατο.

1.1.3.1.1. Πρώτος μηχανισμός κυτταρικού θανάτου: Απόπτωση

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ή απόπτωση είναι ένας σημαντικός μηχανισμός κυτταρικού θανάτου στις αντικαρκινικές θεραπείες όπως επίσης και στην ακτινοθεραπεία (Dewey *et al.*, 1995; Rupnow and Knox,1999; Cragg *et al.*, 2009). Κατά τη διάρκεια της απόπτωσης, τα κύτταρα συρρικνώνονται και μετατρέπονται σε αποπτωτικά ενώ τα μιτοχόνδρια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της απόπτωσης. Επιπλέον, η χρωματίνη συμπυκνώνεται, ο πυρήνας καταστρέφεται και στο DNA δημιουργούνται θραύσεις.

Όσον αφορά την κυτταρική μεμβράνη των αποπτωτικών κυττάρων, διατηρεί την ακεραιότητά της αν και υφίσταται φθορές (Verheij, 2008; Fogg *et al.*, 2011; Eriksson and Stigbrand, 2010).

1.1.3.1.2. Δεύτερος μηχανισμός κυτταρικού θανάτου: Ο μιτωτικός κυτταρικός θάνατος ή μιτωτική καταστροφή

Ο μιτωτικός κυτταρικός θάνατος ή μιτωτική καταστροφή, διαδραματίζεται είτε κατά τη διάρκεια ή κατόπιν της κυτταρικής διαίρεσης και προκαλείται από εσφαλμένο κυτταρικό διαχωρισμό οδηγώντας στο σχηματισμό γιγαντιαίων κυττάρων με μη φυσιολογική πυρηνική μορφολογία και πολλαπλούς πυρήνες. Τα κύτταρα έχουν συχνά μετά από το διπλασιασμό έναν ή περισσότερους μικροπυρήνες και κεντρομερίδια (Sato *et al.*, 2000; Vakifahmetoglu *et al.*, 2008). Μετά την ακτινοβολία, τα καρκινικά κύτταρα συμπαγών όγκων εξουδετερώνονται καθώς έχουν προέλθει από μη φυσιολογικά μιτωτικά γεγονότα (Jonathan *et al.*, 1999). Η απόπτωση και ο μιτωτικός κυτταρικός θάνατος αντιπροσωπεύουν την πλειονότητα των κυτταρικών θανάτων που προκαλούνται από την ιονίζουσα ακτινοβολία (Baskar *et al.*, 2012).

1.1.3.1.3. Τρίτος μηχανισμός κυτταρικού θανάτου: Αυτοφαγία

Η αυτοφαγία είναι μια μορφή κυτταρικού θανάτου η οποία απορρέει κατά την έκθεση σε ακτινοβολία. Πρόκειται για μια γενετικά ρυθμιζόμενη μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου όπου το κύτταρο πέπτει μέσω του αυτοφαγικού/λυσosomalικού οργανιδίου. Στην αυτοφαγία, σχηματίζεται διπλή μεμβράνη κενοτοπίων, οργανίδια, ριβοσώματα και τη συμπυκνωμένη πυρηνική χρωματίνη, που συγκεντρώνονται στο κυτόπλασμα. (Ito *et al.*, 2005; Kuwahara *et al.*, 2011).

1.1.3.1.4. Τέταρτος μηχανισμός κυτταρικού θανάτου: Νέκρωση

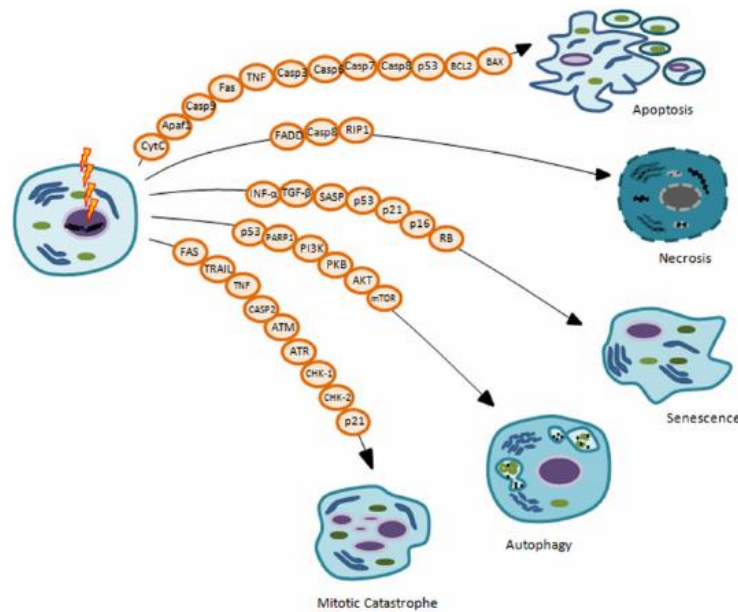
Κατά τη νέκρωση, τα κύτταρα διογκώνονται με αποτέλεσμα την ακόλουθη ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης και απώλεια των ενδοκυτταρικών περιεχομένων. Επιπλέον, η νέκρωση περιλαμβάνει το σχηματισμό κενοτοπίων, αποσυμπύκνωση της χρωματίνης, σχηματισμό μιτοχονδριακού οιδήματος, διαμόρφωση του πυρήνα σε άτυπο σχήμα και αποσύνθεση των κυτταρικών οργανιδίων. Από όλες τις περιπτώσεις κυτταρικού θανάτου μετά από ακτινοβολία, η νέκρωση παρατηρείται σπανιότερα σε νεοπλασματικά κύτταρα ή ιστούς. (Hotchkiss *et al.*, 2009).

1.1.3.1.5. Πέμπτος μηχανισμός κυτταρικού θανάτου: Κυτταρική γήρανση

Στην κυτταρική γήρανση, τα κύτταρα χάνουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού. Τα κύτταρα είναι βιώσιμα αλλά δε διαιρούνται, δεν συντίθεται DNA, διογκώνονται και αποκτούν πιο πεπλατυσμένο σχήμα. Η εν λόγω διαταραχή εμφανίζεται σε καρκινικά κύτταρα τα οποία είναι εκτεθειμένα σε εκτεταμένο κυτταρικό στρες υπό τη μορφή βλάβης του DNA που έχει προκληθεί από την ακτινοθεραπεία με αποτέλεσμα το κύτταρο να οδηγείται στην απόπτωση. (Roninson, 2003; Schmitt, 2007).

1.1.3.2. Ενδοκυττάρια μονοπάτια ενεργοποιούν τους διάφορους τύπους κυτταρικού θανάτου

Διάφορα οργανίδια και ενδοκυττάρια μονοπάτια εμπλέκονται στους διάφορους μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου, επαγόμενους από ακτινοβολία. Το ενδοκυττάριο μονοπάτι ATM-p53-Bax-κυτόχρωμα c-κασπάσες οδηγεί στην απόπτωση ενώ στο μιτωτικό κυτταρικό θάνατο σημαντικό ρόλο διαδραματίζει ο καταρράκτης p53-κασπάσες-κυτόχρωμα c. Στη νέκρωση, εμπλέκεται η οδός TNFα-PARP-JNK-κασπάσες ενώ η οδός MYCINK4A-ARF-p53-p21 πυροδοτεί τη γήρανση (Schmitt, 2003; Vakifahmetoglu *et al.*, 2008; Brandsma *et al.*, 2008; Schmitt *et al.*, 2002). Τέλος, στην αυτοφαγία, ο καταρράκτης PI3K-Akt-mTOR θεωρείται σημαντικός (Kondo *et al.*, 2005). Αν και τα περισσότερα από αυτά τα μονοπάτια αλληλοσυνδέονται στον κυτταρικό θάνατο των καρκινικών κυττάρων, που προκαλείται από την ακτινοβολία, υπάρχουν πολλά σημεία προς μελέτη όσον αφορά την ογκογένεση και την ανθεκτικότητα των κυττάρων στην ακτινοβολία μέσω μονοπατιών κυτταρικού θανάτου (Baskar *et al.*, 2012).



Εικόνα 1.7. Μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου και των αντίστοιχων μονοπατιών που οδηγούν σε απόπτωση (Minafra and Bravatà, 2014).

1.2. Η βιολογική επίδραση της ακτινοθεραπείας

1.2.1. Η παραγωγή ελευθέρων ριζών ως αποτέλεσμα της ακτινοθεραπείας

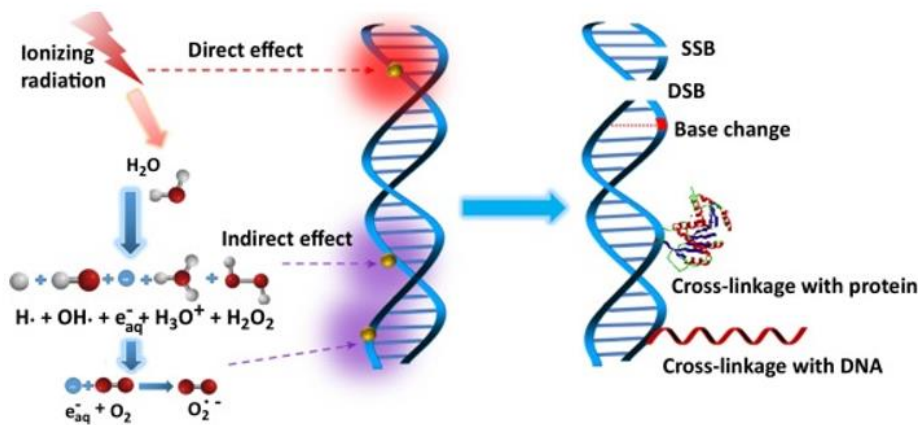
Η βιολογική αποτελεσματικότητα της ακτινοθεραπείας εξαρτάται από τη γραμμική ενέργεια μεταφοράς (LET), τη συνολική δόση, τη κλασματοποίηση και την ευαισθησία των κυττάρων-στόχων ή ιστών (Hall, 2007; Baskar, 2010). Χαμηλή γραμμική ενέργεια μεταφοράς (LET) εναποθέτει σχετικά χαμηλή ποσότητα ενέργειας (LET) ενώ υψηλή γραμμική ενέργεια μεταφοράς (LET) εναποθέτει υψηλότερη ενέργεια στις περιοχές - στόχους. Αν και η ακτινοβολία αποσκοπεί στη θανάτωση του καρκινικού κυττάρου, φυσιολογικοί ιστοί πλησίον του όγκου μπορεί να καταστραφούν από την ακτινοβολία. Ωστόσο, στόχος της ακτινοθεραπείας είναι η μεγιστοποίηση της δόσης σε κύτταρα του όγκου ενώ τα φυσιολογικά κύτταρα πρέπει να εκτίθενται στην ελάχιστη δόση (Emami *et al.*, 1991).

Οι ιονίζουσες ακτινοβολίες, κυρίως οι ακτίνες X, οι οποίες χρησιμοποιούνται ευρέως στη συμβατική ακτινοθεραπεία εξωτερικής δέσμης (RT) καθώς και τα υψηλής ενέργειας ηλεκτρόνια που παράγονται από γραμμικούς επιταχυντές (IORT), μπορούν να προκαλέσουν υψηλά επίπεδα οξειδωτικού στρες είτε σε καρκινικά είτε σε φυσιολογικά κύτταρα. Όταν η ενέργεια έχει υψηλή γραμμική ενέργεια μεταφοράς (LET), είναι δυνατό να προκληθούν βλάβες στα κύτταρα οφειλόμενες τον άμεσο ιονισμό μακρομορίων συμπεριλαμβανομένου των DNA, RNA, λιπιδίων και πρωτεϊνών. Από την άλλη μεριά, ακτινοβολίες χαμηλής γραμμικής

ενέργειας μεταφοράς (LET) προκαλούν έμμεση βλάβη στα μακρομόρια μέσω της παραγωγής δραστικών ριζών οξυγόνου. Από τις δραστικές ρίζες οξυγόνου, το σουπεροξειδίο και οι ρίζες υδροξυλίου που σχηματίζονται κατά την ραδιόλυση του ενδοκυττάρου νερού καθώς και οι δραστικές ρίζες αζώτου, οξειδώνουν τα μακρομόρια και ενεργοποιούν διάφορα ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια, οδηγώντας σε στρεσογόνες αποκρίσεις και φλεγμονή (Hall and Giaccia, 2006; Zhao *et al.*, 2007; Lomax *et al.*, 2013; Mladenov *et al.*, 2013; Golden *et al.*, 2012 ; Multhoff and Radons, 2012).

Οι επαγόμενες από την ακτινοβολία βλάβες του DNA μπορεί να είναι: 1) τροποποιήσεις των αζωτούχων βάσεων, 2) θραύσεις στη μία (SSB) ή και στις δύο αλυσίδες του DNA (DSB) και 3) πιθανές διασταυρώσεις μεταξύ των δύο αλυσίδων κατόπιν της θραύσεως. (Εικόνα 1.8.). Σε γενικές γραμμές, οι διπλές θραύσεις είναι πιο θανατηφόρες στα κύτταρα συγκριτικά με τις θραύσεις στη μία μόνο αλυσίδα, ακόμα και στην περίπτωση όπου έχουν προκύψει λόγω επίδρασης με τη χαμηλή γραμμική ενέργεια μεταφοράς (LET) (Huang *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2007). Οι βλάβες που έχουν δημιουργηθεί λόγω ακτινοθεραπείας και δεν επιδιορθώνονται, οδηγούν σε μεταλλάξεις, γενωμική αστάθεια και κυτταρικό θάνατο (Minafra and Bravatà, 2014).

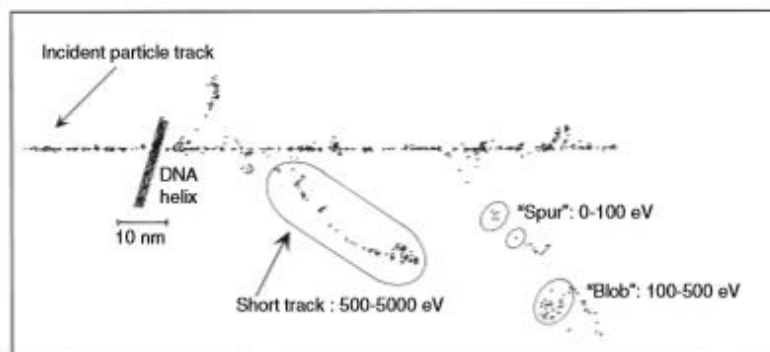
Τέλος, αν και είναι γνωστό ότι το DNA είναι πρωταρχικός μοριακός στόχος της ακτινοβολίας έχει αποδειχθεί ότι και οι πρωτεΐνες είναι σημαντικοί στόχοι της ακτινοθεραπείας οδηγώντας σε ενεργοποίηση μηχανισμών κυτταρικού θανάτου. Ο προκληθής κυτταρικός θάνατος από πρωτεϊνική βλάβη προέρχεται από τη μειωμένη ικανότητα του κυττάρου να επιδιορθώνει με πιστότητα το DNA, μειώνοντας με έμμεσο τρόπο την κυτταρική βιωσιμότητα. Αν και οι νουκλεοτιδικές βάσεις αποτελούν στόχο των ελευθέρων ριζών, οι πρωτεΐνες παραμένουν οι πρωταρχικοί στόχοι τους ενώ *in vitro* πειράματα σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών έδειξαν ότι η επαγόμενη από ακτινοβολία βλάβη οδηγεί σε οξείδωση των πρωτεϊνών και ενεργοποίηση των προ-αποπτωτικών σηματοδοτικών μονοπατιών (Du and Gebicki, 2004; Shuryak and Brenner, 2012 ; Panganiban *et al.*, 2013).



Εικόνα 1.8. Τα βιολογικά αποτελέσματα της άμεσης και έμμεσης δράσης της ιονίζουσας ακτινοβολίας (Wang *et al.*, 2018).

1.2.1.1. Η εναπόθεση της ενέργειας στα βιομόρια

Η ενέργεια καθώς εναποτίθεται στα βιολογικά υλικά, διαχωρίζεται και αποτίθεται τυχαία, με τη μορφή αυξανόμενων ενεργειακών πακέτων όπως είναι “σπινθήρες” (από 100 eV ή και λιγότερα), οι “σταγόνες” (από 100 έως 500 eV) και οι “ μικρές διαδρομές (από 500 έως 5000 eV) (Εικόνα 1.9.). Ωστόσο, σε καθεμία περίπτωση ενεργειακού πακέτου, η ενέργεια μπορεί να απωλέσει από τρεις έως δεκάδες ιονισμένων ατόμων στο πέρασμα της. Όταν ένα φωτόνιο ή φορτισμένο σωματίδιο προσπίπτει, η συχνότητα κατανομής και πυκνότητας με την οποία κατατίθεται η ενέργεια, προσδιορίζουν τη γραμμική μεταφορά ενέργειας γνωστή και ως LET. Αν και τα συμβάντα ενεργειακής εναπόθεσης είναι διαχωρισμένα, το συμπέρασμα το οποίο έχει προκύψει είναι ότι η ποσότητα ενέργειας που εναποτίθεται μακροσκοπικά σε ένα βιολογικό υλικό είναι μέτρια αλλά η κατανομή της σε μικροσκοπική κλίμακα μπορεί να είναι αρκετά υψηλή. Κατά επέκταση, η ιονίζουσα ακτινοβολία μπορεί να προκαλέσει σημαντική βλάβη σε διάφορα βιολογικά υλικά (Gunderson and Terper, 2007).



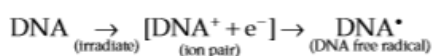
Εικόνα 1.9. Η εναπόθεση της ενέργειας στο μόριο του DNA με τη μορφή "σπινθήρων" (<100 eV), "σταγόνων" (100 -500 eV) ή "μικρών διαδρομών" (500 -5000 eV) (Goodhead, 1995).

Βιομόρια τα οποία λαμβάνουν σχετικά υψηλή δόση ενέργειας, υπόκειται σε μια μεγάλη εναπόθεση ενέργειας σε πολύ μικρό όγκο. Η εναπόθεση ενέργειας φωτονίων και φορτισμένων σωματιδίων οδηγεί σε εκτροχιασμό των τροχιακών ηλεκτρονίων μετασηματίζοντας το μόριο-στόχο αρχικά σε ένα ζεύγος ιόντων και κατόπιν σε μια ελεύθερη ρίζα. Τα εκτροχιασμένα ηλεκτρόνια τα οποία είναι ενεργειακά φορτισμένα σωματίδια εκ φύσεως μπορούν να προκαλέσουν επιπλέον ιονισμό. Όσον αφορά τα μη φορτισμένα ενεργειακά σωματίδια όπως είναι τα νετρόνια, η αλληλεπίδρασή τους με τον πυρήνα ατόμων σε απορροφούμενο μέσο, προκαλεί την εκπομπή φορτισμένων πρωτονίων και των χαμηλά ενεργειακά νετρονίων. Ο κύκλος ιονισμού, η παραγωγή ελευθέρων ριζών και η απελευθέρωση δευτερευόντων φορτισμένων σωματιδίων συνεχίζεται έως ότου εξαντληθεί όλη η ενέργεια του φορτισμένου σωματιδίου. Οι χημικές αντιδράσεις που οδηγούν σε παραγωγή ελευθέρων ριζών είναι επικρατέστερες στην ανταπόκριση των βιομορίων απέναντι στην ακτινοβολία (Gunderson and Terpper, 2007).

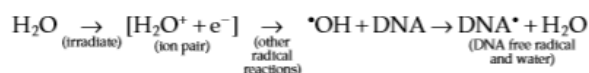
Οποιοδήποτε από τα κυτταρικά μόρια μπορεί να αποτελέσουν στόχους της εντοπισμένης ενέργειας η οποία εναποτίθεται με τη μορφή είτε σπινθήρων, σταγόνων ή μικρών διαδρομών. Ωστόσο, το ενδεχόμενο να οδηγήσει ο ιονισμός ενός συγκεκριμένου βιομορίου σε αξιόλογη βιολογική επίδραση, εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως είναι: α) η πιθανότητα το μόριο-στόχος να αντιπροσωπεύει φορτισμένο σωματίδιο, β) η σημασία του βιομορίου για την υγεία του κυττάρου, γ) ο συνήθης αριθμός "αντιγράφων" του βιομορίου στο κύτταρο, δ) η ικανότητα ανταπόκρισης του κυττάρου στην απώλεια των "αντιγράφων", του εν λόγω βιομορίου και ε) η σημασία του κυττάρου για τη δομή ή λειτουργία του ακτινοβοληθέντος ιστού ή οργάνου. Ανάμεσα στα διάφορα κυτταρικά βιομόρια, το DNA είναι από τα σημαντικότερα. Ωστόσο, υπάρχουν μόρια στο κύτταρο τα οποία μπορεί να διαδραματίζουν λιγότερο σημαντικό ρόλο στην επιβίωση αλλά να βρίσκονται σε μεγαλύτερη

αφθονία από ότι το DNA με αποτέλεσμα να αντιμετωπίζουν μεγαλύτερη πιθανότητα επιδράσης της ακτινοβολίας και εν τέλει ιονισμού. Παράδειγμα αποτελεί το νερό το οποίο είναι το αφθονότερο μόριο στο κύτταρο, καταλαμβάνοντας το 80%-90% του κυττάρου. Από τη ραδιόλυση του νερού σχηματίζονται δραστικές ελεύθερες ρίζες οι οποίες είναι ικανές να προκαλέσουν βλάβη στο DNA, οδηγώντας σε άμεση απορρόφηση της ενέργειας με μετανάστευση στο DNA και έμμεση καταστροφή του. Ο παραπάνω μηχανισμός αναφέρεται ως ‘‘η έμμεση δράση της ακτινοβολίας’’ και ο οποίος διαχωρίζεται από την ‘‘άμεση δράση της ακτινοβολίας’’ (Εικόνα 1.10). Συμπερασματικά, η επίδραση της ακτινοβολίας σε κυτταρικό επίπεδο μπορεί να είναι είτε άμεση είτε έμμεση. Στην περίπτωση της άμεσης επίδρασης, η ακτινοβολία επιδρά άμεσα με το DNA προκαλώντας βλάβη ενώ στην έμμεση επίδραση, παράγονται ελεύθερες ρίζες από τον ιονισμό ή τη διέγερση του υδατικού συστατικού των κυττάρων. Οι διπλές θραύσεις που πιθανότατα μπορεί να δημιουργηθούν στο DNA είναι ανεπανόρθωτες βλάβες και οδηγούν σε θάνατο τόσο τα καρκινικά κύτταρα όσο και τα φυσιολογικά κύτταρα (Gunderson and Tepper, 2007).

Αντίδραση άμεσης επίδρασης στο DNA:



Αντίδραση έμμεσης επίδρασης στο DNA:



Εικόνα 1.10. Αντιδράσεις άμεσης και έμμεσης επίδρασης στο DNA (Gunderson and Tepper, 2007).

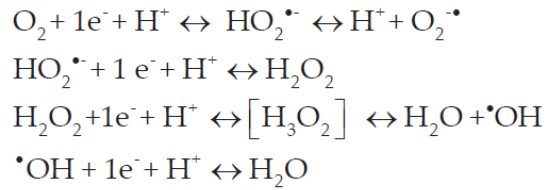
1.2.1.2. Σχηματισμός δραστικών ενώσεων οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS)

Όλοι οι αερόβιοι πολυκύτταροι ζωντανοί οργανισμοί απαιτούν μοριακό οξυγόνο (O_2) αντί του μονήρους οξυγόνου για να επιβιώσουν. Το μονήρες οξυγόνο λόγω της ηλεκτρονιακής του δομής χρησιμοποιείται για το σχηματισμό ριζών. Οι δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS) είναι μικρά μόρια προερχόμενα από μόρια οξυγόνου συμπεριλαμβανομένων των ελεύθερων ριζών οξυγόνου όπως είναι το ανιόν σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), ανιόν του υδροξυλίου ($\cdot OH$), υπεροξυλίου (RO_2^{\cdot}), αλκοξυλίου (RO^{\cdot}). Στην ίδια κατηγορία ανήκει και το υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$), όζον (O_3), απλό οξυγόνο (O_2), και υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) όπου αυτές οι ενώσεις δεν είναι ρίζες. Οι συγκεκριμένες ενώσεις που δεν ανήκουν στην κατηγορία των ελεύθερων ριζών, είναι είτε οξειδωτικοί παράγοντες ή μετατρέπονται εύκολα σε ρίζες. Οι οξειδωτικές ενώσεις, των οποίων το κεντρικό στοιχείο είναι το άζωτο, είναι το μονοξείδιο του αζώτου (NO^{\cdot}), υπεροξυνιτρίτης ($ONOO^{\cdot}$), διοξείδιο του αζώτου (NO_2) και ονομάζονται δραστικές ενώσεις αζώτου (RNS) (Bedard and Krause, 2007; Klebanoff, 1980).

Όσον αφορά τις ελεύθερες ρίζες είναι μια ομάδα δραστικών χημικών μορίων με ένα ή περισσότερα μη συζευγμένα ηλεκτρόνια, οι οποίες αποδίδουν μια σειρά χημικών αντιδράσεων περιλαμβάνοντας περισσότερα από ένα βήματα, όπου σε κάθε ένα σχηματίζεται μια ελεύθερη ρίζα η οποία θα πυροδοτήσει το επόμενο βήμα. Καθεμία από τις αντιδράσεις των ελεύθερων ριζών αποτελούνται από τρεις φάσεις την έναρξη, τη διάδοση και λήξη της χημικής αντίδρασης (Agarwal *et al.*, 2006; Perrone *et al.*, 2010).

1.2.1.2.1. Οι δραστικές ενώσεις οξυγόνου (ROS)

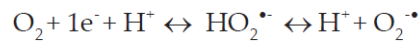
Η κατηγορία ελεύθερων ριζών οξυγόνου είναι από τις σημαντικότερες κατηγορίες αυτού του είδους ενώσεων. Οι δραστικές ενώσεις οξυγόνου είναι γνωστές ως ROS δεδομένου ότι το κεντρικό στοιχείο είναι το οξυγόνο. Από όλες τις δραστικές ενώσεις οι τρεις πιο σημαντικές είναι το α) το ανιόν του σουπεροξειδίου, β) υπεροξείδιο του υδρογόνου και γ) το ανιόν του υδροξυλίου. Όπως θα διαπιστωθεί και παρακάτω, σύμφωνα με τις αντιδράσεις, για το σχηματισμό των παραπάνω ενδιάμεσων, χάνεται ένα οξυγόνο (Buonocore *et al.*, 2010; Halliwell, 2007) (Εικόνα 1.11).



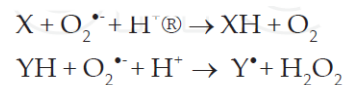
Εικόνα 1.11. Διαδοχικές χημικές αντιδράσεις σχηματισμού των ενδιάμεσων προϊόντων $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 και $\bullet\text{OH}$.

1.2.1.2.1.1. Το ανιόν του σουπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\bullet-}$)

Το ανιόν του σουπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\bullet-}$), είναι η πιο κοινή ROS ένωση η οποία παράγεται στα μιτοχόνδρια, στο καρδιαγγειακό σύστημα καθώς και σε άλλα συστήματα. Η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων είναι υπεύθυνη ως επί το πλείστον για την παραγωγή του σουπεροξειδίου, διαμέσου αναγωγής του οξυγόνου (Salman and Ashraf, 2013; Drew and Leeuwenburgh, 2002; Bolisetty and Jaimes, 2013). Η χημική αντίδραση που λαμβάνει περιγράφεται αμέσως παρακάτω:



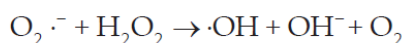
Επιπλέον, είναι πιθανόν να συμβούν χημικές αντιδράσεις όπου το αντιδρών είναι το ανιόν του σουπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\bullet-}$) και παράγεται κάποια ρίζα ή υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) όπως περιγράφεται στις παρακάτω αντιδράσεις:



1.2.1.2.1.2. Το υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2)

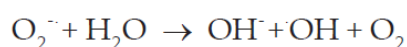
Το υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) είναι ένα ουδέτερο μόριο, το λιγότερο δραστικό από όλες τις δραστικές ROS και είναι σταθερό σε φυσιολογικό pH και θερμοκρασία, απουσία μεταλλικών ιόντων. Πρόκειται για διάχυτο μόριο το οποίο καταφέρνει να διαπερνά την πλασματική μεμβράνη αρκετά εύκολα. Το H_2O_2 σχηματίζεται μέσα από ένα μεγάλο αριθμό αντιδράσεων αποδίδοντας δραστικές ενώσεις. Το H_2O_2 παράγεται μέσω της δισμουτάσης του σουπεροξειδίου, με μια αντίδραση διάσπασης. Η οξειδάση του αμινοξέος και η οξειδάση της

ξανθίνης επίσης παράγουν H₂O₂ από το ανιόν του σουπεροξειδίου. Υπό την παρουσία μεταλλικών ιόντων και ανιόντος σουπεροξειδίου, το H₂O₂ παράγει την υδροξυλική ρίζα (Salman and Ashraf, 2013; Lee *et al.*, 2004 ; Barbusiński, 2009). Η χημική αντίδραση που λαμβάνει χώρα περιγράφεται παρακάτω:



1.2.1.2.1.3. Το ανιόν του υδροξυλίου (•OH) και η βιολογική του επίδραση στο DNA

Το ανιόν του υδροξυλίου είναι από τις πιο δραστικές και επικίνδυνες ενώσεις, η οποία σχηματίζεται από το ανιόν του σουπεροξειδίου (O₂^{•-}) και υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂), παρουσία μεταλλικών ιόντων και *in vivo* εμφανίζει σύντομο χρόνο ημιζωής, γύρω στα 10⁻⁹s . Συνεπώς, με το σχηματισμό της υδροξυλικής ρίζας (•OH) *in vivo*, ακολουθεί ο σχηματισμός του υδροξυλίου (OH) Οι περισσότερες υδροξυλικές ρίζες παράγονται σύμφωνα με την αντίδραση Haber- Weiss (Buonocore *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2004; Liochev and Fridovich, 2002). Η χημική αντίδραση που λαμβάνει χώρα περιγράφεται αμέσως παρακάτω:

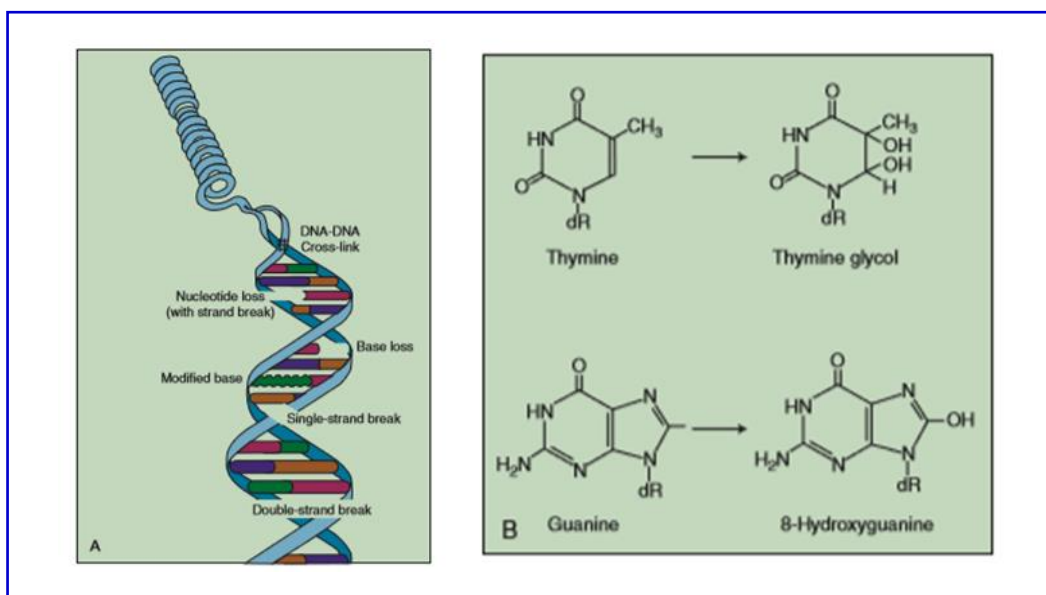


Η πιο δραστική και επιβλαβής ρίζα που παράγεται από την ραδιόλυση του νερού είναι η υδροξυλική ρίζα (•OH) ενώ συγχρόνως παράγονται και άλλες ελεύθερες ρίζες σε διαφορετικά ποσοστά. Έχει αποδειχθεί ότι ένα κύτταρο πεθαίνει από την έμμεση αντίδραση της ιονίζουσας ακτινοβολίας σε ποσοστό 70% από τη συνολική βλάβη που έχει προκληθεί στο DNA από τη χαμηλή LET ακτινοβολία (Gunderson and Tepper, 2007).

Ωστόσο, το ερώτημα που τίθεται είναι πώς οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να προκαλέσουν τόσες πολλές βλάβες στο ακτινοβολημένο DNA. Το παραπάνω φαινόμενο οφείλεται στα μη συζευγμένα ηλεκτρόνια τα οποία εμπεριέχονται στις ελεύθερες ρίζες. Όπως είναι γνωστό, οι ελεύθερες ρίζες είναι πολύ δραστικά χημικά μόρια τα οποία φέρουν εις πέρας έναν αριθμό αντιδράσεων με απώτερο σκοπό να αποκτήσουν νέα ηλεκτρόνια ή να απαλλαγούν από τα μη συζευγμένα. Οι αντιδράσεις αυτές θεωρούνται αρκετά αργές συγκριτικά με την ταχύτητα με την οποία έρχονται εις πέρας τα αρχικά στάδια ιοντισμού ενώ συγχρόνως είναι πιο γρήγορες από τις φυσιολογικές ενζυμικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα σε ένα τυπικό κύτταρο θηλαστικού οργανισμού. Οι αντιδράσεις ελευθέρων ριζών ολοκληρώνονται σε λιγότερο από ένα δευτερόλεπτο μετά την ακτινοβολήση (Gunderson and Tepper, 2007).

Η υδροξυλική ρίζα (•OH) μπορεί να αφαιρέσει άτομα υδρογόνου από άλλα μόρια

καθώς και να προσθέσει άτομα άνθρακα-άνθρακα ή επιπλέον διπλούς δεσμούς. Μακρομόρια με περίπλοκη δομή μετατρέπονται σε ελεύθερες ρίζες και μέσα από μια σειρά μετασχηματισμών αποβάλλουν μη συζευγμένα ηλεκτρόνια τα οποία μπορούν να διασπάσουν χημικούς δεσμούς. Στην περίπτωση του DNA, πολλοί από τους διασπώμενους χημικούς δεσμούς οδηγούν σε απώλεια μιας βάσης, ενός ολόκληρου νουκλεοτιδίου ή στη διάσπαση του φωσφοσακχαρικού σκελετού, στη μία ή και τις δύο αλυσίδες του DNA. Σε ορισμένες περιπτώσεις όπου διασπώνται χημικοί δεσμοί, υπάρχει η δυνατότητα αναδιάταξης, ανταλλαγής ή επανασύνδεσης με μη ορθόδοξους τρόπους με αποτέλεσμα να προκύπτουν τροποποιημένες βάσεις του DNA λόγω προσθήκης ενός ή περισσότερων υδροξυλικών ομάδων (πχ η βάση της θυμίνης μετατρέπεται σε γλυκόλη της θυμίνης), διμερισμένες πυριμιδίνες και διασταύρωση (crosslinks) του DNA είτε τον εαυτό του ή με πρωτεϊνικά στοιχεία (Εικόνα 1.12). Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, επειδή τα συμβάντα εναπόθεσης ενέργειας πραγματοποιούνται με τυχαίο και διακριτό τρόπο, οι ελεύθερες ρίζες που προκύπτουν, συγκεντρώνονται και προκαλούν ποικίλες χημικές αντιδράσεις, καταλήγοντας σε διάφορες βλάβες σε μια συγκεκριμένη περιοχή. Το παραπάνω φαινόμενο αναφέρεται και ως η υπόθεση της «πολλαπλής ανίχνευσης» (Gunderson and Tepper, 2007).



Εικόνα 1.12. Διατάραξη της ακεραιότητας της διπλής έλικας του DNA από ROS ενώσεις. Η εικόνα 1.12A) αναπαριστά όλες τις πιθανές βλάβες που μπορεί να υποστεί η διπλή έλικα του DNA εξαιτίας της αλληλοεπίδρασης με $\bullet\text{OH}$ και η εικόνα 1.12 B) τις τροποποιήσεις σε συγκεκριμένες βάσεις όπως είναι η θυμίνη και γουανίνη (Gunderson and Tepper, 2007).

1.2.1.2.2. Οι δραστικές ενώσεις αζώτου (RNS)

Το μονοξειδίο του αζώτου (NO) καθώς και άλλα προϊόντα, όπως είναι το νιτρικό ανιόν (NO_3^-), το νιτρώδες ανιόν (NO_2^-), ο υπεροξυνιτρίτης (ONOO^-) και η 3-νιτροτυροσίνη είναι γνωστές ως δραστικές ενώσεις αζώτου (RNS). Οι RNS ενώσεις εμπλέκονται άμεσα στην κυτταρική σηματοδότηση, αγγειοδιαστολή και ανοσοαπόκριση (Drew and Leeuwenburgh, 2002).

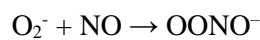
1.2.1.2.2.1. Το μονοξειδίο του αζώτου (NO)

Το μονοξειδίο του αζώτου (NO) παράγεται από τη διάσπαση της αργινίνης σε κιτρουλλίνη, υπό τη δράση μιας οικογένειας ενζύμων των οποίων η δράση εξαρτάται από NADPH και είναι γνωστή ως η συνθάση του νιτρικού οξέος (Drew and Leeuwenburgh, 2002, Bolisetty and Jaimes, 2013). Το μονοξειδίο του αζώτου (NO) είναι ένα μη φορτισμένο λιπόφιλο μόριο, με μη συζευγμένο ηλεκτρόνιο το οποίο ενισχύει τη αλληλοεπίδρασή του μονοξειδίου του αζώτου (NO) με άλλα μόρια όπως είναι το οξυγόνο, ρίζες σουπεροξειδίου και γλουταθείου. Αν και το μονοξειδίο του αζώτου (NO) δεν είναι δραστική ρίζα, μπορεί να σχηματίσει ενδιάμεσες δραστικές ενώσεις, οι οποίες επηρεάζουν τη λειτουργικότητα πρωτεϊνών και κατά επέκταση ολόκληρων οργανισμών. Οι ενδιάμεσες δραστικές ενώσεις οι οποίες προκύπτουν από το μονοξειδίο του αζώτου (NO), πυροδοτούν τη νιτρώδη βλάβη σε διάφορα βιομόρια (Drew and Leeuwenburgh, 2002). Συνεπώς, το μονοξειδίο του αζώτου (NO) μπορεί να δράσει ως οξειδωτικός ή μη οξειδωτικός παράγοντας. Επιπλέον, το μονοξειδίο του αζώτου (NO) λειτουργεί ως νευροδιαβιβαστής, ρυθμίζει την πίεση του αίματος και παράγει οξειδωτικές δραστικές ενώσεις σε παθολογικές καταστάσεις (Salman and Ashraf, 2013).

Το μονοξειδίο του αζώτου (NO) εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια όπου η παραγωγή των ROS και RNS ενώσεων αυξάνεται, οι οποίες με τη σειρά τους μεταβάλλουν την δραστηριότητα διάφορων αντιδράσεων όπως είναι η μιτοχονδριακή βιογένεση, η αναπνοή και το οξειδωτικό στρες (Bolisetty and Jaimes, 2013). Συγκριτικά με τις υδροξυλικές ρίζες ($\bullet\text{OH}$), το μονοξειδίο του αζώτου (NO) είναι πιο σταθερό και διάχυτο μόριο. Επιπλέον χαρακτηριστικά της ένωσης αυτής είναι η ικανότητα άμεσης τροποποίησης του DNA και απενεργοποίησης ενζύμων επιδιόρθωσης. Επιπροσθέτως, το μονοξειδίο του αζώτου (NO) είναι ένα πολύ δραστικό σηματοδοτικό μόριο το οποίο ρυθμίζει κυτταρικές λειτουργίες ενώ το νιτρώδες στρες που προκαλεί διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σχετιζόμενη με φλεγμονή καρκινογένεση, ενεργοποιώντας τους κατάλληλους οξειδοαναγωγικούς μεταγραφικούς παράγοντες (Salman and Ashraf, 2013).

1.2.1.2.2.2. Ο υπεροξυνιτρίτης (ONOO⁻)

Το μονοξειδίο του αζώτου (NO) αντιδρά με το O₂⁻ παράγοντας τον υπεροξυνιτρίτη (ONOO⁻) ο οποίος μέσω μίας αυθόρμητης αντίδρασης αποσυντίθεται, παράγοντας τις ρίζες του διοξειδίου του αζώτου (NO₂[•]) και υδροξυλίου (OH[•]) (Barbusiński, 2009; Beckman *et al.*, 1990; Radi *et al.*, 1993). Σε φυσιολογικό pH, ο υπεροξυνιτρίτης (ONOO⁻) λειτουργεί ως ισχυρότερος οξειδωτικός παράγοντας, συγκρινόμενος με O₂⁻ ή NO, οξειδώνοντας λιπίδια, πρωτεΐνες, αζωτούχα αμινοξέα και DNA (Crow and Beckman, 1995 ; Pryor and Squadrito, 1995).



Ο υπεροξυνιτρίτης (ONOO⁻) ανήκει στην κατηγορία των κυτταροτοξικών παραγόντων, προκαλώντας βλάβες σε ιστούς και οξειδώνοντας χαμηλής περιεκτικότητας λιποπρωτεΐνες. Η σημασία του υπεροξυνιτρίτη (ONOO⁻) ως βιολογικός οξειδωτικός παράγοντας βασίζεται στην ικανότητα διάχυσής του διαμέσου των μεμβρανών. Επιπλέον, ο υπεροξυνιτρίτης (ONOO⁻) μπορεί να προκαλέσει βλάβες σε φλεγμένοντες ιστούς, εμπλέκεται σε νευροεκφυλιστικές διαταραχές και ασθένειες νεφρών, οξειδώνει άμεσα πρωτεΐνες και νουκλεοτιδικές βάσεις ενώ προκαλεί τροποποιήσεις δρώντας ως "υδροξυλική ρίζα" (OH[•]). Τέλος, από τις αντιδράσεις υπεροξυνιτρίτη (ONOO⁻) με αμινοξέα, σχηματίζεται η νιτροτυροσίνη η οποία εντοπίζεται κυρίως σε ιστούς που σχετίζονται με το γήρας (Halliwell, 2007; Lee *et al.*, 2004). Τέλος, θεωρείται πιθανός βιοδείκτης σε καρκίνους που σχετίζονται με φλεγμονή ενώ προϊόν αντίδρασης μεταξύ μονοξειδίου του αζώτου (NO) και ανιόντος σουπεροξειδίου (O₂^{•-}) προκαλεί βλάβες στο DNA παράγοντας τη 8-νιτρογουανίνη (Salman and Ashraf, 2013).

1.2.1.2.2.3. Το ανιόν του διοξειδίου του αζώτου (NO₂[•])

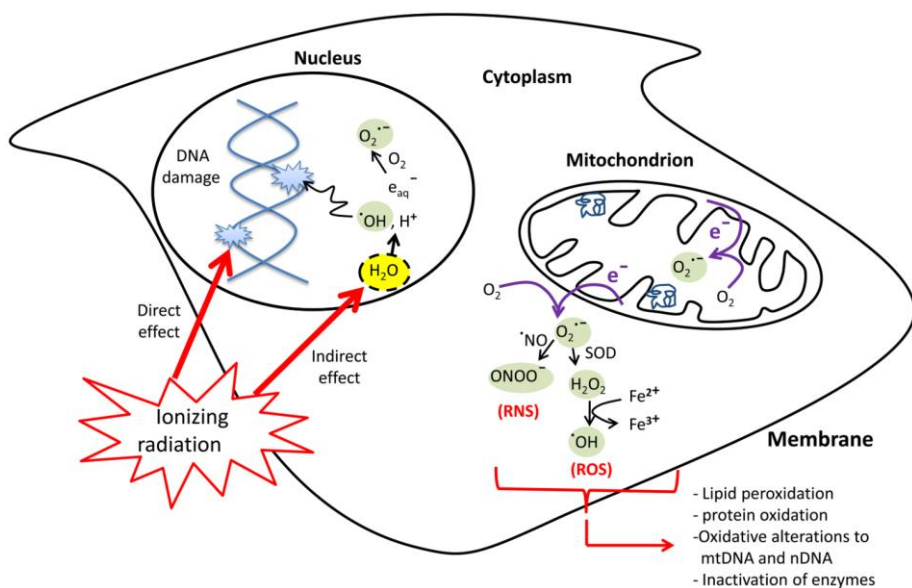
Η ρίζα του διοξειδίου του αζώτου (NO₂[•]) σχηματίζεται από την αντίδραση της ρίζας υπεροξυλίου (RO₂[•]) με μονοξειδίο του αζώτου (NO), προκαλεί την υπεροξειδωση λιπιδίων με αποτέλεσμα την παραγωγή ελεύθερων ριζών ενώ οξειδώνει και το ασκορβικό οξύ (Lee *et al.*, 2004). Επιπλέον, η ρίζα του διοξειδίου του αζώτου (NO₂[•]) είναι ένα βασικό προϊόν αποσύνθεσης μονοξειδίου του αζώτου (NO), με ισχυρή οξειδωτική δράση, οξειδώνοντας την τυροσίνη σε 3-νιτροτυροσίνη. Επιπλέον, λειτουργεί ως υπόστρωμα για τα ένζυμα της υπεροξειδάσης και λακτουπεροξειδάσης ενώ από την αντίδραση οξείδωσης του ανιόντος του διοξειδίου του αζώτου (NO₂[•]) σχηματίζεται μονοξειδίο του αζώτου (NO). Συνεπώς, προκύπτει

ένα επιπλέον μονοπάτι, κυτταροτοξικότητας ή άμυνας ξενιστή, σχετιζόμενη με την αυξημένη παραγωγή NO καθώς και ενός εναλλακτικού μονοπατιού σύνθεσης 3-νιτροτυροσίνης (Drew and Leeuwenburgh, 2002).

1.2.1.3. Προϊόντα βλαβών DNA: η 8-υδροξυ-2-γουανοσίνη και η 8-νιτρογουανίνη

Οι δραστικές ενώσεις οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS) εμπλέκονται στην οξειδωτική βλάβη και παράγονται είτε από φλεγμονώδη κύτταρα είτε κατά την επίδραση καρκινογόνων χημικών ενώσεων ή στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια Shibutani *et al.*, 19991; Bruner *et al.*, 2000; Kawanishi and Hiraku, 2006). Στην περίπτωση χρόνιας φλεγμονής, οι δραστικές ενώσεις οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS), προερχόμενες από επιθηλιακά και φλεγμονώδη κύτταρα, προκαλούν βλάβες σε διάφορα κυτταρικά στοιχεία όπως είναι τα νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες και λιπίδια. Ακόμη, οι ROS και RNS ενώσεις συμμετέχουν στην καρκινογένεση μέσω της οξειδωτικής και νιτρώδους βλάβης στο DNA (Hussain *et al.*, 2003 ; Kawanishi and Hiraku, 2006; Hiraku , 2010; Kawanishi *et al.*, 2006) (Εικόνα 1.13.).

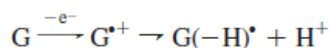
Η δισμουτάση του σουπεροξειδίου είναι το ένζυμο που καταλύει τις ενώσεις ROS σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂), παράγοντας ρίζες υδροξυλίου (OH·) μέσω της αντίδρασης Fenton. Εν συνεχεία, οι ελεύθερες ρίζες προσβάλλουν τη νουκλεοτιδική βάση της γουανίνης στον C-8, σχηματίζοντας κατά επέκταση την 8-υδροξυ-2-δεοξυγουανοσίνη (8-OHdG) (Li *et al.*, 2011). Από την κατηγορία των δραστικών ενώσεων RNS, ο υπεροξυνιτρίτης (ONOO-) αντιδρά συχνά με τη γουανίνη στον C-8 , σχηματίζοντας τη 8-νιτρογουανίνη (8-NG). Οι 8-υδροξυ-2-δεοξυγουανοσίνη και 8-νιτρογουανίνη προκύπτουν από τις αντιδράσεις των ROS και RNS ενώσεων με τη γουανίνη αντιστοίχως, ενώ έχει διαπιστωθεί πως προκαλούν παθοφυσιολογικές καταστάσεις λόγω των μεταλλαξιογόνων ιδιοτήτων τους, εισάγοντας γκανσικλοβίρη (G) μεταπίπτοντας σε θυμίνη (T). Παρόλα αυτά, οι βλάβες του DNA μπορούν να επιδιορθωθούν μέσω του μηχανισμού εκτομής νουκλεοτιδίων με τις κατεστραμμένες βάσεις γουανίνης ((8-OHdG και 8-NG) να μεταφέρονται έξω από τα κύτταρα και εν τέλει να απεκκρίνονται στα ούρα χωρίς περαιτέρω μεταβολισμό. (Li *et al.*, 2011).



Εικόνα 1.13. Άμεσες και έμμεσες κυτταρικές συνέπειες της ιονίζουσας ακτινοβολίας σε διάφορα μακρομόρια συμπεριλαμβανομένου και του DNA. Η απορρόφηση της ιονίζουσας ακτινοβολίας από ζωντανά κύτταρα μπορεί να επιδράσει είτε άμεσα διαταράσσοντας τις δομές των ατόμων προκαλώντας κατά επέκταση χημικές και βιολογικές αλλαγές είτε έμμεσα με τη ραδιόλυση του νερού παράγοντας δραστικές χημικές ενώσεις (ROS και RNS) κατόπιν πυροδότησης της δράσης των ενζύμων της οξειδάσης και της συνθάσης μονοξειδίου του αζώτου (Azzam *et al.*, 2012).

1.2.1.3.1. Η γουανίνη "στόχος" των δραστικών ενώσεων ROS και RNS

Οι επιβλαβείς επιπτώσεις της ακτινοβολίας περιλαμβάνουν βλάβες στο DNA οι οποίες με τη σειρά τους οδηγούν σε γήρανση, καρκίνο και νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Βλάβες στο DNA προκύπτουν εξαιτίας της αντίδρασής του με: α)ελεύθερες ρίζες, όπως είναι οι δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS), β)ακτινοβολία υψηλής ενέργειας, γ)UV ακτινοβολία, δ)διάφορες χημικές ενώσεις καθώς και ε)κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων ή πυρήνων. Από την αλληλεπίδραση του DNA με την υψηλής ενέργειας ακτινοβολία οι νουκλεοτιδικές βάσεις ιονίζονται, με την επικρατέστερη την γουανίνη, λόγω του χαμηλότερου δυναμικού ιονισμού που παρουσιάζει συγκριτικά με τις υπόλοιπες νουκλεοτιδικές βάσεις. Κατά την αντίδραση ιονισμού της γουανίνης, σχηματίζεται γρήγορα το γουανυλικό κατιόν το οποίο κατόπιν αποπρωτονιώνεται, σχηματίζοντας τη γουανυλική ρίζα [G(-H)•] με σταθερά ταχύτητας 107 s^{-1} σε pH 7 (Agnihotri and Mishra, 2010). Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι η παρακάτω:



Αποπρωτονίωση των νουκλεοτιδικών βάσεων του DNA συμβαίνει κυρίως στις νιτρώδεις ομάδες, όπου καθεμία από αυτές αποτελούν θέσεις σχηματισμού γλυκοσιδικών δεσμών στο DNA. Διαφορετικά ταυτομερή της γουανυλικής ρίζας G(-H)[•] προκύπτουν κατά τη μεταφορά πρωτονίων από διαφορετικά νιτρώδη κέντρα (π.χ. N1, N2, and N9) του γουανυλικού κατιόντος G^{•+}, τα οποία φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη βλάβη του DNA. Οι δραστικές αυτές ενώσεις έχουν μακρά διάρκεια ζωής ενώ ο χρόνος ζωής που έχει προκύψει από μελέτες φωτόλυσης με λέιζερ κυμαίνονται από 0.2 έως 0.6 sec σε διαλύματα κορεσμένα με οξυγόνο. Οι συγκεκριμένες δραστικές ενώσεις είναι οι πρωταρχικοί στόχοι των δραστικών ενώσεων ROS και RNOS (Agnihotri and Mishra, 2010).

1.2.1.3.2. Η παραγωγή των ROS ενώσεων κατά την έκθεση σε ακτινοβολία

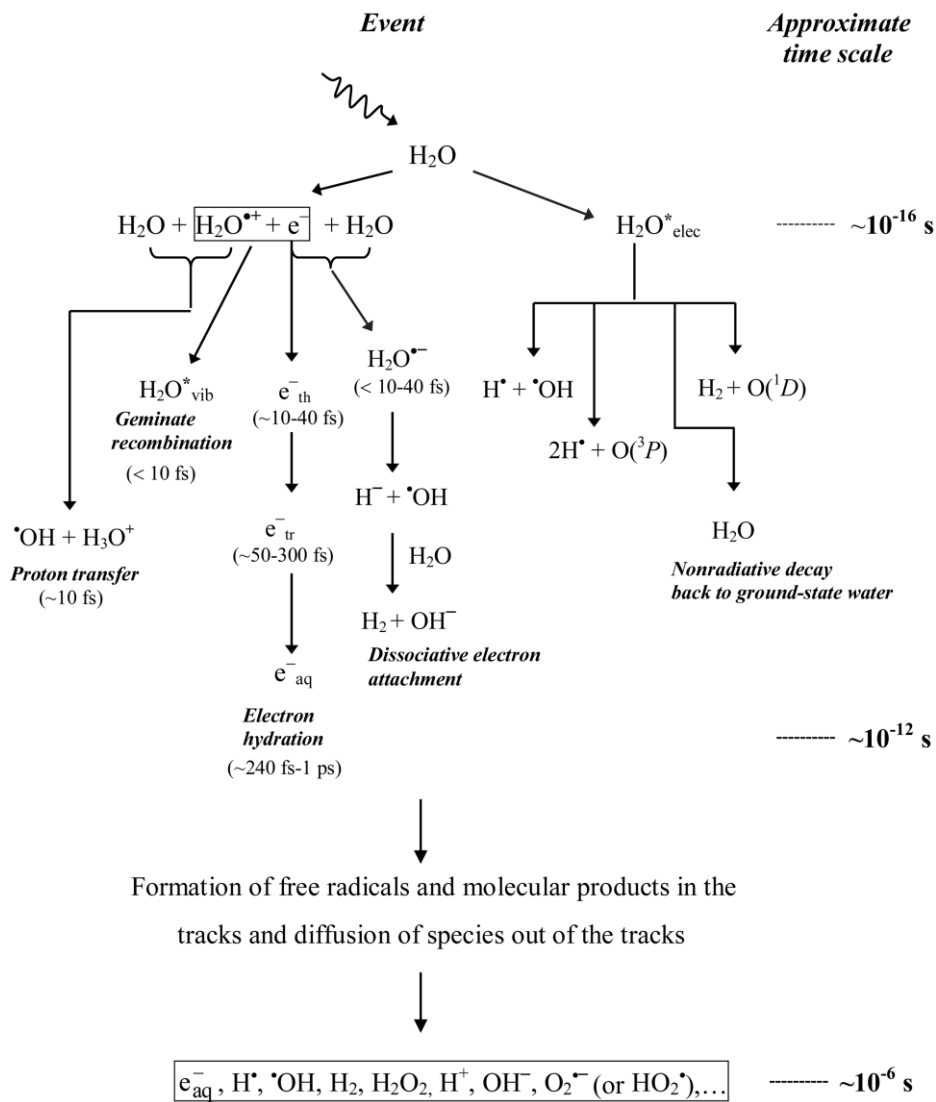
Το νερό (H₂O) είναι από τα βασικότερα συστατικά ενός κυττάρου, καταλαμβάνοντας το 80%. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, κατόπιν επιδράσεως με ακτινοβολία, το νερό υφίσταται ραδιόλυση, ένα φαινόμενο το οποίο παρέχει τις κατάλληλες πληροφορίες για πιθανές ακτινοβιολογικές επιδράσεις της ακτινοβολίας. Η απορρόφηση της ακτινοβολίας από το νερό μπορεί να οδηγήσει τόσο σε διέγερση όσο και ιονισμό, καταλήγοντας με αυτόν τον τρόπο στην παραγωγή ελευθέρων ριζών οι οποίες με τη σειρά τους προσβάλλουν κρίσιμα για έναν οργανισμό βιομόρια (Platzman, 1958).

Η απορρόφηση φωτονίων υψηλής ενέργειας ή η δίοδος των φορτισμένων σωματιδίων συνοδεύεται από τέσσερα διαδοχικά και σχετικά οριοθετημένα στάδια. Στο πρώτο στάδιο ή αλλιώς "φυσικό" στάδιο, η προσπίπτουσα ακτινοβολία οδηγεί σε εναπόθεση της ενέργειας και παραγωγή δευτερευόντων ηλεκτρονίων. Οι ενώσεις οι οποίες παράγονται είναι ιδιαίτερα ασταθείς και η αναδιοργάνωσή τους λαμβάνει μέρος στο δεύτερο στάδιο, γνωστό και ως "φυσικοχημικό" στάδιο. Μέσω των διαδικασιών αυτών, παράγονται ελεύθερες ρίζες καθώς και μοριακά προϊόντα ραδιόλυσης τα οποία κατανέμονται με μη ομοιογενή τρόπο σε μια δομή τροχιάς. Όσον αφορά τα δευτερεύοντα ηλεκτρόνια, μειώνουν τις ενέργειες υπο-διέγερσης ενώ μόλις υποστούν θερμική επεξεργασία, παγιδεύονται (e-tr) και ενυδατώνονται (e-aq). Στο τρίτο στάδιο, οι διάφορες δραστικές ενώσεις διαχέονται με αποτέλεσμα είτε να αντιδρά το ένα μόριο με το άλλο είτε με τον περιβάλλοντα χώρο μέχρις ότου ολοκληρωθούν οι αντιδράσεις εντός τη τροχιακής δομής. Το τελευταίο στάδιο σε ένα ζωντανό οργανισμό είναι το βιολογικό στάδιο όπου τα κύτταρα αποκρίνονται στην προκληθείσα βλάβη από προϊόντα τα οποία έχουν σχηματιστεί σε προηγούμενα στάδια. Σε αυτό το στάδιο, η μακροχρόνια έκθεση στην

ακτινοβολία μπορεί να επηρεάσει τις βιολογικές αποκρίσεις (Ferradini and Jay-Gerin, 1999; Spinks and Wodds, 1990).

Από τη ραδιόλυση του καθαρού, απαερωμένου H_2O παράγονται $\bullet OH$, $H\bullet$, H_2 , και H_2O_2 . Παρουσία οξυγόνου, τα ενυδατωμένα ηλεκτρόνια (e_{-aq}) και οι ρίζες υδρογόνου ($H\bullet$) μετατρέπονται γρήγορα σε ρίζες σουπεροξειδίου/υπεροδροξυλίου ($O_2^{\bullet-}/HO_2^{\bullet}$) όπου η ρίζα σουπεροξειδίου $O_2^{\bullet-}$ διατηρείται σε ένα διάλυμα με την ισορροπία της αντίδρασης με το συζευγμένο οξύ να εξαρτάται από το pH ($pK_a = 4.8$). Επομένως, σε ένα αερόβιο κυτταρικό περιβάλλον με φυσιολογικό pH, οι κύριες δραστικές ενώσεις που βρίσκονται σε ομοιογένεια είναι οι $O_2^{\bullet-}$, $\bullet OH$ και H_2O_2 ενώ το διατομικό υδρογόνο (H_2) διαδραματίζει περιορισμένο ρόλο στη ραδιόλυση υδατικών διαλυμάτων (Bielski *et al.*, 1985) (Εικόνα 1.14.).

Όσον αφορά τις οργανικές ρίζες ($R\bullet$), σχηματίζονται σε βιολογικά συστήματα, συνήθως μέσω αντιδράσεων αφαίρεσης ατόμων υδρογόνου (ξεκινώντας από $\bullet OH$ υδροξυλικές ρίζες). Οι ανθρακικές ρίζες οι οποίες έχουν ως κεντρικό στοιχείο τον άνθρακα (C) αντιδρούν γρήγορα με το O_2 σχηματίζοντας περοξυλικές ρίζες ($RO_2\bullet$) και δρουν ως δραστικότεροι οξειδωτικοί παράγοντες συγκριτικά με τις πρόδρομες τους ρίζες. Οι περοξυλικές ρίζες ($RO_2\bullet$) αφαιρούν ρίζες υδρογόνου ($H\bullet$) από άλλα μόρια, σχηματίζοντας υδροξυπεροξείδιο ($ROOH$), μια αντίδραση η οποία συναντάται συχνά στην υπεροξείδωση λιπιδίων (Alfassi, 1997).



Εικόνα 1.14. Διαγραμματική απεικόνιση παραγωγής των ROS ενώσεων. Συγκεκριμένα, συμπεριλαμβάνεται η χρονική σειρά των γεγονότων, κατόπιν της ραδιόλυσης που υφίσταται το H_2O λόγω της χαμηλής γραμμικής ενέργειας μεταφοράς της ακτινοβολίας (Azzam *et al.*, 2012).

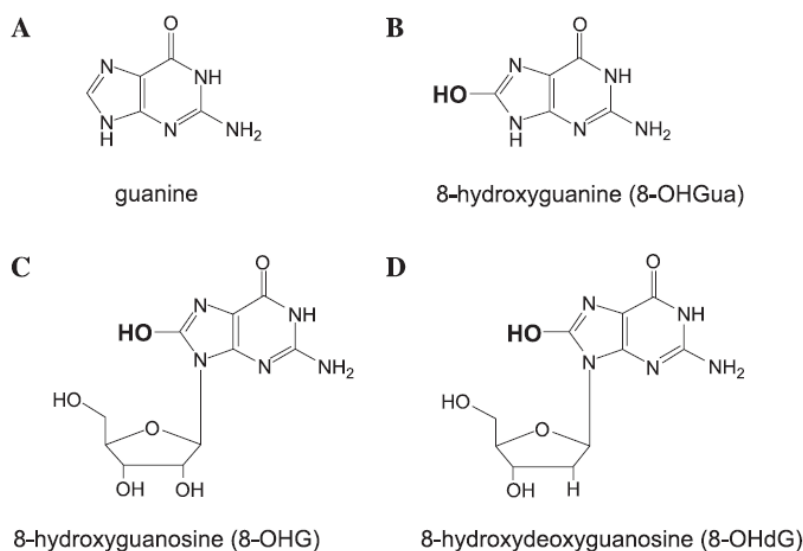
1.2.1.3.3. Η 8-υδροξυ-2-δεοξυγουανοσίνη (8-OHdG)

1.2.1.3.3.1. Η 8-υδροξυ-2-δεοξυγουανοσίνη (8-OHdG) και ROS ενώσεις

Οξειδωτική βλάβη στο DNA μπορεί να προκαλέσουν και εξωγενείς πηγές δραστικών ενώσεων οξυγόνου (ROS) όπως είναι το κάπνισμα, η UV και ιονίζουσα ακτινοβολία (Loft *et al.*, 1992). Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η κυτταροτοξική δράση της ακτινοθεραπείας μπορεί να επάγει τη σύνθεση δραστικών ενώσεων οξυγόνου (ROS) οι οποίες οδηγούν σε οξειδωτικό στρες (Pour Khavari *et al.*, 2018). Πιο συγκεκριμένα, υπό φυσιολογικές συνθήκες, υπάρχει μια ισορροπία μεταξύ ενδογενών οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών. Ωστόσο, σε κατάσταση αυξημένης παραγωγής οξειδωτικών ή μείωσης αντιοξειδωτικών, η ισορροπία αυτή διαταράσσεται προκαλώντας οξειδωτικό στρες (Halliwell and Gutteridge, 1999). Τα αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού στρες επεξηγούν τα συχνά χαρακτηριστικά που φέρουν τα καρκινικά κύτταρα όπως είναι η γενωμική αστάθεια, ο αυξημένος ρυθμός κυτταρικού πολλαπλασιασμού, η χημειοανθεκτικότητα και η μετάσταση. Η παρουσία των μη συζευγμένων ηλεκτρονίων καθιστά τις ROS ενώσεις ως ιδιαίτερα ασταθείς και δραστικές με άλλα μόρια όπως είναι για παράδειγμα λιπίδια, πρωτεΐνες, RNA, DNA, dNTP και NTP, τροποποιώντας τη δομές και τη λειτουργία των εν λόγω βιομορίων (Pour Khavari *et al.*, 2018). Σε ζωντανά κύτταρα, οι πιο σημαντικές δραστικές ενώσεις οξυγόνου (ROS) είναι το ανιόν του σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$), το υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) και η υδροξυλική ρίζα (HO^{\bullet}) όπου η τελευταία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο δεδομένου ότι οι προκληθείσες από την υδροξυλική ρίζα (HO^{\bullet}) βλάβες ισοδυναμούν με τα 2/3 των βλαβών του DNA που προκύπτουν από τις ακτίνες X (Gao *et al.*, 2019).

Από όλες τις νουκλεοτιδικές βάσεις, η γουανίνη είναι ο πιο πιθανός στόχος προσβολής στον άνθρακα-8 (C-8) από την υδροξυλική ρίζα (HO^{\bullet}), σχηματίζοντας ένα τροποποιημένο προϊόν, την 8-υδροξυ-2-δεοξυγουανοσίνη (8-OHdG) η οποία αποτελεί μία εκ των κυριότερων βλαβών που προκύπτουν από ελεύθερες ρίζες (Kasai, 1997; Wu *et al.*, 2004). Εκτός από τη γουανίνη, η υδροξυλική ρίζα (HO^{\bullet}) μπορεί να αντιδράσει με την τριφωσφορική δεοξυγουανοσίνη (dGTP) η οποία εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, παράγοντας την 8-υδροξυ-2-δεοξυγουανοσίνη (8-OHdG) (Pour Khavari *et al.*, 2018). Επιπροσθέτως, εκτός από την 8-OHdG, πιθανό προϊόν οξείδωσης είναι και η 8-οξο-7,8-διϋδρο-2-δεοξυγουανοσίνη (8-oxodG) η οποία είναι ένα κετονολικό ταυτομερές της 8-OHdG. Τα δύο αναφερθέντα οξειδωμένα προϊόντα (8-OHdG και 8-oxodG) αντιπροσωπεύουν τους κατάλληλους δείκτες οξειδωτικής βλάβης που σχηματίζονται από τη προσβολή της υδροξυλικής ομάδας (OH) στον C-8 της γουανίνης. Σε περίπτωση όπου οι εν λόγω βλάβες δεν έχουν επιδιορθωθεί μπορεί να προκαλέσουν λανθασμένη ενσωμάτωση νουκλεοτιδίων στην αντιγραφόμενη αλυσίδα, συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο σε καρκινογένεση (Gao *et al.*, 2019) (Εικόνα 1.15.)

Δεδομένου ότι η 8-υδροξυ-2-δεοξυγουανοσίνη (8-OHdG) εντοπίζεται στα ούρα, χωρίς δυνατότητα διείσδυσης της σε άλλους ιστούς, καθίσταται εφικτή η εκτίμηση της έκτασης της οξειδωτικής βλάβης (Cooke *et al.*, 2001). Τέλος, μελέτες υποδεικνύουν συσχετισμό μεταξύ του δείκτη οξειδωτικής βλάβης, 8-υδροξυ-2-δεοξυγουανοσίνη (8-OHdG), με διάφορες ασθένειες όπως είναι ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές ασθένειες και ο διαβήτης (Gao *et al.*, 2019).



Εικόνα 1.15. Βιολογικές δομές της 8-OHdG και των αναλόγων της. (A) η δομή της μη τροποποιημένης βάσης της γουανίνης, (B) η δομή της οξειδωμένης γουανυλικής βάσης, (C) ανάλογο μόριο της 8-OHdG προερχόμενο από RNA και (D) η δομή της 8-OHdG προερχόμενο από DNA (Wu *et al.*, 2004).

1.2.1.3.3.2. 8-OHdG και καρκίνος

Η οξειδωτική υδροξυλίωση της γουανίνης στον C-8 είναι η πιο συχνή και μεταλλαξιογόνος επίδραση στο πυρηνικό DNA και η οποία αντικατοπτρίζεται με το σχηματισμό της 8-υδροξυ-2-δεοξυγουανοσίνης (8-OHdG). Η 8-υδροξυλίωση της γουανίνης (8-OHdG) οδηγεί σε αναντιστοιχία ζευγών βάσεων και λανθασμένη κωδικοποίηση της τροποποιημένης βάσης και γειτονικών καταλοίπων. Αποτελέσματα μελετών από βακτήρια και μύκητες απέδειξαν ότι κατά τη διαδικασία επιδιόρθωσης σφαλμάτων, παρατηρήθηκε αυξημένη συχνότητα μεταστροφής των ζευγών βάσεων G.C- -T.A οδηγώντας σε μεταλλάξεις (Klungland *et al.*, 1999). Για να επιβιώσουν τα κύτταρα, υπάρχουν διάφορα συστήματα επιδιόρθωσης τα οποία μεσολαβούν για να απομακρύνουν ή να επιδιορθώσουν τα σφάλματα της οξειδωτικής

τροποποίησης του DNA (DeWeese *et al.*, 1998; Mazurek *et al.*, 2002). Οποιαδήποτε οξειδωτική βλάβη δεν επιδιορθώνεται καταλήγει σε μεταλλάξεις, αυξάνοντας τον κίνδυνο καρκινογένεσης (Poulsen *et al.*, 1998). Μελέτες επιδημιολογίας και παρέμβασης με αντιοξειδωτικά απέδειξαν ότι η οξειδωτική τροποποίηση του DNA, συμπεριλαμβανομένου και της 8-υδροξυ-2-δεοξυγουανωσίνης (8-OHdG), σχετίζεται με την ανάπτυξη του καρκίνου με πολλαπλούς μηχανισμούς. Τα επίπεδα της οξειδωτικής βλάβης τα οποία διαφεύγουν της άμεσης επιδιόρθωσης και υφίστανται στο DNA σε ένα συγκεκριμένο εύρος, συνεισφέρουν σημαντικά στο ρυθμό μεταλλάξεων *in vivo*. Αν και δεν υπάρχει άμεση συσχέτιση της οξειδωτικής τροποποίησης του DNA με τον καρκίνο, μελέτες υπέδειξαν ότι διατροφή με φρούτα και λαχανικά μπορεί να μειώσουν τόσο τις πιθανότητες για οξειδωτική βλάβη όσο και για καρκινογένεση (Poulsen *et al.*, 1998 ; Halliwell, 2002).

1.2.1.3.4. Παραγωγή των RNS κατά την έκθεση σε ακτινοβολία

Καθώς η ιονίζουσα ακτινοβολία στοχεύει στα κύτταρα, πυροδοτεί συγχρόνως τη δραστηριότητα του ενζύμου της συνθάσης του νιτρικού οξειδίου (NOS) παράγοντας με αυτόν τον τρόπο σημαντικές ποσότητες νιτρικού οξειδίου ($\bullet\text{NO}$) (Mikkelsen and Wardman, 2003). Αν και η ρίζα του νιτρικού οξειδίου ($\bullet\text{NO}$) είναι χημικά αδρανής στα περισσότερα κυτταρικά συστατικά, εξαιρώντας το μόριο της αίμης, μπορεί να αντιδράσει με ανιόν σουπεροξειδίου ($\text{O}_2\bullet^-$) σχηματίζοντας το ανιόν του υπεροξυνιτρίτη (ONOO^-) με σταθερά ταχύτητας μεγαλύτερη από αυτήν που απαιτεί η διάσπαση σουπεροξειδίου ($\text{O}_2\bullet^-$) από τη δισμουτάση του σουπεροξειδίου (Jay-Gerin and Ferradini, 2000). Όπως και οι υδροξυλικές ρίζες, το ανιόν του υπεροξυνιτρίτη (ONOO^-) είναι ένα επιπλέον δραστικό μόριο, ικανό να προσβάλλει διάφορους κυτταρικούς στόχους συμπεριλαμβάνοντας λιπίδια, θειόλια, πρωτεΐνες και νουκλεοτιδικές βάσεις. Η υψηλή δραστικότητα του υπεροξυνιτρίτη (ONOO^-) υποδηλώνει χαμηλή επιλεκτικότητα, περιορισμένη δραστικότητα με τα άμεσα γειτονικά μόρια καθώς και ανικανότητα ως προς το να λειτουργήσει ως αγγελιοφόρος κυτταρικών μηνυμάτων. Αντίθετα, η χαμηλότερη δραστικότητα των μορίων υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) και ανιόντος σουπεροξειδίου ($\text{O}_2\bullet^-$) επιτρέπει στα μόρια αυτά να διαχέονται σε μεγάλη απόσταση, μακριά από την περιοχή σχηματισμού (Frongillo *et al.*, 1998) ενώ η παρουσία καταλυτικών ιόντων μετάλλων οξειδοαναγωγής, κυρίως σιδήρου και χαλκού, μέσω των αντιδράσεων Fenton και Haber-Weiss, ενισχύουν το σχηματισμό υδροξυλικών ριζών (Halliwell and Gutteridge, 1992; Halliwell and Gutteridge, 2007).

Ουσιαστικά, η διαδικασία της ραδιόλυσης του νερού καθώς και η πρόωρη ενεργοποίηση της συνθάσης του νιτρικού οξειδίου αποτελούν τις κύριες πηγές παραγωγής των ROS/RNS στα ακτινοβολημένα κύτταρα, παρουσία οξυγόνου. Ενδιαφέρον προκαλεί και η απόδοση παραγωγής αυτών των ενώσεων, η οποία ρυθμίζεται από τα διαφορετικά είδη ακτινοβολίας. Η αυξανόμενη γραμμική ενέργεια μεταφοράς (LET) των φορτισμένων σωματιδίων, οδηγεί σε αυξημένη απόδοση των μοριακών προϊόντων όπως είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) ενώ συνοδεύεται από μειωμένη απόδοση ριζών όπως είναι η υδροξυλική ρίζα ($\bullet OH$). Εν αντιθέσει δραστικές ρίζες όπως είναι οι $O_2 \bullet^-$ και $HO_2 \bullet$, είναι άφθονες και παράγονται από υψηλή γραμμική ενέργεια μεταφοράς (LET) (La Verne, 2004; Meesungnoen and Jay-Gerin, 2011). Προφανώς, η απόδοση καθώς και οι συγκεντρώσεις των προϊόντων κατά μήκος της διαδρομής των ακτινοβοληθέντων σωματιδίων επιφέρουν σημαντικές συνέπειες στην έκταση και φύση των βλαβών του DNA (Goodhead, 1989; Campa *et al.*, 2005). Οι δραστικές ενώσεις οξυγόνου και αζώτου προσβάλλουν το DNA μέσω διαφόρων τροποποιήσεων περιλαμβάνοντας θραύσεις DNA, βλάβη σε νουκλεοτιδική βάση, καταστροφή σακχάρων, διασταυρώσεις και δυσλειτουργία στα τελομερή (O'Neill and Wardman, 2009; Sahin *et al.*, 2011; Valerie *et al.*, 2007). Τέλος, οι μη επιδιορθωμένες βλάβες ή λανθασμένα αποκατεστημένες βλάβες οδηγούν σε μεταλλάξεις και προώθηση νεοπλασματικής μετάβασης ή κυτταρικό θάνατο (Kryston *et al.*, 2011; Azzam *et al.*, 2012).

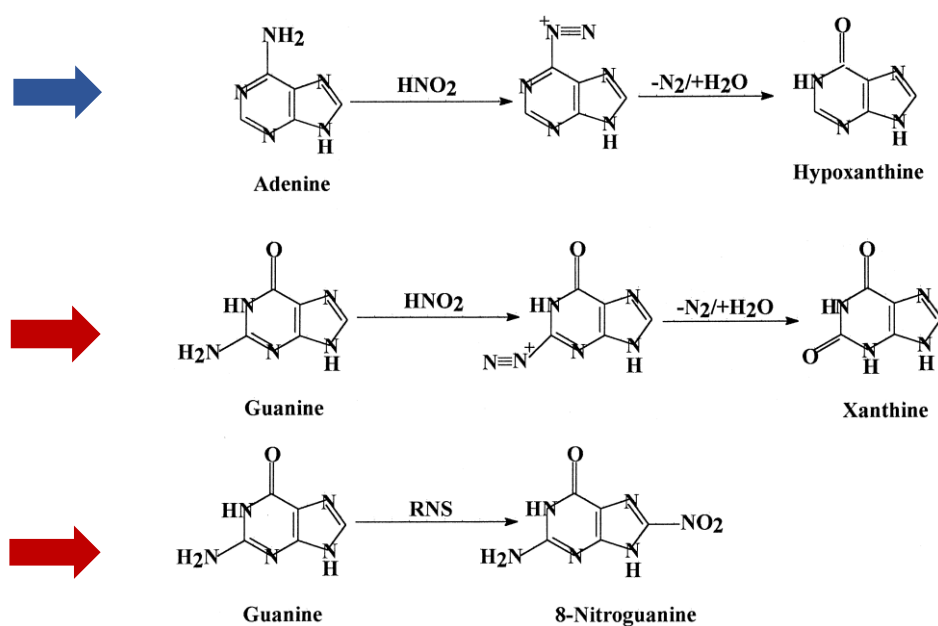
1.2.1.3.5. 8-νιτρογουανίνη

1.2.1.3.5.1. 8-νιτρογουανίνη και RNS ενώσεις

Ο ανθρώπινος οργανισμός προσλαμβάνει το άζωτο υπό τη μορφή νιτρικών, νιτρωδών, πεπτιδίων, πρωτεϊνών, αμινοξέων καθώς και μεταβολιτών του όπως είναι το νιτρικό οξύ, οξείδια του αζώτου και υπεροξυνιτρίτη. Αν και το νιτρικό οξύ είναι μια ελεύθερη ρίζα, το μονοξείδιο του αζώτου (NO) δεν είναι αρκετά δραστικό μόριο ώστε να προσβάλλει άμεσα το DNA (Tamiir and Tannenbaum, 1996). Ωστόσο, το μονοξείδιο του αζώτου (NO) και παράγωγες ενώσεις όπως είναι οι NO^- , $ONOO^-$, N_2O_3 μπορούν να προκαλέσουν νίτρωση καθώς και απαμίνωση των αμινικών ομάδων των νουκλεοτιδικών βάσεων του DNA, προκαλώντας με αυτούς τους τρόπους θραύση στην αλυσίδα του DNA και μεταλλάξεις (Wiseman *et al.*, 1995).

Από τις παράγωγες ενώσεις ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζει ο υπεροξυνιτρίτης ($ONOO^-$) ο οποίος σχηματίζεται μέσω της αντίδρασης του μονοξειδίου του αζώτου (NO) με ανιόν του σουπεροξειδίου (O_2^-) ενώ η υψηλή δραστικότητά του οδηγεί στο σχηματισμό της 8-νιτρογουανίνης (8-NG) (Halliwell, 1999). Πιο συγκεκριμένα, η 8-νιτρογουανίνη (8-NG) αποτελεί το κύριο προϊόν της αντίδρασης μεταξύ του C-8 της γουανίνης με υπεροξυνιτρίτη

(ONOO⁻) ενώ το προϊόν που προκύπτει από τη νιτροποίηση της αδενίνης θεωρείται αμελητέο συγκριτικά το προϊόν που αποδίδεται κατά την οξείδωση του C-8 της γουανίνης (Sodum and Fiala, 2001). Επιπλέον, ο γλυκοσιδικός δεσμός μεταξύ της 8-νιτρογουανίνης (8-NG) και της δεοξυριβόζης είναι ιδιαίτερα ασταθής με αποτέλεσμα να απελευθερώνεται αυθόρμητα η εν λόγω βλάβη του DNA καταλήγοντας με αυτόν τον τρόπο σε μια αποπουρινική θέση (Yermilov *et al.*, 1995a). Ωστόσο, η προκληθείσα αποπουρινική βάση σχηματίζει ζεύγος βάσεων με την αδενίνη κατά τη διάρκεια της σύνθεσης του DNA, προκαλώντας μεταστροφή του ζεύγους βάσεων από G:C σε T:A (Loeb and Preston, 1986; Kawanishi *et al.*, 2017). Άλλη περίπτωση μεταστροφής βάσεων από υπεροξυνιτρίτη (ONOO⁻) συμβαίνει μέσω απαμίνωσης της αδενίνης σε υποξανθίνη προκαλώντας αλλαγή του ζεύγους βάσεων A:T σε G:C δεδομένου ότι η υποξανθίνη μπορεί να δημιουργήσει ζεύγος βάσεων με την κυτοσίνη (C) (Tamir and Tannenbaum, 1996; Felley-Bosco, 1998) (Εικόνα 1.16.).



Εικόνα 1.16. Αντιδράσεις απαμίνωσης και νίτρωσης των πουρινικών βάσεων του DNA (Halliwell, 1999).

Εκτός από τον υπεροξυνιτρίτη (ONOO⁻), σημαντικό ρόλο διαδραματίζει και η ελεύθερη ρίζα διοξειδίου του αζώτου (NO₂•) η οποία ανήκει στην κατηγορία των RNOS ενώσεων, είναι παρούσα σε διάφορα βιολογικά περιβάλλοντα και αλληλεπιδρά με άλλες ελεύθερες ρίζες αφαιρώντας άτομα υδρογόνου. Η ελεύθερη ρίζα του διοξειδίου του αζώτου (NO₂•) παράγεται από ουδετερόφιλα και μακροφάγα. Στα ουδετερόφιλα, η οξείδωση των

ανιόντων διοξειδίου του αζώτου (NO_2^-) από H_2O_2 καταλύεται από τη μυελοπεροξειδάση και οδηγεί στο σχηματισμό της ελεύθερης ρίζας διοξειδίου του αζώτου (NO_2^\bullet). Η ενεργοποίηση των μακροφάγων οδηγεί στην παραγωγή ριζών μονοξειδίου του αζώτου (NO^\bullet) καθώς και ανιόντων σουπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\bullet-}$) τα οποία συνδυαζόμενα σχηματίζουν την τοξική ένωση του υπεροξυνιτρίτη (ONOO^-). Οι ελεύθερες ρίζες αζώτου συμπεριλαμβανομένου και της ελεύθερης ρίζας του διοξειδίου του αζώτου (NO_2^\bullet) η οποία αντιδρά ταχύτατα με τη γουανυλική ρίζα, προσβάλλουν επιλεκτικά τον C8 της γουανίνης, σχηματίζοντας τη 8-νιτρογουανίνη (8-NG). Τέλος, όπως θα αναλυθεί παρακάτω, η 8-νιτρογουανίνη είναι μεταλλαξιογόνος ένωση, καθότι προκαλεί αποπουρινώσεις στο DNA οι οποίες καταλήγουν σε μεταστροφές ζευγών βάσεων από G:C σε A:T ενώ ανήκει και στην κατηγορία των βιοδεικτών καθότι προσδιορίζει την πιθανότητα καρκινογένεσης σχετιζόμενη με φλεγμονή (Agnihotri and Mishra, 2010).

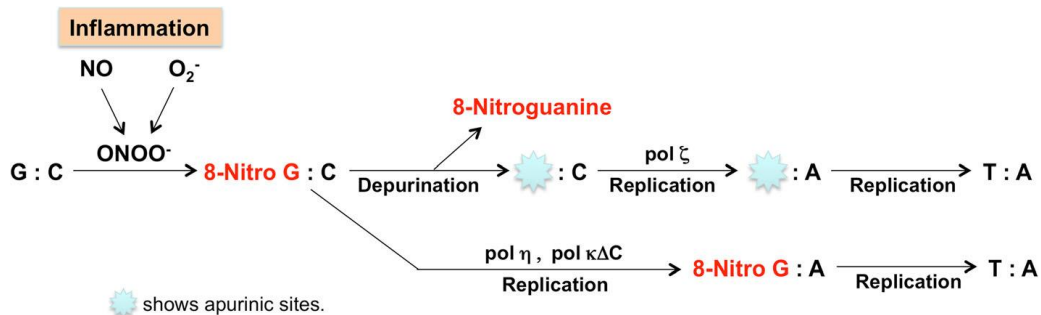
1.2.1.3.5.2. 8-NG και καρκίνος

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το μονοξείδιο του αζώτου (NO) συντίθεται από τη συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (NO). Ωστόσο, υπάρχουν τρεις ισομορφές της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (NO) οι οποίες είναι οι εξής: 1) νευρωνική συνθάση NO (nNOS ή NOS1), 2) επαγωγίμη συνθάση NO (iNOS or NOS2) και 3) ενδοθηλιακή συνθάση NO (eNOS ή NOS3) (Fukumura *et al.*, 2006; Lala and Chakraborty, 2001). Από τις τρεις ισομορφές συνθάσης NO, σημαντικές ποσότητες μονοξειδίου του αζώτου (NO) παράγονται σε κατάσταση φλεγμονής από φλεγμονώδη και επιθηλιακά κύτταρα μέσω της επαγωγίμης συνθάσης NO (iNOS). Αντίθετα, χαμηλές ποσότητες μονοξειδίου του αζώτου (NO) παράγονται από την νευρωνική (nNOS) και ενδοθηλιακή συνθάση NO (eNOS) παρότι και οι δύο ισομορφές συνθάσης μονοξειδίου του αζώτου (NO) εκφράζονται συνεχώς. Όσον αφορά την ενζυμική δράση της επαγωγίμης συνθάσης NO (iNOS), μεταγραφικοί παράγοντες όπως είναι οι NF-κB, HIF1- α , STAT και TNF- α ενισχύουν τη δράση της. Από τους μεταγραφικούς παράγοντες, ο NF-κB διαδραματίζει κεντρικό ρόλο σε μια φλεγμονή δεδομένου ότι επάγει τη μεταγραφή προφλεγμονωδών γονιδίων περιλαμβάνοντας και το γονίδιο της επαγωγίμης συνθάσης NO (iNOS) ενώ προάγει την ογκογένεση σε καρκίνο σχετιζόμενο με φλεγμονή (Wang *et al.*, 2009).

Η παραγωγή υψηλών επιπέδων μονοξειδίου του αζώτου (NO) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως είναι ο καρκίνος (Fukumura *et al.*, 2006). Όπως έχει ήδη αναλυθεί, το μονοξείδιο του αζώτου (NO) αντιδρά με ανιόν σουπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\bullet-}$) σχηματίζοντας τον υπεροξυνιτρίτη (ONOO^-), μια σημαντικά δραστική ένωση η οποία οδηγεί στο σχηματισμό της 8-νιτρογουανίνης (8-NG). (Yermilov *et al.*, 1995a; Halliwell, 1999). Εκτός από δείκτη φλεγμονής, η 8-νιτρογουανίνη (8-NG) αποτελεί μια πιθανή μεταλλαξιογόνο αιτία στο DNA, προκαλώντας καρκινογένεση (Ma *et al.*, 2012). Εξαιτίας της

χημικής αστάθειας που παρουσιάζει η 8-νιτρογουανίνη, υπάρχει η δυνατότητα της αυθόρμητης απελευθέρωσής της, δημιουργώντας μια αποπουρινική θέση (Yermilov *et al.*, 1995b). Η αποπουρινική βάση μπορεί να δημιουργήσει ζεύγος βάσεων με την αδενίνη κατά τη σύνθεση του DNA, μεταστρέφοντας το ζεύγος βάσεων από G:C σε T:A (Loeb and Preston, 1986).

Στη διαδικασία μεταστροφής του ζεύγους βάσεων G:C σε T:A, έχει μελετηθεί ο ρόλος συγκεκριμένων DNA πολυμερασών στη σύνθεση του DNA πέρα από τις θέσεις βλαβών (Sale *et al.*, 2012). Πιο συγκεκριμένα, έχει αποδειχτεί ότι κύτταρα με έλλειψη στις υπομονάδες της DNA πολυμεράσης ζ, Rev1 και Rev3, είναι υπερευαίσθητα στο νιτρώδες στρες ενώ η σύνθεση του DNA πέρα από τις αποπουρινικές θέσεις η οποία διεξάγεται από την εν λόγω πολυμεράση, συνεισφέρει σε εκτεταμένες σημειακές μεταλλάξεις (Wu *et al.*, 2006). Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι η αδενίνη ενσωματώνεται κατά προτίμηση απέναντι από τη 8-νιτρογουανίνη κατά τη διάρκεια σύνθεσης του DNA η οποία καταλύεται από τη DNA πολυμεράση η, καταλήγοντας εν τέλει σε μεταστροφή του ζεύγους βάσεων από G:C σε T:A (Suzuki *et al.*, 2005) (Εικόνα 1.17.).



Εικόνα 1.17. Ο πιθανός μηχανισμός μεταλλαξιγένεσης μέσω της 8-NG (Kawanishi *et al.*, 2017).

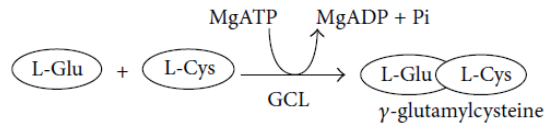
1.2.2. Ο ρόλος της γλουταθειόνης στην ακτινοθεραπεία

Η γλουταθειόνη (GSH) ανήκει στην κατηγορία των σουλφυδρυλίων και θεωρείται γνωστή για την αντιοξειδωτική της δράση έναντι παραγόντων που προκαλούν οξειδωτικές στρες. Όπως έχει εκτενώς αναλυθεί παραπάνω, η ακτινοθεραπεία και κατά επέκταση η ιονίζουσα ακτινοβολία η οποία χρησιμοποιείται ευρέως στο εν λόγω θεραπευτικό πεδίο, οδηγεί στην παραγωγή ελεύθερων δραστικών ριζών οξυγόνου και αζώτου, ROS και RNS αντίστοιχα. (Mitchell and Russo, 1987). Μία από τις πιο σημαντικές θεωρίες που έχουν διατυπωθεί σχετικά με το ρόλο της γλουταθειόνης στην προστασία από δραστικές ρίζες είναι του Alexander και Charlesby (1954) και μετέπειτα του Howard-Flanders (1960) σύμφωνα με τους οποίους θειόλες όπως είναι η γλουταθειόνη αποτελούν σημαντική άμυνα ακόμα και σε ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα ελευθέρων ριζών οξυγόνου (Mitchell and Russo, 1987). Αντιοξειδωτικές ενώσεις ανευρίσκονται σε διάφορες τροφές παρέχοντας αντιοξειδωτική προστασία *in vivo* μέσω ποικίλων μηχανισμών οι οποίοι σχετίζονται με την αποτοξίνωση, μακροζωία, διατήρηση της κυτταρικής ακεραιότητας και τέλος με την επιδιόρθωση του DNA (Kensler *et al.*, 2007; Wood *et al.*, 2004; Astley *et al.*, 2004).

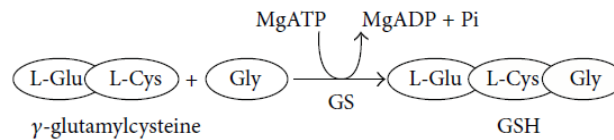
1.2.2.1. Ο μηχανισμός βιοσύνθεσης της GSH

Η γλουταθειόνη (GSH) είναι μη πρωτεϊνικό μόριο θειόλης, αποτελούμενο από τρία αμινοξέα: L-γ-γλουταμυλ-L-κυστεϊνυλ-γλυκίνη. Η βιοσύνθεση της γλουταθειόνης από τα συσταθέντα αμινοξέα της διεκπεραιώνεται μέσω δύο ενζυμικών βημάτων όπου και στα δύο απαιτείται η παρουσία του ATP. Αρχικά, συντίθεται η γ-γλουταμυλ-κυστεΐνη μέσω σχηματισμού γ-πεπτιδικού δεσμού μεταξύ της γ-γλουταμυλικής ομάδας του γ-γλουταμικού οξέος και της κυστεΐνης. Το πρώτο αυτό βήμα σύνθεσης παρουσιάζει περιορισμό ως προς τον ρυθμό της αντίδρασης και καταλύεται από τη λιγάση της γλουταμυλ-κυστεΐνης (GCL) η οποία αποτελείται από δύο υπομονάδες, την καταλυτική (GCLC) και την τροποποιητική υπομονάδα (GCLM). Κατόπιν, συντίθεται η γλουταθειόνη (GSH) μέσω ενζυμικής αντίδρασης που καταλύεται από τη συνθετάση της γλουταθειόνης (GS) (Lu, 2009) (Εικόνα 1.18).

1^ο βήμα βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης



2^ο βήμα βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης



Εικόνα 1.18. Βήματα βιοσύνθεσης της GSH (Oppenheimer *et al.*, 1979).

Αν και η συνθετάση της γλουταθειόνης δε συμμετέχει σημαντικά στη ρύθμιση βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης, υπάρχουν ωστόσο αρκετές ενδείξεις σύμφωνα με τις οποίες η συνθετάση της γλουταθειόνης εμπλέκεται σε αρκετούς ιστούς ή/και σε στρεσογόνες καταστάσεις (Luo *et al.*, 1998).

Ωστόσο, υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο ρυθμός σύνθεσης της γλουταθειόνης καθορίζεται κυρίως από δύο παράγοντες όπως είναι η διαθεσιμότητα του αμινοξέος της κυστεΐνης και η ενζυμική δράση της λιγάσης της γλουταμυλ-κυστεΐνης (GCL). Όσον αφορά τη διαθεσιμότητα της κυστεΐνης, προσλαμβάνεται κυρίως μέσω της διατροφής, διάσπασης πρωτεϊνών και από την αντίδραση τρανσουλφονίωσης της μεθειονίνης στο ήπαρ. Η κυστεΐνη διαφέρει από τα υπόλοιπα αμινοξέα καθότι με τη σουλφυδρυλική της μορφή ως κυστεΐνη εντοπίζεται κυρίως ενδοκυτταρικά ενώ με βάση τη δισουλφυδρυλική της ως κυστίνη εξωκυτταρικά (Lu, 1999).

1.2.2.2. Οι μορφές και διαμερισματοποίηση της GSH

Το τριπεπίδιο της γλουταθειόνης εντοπίζεται κυρίως ενδοκυτταρικά, προσεγγίζοντας συγκεντρώσεις της τάξεως mM (millimolar) στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους. Η επικρατέστερη μορφή της γλουταθειόνης είναι η ανηγμένη της μορφή (GSH) η οποία είναι η

δραστικότερη, εκτελώντας ένα εύρος κυτταρικών λειτουργιών όπως είναι είτε η αντιοξειδωτική δράση διαμέσου άμεσης αλληλοεπίδρασης της με δραστικές ρίζες οξυγόνου και αζώτου (ROS/RNS) είτε μέσω ενζυμικών αντιδράσεων αποτοξίνωσης οι οποίες διεκπεραιώνονται από τα ένζυμα υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και τρανσφεράση της S-γλουταθειόνης (Dickinson and Forman, 2002). Αντιθέτως, η οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSSG) αποτελεί <1% στο σύνολο της γλουταθειόνης. Όσον αφορά τη διαμερισματοποίηση της γλουταθειόνης (GSH) ενδοκυτταρικά, η πλειοψηφία εντοπίζεται στο κυτοσόλιο σε ποσοστό 90%, στα μιτοχόνδρια 10% ενώ το ενδοπλασματικό δίκτυο διαθέτει πολύ μικρό ποσοστό (Lu, 2009).

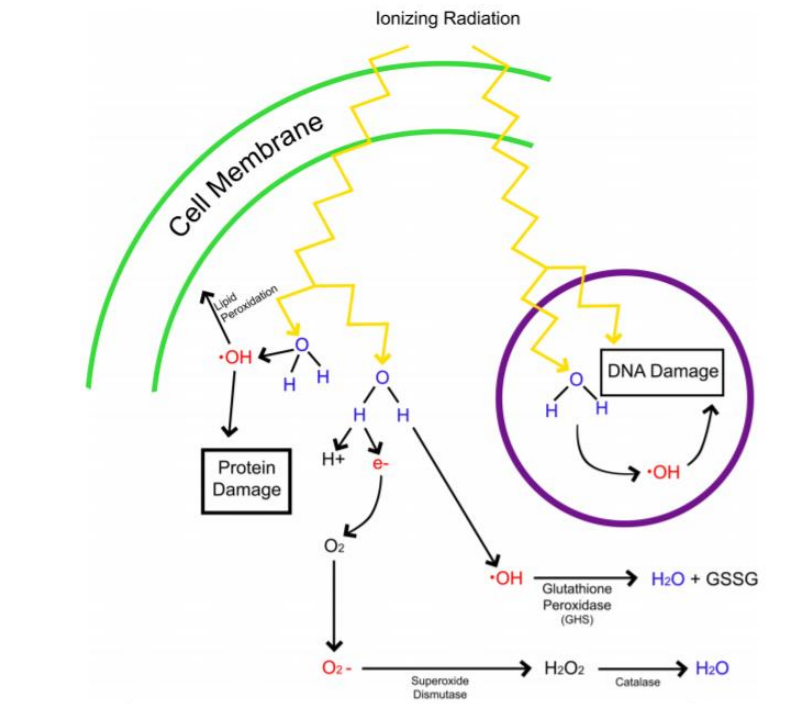
Ο πυρήνας, τα μιτοχόνδρια και το ενδοπλασματικό δίκτυο αποτελούν οξειδοαναγωγικές δεξαμενές οι οποίες διαφοροποιούνται από το κυτταρόπλασμα ως προς την κατανομή της ανηγμένης και οξειδωμένης μορφής γλουταθειόνης, GSH και GSSG αντιστοίχως, το οξειδοαναγωγικό δυναμικό και τον έλεγχο διαφόρων κυτταρικών δραστηριοτήτων. Η οξειδοαναγωγική δεξαμενή της γλουταθειόνης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία από οξειδωτικές και επαγόμενες από την ιονίζουσα ακτινοβολία βλάβες καθώς και στην παραμονή των πυρηνικών πρωτεϊνών σε αναγωγικό περιβάλλον οι οποίες είναι χρήσιμες στη μεταγραφή γονιδίων κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (Cotgreave, 2003; Chen *et al.*, 2003).

1.2.2.3. Η GSH <<ασπίδα>> απέναντι στις ROS και RNS

Τα κύτταρα παρουσία αυξημένων συγκεντρώσεων ελευθέρων ριζών παράγουν “φυσικά” αντιοξειδωτικά όπως είναι η δισμουτάση του σουπεροξειδίου, η γλουταθειόνη και η καταλάση των οποίων ο ρόλος εστιάζει στον περιορισμό ή μείωση βλαβών που εντοπίζονται στις κυτταρικές δομές και έχουν προκύψει από ελεύθερες ρίζες. Αρχικά, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης καταλύει τη μετατροπή των ιόντων υδροξειδίου σε νερό. Εν τω μεταξύ, η δισμουτάση του σουπεροξειδίου μετατρέπει τα ιόντα του σουπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) το οποίο εν συνεχεία μετατρέπεται σε οξυγόνο (O_2) και νερό (H_2O) από την καταλάση. Η δισμουτάση του σουπεροξειδίου υφίσταται σε διάφορες ισομορφές όπου η κάθε ισομορφή εντοπίζεται σε συγκεκριμένες περιοχές του κυττάρου. Σε περίπτωση έκθεσης των κυττάρων σε αυξανόμενα επίπεδα ιονίζουσας ακτινοβολίας, τα κύτταρα αποκρίνονται με αυξημένη έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων. Ωστόσο, αν το επίπεδο των ριζών οξυγόνου (ROS) εξουδετερώνει τις κυτταρικές άμυνες, τα κύτταρα καταλήγουν σε καρκινογένεση, νέκρωση ή απόπτωση (Holley *et al.*, 2014).

Στην περίπτωση του “φυσικού” κυτταρικού αντιοξειδωτικού παράγοντα, τη γλουταθειόνη (GSH), οι πιθανές λειτουργίες καθορίζονται από τη χημική της δομή ενώ η

ευρεία κατανομή της στους διάφορους ζωντανούς οργανισμούς αντανακλά τη σημασία του βιολογικού ρόλου που επιτελεί (Meister,1988). Όπως έχει διαπιστωθεί, η γλουταθειόνη (GSH) ανήκει στους σημαντικότερους αντιοξειδωτικούς παράγοντες με την αποτοξινωτική της δράση να αντανακλάται μέσα από ένα πρίσμα διαφόρων δραστηριοτήτων οι οποίες είναι οι εξής: α) αναγωγή αντιοξειδωτικών ενώσεων όπως προκύπτει στην περίπτωση του ασκορβικού οξέος, β) αποτοξίνωση ξενοβιοτικών, καρκινογενών ενώσεων καθώς και ελευθέρων ριζών και γ) διατήρηση της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος. Ωστόσο, από τις προαναφερθείσες λειτουργίες, η κρισιμότερη βιολογική δράση της γλουταθειόνης (GSH) αφορά την αποτοξίνωση των ξενοβιοτικών και ορισμένων ενδογενών ενώσεων οι οποίες είναι ηλεκτρονιόφιλες και κατά επέκταση ικανές να συζευχθούν με τη γλουταθειόνη (GSH) είτε μέσω αυθόρμητων είτε μέσω ενζυμικών αντιδράσεων οι οποίες καταλύονται από τη S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST). Ωστόσο, η ύπαρξη διαφόρων συστημάτων οξειδοαναγωγής όπως είναι η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) η οποία αντιδρά με διάφορα είδη υπεροξειδίων και η γλουταρεδοξίνη (GRX) η οποία χρησιμοποιεί τη γλουταθειόνη (GSH) ως συμπάροντα, συνεισφέρουν στην αποτοξινωτική δράση της γλουταθειόνης (GSH) λειτουργώντας ως δέκτες ηλεκτρονίων (Sáez *et al.*, 1993 ; Meyer *et al.*, 2009). Ούσα ο σημαντικότερος αντιοξειδωτικός παράγοντας, η γλουταθειόνη (GSH) είναι ικανή να διασπάσει μόρια όπως είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) και υπεροξειδία των λιπιδίων τα οποία λειτουργούν ως κατάλληλα υποστρώματα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (Εικόνα 1.19.). Συνεπώς, η γλουταθειόνη συγκεντρώνει τις απαραίτητες ιδιότητες, καθιστώντας την ως ένα ισχυρό ενδοκυττάριο αντιοξειδωτικό, αποτοξινώνοντας τυχόν ελεύθερες ρίζες οι οποίες απορρέουν κατά την έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία (Mukundan *et al.*, 1999; Meister,1988).



Εικόνα 1.19. Διαδικασία παραγωγής και αποτοξίνωσης των παραγόμενων ROS ενώσεων (Smith *et al.*, 2017).

Η αντιοξειδωτική γλουταθειόνη (GSH) αναφέρεται συχνά και ως “ακτινο-προστάτης” καθότι αντιδρά με τις δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS) οι οποίες παράγονται κατά τη διάρκεια της ακτινοθεραπείας και εξαντλούν κυτταρικά αντιοξειδωτικά αποθέματα, κυρίως τη γλουταθειόνη (GSH) (Turella *et al.*, 2005). Έχει διαπιστωθεί πως θεραπείες οι οποίες βασίζονται στη ρύθμιση των επιπέδων της γλουταθειόνης στα καρκινικά κύτταρα μπορούν να συρρικνώσουν έναν επιθετικό όγκο, με αποτέλεσμα το επιστημονικό ενδιαφέρον να επικεντρώνεται στην ανηγμένη γλουταθειόνη η οποία καθορίζει την εγγενή ευαισθησία των κυττάρων σε διάφορους μεταλλαξιογόνους παράγοντες συμπεριλαμβανομένου και της ακτινοβολίας (Estrela *et al.*, 1995).

Πιο συγκεκριμένα, η ακτινο-ευαισθησία των κυττάρων σχετίζεται αντιστρόφως ανάλογα με τα ενδογενή επίπεδα των μη πρωτεϊνικών συνδεδεμένων σουλφυδρυλίων (NPSH), με τη γλουταθειόνη (GSH) και αποτελεί κύριο συστατικό των NPSH (Rénész *et al.*, 1963). Η γλουταθειόνη (GSH) θεωρείται μόριο κρίσιμης σημασίας για την ακτινο-ευαισθησία των κυττάρων, όταν είναι παρούσα μέσα στον κυτταρικό πυρήνα, ιδιαίτερα κοντά στο DNA (Prise *et al.*, 1992). Ωστόσο, η επίδραση των κυττάρων με θειόλες όπως είναι η μερκαπτοαιθυλαμίνη, η S-2αμινοαιθυλισοθειουρία και η κυστεΐνη ενισχύουν το κυτταρικό περιεχόμενο με ελεύθερη γλουταθειόνη (GSH), πυροδοτώντας όμως την έκκριση δεσμευμένων νουκλεοπρωτεϊνών με γλουταθειόνη (GSH) (Modig *et al.*, 1972). Επιπλέον, διάφορες ασθένειες όπως είναι η 5-

οξοπρολινουρία, η λευχαιμία και η αναιμία, οι οποίες συνδέονται με τον ελαττωματικό μεταβολισμό της γλουταθειόνης, ενισχύουν την ευαισθησία των κυττάρων στην ακτινοβολία. (Larsson, 1981). Ακόμη, η επίδραση με βουθειονίνη σουλφοξιμίνη (BSO) αναστέλλει τη δράση της γ-γλουταμυλ-κυστεΐνης, μειώνοντας με αυτόν τον τρόπο τα ενδογενή επίπεδα γλουταθειόνης ενώ αυξάνεται συγχρόνως η ακτινο-ευαισθησία των κυττάρων (Meister, 1983; Louie *et al.*, 1985; Chattopadhyay *et al.*, 1999). Έχει παρατηρηθεί ότι ανθρώπινα κύτταρα με 6% γλουταθειόνη (GSH) εμφανίζουν αυξημένη ακτινο-ευαισθησία συγκριτικά με φυσιολογικά κύτταρα τα οποία διαθέτουν το απαιτούμενο περιεχόμενο γλουταθειόνης (GSH) (Edgren *et al.*, 1981). Συμπερασματικά, η μείωση των ενδογενών επιπέδων της γλουταθειόνης (GSH) τόσο σε φυσιολογικά όσο και σε καρκινικά κύτταρα καθιστά τα κύτταρα ευαίσθητα στην ακτινοβολία καθώς και στους διάφορους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες (Fojo and Bates, 2003; Varnes *et al.*, 1980; Griffith and Meister, 1979).

Η χορήγηση ακτινο-προστατευτικών παραγόντων αποτελεί έναν τρόπο προστασίας των κυττάρων από τις επιβλαβείς επιδράσεις που επιφέρει η ακτινοβολία στα κύτταρα. Οι αντιοξειδωτικοί παράγοντες έχουν την ικανότητα να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες, απαλλάσσοντας τα κύτταρα από την παρουσία τους και κατά επέκταση να μειώσουν σημαντικά βλάβες στο DNA οι οποίες έχουν δημιουργηθεί υπό την επίδραση της ιονίζουσας ακτινοβολίας (Kuefner *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2014; Brand *et al.*, 2015 ; Pei *et al.*, 2014). Υποθετικά, η αλληλοεπίδραση μεταξύ αντιοξειδωτικών και δραστικών ριζών θα μπορούσε να επιτρέψει την εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών που θα προκύψουν κατά την έκθεση σε ακτινοβολία με αντιοξειδωτικούς παράγοντες, αρκεί τα ενδοκυττάρια επίπεδα των αντιοξειδωτικών ενώσεων να επαρκούν για το χρόνο έκθεσης σε ακτινοβολία. Οι ακτινο-προστατευτικοί παράγοντες μπορούν να καταστείλουν το σχηματισμό και να απομακρύνουν ελεύθερες ρίζες, να επάγουν την παραγωγή ‘‘φυσικών’’ ακτινο-προστατών συμπεριλαμβάνοντας τη δισμουτάση του σουπεροξειδίου, τη γλουταθειόνη, την υπεροξειδάση και την καταλάση, να ενισχύσουν την επιδιόρθωση του DNA, να μειώσουν τη φλεγμονώδη απόκριση μετά την ακτινοβολία ή να καθυστερήσουν την κυτταρική διαίρεση παρέχοντας περισσότερο χρόνο στα κύτταρα για να επιδιορθώσουν μια βλάβη ή να οδηγηθούν στην απόπτωση. Αν και οι ακτινο-προστατευτικές ενώσεις έχουν εμφανίσει αποτελεσματική δράση στη μείωση των επιδράσεων της ακτινοθεραπείας, δεν υπάρχουν μέχρι στιγμής ακτινο-προστατευτικοί παράγοντες στη διαγνωστική ραδιολογία (Pei *et al.*, 2014).

1.3. Ακτινοθεραπεία και τοξικότητα

1.3.1. Ακτινοθεραπεία και παρενέργειες

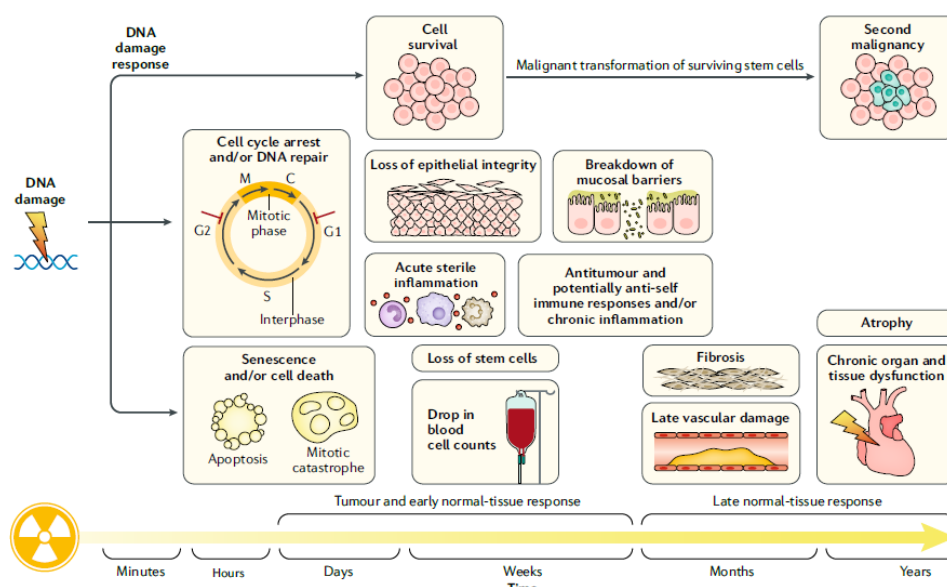
Αν και οι διάφορες θεραπείες εναντίον του καρκίνου έχουν αυξήσει τα ποσοστά επιβίωσης, οι περισσότεροι ασθενείς εκδηλώνουν παρενέργειες ως αποτέλεσμα της θεραπείας που εφαρμόστηκε και οι οποίες εκδηλώνονται με την πάροδο του χρόνου. Στην περίπτωση της ακτινοθεραπείας, πέρα από τη θεραπευτική ωφελιμότητα που αποφέρει, προκαλεί τοξικότητα, είτε βραχυπρόθεσμη είτε μακροπρόθεσμη. Όσον αφορά τις βραχυπρόθεσμες συνέπειες της ακτινοθεραπείας, εμφανίζονται συνήθως κατά τη διάρκεια της θεραπείας ή μέσα σε διάστημα 3 μηνών από την έναρξή της ενώ οι πιο μακροπρόθεσμες εμφανίζονται σε μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Η βραχυπρόθεσμη ή οξεία τοξικότητα όπως είναι για παράδειγμα η βλεννογονίτιδα, συνήθως θεραπεύεται μέσα σε διάστημα μερικών εβδομάδων ή μηνών. Αντιθέτως, οι πιο μακροπρόθεσμες παρενέργειες, όπως είναι η ίνωση, είναι συνήθως μη αναστρέψιμες και εξελίσσονται περαιτέρω με την πάροδο του χρόνου. Οι πρώιμες και όψιμες παρενέργειες της ακτινοθεραπείας εξαρτώνται κυρίως από το στοχευόμενο ιστό και περιλαμβάνουν οξεία γαστρεντερική βλάβη, καρδιακή τοξικότητα, νοητική δυσλειτουργία, διαταραχές του αναπαραγωγικού συστήματος, παραμόρφωση και επιδείνωση της ανάπτυξης των οστών, τριχόπτωση καθώς και δευτερογενείς κακοήθειες. Τέλος, υπάρχουν περιπτώσεις εμφάνισης συμπτωμάτων τα οποία μπορεί να εκδηλωθούν είτε κατά τη διάρκεια είτε μετά την ακτινοθεραπεία, τα οποία ωστόσο δε σχετίζονται άμεσα με την ακτινοβολία καθώς προκαλούνται από κάποιον άλλο μηχανισμό. Για να εξακριβωθεί η αιτία του συμπτώματος, απαιτείται διαφορική διάγνωση και κατά επέκταση διαφορετική θεραπευτική αντιμετώπιση (De Ruyscher *et al.*, 2019).

1.3.1.1. Πρώιμες και όψιμες παρενέργειες ακτινοθεραπείας

Όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, οι παρενέργειες της ακτινοθεραπείας διακρίνονται σε πρώιμες και όψιμες. Οποιαδήποτε βλάβη σε φυσιολογικό ιστό οφείλεται σε άμεση απώλεια των ήδη ακτινοβοληθέντων κυττάρων, έμμεση επίδραση της ακτινοβολίας σε μη ακτινοβοληθέντα κύτταρα καθώς και σε φλεγμονή η οποία πυροδοτείται από την ενεργοποίηση του έμφυτου καθώς και προσαρμοστικού ανοσοποιητικού συστήματος (Ventura *et al.*, 2017; Peng *et al.*, 2017; Moding *et al.*, 2013).

Ανάμεσα στις πιο κοινές και πρώιμες παρενέργειες της ακτινοθεραπείας σε ιστό είναι η δερματίτιδα, η βλεννογονίτιδα, η πνευμονίτιδα καθώς και η μείωση του αριθμού των κυττάρων του αίματος (Wirsdörfer and Jendrossek, 2017; Bickelhaupt *et al.*, 2017). Στην περίπτωση των όψιμων παρενεργειών, η χρόνια φλεγμονή οδηγεί σε ίνωση του δέρματος όπου

παρατηρείται εκτεταμένη παραγωγή πρωτεϊνών από ινοβλάστες, με αποτέλεσμα την επίμονη και παρατεταμένη επούλωση βλάβης (Abdollahi *et al.*, 2005). Εκτός από την δερματική ίνωση, στις όψιμες παρενέργειες ακτινοθεραπείας, οι οποίες είναι συνήθως μη αναστρέψιμες, περιλαμβάνονται οι αγγειακές και νευρικές βλάβες, η ατροφία ιστών, η νέκρωση καθώς και οι δευτερογενής κακοήθειες (Bentzen, 2006 ; Khanna, 2015) (Εικόνα 1.20).



Εικόνα 1.20. Κυτταρικές και ιστικές βλάβες μετά από έκθεση σε ακτινοβολία (De Ruyscher *et al.*, 2019).

1.3.2. Ακτινοθεραπεία και δερματική τοξικότητα

Η ιονίζουσα ακτινοβολία χρησιμοποιείται για την ίαση διαφόρων κακοηθειών καθώς και για την παρεμπόδιση υποτροπών και μεταστάσεων. Ωστόσο, η ανάπτυξη δερματικών βλαβών από την ακτινοβολία είναι από τις πιο σημαντικές παρενέργειες της ακτινοθεραπείας και συνδέονται με την τεχνική, τη συνολική θεραπευτική δόση, τον όγκο και τις ατομικές μεταβολές στη θεραπεία (Ang and Wilder, 2003; Hall and Cox, 2003).

1.3.2.1. Κλίμακα ταξινόμησης δερματικών αντιδράσεων (RISRs)

Σύγχρονες μελέτες αποδεικνύουν ότι το >70% των ασθενών υποβάλλονται σε ακτινοθεραπεία η οποία σχετίζεται άμεσα με δερματικές αντιδράσεις γνωστές και ως RISRs (radiation-induced skin reactions) (Vaz *et al.*, 2007). Οι RISRs μπορούν να χαρακτηριστούν ως οξείες ή χρόνιες ενώ με βάση το βαθμό της σοβαρότητάς τους ταξινομούνται σε 4

κατηγορίες - στάδια σύμφωνα με τα κοινά κριτήρια τοξικότητας για ανεπιθύμητες παρενέργειες του εθνικού αντικαρκινικού ινστιτούτου (NCI CTCAE version 3.0). Πιο συγκεκριμένα, η 1^η κατηγορία περιλαμβάνει δερματικές αλλαγές όπως είναι η ξηρή απολέπιση με γενικευμένο ερύθημα. Στη 2^η κατηγορία ανήκουν τα συμπτώματα του έντονου ερυθήματος και της ανομοιόμορφης υγρής απολέπισης. Υγρή απολέπιση μπορεί να εμφανιστεί σε περίπτωση ακτινοβολήσης συσσωρευτικής ακτινοθεραπευτικής δόσης ≥ 40 Gy σε πτυχές δέρματος. (Mendelsohn *et al.*, 2002). Η 3^η βαθμίδα περιλαμβάνει υγρή απολέπιση εκτός των πτυχών του δέρματος και η 4^η κατηγορία έλκη, αιμορραγία και νέκρωση του δέρματος (Hymes *et al.*, 2006). Στις χρόνιες δερματικές αντιδράσεις από ακτινοθεραπεία ανήκουν οι χρόνιες εξελκώσεις και βλάβες, ίνωση, τηλαγγειεκτασία, δευτερογενείς κακοήθειες και κεράτωση του δέρματος (Martin *et al.*, 2016). Οι χρόνιες δερματικές αντιδράσεις είναι το τελικό στάδιο αντιδράσεων, διαρκούν από μήνες έως χρόνια και εξαρτώνται περισσότερο από τον τύπο του δέρματος, την περιοχή που ακτινοβολείται, τον όγκο (volume), το κλάσμα και το θεραπευτικό σχήμα της ακτινοβολίας παρά από τη συνολική θεραπευτική δόση (Archambeau *et al.*, 1995) (Εικόνα 1.21.).



Εικόνα 1.21. Ασθενείς με δερματικές αντιδράσεις διαφόρων κατηγοριών. 1) ασθενής με οξεία δερματίτιδα από ακτινοβολία, κλίμακας 1 (Mesía *et al.*, 2009), 2) ασθενής με οξεία δερματίτιδα από ακτινοβολία, με μέτριο βαθμό ερυθήματος και αποξηραμένη ξηρή απολέπιση, κλίμακας 2 (Hymes *et al.*, 2006) και 3) ασθενής με οξεία δερματίτιδα από ακτινοβολία και συνεχόμενη υγρή απολέπιση, κλίμακας 3 (Hymes *et al.*, 2006).

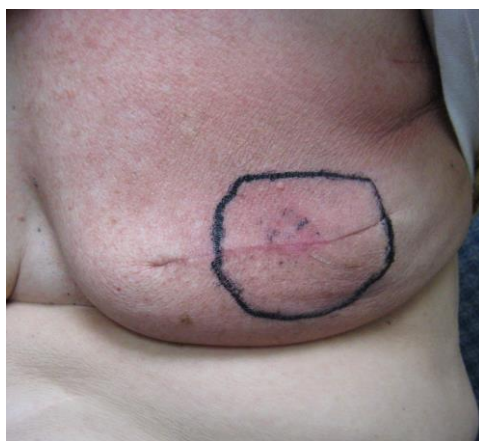
1.3.2.2. Ακτινοθεραπεία και τραυματισμός επιθηλίου

Η επίδραση της ακτινοθεραπείας οδηγεί σε επιθηλιακό τραυματισμό προκαλώντας δερματικές βλάβες και καταστροφή των μεμβρανών του βλεννογόνου. Κερατινοκύτταρα της βασικής στιβάδας, βλαστικά κύτταρα θυλάκων τριχών και μελανοκύτταρα είναι κατηγορίες κυττάρων του δέρματος σημαντικά ευαίσθητες στην ακτινοβολία. Συνεπώς, η επιδερμίδα χάνει την ιδιότητα της για αυτο-επιδιόρθωση των κατεστραμμένων ιστών μετά από την επίδραση της

ακτινοθεραπείας (Hymes *et al.*, 2006). Επιπλέον, οι αλληπάλληλες εκθέσεις στην ακτινοβολία δεν παρέχουν τον κατάλληλο χρόνο στα κύτταρα ώστε να επιδιορθώσουν κάποια βλάβη στον ιστό ή στο DNA, καταλήγοντας σε δερματίτιδα. Το γεγονός ότι η δερματίτιδα είναι από τις πιο συνήθεις παρενέργειες της ακτινοθεραπείας, καθιστά την εν λόγω θεραπεία ιδιαίτερα περίπλοκη σε περιπτώσεις κακοηθειών όπως είναι του μαστού, περινέου, κεφαλής και τραχήλου (Naylor and Mallett, 2001). Οι πιο πρώιμες αλλαγές που παρατηρούνται στο δέρμα είναι το ερύθημα, ξηρή και υγρή απολέπιση ενώ οι πιο όψιμες που συναντώνται είναι οι μεταβολές του χρώματος στο δέρμα, τηλαγγειεκτασία, αλωπεκία, ατροφία, ίνωση και έλκωση (British Columbia Cancer Agency, 2020) (Εικόνες 1.22, 1.23, 1.24 και 1.25). Επιπλέον, παράγοντες όπως είναι η παχυσαρκία, η χημειοθεραπεία και υψηλή μάζα σώματος αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης δερματίτιδας (Hymes *et al.*, 2006).

Στη βλεννογονίτιδα, η απώλεια βλαστικών κυττάρων από τη βασική στιβάδα του επιθηλίου αναπληρώνεται από κύτταρα των επιφανειακών στιβάδων τα οποία φυσιολογικά θα απορρίπτονταν. Η καταστροφή του επιθηλίου οδηγεί σε βλεννογονίτιδα η οποία σε περιπτώσεις ακτινοβόλησης κεφαλής - τραχήλου ή οισοφάγου παρεμποδίζει τη στοματική λήψη τροφής (Hymes *et al.*, 2006).

Τέλος, ένα ακόμη φαινόμενο που παρατηρείται είναι η 'ανάκληση' ακτινοβολίας όπου σε σύντομο χρονικό διάστημα αναπτύσσεται ερεθισμός σε ένα ήδη ακτινοβολούμενο πεδίο μόλις μετά την έναρξη χημειοθεραπευτικών παραγόντων όπως είναι η δοξορουβικίνη (αδριαμυκίνη), η φθοροουρακίλη, η υδροξουρία (Hydrea), η μεθοτρεξάτη και η πακλιταξέλη (Taxol) (Berkey, 2010)



Εικόνα 1.22. Ερύθημα μετά από ακτινοθεραπεία. Η παραπάνω δερματική αντίδραση εμφανίστηκε στον αριστερό μαστό ασθενούς ηλικίας 76 ετών, η οποία έχει υποβληθεί σε ακτινοθεραπεία (5,750 cGy) για την αντιμετώπιση πορογενούς διηθητικού καρκινώματος μαστού (Berkey, 2010).



Εικόνα 1.23. Ξηρή απολέπιση μετά από την επίδραση της ακτινοθεραπείας. Το σύμπτωμα εμφανίστηκε την τελευταία μέρα της ακτινοθεραπείας (6,120 cGy) σε γυναίκα ασθενή ηλικίας 64 ετών με πορογενή διηθητικό καρκίνωμα στον αριστερό μαστό (Berkey, 2010).



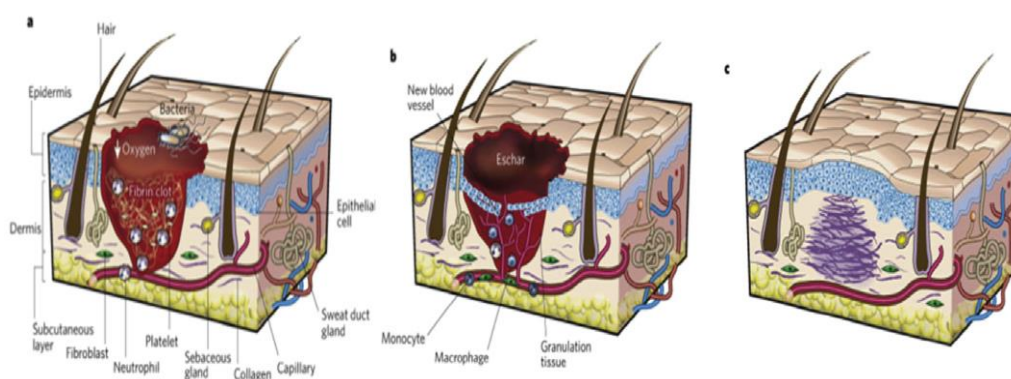
Εικόνα 1.24. Ξηρή απολέπιση κατόπιν ακτινοθεραπείας. Η δερματική αντίδραση παρουσιάστηκε σε γυναίκα ασθενή ηλικίας 69 ετών η οποία υπεβλήθη σε ακτινοθεραπεία (4,320 cGy) για πορογενές διηθητικό καρκίνωμα *in situ* (Berkey, 2010).



Εικόνα 1.25 Τηλαγγειεκτασία ως παρενέργεια ακτινοθεραπείας. Παρατηρήθηκε σε γυναίκα ασθενή ηλικίας 73 ετών η οποία έχει υποβληθεί σε εξωτερική ακτινοθεραπεία (1,440 cGy) για πορογενές διηθητικό καρκίνωμα στο δεξιό μαστό (Berkey, 2010).

1.3.2.3. Παράγοντες ‘κλειδιά’ στην παθογενή επούλωση δερματικής βλάβης: κυτταρική απόπτωση, ινοβλάστες, MMPs, μικροαγγειακές βλάβες και υποξία ιστών

Η διαδικασία της επούλωσης δερματικής βλάβης είναι μια ιδιαίτερα περίπλοκη και συντονισμένη διαδικασία η οποία διαδραματίζεται σε τρία αλληλοεπικαλυπτόμενα βασικά στάδια: 1) φλεγμονή, 2) πολλαπλασιασμός και 3) αναδιαμόρφωση. Ωστόσο, η χορήγηση της ακτινοβολίας ιοντίζει τα ηλεκτρόνια με αποτέλεσμα η διπλή έλικα του DNA να υφίσταται θραύσεις καθώς και να παράγονται ελεύθερες ρίζες, προκαλώντας βλάβες σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα. Συνεπώς, η ακτινοβολία διαταράσσει τη διαδικασία επούλωσης στα διάφορα στάδια με τις πιο αξιοσημείωτες παθολογικές αλλαγές να αφορούν την κυτταρική εξάντληση, μεταβολές της εξωκυττάριας κάψας και μικροαγγειακές βλάβες, προκαλώντας τοπική υποξία στους ιστούς (Jacobson *et al.*, 2017) (Εικόνα 1.26.).



Εικόνα 1.26. Τα τρία βασικά στάδια επούλωσης δερματικής βλάβης: φλεγμονή, πολλαπλασιασμός και αναδιαμόρφωση (Gurtner *et al.*, 2008).

Τα κύτταρα στις φάσεις G2 και M του κυτταρικού κύκλου εμφανίζουν τον υψηλότερο βαθμό ευαισθησίας στην ιονίζουσα ακτινοβολία. Όσον αφορά το δέρμα, η ιονίζουσα ακτινοβολία στοχεύει στα κύτταρα της βασικής στιβάδας της επιδερμίδας καθότι διαιρούνται με ταχύτερους ρυθμούς. Η επαγόμενη από την ακτινοβολία απόπτωση επιβραδύνει σημαντικά το ρυθμό επούλωσης μίας δερματικής βλάβης δεδομένου ότι η ακτινοβολία επηρεάζει δυσμενώς το ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων, επιτυγχάνοντας την κυτταρική

εξάντληση στην ακτινοβοληθείσα περιοχή. Επιπλέον, μελέτες αποδεικνύουν ότι η αυξημένη έκφραση δευτερογενών αγγελιοφόρων μορίων τα οποία μεσολαβούν για την απόπτωση καθώς και η επακόλουθη απόπτωση και παύση του κυτταρικού κύκλου συμπίπτουν χρονικά με το σχηματισμό κοκκιώδους ιστού, καθυστερώντας τη διαδικασία επούλωσης της βλάβης. Ωστόσο, οι μακροχρόνιες βλάβες πιθανότατα να οφείλονται στην απόπτωση των δερματικών βλαστικών κυττάρων (Jacobson *et al.*, 2017).

Στη διαδικασία επούλωσης δερματικής βλάβης, ιδιαίτερη προσοχή έχει δοθεί στους ινοβλάστες. Σύμφωνα με τους Rudolph *et al.*, οι ινοβλάστες μετά από την επίδραση της ακτινοβολίας, υφίστανται εσωτερικές και μόνιμες βλάβες καθότι η ικανότητά τους για την αντιγραφή του DNA είναι μειωμένη και οι ρυθμοί ανάπτυξής τους χαμηλοί (Rudolph *et al.*, 1988; Rudolph *et al.*, 1982). Όσον αφορά την κατηγορία των μυοϊνοβλαστών, έχει παρατηρηθεί ότι η ακτινοβολία επιδρά αρνητικά στη διαφοροποίηση του τερματικού άκρου των ινοβλαστών με αποτέλεσμα τη μειωμένη συσταλτικότητα των μυοϊνοβλαστών και κατά επέκταση το μειωμένο ρυθμό επούλωσης δερματικών βλαβών (Jacobson *et al.*, 2017).

Επιπρόσθετα, οι ινοβλάστες είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή κολλαγόνου και άλλων συστατικών της εξωκυττάριας κάψας. Αν και παρατηρείται μείωση στον αριθμό και στη δραστηριότητα των ινοβλαστών λόγω της ακτινοβολίας, οι επιπτώσεις στη σύνθεση του κολλαγόνου φαίνονται παράδοξες. Αμέσως μετά τον τραυματισμό, η περιεκτικότητα σε κολλαγόνο και η ανθεκτικότητα των ιστών μειώνονται στις ακτινοβολημένες περιοχές. Ωστόσο, δύο εβδομάδες μετά από την έκθεση σε ακτινοβολία, η περιεκτικότητα σε κολλαγόνο αυξάνεται. Το παρόν φαινόμενο της δυσλειτουργικής έκφρασης του κολλαγόνου οφείλεται στη β-κατενίνη, η οποία είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας υπεύθυνος για τη ρύθμιση της έκφρασης του κολλαγόνου και άλλων γονιδίων σχετικών με την αναδιαμόρφωση ιστών (Jacobson *et al.*, 2017).

Επιπλέον, στη διαδικασία επούλωσης έχει μελετηθεί και ο ρόλος των μεταλλοπρωτεασών (MMPs) της κάψας και ενδοπεπτιδασών τα οποία διασπούν το κολλαγόνο. Συγκεκριμένα, η υπερέκφραση των MMPs σε πιο μετέπειτα στάδια της επούλωσης αποτελεί έναν μηχανισμό για τον καθυστερημένο σχηματισμό του κοκκιώδους ιστού καθώς και για τη μειωμένη ανθεκτικότητα που διαθέτει ο ιστός κατά την αναδιαμόρφωσή του. Συνήθως αυξημένα επίπεδα MMPs εντοπίζονται σε ακτινοβολημένες περιοχές, χωρίς ωστόσο η δράση τους να αντισταθμίζεται από αναστολείς των MMPs, (TIMPs), διαταράσσοντας την απαραίτητη για την επούλωση ισορροπία και τη δύναμη ενός ιστού (Jacobson *et al.*, 2017).

Τέλος, οι μικροαγγειακές βλάβες και η υποξία των ιστών εμπλέκονται στην παθογένεια των ιστών από ακτινοβολία. Μορφολογικά, οι μεταβολές περιλαμβάνουν δυσμορφίες στα αγγεία, μειωμένη ροή αίματος, διάτρητο ενδοθήλιο και απόφραξη αγγείων. Η ιονίζουσα ακτινοβολία αυξάνει τη διαπερατότητα των μικρών αγγείων, δημιουργώντας οίδημα στο περιβάλλον των ιστών και πάχυνση των βασικών μεμβρανών. Ακόμη, μειώνεται η ανταλλαγή

αερίων και μεταβολιτών, με αποτέλεσμα τη μεταβολή του εξωκυττάριου περιβάλλοντος και την υποξία των ιστών. Μελέτες έχουν δείξει πως η υποξία των ιστών είναι μια παροδική κατάσταση ενώ παρατηρείται βελτίωση των διαδερμικών επιπέδων οξυγόνου για αρκετές εβδομάδες μετά από τη προκληθείσα βλάβη της ακτινοβολίας. Ωστόσο, υπάρχουν υποθέσεις ότι η υποξία μπορεί να είναι μια χρόνια κατάσταση κατά τη διάρκεια της οποίας παράγονται δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS) και διεγείρεται η παραγωγή του TGF- β παράγοντα, μια σημαντικής κυτοκίνης που συμμετέχει στην ίνωση (Jacobson *et al.*, 2017).

1.3.2.4. Η αναγεννητική ικανότητα στα διάφορα είδη ιστών

Ο απαιτούμενος χρόνος εμφανίσεως μιας βλάβης διαφέρει χρονικά στα διάφορα είδη ιστών. Ιστοί που παρουσιάζουν οξείες παρενέργειες όπως είναι ο αιμοποιητικός και εμβρυϊκός, οι θύλακες τριχών και συγκεκριμένα στρώματα του εντερικού επιθηλίου και του δέρματος, χαρακτηρίζονται από σημαντική δραστηριότητα βλαστικών κυττάρων και κατά επέκταση υψηλή αναγεννητική ικανότητα. Στις συγκεκριμένες κατηγορίες ιστών, η ακτινοβολία επάγει την πρόωμη p53-επαγόμενη απόπτωση και μετέπειτα την όψιμη, περιορίζοντας τον πληθυσμό κατεστραμμένων κυττάρων τα οποία θα αντικατασταθούν από τα εναπομείναντα βλαστικά κύτταρα. Αντιθέτως, ιστοί με αργούς ρυθμούς αναγέννησης όπως είναι ο εγκέφαλος ή είναι δομημένοι από συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους όπως είναι οι ινοβλάστες, αποκρίνονται στην ενεργοποίηση της p53 πρωτεΐνης μέσω μόνιμης παύσης του κυτταρικού κύκλου αντί απόπτωσης, περιορίζοντας την αναγέννηση του κατεστραμμένου ιστού (Gudkov and Komarova, 2003).

1.3.3. Μηχανισμοί της επαγόμενης από την ακτινοβολία δερματικής τοξικότητας

1.3.3.1. Οι μηχανισμοί των δερματικών αντιδράσεων από ακτινοθεραπεία: φλεγμονώδης αντίδραση και οξειδωτικό στρες

Η φλεγμονώδης αντίδραση και το οξειδωτικό στρες είναι οι δύο μηχανισμοί που εμπλέκονται στις δερματικές αντιδράσεις από ακτινοβολία ενώ όπως φαίνεται η μεταξύ τους αλληλοεπίδραση οδηγεί σε προώθηση του ενός μηχανισμού από τον άλλον (Εικόνα) Najafi *et al.*, 2018; Zhao and Robbins, 2009). Όπως έχει αναφερθεί στην ενότητα 1.1., η έκθεση σε ακτινοβολία προκαλεί κυτταρικές βλάβες με αποτέλεσμα τα κύτταρα να οδηγούνται στον κυτταρικό θάνατο μέσω διαφόρων οδών, κυρίως μέσω της μιτωτικής καταστροφής,

προκαλώντας φλεγμονή και χρόνια οξειδωτικό στρες. Στις χρόνιες φάσεις, η φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες μέσω α) των αλλαγών που προκαλούν στις κυτοκίνες και στον κυτταρικό κύκλο και β) των βλαβών στο DNA, διατηρούν τον κατάλληλο “καταρράκτη” μεταβολών ώστε να προκληθούν σε μεταγενέστερο χρόνο δερματικές αντιδράσεις. Η σταδιακή εξέλιξη, η μονιμότητα και η μη αναστρεψιμότητα αποτελούν τα πιο βασικά χαρακτηριστικά των χρόνιων δερματικών αντιδράσεων μετά από ακτινοθεραπεία ενώ η μη αναστρεψιμότητα της βλάβης φαίνεται να επιβαρύνει σημαντικά την ποιότητα ζωής του ασθενούς (Straub *et al.*, 2015).

1.3.3.1.1. Η δερματική φλεγμονώδης αντίδραση

Φλεγμονώδης αντίδραση προκαλείται γενικά σε όλες τις δερματικές αντιδράσεις και πυροδοτείται κατά τη διάρκεια της 1^{ης} περιόδου της ακτινοθεραπείας. Η πρόωρη φλεγμονώδης αντίδραση από ακτινοβολία προκαλεί την παραγωγή μίας σειράς μεταβιβαστών φλεγμονής όπως είναι οι προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες (IL-1, IL-3, IL-5, IL-6, ο παράγοντας νέκρωσης όγκων [TNF-α]), χημειοκίνες (IL-8), μόρια κυτταρικής προσκόλλησης (CAM-1, ε-σελεκτίνη και πρωτεΐνες προσκόλλησης αγγειακών κυττάρων) καθώς και την έκφραση του υποδοχέα κινάσης τυροσίνης. Οι παραπάνω μεσολαβητές της δερματικής φλεγμονής επάγουν μια τοπική φλεγμονώδη απόκριση προσελκύοντας ηωσινόφιλα και ουδετερόφιλα, καταρρίπτοντας συγχρόνως οποιαδήποτε προστασία απέναντι στη δερματική φλεγμονή με αποτέλεσμα να διαιωνίζονται οι δερματικές βλάβες (Peter, 2015). Ωστόσο, από όλες τις κυτοκίνες, ιδιαίτερο θεραπευτικό ενδιαφέρον στην αντιμετώπιση των δερματικών αντιδράσεων παρουσιάζει η IL-1, η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση δερματικών αντιδράσεων από ακτινοθεραπεία ενώ η παραγωγή της στο δέρμα, ρυθμίζεται από κυτταρικές ομάδες (μονοκύτταρα, μακροφάγα, ινοβλάστες και κερατινοκύτταρα) και διάφορους μεσολαβητές της ανοσολογικής απόκρισης. Όπως έχει αποδειχθεί μέχρι στιγμής, απώλεια έκφρασης της IL-1 ή του υποδοχέα της προκαλεί λιγότερη φλεγμονή ή λιγότερο σημαντικές δερματικές παθήσεις σε μεταγενέστερο χρονικό διάστημα (Janko *et al.*, 2012).

Κατά την οξεία φάση των δερματικών αντιδράσεων, οι διάφορες κυτταρικές ομάδες που βρίσκονται στην ακτινοβοληθείσα περιοχή, αποκρίνονται στην ακτινοβολία μέσω ενεργοποίησης των κατάλληλων γονιδίων και πρωτεϊνών άμεσης απόκρισης, περιλαμβάνοντας αυξητικούς παράγοντες, χημειοκίνες και κυτοκίνες. Τέλος, οι αυξητικοί παράγοντες θα προσελκύσουν φλεγμονώδη κύτταρα τα οποία θα συμμετάσχουν στην ανάπτυξη των δερματικών αντιδράσεων (Wei *et al.*, 2018).

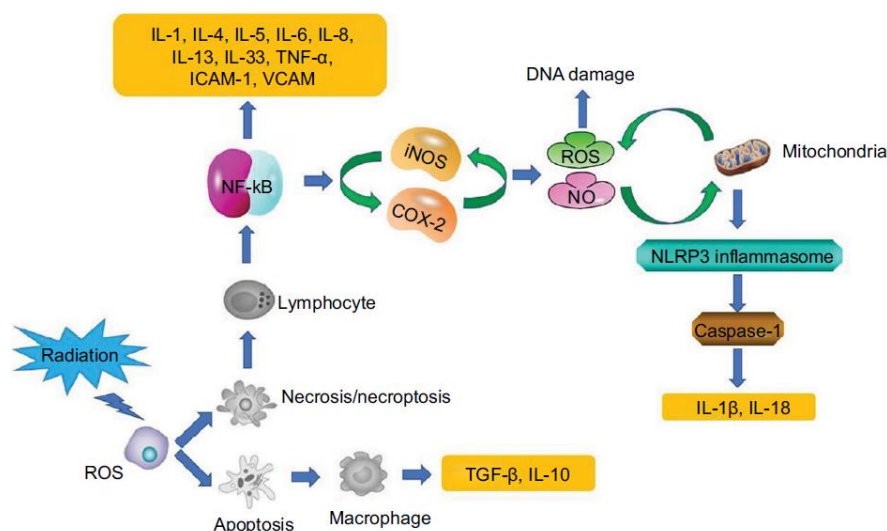
1.3.3.1.2. Ο ρόλος του NLRP3 φλεγμονοσώματος στη δερματική φλεγμονώδη αντίδραση

Το NLRP3 είναι ένα φλεγμονοσώμα αποτελούμενο από τρεις βασικές περιοχές: τη θέση δέσμευσης νουκλεοτιδίου, τη καρβοξυ-τερματική περιοχή με επαναλήψεις λευκίνης και την περιοχή δέσμευσης πυρίνης 3. Το NLRP3 φλεγμονοσώμα είναι ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο του οποίου ο ρόλος στις δερματικές αντιδράσεις σχετίζεται με την ενεργοποίηση της κασπάσης 1, η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε ωρίμανση των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών, IL-1 και IL-18 (Han *et al.*, 2017; Shin *et al.*, 2016; Ahmad *et al.*, 2017). Σύμφωνα με μελέτες των Allam *et al.* η επαγόμενη από την ακτινοβολία μιτοχονδριακή απόπτωση οδηγεί σε απελευθέρωση του οξειδωμένου μιτοχονδριακού DNA στο κυτταρόπλασμα όπου προσδέεται με το NLRP3 φλεγμονοσώμα με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος και την πυροδότηση δερματικής φλεγμονώδους αντίδρασης (Allam *et al.*, 2014).

1.3.3.1.3. Η ίνωση του δέρματος στη φλεγμονώδη αντίδραση

Η επαγόμενη από ακτινοβολία ίνωση του δέρματος ξεκινάει από φλεγμονή η οποία αναπτύσσεται μετά από την επίδραση της ιονίζουσας ακτινοβολίας και διαρκεί από μήνες έως χρόνια (Straub *et al.*, 2015). Οι μεσολαβητές της ανοσολογικής απόκρισης οι οποίοι εμπλέκονται στην ίνωση είναι οι TNF- α , IL-6 και IL-1 ενώ ο TGF- β και ο αυξητικός παράγοντας αιμοπεταλίων (PDGF) ρυθμίζουν τη δραστηριότητα των ινοβλαστών και κατά επέκταση την παραγωγή πρωτεϊνών της εξωκυττάριας κάψας (Bentzen, 2006). Στη συγκεκριμένη περίπτωση της δερματικής φλεγμονής, οι ινοβλάστες παίζουν ρόλο κλειδί στην ανάπτυξη μεταγενέστερων ινωδών αλλαγών οι οποίες προκύπτουν από την έκθεση σε ακτινοβολία (Martin *et al.*, 2000) Παραδείγματα σχετικά με το ρόλο των ινοβλαστών αποτελούν η ατροφία, η σύσπαση και ίνωση του δέρματος από μόνιμα αδιαφοροποίητους ινοβλάστες (Tibbs, 1997). Όσον αφορά τον αυξητικό παράγοντα TGF- β , πρόκειται για ρυθμιστική πρωτεΐνη η οποία ελέγχει την επούλωση δερματικής βλάβης, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση κυττάρων καθώς και τη σύνθεση πρωτεϊνών εξωκυττάριας κάψας σε φυσιολογικό ιστό κατά τη διάρκεια φλεγμονώδους αντίδρασης (Pohlers *et al.*, 2009). Επιπρόσθετα, ο TGF- β παράγοντας εκτός από τους ινοβλάστες, επηρεάζει και άλλες κατηγορίες κυττάρων όπως είναι για παράδειγμα τα ενδοθηλιακά και επιθηλιακά κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα, ο TGF- β παράγοντας πυροδοτεί τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων ενώ αναστέλλει την αύξηση των επιθηλιακών κυττάρων. Εκτός από τον TGF- β παράγοντα και την ίνωση του δέρματος, στις δερματικές αντιδράσεις συμμετέχουν και άλλοι αυξητικοί παράγοντες όπως είναι ο ινσουλινομορφος αυξητικός παράγοντας (IGF-1) και οι αυξητικοί παράγοντες συνδετικών ιστών (CTGFs). Ωστόσο, μία θεραπευτική προσέγγιση για

την αντιμετώπιση δερματικών αντιδράσεων παραμένει η αναστολή των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών όπως είναι οι MCP-1, κυκλοοξυγονάση 2 (COX-2) ενισχύοντας την ανοχή του δέρματος στην ακτινοβολία (Chen *et al.*, 2010) (Εικόνα 1.27).



Εικόνα 1.27. Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στις RISRs: φλεγμονώδης αντίδραση και οξειδωτικό στρες (Wei *et al.*, 2018).

1.3.3.1.4. Οξειδωτικό στρες και δερματικές αντιδράσεις

Εκτός από τη φλεγμονώδη αντίδραση, το χρόνια οξειδωτικό στρες επίσης σχετίζεται με τις πρώιμες και όψιμες δερματικές αντιδράσεις (RISRs). (Yahyaoui *et al.*, 2018a; Najafi *et al.*, 2017). Δεδομένου ότι το 80% των κυττάρων και των ιστών αποτελείται από νερό, η δημιουργία βλαβών σε έναν ιστό κατά την έκθεση στη χαμηλή ενέργεια γραμμικής μεταφοράς οφείλεται στη ραδιόλυση του νερού και παραγωγή των δραστικών ριζών ROS και RNS. (Vorotnikova *et al.*, 2010).

Υπό φυσιολογικές συνθήκες οι ROS και RNS μεσολαβούν σε διάφορες λειτουργίες του κυττάρου όπως είναι η ανοσολογική απόκριση, η κυτταρική σηματοδότηση, μικροβιακή άμυνα, διαφοροποίηση, κυτταρική προσκόλληση και απόπτωση (Bae *et al.*, 2011). Ωστόσο, κατά την έκθεση σε ακτινοβολία οι ROS ενώσεις υφίστανται διάφορες μοριακές αλλαγές σχηματίζοντας παράγωγα ριζών οξυγόνου, προκαλούν βλάβες σε μακρομόρια όπως είναι το DNA, πρωτεΐνες και λιπίδια όπως επίσης ενεργοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες άμεσης απόκρισης και σηματοδοτικά μονοπάτια. Το αποτέλεσμα των παραπάνω ενεργειών επαγόμενων από τις ROS ενώσεις είναι η δημιουργία βλαβών στον ιστό του δέρματος.

Επιπλέον, οι ρίζες οξυγόνου και αζώτου, ROS και RNS, ενισχύουν την έκφραση των ενζύμων COXs (κυκλοοξυγονάση), NOS (συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου), LOXs (λυσουλ-οξειδάσης), και οξειδάσης του NADPH, με καθένα από αυτά να εκφράζεται με διαφορετικό τρόπο στα διάφορα κύτταρα, ιστούς και όργανα (Vorotnikova *et al.*, 2010). Η οξειδάση του NADPH είναι μια μεμβρανο-συνδεδεμένη οξειδοαναγωγή η οποία μεταφέρει ένα ηλεκτρόνιο από το NADPH στο μόριο του οξυγόνου. Ωστόσο, μετά από έκθεση σε ακτινοβολία, εκτός από την οξειδάση του NADPH, συμμετέχουν και άλλες σημαντικές υποκατηγορίες ενζύμων της οξειδάσης του NADPH (NOX1–5, DUOX1 και DUOX2) στην αναπνευστική αλυσίδα (Drummond *et al.*, 2011). Τα συγκεκριμένα ένζυμα είναι ιδιαίτερα σταθερά, ενεργοποιούνται από κυτοκίνες και αυξητικούς παράγοντες ενώ παράγουν τις ROS ενώσεις μετά από την επίδραση της ακτινοβολίας. Παράδειγμα αποτελεί το ένζυμο NOX το οποίο ενεργοποιείται από μία σειρά φλεγμονωδών παραγόντων όπως κυτοκίνες (IL-1, TNF- α και IFN- γ), χημειοκίνες και αυξητικοί παράγοντες (TGF- β) αλλά και της αγγειοτενσίνης II (Panday *et al.*, 2015).

Υπό συνθήκες στρες, όπως είναι η φλεγμονή, η συνθάση του NO (iNOS) αποτελεί την κύρια πηγή NO, το οποίο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο οξειδωτικό στρες και στην καρκινογένεση. Πιο αναλυτικά, το NO παράγεται από τα μακροφάγα μέσω του ενζύμου της συνθάσης του NO (iNOS) ως απόκριση μιας φλεγμονώδους αντίδρασης. Το NO είναι ένα ιδιαίτερα δραστικό μόριο το οποίο αλληλοεπιδρά με το σουπεροξειδίο ($O_2^{\cdot-}$) των μιτοχονδρίων, σχηματίζοντας τον υπεροξυνιτρίτη ($ONOO^{\cdot-}$). Ωστόσο, τα υψηλά επίπεδα NO ανταγωνίζονται το O_2 στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, αναστέλλοντας τη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας στα μιτοχόνδρια. Επιπλέον, τα υψηλά επίπεδα NO μπορούν να οδηγήσουν σε αυξημένα επίπεδα παραγωγής σουπεροξειδίου, ενισχύοντας με αυτόν τον τρόπο το οξειδωτικό στρες. Τέλος, τα υψηλά επίπεδα NO σχετίζονται άμεσα με τη χορηγούμενη δόση της ακτινοβολίας ενώ η υψηλότερη παραγωγή NO παρατηρείται τις πρώτες ώρες μετά την ακτινοθεραπεία (Ohta *et al.*, 2007).

Η άμεση έκθεση των φυσιολογικών κυττάρων στην ιονίζουσα ακτινοβολία ή στις ROS ενώσεις φέρει επιβλαβείς επιπτώσεις στο πυρηνικό και μιτοχονδριακό DNA με αποτέλεσμα το κύτταρο να οδηγείται στην απόπτωση είτε μέσω της μιτωτικής καταστροφής είτε της νέκρωσης (Pugin, 2012). Κατά την απόπτωση, παράγονται αντι-φλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως είναι οι IL-10 και ο TGF- β παράγοντας ενώ κατά τη νέκρωση απελευθερώνονται προ-φλεγμονώδη κυτοκίνες όπως είναι οι IL-1, IL-6, IL-8, IL-13, IL-33, ο TNF- α αυξητικός παράγοντας καθώς και άλλοι φλεγμονώδεις μεσολαβητές (Frey *et al.*, 2017). Η χρόνια φλεγμονή συνήθως υφίσταται αρκετό καιρό μετά από ακτινοθεραπεία, χωρίς το ανοσοποιητικό σύστημα να την καταστέλλει, ενώ συνδέεται με το χρόνια οξειδωτικό στρες το οποίο με τη σειρά του προκαλεί γενωμική αστάθεια και βλάβες στη φυσιολογική λειτουργία του δερματικού ιστού (Yahyaour *et al.*, 2018b).

1.4. Ο καρκίνος του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού ανήκει στις πιο συχνές μορφές καρκίνου ενώ είναι από τις κυριότερες αιτίες θνησιμότητας στις γυναίκες παγκοσμίως. Σύμφωνα με σύγχρονες εκτιμήσεις, $1,7 \times 10^6$ περιπτώσεις με καρκίνο του μαστού διαγιγνώσκονται, αντιπροσωπεύοντας το 12% του συνόλου των περιπτώσεων με καρκίνο ($14,1 \times 10^6$ περιπτώσεις με καρκίνο), ενώ 512.900 θάνατοι κατεγράφησαν το 2012, καθιστώντας τον καρκίνο του μαστού ως τον πιο κοινό καρκίνο σε παγκόσμια κλίμακα με το 15% των θανάτων στις γυναίκες να οφείλεται στον καρκίνο του μαστού (Torre *et al.*, 2015). Αξιοσημείωτο παραμένει το γεγονός ότι ο καρκίνος του μαστού δεν περιορίζεται μόνο στο γυναικείο φύλο καθότι το 0.8%-1% καρκίνων του μαστού προέρχεται από το ανδρικό φύλο (Gómez-Raposo *et al.*, 2010; Giordano *et al.*, 2002). Ωστόσο, τα ποσοστά ασθενών με καρκίνο του μαστού φαίνονται ιδιαίτερα υψηλά στις χώρες με χαμηλό εισόδημα, δεδομένου ότι το ήμισυ των περιπτώσεων που είχαν διαγνωσθεί με καρκίνο του μαστού το 2008 καθώς και το 60% των θανάτων προέρχονταν από χώρες με χαμηλό εισόδημα. Επιπλέον, σημαντικές διαφοροποιήσεις σημειώνονται στα ποσοστά επιβίωσης μεταξύ χωρών με υψηλό και χαμηλό εισόδημα. Συνολικά, ο εκτιμώμενος χρόνος επιβίωσης είναι 5 έτη για το 80% ασθενών από χώρες υψηλού εισοδήματος ενώ μόλις το 40% των ασθενών από χώρες χαμηλού εισοδήματος σημειώνει τον ίδιο χρόνο επιβίωσης (Ferlay *et al.*, 2015; Coleman *et al.*, 2008). Παρότι τα ποσοστά επιβίωσης ποικίλουν ευρέως, επικρατεί μια θετική τάση ως προς την αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού η οποία οφείλεται στις μεθόδους διαλογής, στην έγκαιρη διάγνωση και στις συνεχείς θεραπευτικές ανακαλύψεις (Ferlay *et al.*, 2015).

1.4.1. Αίτια και παθοφυσιολογία καρκίνου του μαστού

Συχνά αίτια ανάπτυξης καρκίνου του μαστού είναι η γενετική προδιάθεση, οι ορμόνες (οιστρογόνα και τεστοστερόνη), ατομικά χαρακτηριστικά (ηλικία, παθολογία μαστού, ατομικό ιστορικό) και περιβαλλοντικοί παράγοντες τα οποία αποτελούν συγχρόνως χρήσιμα εργαλεία για τα προγνωστικά μοντέλα τα οποία διαβαθμίζουν τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού (Shah *et al.*, 2014).

1.4.1.1. Αίτια εμφάνισης καρκίνου του μαστού

1.4.1.1.1. Γονιδιακό προφίλ καρκίνου του μαστού

Σύμφωνα με ευρήματα των επιδημιολογικών μελετών, το 12% των ασθενών με καρκίνο του μαστού έχουν στην οικογένειά τους ένα μέλος με καρκίνο του μαστού ενώ το 1% των ασθενών με καρκίνο του μαστού έχουν ένα ή περισσότερους συγγενείς που πάσχουν από καρκίνο του μαστού (Dumitrescu and Cotarla, 2005). Η αυξημένη συχνότητα εμφάνισης περιστατικών με καρκίνο του μαστού οφείλεται σε πληθώρα γονιδίων τα οποία συμβάλλουν σημαντικά στην παθοφυσιολογία του καρκίνου του μαστού. Τα γονίδια τα οποία φαίνεται ότι εμπλέκονται στην ανάπτυξη και εξέλιξη της συγκεκριμένης νόσου είναι γονίδια υψηλής διεισδυτικότητας (BRCA1, BRCA2, p53, PTEN, ATM, NBS1 ή LKB1) , γονίδια χαμηλής διεισδυτικότητας όπως είναι το P450 (CYP1A1, CYP2D6, CYP19), γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της οικογένειας της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GSTM1, GSTP1), γονίδια μεταβολισμού ενός άνθρακα και αλκοόλης (ADH1C και MTHFR), γονίδια επιδιόρθωσης βλαβών του DNA (XRCC1, XRCC3, ERCC4/XPF) καθώς και γονίδια τα οποία κωδικοποιούν σηματοδοτικά μόρια όπως είναι οι υποδοχείς προγεστερόνης, οιστρογόνων, τον παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF-alpha) καθώς και τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSP70) (Dumitrescu and Cotarla, 2005). Ωστόσο, στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού, το καρκινικό αντιγόνο το οποίο συναντάται αρκετά συχνά είναι ο αυξητικός επιδερμικός παράγοντας HER-2/neu. Παλαιότερες μελέτες απέδειξαν ότι το πρωτο-ογκογονίδιο HER-2/neu ενισχύεται και υπερεκφράζεται στο 20-30% των διηθητικών καρκίνων του μαστού ενώ σχετίζεται με χαμηλή πρόγνωση και σύντομη επιβίωση (Hung *et al.*, 1999). Εκτός από τον καρκίνο του μαστού, ο αυξητικός επιδερμικός παράγοντας HER-2/neu υπερεκφράζεται και σε άλλους τύπους καρκίνου όπως είναι των ωοθηκών, του γαστρικού και του στόματος (Gancberg *et al.*, 2000).

Οι μεταλλάξεις των γονιδίων BRCA1, BRCA2, p53, PTEN και STK11 οδηγούν σε σύνδρομα (Li-Fraumeni, Cowden και Peutz-Jegher) τα οποία δημιουργούν την κατάλληλη προδιάθεση για καρκίνο του μαστού, αυξάνοντας τον κίνδυνο κατά 40-50%. Επιπλέον, η νευρωϊνωμάτωση τύπου 1 (NF1) και η απώλεια ετεροζυγωτίας του γονιδίου (CDH-1) E-καδερίνης είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση καρκίνου του μαστού (Sharif *et al.*, 2007). Ωστόσο, το ήμισυ των συνδρόμων που προκαλούν καρκίνο του μαστού οφείλονται στις μεταλλάξεις των γονιδίων BRCA1 και BRCA2. Επιπλέον, μεταλλάξεις που προκύπτουν από απώλεια νουκλεοτιδίων αποτελούν μεγαλύτερο κίνδυνο για καρκίνο του μαστού ενώ φορείς με μεταλλάξεις στο γονίδιο BRCA2 έχουν πιθανότητες από 65% έως 81% (Ford *et al.*, 1998; Antoniou *et al.*, 2003; King *et al.*, 2003). Γονίδια τα οποία συμβάλλουν κατά 20-40% στην ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού αφορούν ομόζυγες μεταλλάξεις του γονιδίου ATM, σωματικές μεταλλάξεις των ογκοκατασταλτικών γονιδίων CHEK2, BRCA1 καθώς και των

PALB2 και BRIP1 γονιδίων τα οποία τροποποιούν το γονίδιο BRCA2 (Partners and localizers of BRCA2) (Thompson *et al.*, 2005; Seal *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 2011). Συνολικά, η γενετική προδιάθεση μπορεί να αυξήσει σημαντικά τον κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου του μαστού καθότι το 20-25% των ασθενών έχουν οικογενειακό ιστορικό ενώ μόλις το 5-10% των ασθενών εμφανίζει αυτοσωμική επικρατή κληρονομικότητα (Lynch and Lynch, 1986; Margolin *et al.*, 2006).

1.4.1.1.2. Ο ρόλος των ορμονών στον καρκίνο του μαστού

Τα επίπεδα των ενδογενών οιστρογόνων μεταβάλλονται καθ'όλη τη διάρκεια ζωής μιας γυναίκας ενώ η εμπλοκή τους στον καρκίνο του μαστού είναι διττή δεδομένου ότι αναφέρονται ως η επικρατέστερη αιτία εμφάνισης καρκίνου του μαστού ενώ συγχρόνως λειτουργούν ως ασπίδα απέναντι στο συγκεκριμένο τύπο καρκίνου. Συγκεκριμένα, οι ηλικίες της εμμηνόρροιας, της πρώτης εγκυμοσύνης και της εμμηνόπαυσης καθώς και ο θηλασμός είναι γεγονότα κατά τη διάρκεια των οποίων μεταβάλλονται τα επίπεδα των οιστρογόνων. Τέλος, εκτός από τα οιστρογόνα, μία ακόμη ορμόνη η οποία συμβάλλει στην εμφάνιση του καρκίνου του μαστού είναι η τεστοστερόνη (Shah *et al.*, 2014).

Στην περίπτωση της εμμηνόρροιας, πρόωρη έμμηνος ρύση αποτελεί παράγοντα κινδύνου για τις γυναίκες που βρίσκονται είτε προ- είτε μετά την εμμηνόπαυση. Έχει διαπιστωθεί πώς η καθυστέρηση της εμμηνόρροιας για 2 χρόνια μειώνει τις πιθανότητες για εμφάνιση καρκίνου του μαστού κατά 10% (Hsieh *et al.*, 1990). Σύμφωνα με το EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition cohort) γυναίκες με εμμηνόρροια από την ηλικία ≤ 13 ετών αντιμετωπίζουν διπλάσιο κίνδυνο για ορμονοεξαρτώμενο καρκίνο του μαστού (Ritte *et al.*, 2012).

Όπως έχει αναφερθεί, εκτός από την ηλικία της εμμηνόρροιας, η ηλικία της εμμηνόπαυσης αποτελεί έναν ακόμη παράγοντα κινδύνου για τον καρκίνο του μαστού. Η καθυστέρηση της εμμηνόπαυσης σχετίζεται με αύξηση του κινδύνου για καρκίνο του μαστού καθώς για κάθε ένα χρόνο που καθυστερεί η εμμηνόπαυση οι πιθανότητες αυξάνονται κατά 3% ενώ για κάθε 5 χρόνια αυξάνονται κατά 17% (Hsieh *et al.*, 1990; Kelsey *et al.*, 1993).

Ενδείξεις υπάρχουν για τον προστατευτικό ρόλο του θηλασμού εναντίον του καρκίνου του μαστού. Δεδομένου ότι ο θηλασμός καθυστερεί την επαναφορά της κανονικότητας του κύκλου ωορρηξίας, τα επίπεδα των φυλετικών ορμονών παραμένουν σε χαμηλά επίπεδα ενώ για κάθε χρόνο θηλασμού ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του μαστού μειώνεται κατά 4.3% (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2002).

Επιπροσθέτως, οι άτεκνες γυναίκες παρουσιάζουν μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης για καρκίνο του μαστού συγκριτικά με γυναίκες που έχουν τεκνοποιήσει. Η ηλικία τεκνοποίησης επίσης επηρεάζει τις πιθανότητες για καρκίνο του μαστού καθότι η νεαρή ηλικία μιας γυναίκας

αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα στην ανάπτυξη καρκίνου του μαστού. Αντιθέτως, μία γυναίκα η οποία έχει τεκνοποιήσει σε προχωρημένη ηλικία αντιμετωπίζει μεγαλύτερο κίνδυνο για καρκίνο του μαστού συγκριτικά με μία άτεκνη γυναίκα. Συγκριτικά με μία άτεκνη γυναίκα, γυναίκα που τεκνοποιεί για πρώτη φορά στην ηλικία των 20 και 25 ετών έχουν μειωμένες πιθανότητες κατά 20% και 10% αντιστοίχως, ενώ στην ηλικία των 35 ετών οι πιθανότητες είναι αυξημένες κατά 5% (Rosner *et al.*,1994).

Εκτός από τα οιστρογόνα, μία ακόμη ορμόνη η οποία εμπλέκεται στον καρκίνο του μαστού είναι όπως και πιο πάνω αναφέρθηκε, η τεστοστερόνη. Υψηλά επίπεδα ενδογενών φυλετικών ορμονών, συμπεριλαμβανομένου και της τεστοστερόνης οδηγούν σε καρκίνο του μαστού σε γυναίκες που βρίσκονται είτε προ- είτε μετά την εμμηνόπαυση. Έχει διαπιστωθεί ότι τα υψηλά επίπεδα τεστοστερόνης σε γυναίκες που βρίσκονται μετά την εμμηνόπαυση συνδέονται με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού (Sieri *et al.*,2009).

1.4.1.1.3. Ατομικά χαρακτηριστικά ασθενούς

Από τα ατομικά χαρακτηριστικά, η ηλικία της ασθενούς φαίνεται να συμβάλλει στην ανάπτυξη καρκίνου του μαστού καθότι όσο μεγαλύτερη είναι ηλικιακά μια γυναίκα τόσο πιο πολύ ενισχύονται οι πιθανότητες για καρκίνο του μαστού. Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results), στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής η πιθανότητα να εμφανίσει μια γυναίκα κατά τη διάρκεια της ζωής της καρκίνο του μαστού είναι 1:8, (1 in 202) μέχρι την ηλικία των 39 ετών, 1:26 από 40-59 ετών και 1:28 σε ηλικίες από 60-69 ετών (Siegel *et al.*,2013).

Σύνηθες φαινόμενο αποτελούν ασθενείς με καρκίνο του μαστού οι οποίοι φέρουν προγενέστερη πάθηση του μαστού προκαλούμενη από τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων του μαστού. Σε γενικές γραμμές, οι αλλοιώσεις του μαστού οι οποίες προέκυψαν από τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αυξάνουν τις πιθανότητες για καρκίνο του μαστού. Ωστόσο, αλλοιώσεις που δε χαρακτηρίζονται από ατυπία όπως είναι η συνήθης υπερπλασία των πόρων, ενδοπορικά θηλώματα, σκληρυντική αδένωση και ινοαδένωμα συμβάλλουν σε μικρό βαθμό (1.5-2 φορές) για καρκίνο του μαστού συγκριτικά με την άτυπη υπερπλασία η οποία είτε πορογενής είτε λοβιδιακή, αυξάνει τις πιθανότητες κατά 4.3 φορές στο γενικό πληθυσμό (Hartmann *et al.*, 2005; Dupont *et al.*,1993).

Το ατομικό ιστορικό μπορεί επίσης να επηρεάσει την εξέλιξη ενός δευτερογενούς καρκίνου είτε στον ίδιο είτε στον άλλο μαστό. Ωστόσο, η πιο συχνή περίπτωση μεταστατικού καρκίνου του μαστού είναι ο μετάχρονος καρκίνος στον άλλο μαστό (Curtis, 2006). Αυξημένες πιθανότητες για δευτερογενές καρκίνο του μαστού παρουσιάζονται όταν έχει διαγνωσθεί πρωτογενές πορογενές καρκίνωμα *in situ*, καρκίνωμα μαστού σταδίου IIB, καρκίνος αρνητικός σε ορμονικούς υποδοχείς καθώς και η νεαρή ηλικία της ασθενούς (Buist *et al.*, 2010).

1.4.1.1.4. Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Η έκθεση στην ακτινοβολία είτε στα πλαίσια ακτινοθεραπείας είτε πυρηνικής έκρηξης συμβάλλει στην εμφάνιση καρκίνου του μαστού. Στην περίπτωση των παιδιατρικών καρκίνων, η χορήγηση δόσης ακτινοβολίας στην περιοχή του θώρακα για θεραπευτικούς λόγους αυξάνει τον κίνδυνο για καρκίνο του μαστού με γραμμικό τρόπο (Henderson *et al.*, 2010). Παιδιά τα οποία θεραπεύτηκαν από παιδιατρικό καρκίνο μετά από ακτινοθεραπεία κινδυνεύουν με καρκίνο του μαστού με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο ενώ ασθενείς που θεραπεύτηκαν από τη Hodgkin νόσο αντιμετωπίζουν ακόμα μεγαλύτερο κίνδυνο (Guibout *et al.*, 2005). Ακόμη, οι επιπτώσεις της ακτινοβολίας στον καρκίνο του μαστού έχουν διαπιστωθεί σε περιοχές της Ιαπωνίας όπως είναι η Χιροσίμα και Ναγκασάκι όπου η πυρηνική επίθεση και κατά επέκταση η έκθεση στην ακτινοβολία υπήρξε υπεύθυνη για τον καρκίνο του μαστού σε γυναίκες ηλικίας <35 ετών ενώ περιστατικά με καρκίνο του μαστού διπλασιάστηκαν σε περιοχές που μολύνθηκαν μετά από το πυρηνικό ατύχημα του Τσερνόμπιλ (Preston *et al.*, 2007 ; Pukkala *et al.*, 2006).

Ο παράγοντας της παχυσαρκίας στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες αυξάνει τον κίνδυνο για καρκίνο του μαστού. Σύμφωνα με μελέτες του EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition), γυναίκες που δεν έλαβαν θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης μετά την εμμηνόπαυση αντιμετωπίζουν μεγαλύτερο κίνδυνο για καρκίνο του μαστού λόγω του αυξημένου βάρους, δείκτη μάζας (BMI) και περιφέρειας ισχίων. Αποτελέσματα μελέτης πληθυσμού έδειξε ότι οι πιθανότητες για καρκίνο του μαστού αυξάνονται κατά 1.28 φορές σε υπέρβαρες (BMI 25.0-29.9) καθώς και σε παχύσαρκες γυναίκες (BMI > 30.0) συγκριτικά με γυναίκες των οποίων το βάρος κυμαίνεται σε φυσιολογικά πλαίσια. Ωστόσο, αδύνατες γυναίκες οι οποίες έλαβαν θεραπεία υποκατάστασης ορμονών αντιμετωπίζουν σημαντικά υψηλότερο κίνδυνο για καρκίνο του μαστού από ότι οι υπέρβαρες και παχύσαρκες γυναίκες (Lahmann *et al.*, 2004).

Η αντίσταση στην ινσουλίνη και υπερινσουλιναίμια μελετώνται ως παράγοντες οι οποίοι σχετίζουν την παχυσαρκία με καρδιαγγειακά νοσήματα και διαβήτη. Δεδομένου ότι η ινσουλίνη έχει αναβολικές επιδράσεις στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην υπερέκφραση του υποδοχέα της ινσουλίνης στα καρκινικά κύτταρα, η υπερινσουλιναίμια μπορεί να εξηγήσει περαιτέρω τη συσχέτιση μεταξύ καρκίνου του μαστού και παχυσαρκίας (Milazzo *et al.*, 1992).

Στους περιβαλλοντικούς παράγοντες ανήκει η κατανάλωση αλκοόλ η οποία στατιστικά δείχνει σημαντική αύξηση του κινδύνου για καρκίνο του μαστού σε χαμηλά επίπεδα κατανάλωσης, από 5.0 μέχρι 9.9 g την ημέρα, κατανάλωση η οποία ισοδυναμεί με 3-6 ποτά την εβδομάδα. (Chen *et al.*, 2011). Ένας επιπλέον περιβαλλοντικός παράγοντας είναι η σωματική άσκηση η οποία μειώνει τον κίνδυνο για καρκίνο του μαστού με δόσο-εξαρτώμενο

τρόπο δεδομένου ότι η σωματική δραστηριότητα μέτριας εντάσεως μειώνει τον κίνδυνο κατά 2% ενώ η υψηλής εντάσεως κατά 5% (Wu *et al.*,2013).

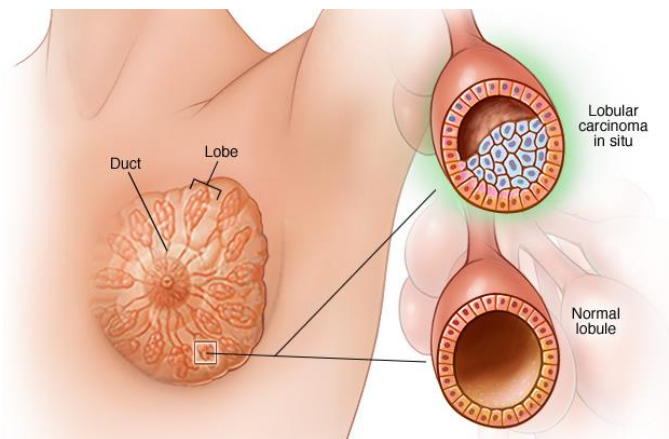
1.4.1.2. Παθοφυσιολογία καρκίνου του μαστού

Το στάδιο ενός καρκινώματος στο μαστό προσδιορίζεται από το εάν τα καρκινικά κύτταρα έχουν εισβάλλει στους παρακείμενους ιστούς του μαστού ή εάν έχουν διαπεράσει τη βασική μεμβράνη, οδηγώντας σε μετάσταση (Phips and Li, 2010). Ο καρκίνος του μαστού διαχωρίζεται σε δύο βασικές κατηγορίες, στο *in situ* και διηθητικό καρκίνωμα. Το *in situ* καρκίνωμα κατηγοριοποιείται περαιτέρω σε πορογενές και λοβιακό *in situ* καρκίνωμα. Όσον αφορά το *in situ* λοβιακό καρκίνωμα, είναι το αποτέλεσμα της άτυπης λοβιακής υπερπλασίας ενώ οι προ-διηθητικές βλάβες προέρχονται από το λοβιακό *in situ* καρκίνωμα. Στην περίπτωση του πορογενούς *in situ* καρκινώματος, συναντώνται συχνότερα στους γαλακτοφόρους αγωγούς. (Logan *et al.*,2015). Επιπλέον, το πορογενές καρκίνωμα του μαστού διακρίνεται σε non-comedo και comedo όπου το comedo καρκίνωμα είναι πιο επιθετικό από το non-comedo (Norton *et al.*, 2010). Περιπτώσεις non-comedo πορογενούς *in situ* καρκινώματος είναι οι παρακάτω:

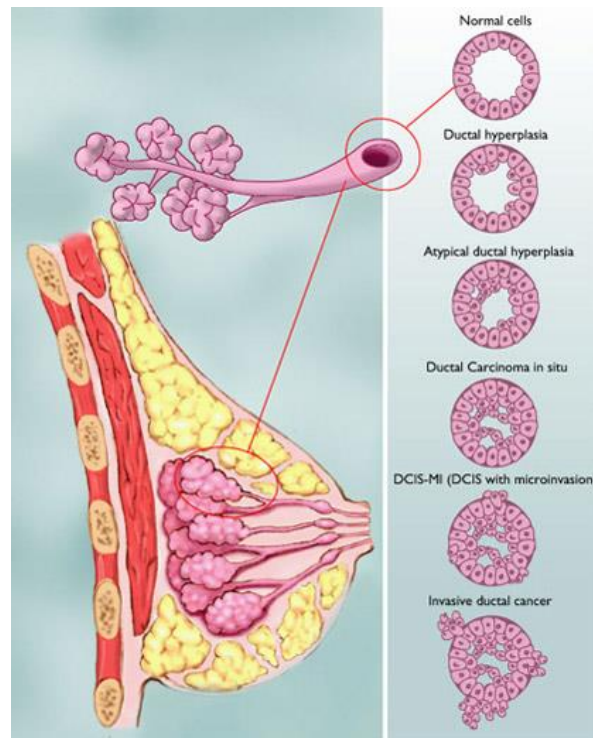
- **Συμπαγές *in situ* νεόπλασμα μαστού** όπου τα καρκινικά κύτταρα γεμίζουν πλήρως τους μαστικούς αδένες.
- **Ηθμοειδές *in situ* νεόπλασμα μαστού** όπου τα καρκινικά κύτταρα δεν έχουν γεμίσει πλήρως τους μαστικούς αδένες ενώ μεταξύ των κυττάρων υπάρχουν κενά.
- **Θηλώδες και μικροθηλώδες πορογενές *in situ* νεόπλασμα μαστού** όπου τα καρκινικά κύτταρα οργανώνονται με ένα συγκεκριμένο μοτίβο στους μαστικούς αδένες ενώ τα μικροθηλώδη κύτταρα είναι μικρότερα από τα θηλώδη του *in situ* καρκινώματος.

Όσον αφορά το διηθητικό/μεταστατικό **νεόπλασμα**, περιλαμβάνεται το λοβιακό και πορογενές *in situ* **νεόπλασμα**, όπου το διηθητικό λοβιακό **νεόπλασμα** καταλαμβάνει το 15% των περιπτώσεων, με τα καρκινικά κύτταρα να είναι μορφολογικά όμοια μεταξύ τους ενώ ο πυρήνας διαφέρει από κύτταρο σε κύτταρο. (McCart Reed *et al.*,2015) (Εικόνες 1.28 και 1.29.). Ο τρόπος ανάπτυξης ενός διηθητικού όγκου έχει διάφορα μοτίβα όπως είναι τα παρακάτω:

- **Κλασσικός διηθητικός λοβιακός καρκίνος** όπου τα μικρά καρκινικά κύτταρα διεισδύουν στο στρώμα ένα προς ένα.
- **Συμπαγής διηθητικός καρκίνος** όπου τα κύτταρα μεγαλώνουν σε μια μεγάλη επιφάνεια με λίγο στρώμα μεταξύ τους.
- **Κυψελιδώδης καρκίνος** όπου τα κύτταρα μεγαλώνουν σε ομάδες των 20 ή και περισσότερων κυττάρων.
- **Σωληνοειδής διηθητικός λοβιακός καρκίνος** όπου η ανάπτυξη του όγκου αυτού ακολουθεί το μοτίβο του κλασσικού λοβιακού νεοπλάσματος με κάποια από τα κύτταρα να σχηματίζουν μικρούς σωληνίσκους.



Εικόνα 1.28. Λοβιακό in situ νεόπλασμα (Lobular carcinoma in situ (LCIS), 2020).



Εικόνα 1.29. Περιπτώσεις πορογενούς νεοπλάσματος μαστού (Diagnosis of DCIS, 2020).

Το διηθητικό πορογενές καρκίνωμα υποκατηγοροποιείται σε βλεννώδες, σωληνοειδές, μυελοειδές, θηλώδες και ηθμοειδές καρκίνωμα. Ωστόσο, το διηθητικό πορογενές καρκίνωμα διαφοροποιείται με βάση το βαθμό πλειομορφισμού, σχηματισμού αδένων/σωληναρίων και μιτωτικού δείκτη. Οι 3 βαθμοί (Grade) διαφοροποίησης του διηθητικού πορογενούς καρκινώματος είναι οι εξής: η βαθμίδα 1 αντιστοιχεί σε καλά διαφοροποιημένο καρκίνωμα, η βαθμίδα 2 σε μέτρια διαφοροποιημένο καρκίνωμα και η βαθμίδα 3 σε ελάχιστα διαφοροποιημένο καρκίνωμα (Lester *et al.*, 2009).

1.4.2. Μοριακοί υπότυποι καρκίνου του μαστού

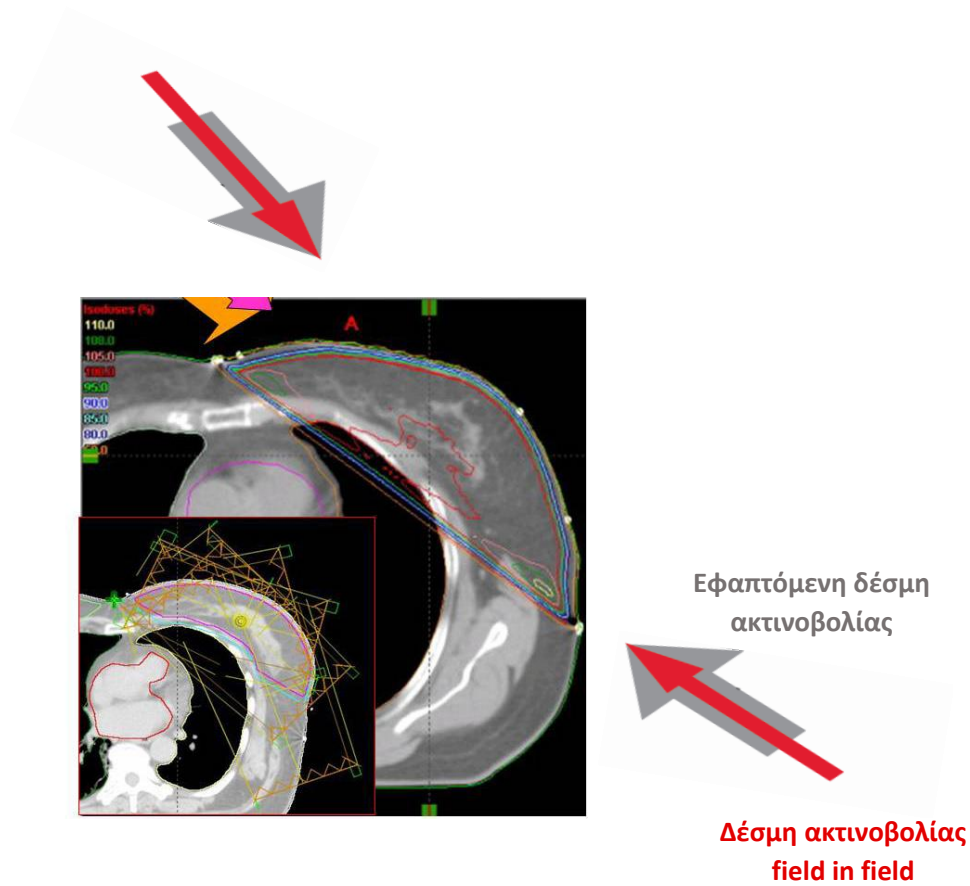
Η διάκριση των καρκίνων του μαστού ξεκίνησε με βάση την έκφραση του οιστρογονικού υποδοχέα και αργότερα του HER2. Συνεπώς, με βάση τη βιολογία, οι καρκίνοι του μαστού κατατάσσονται σε 4 βασικούς μοριακούς υπότυπους οι οποίοι είναι οι εξής παρακάτω:

1. **Luminal A:** ο καρκίνος χαρακτηρίζεται από την έκφραση υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης (ER+ και PR+), απουσία έκφρασης υποδοχέα HER2 ενώ το ποσοστό έκφρασης του μιτωτικού δείκτη Ki-67 είναι χαμηλό (Inic *et al.*,2014).
2. **Luminal B:** ο καρκίνος χαρακτηρίζεται από την έκφραση υποδοχέα οιστρογόνων (ER+) ενώ δεν εκφράζεται ο υποδοχέας HER2 (HER2-). Ωστόσο, στην κατηγορία αυτή, είτε τα επίπεδα έκφρασης του μιτωτικού δείκτη Ki-67 θα είναι υψηλά είτε τα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα προγεστερόνης θα είναι χαμηλά (Inic *et al.*,2014).
3. **Καρκίνος μαστού <<βασικού>> τύπου (basal-like breast cancer):** Απουσία έκφρασης των μοριακών στόχων οι οποίοι θα επέτρεπαν την ανταπόκριση σε αποτελεσματικές θεραπείες όπως είναι η ταμοξιφένη, οι αναστολείς αρωματάσης ή η τραστουζουμάμπη (Toft and Cryns, 2011).
4. **Τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού (TNBC):** χαρακτηρίζεται από απουσία έκφρασης υποδοχέων οιστρογόνων (ER-), προγεστερόνης (PR-) και HER2-. Οι τριπλά αρνητικοί καρκίνοι περιλαμβάνουν ιστολογικούς τύπους όπως είναι το μυελοειδές και αδеноειδές κυστικό καρκίνωμα οι εμφανίζουν χαμηλό κίνδυνο υποτροπής (Senkus *et al.*,2013)
5. **HER2+:** η έκφραση του υποδοχέα HER-2 (HER2+) διαγιγνώσκεται στο 10-20% ασθενών με καρκίνο του μαστού. Ο συγκεκριμένος τύπος καρκίνος είναι ιδιαίτερα επιθετικός και εξαπλώνεται πολύ πιο γρήγορα από άλλους τύπους καρκίνου του μαστού (Logan *et al.*,2015).
6. **Claudin low:** ο καρκίνος διακρίνεται από την απουσία υποδοχέων οιστρογόνων (ER-), προγεστερόνης (PR-) και HER2- καθώς και από τη χαμηλή έκφραση πρωτεϊνών των διακυτταρικών συνδέσεων όπως είναι η E-cadherin (Nounou *et al.*,2015).

1.4.3. Η ακτινοθεραπεία στον καρκίνο του μαστού

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο καρκίνος του μαστού είναι ο πιο κοινός καρκίνος στις γυναίκες, σημειώνοντας 1.000.000 νέες διαγνώσεις και 400.000 θανάτους σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας. Ο καρκίνος του μαστού συνιστά μια από τις πιο σοβαρές και κοστοβόρες ασθένειες, με την τοποπεριοχική θεραπεία στο μαστό να επιτυγχάνεται μέσω της χειρουργικής καθώς και της ακτινοθεραπείας. Όσον αφορά το πεδίο της χειρουργικής, τις 2 τελευταίες δεκαετίες έχει εξελιχθεί με τέτοιο τρόπο ώστε να παρέχει τη δυνατότητα αφαίρεσης του όγκου, διατηρώντας την ακεραιότητα του μαστού, καθώς και της βιοψίας από το φρουρό λεμφαδένα εφόσον είναι εφικτή. Με τη μέθοδο της χειρουργικής απομακρύνεται ο όγκος καθώς και οι τοπικοί λεμφαδένες ενώ μη ανιχνεύσιμα κατάλοιπα όγκου πιθανότατα να παραμένουν στην περιοχή του μαστού, της ουλής, του θωρακικού τοιχώματος ή στους απομεινάντες λεμφαδένες. Ωστόσο, τα εναπομείναντα καρκινικά κύτταρα μπορούν να οδηγήσουν σε τοποπεριοχική υποτροπή και μεταστάσεις σε απομακρυσμένα όργανα (Early breast cancer trialists' collaborative group, 1995).

Η συμβολή της ακτινοθεραπείας στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού είναι κυρίως επικουρική, αποτρέποντας την υποτροπή στην περιοχή από όπου έχει απομακρυνθεί ο όγκος ή έχει γίνει μαστεκτομή (Eifel *et al.*, 2001). Συνεπώς, η ακτινοθεραπεία διαδραματίζει έναν συντηρητικό ρόλο μετά από τη χειρουργική επέμβαση (Becker, 2015) Ωστόσο, υπάρχουν περιπτώσεις ασθενών με καρκίνο του μαστού όπου η ακτινοθεραπεία θα μπορούσε να παραλειφθεί ενώ η θεραπεία τους περιορίζεται μόνο στην αφαίρεση του όγκου. Μέχρις στιγμής δεν υπάρχουν αρκετά στοιχεία σχετικά με την επιλογή των ασθενών οι οποίοι πιθανότατα δε θα χρειάζονταν ακτινοθεραπεία ενώ ανεπιτυχής κρίθηκε η προσπάθεια εύρεσης ομάδας ασθενών με χαμηλό κίνδυνο υποτροπής (<5%) όπου η ακτινοθεραπεία θα ήταν περιττή (Clark *et al.*, 1992). Επί του παρόντος, η ακτινοθεραπεία συνιστάται σχεδόν σε όλες τις ασθενείς μετά από ογκεκτομή καθώς και σε ασθενείς με χαμηλό βαθμό κακοήθειας στους μασχαλιαίους λεμφαδένες. Η απόφαση για ακτινοθεραπεία εξαρτάται περισσότερο από κλινικούς παράγοντες, το στάδιο του καρκίνου, τα ιστοπαθολογικά δείγματα όπου απεικονίζονται μορφολογικά χαρακτηριστικά και το είδος της χειρουργικής επέμβασης παρά από προγνωστικούς δείκτες οι οποίοι σχετίζονται με την ευαισθησία στην ακτινοθεραπεία. Συμπερασματικά, σχεδόν όλοι οι ασθενείς με καρκίνο του μαστού υπόκεινται σε ακτινοθεραπεία. Όταν κρίνεται αναγκαία η ακτινοβολήση ολόκληρου του μαστού, η ελάχιστη δυνατή καθυστέρηση πρέπει να είναι 3-4 εβδομάδες κυρίως για ασθενείς που δεν έχουν λάβει χημειοθεραπεία. Σε περίπτωση όπου ο κίνδυνος υποτροπής σε 10 χρόνια είναι 6%, ο κίνδυνος αυξάνεται κατά 0.5% για κάθε μήνα όπου η θεραπεία καθυστερεί (Gupta *et al.*, 2016) (Εικόνα 1.30.).



Εικόνα 1.30. Συμβατική ακτινοθεραπεία σε ολόκληρο το μαστό, χρησιμοποιώντας δύο εφαπτόμενα, παράλληλα και αντίθετα πεδία ακτινοθεραπείας σε σύγκριση με IMRT (Kron and Chua, 2014).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ

Η ακτινοθεραπεία είναι μια ιδιαίτερα αποτελεσματική μέθοδος, η οποία έχει ως στόχο την εκρίζωση ή συρρίκνωση ενός όγκου ή την εξάλειψη εναπομεινάντων καρκινικών κυττάρων με τη χρήση ιονίζουσας ακτινοβολία, όπως οι ακτίνες X και γάμμα. Έχει διαπιστωθεί πώς κατά την επίδραση της ιονίζουσας ακτινοβολίας, σχηματίζονται δραστικές ενώσεις ROS και RNS οι οποίες σχηματίζονται μέσω της ραδιόλυσης του H₂O και της συνθάσης του νιτρικού οξειδίου NO, αντίστοιχα. Οι συγκεκριμένες δραστικές ενώσεις παρουσιάζουν υψηλή δραστηριότητα με αποτέλεσμα να προσβάλλουν και να προκαλούν βλάβες στο DNA. Τα κύρια προϊόντα τα οποία προκύπτουν κατά την αντίδραση των ROS και RNS ενώσεων με τον C-8 της γουανίνης είναι η 8-OHdG και 8-NG, αντιστοίχως. Ωστόσο, η GSH η οποία αποτελεί ενδοκυττάριο αντιοξειδωτικό εξουδετερώνει τη δράση των ROS και RNS ενώσεων, προστατεύοντας τον οργανισμό από την επίδραση των ελευθέρων ριζών οι οποίες παράγονται κατά την έκθεση σε ακτινοβολία.

Με βάση τα παραπάνω, σκοπός της παρούσας διατριβής είναι ο εντοπισμός βλαβών DNA, 8-OHdG και 8-NG, στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο του μαστού καθώς και η μελέτη της μεταβολής των συγκεντρώσεών τους κατά τη διάρκεια της ακτινοθεραπείας. Δεδομένου ότι οι ασθενείς φέρουν ένα εύρος κλινικών παραμέτρων, κρίθηκε απαραίτητη η διερεύνηση για πιθανή συσχέτιση των 8-OHdG και 8-NG με παραμέτρους όπως είναι το ύψος, το βάρος, η ηλικία, δείκτης μάζας σώματος (BMI), επιφάνεια σώματος (BSA), αιματοκρίτης (HCT), ουρία, κρεατινίνη και καθαρή κρεατινίνης (GFR). Ωστόσο, το σημαντικότερο ερώτημα το οποίο τέθηκε στην παρούσα εργασία είναι η πιθανή συσχέτιση των βλαβών DNA, 8-OHdG και 8-NG, με το βαθμό της προκληθείσας ακτινικής δερματίτιδας η οποία αποτελεί μια από τις πιο συνήθεις παρενέργειες της ακτινοθεραπείας στο μαστό. Συνεπώς, το ερώτημα που αναμένεται να απαντηθεί αφορά την πιθανή προγνωστική αξία των 8-OHdG και 8-NG σε σχέση με την εμφάνιση ακτινικής δερματίτιδας. Τέλος, παρόμοιες συσχετίσεις εφαρμόστηκαν και για τον αντιοξειδωτικό παράγοντα GSH ο οποίος όπως αναφέρθηκε και παραπάνω διαδραματίζει προστατευτικό ρόλο έναντι των δραστικών ενώσεων ROS και RNS.

Πιο αναλυτικά, η παρούσα διατριβή περιλαμβάνει τη διερεύνηση των παρακάτω:

- εντοπισμό των [8-NG] και [8-OHdG] στο πλάσμα των ακτινοβοληθέντων ασθενών σε σχέση με το χρόνο και τη δόση ακτινοβολίας,
- μεταβολές των επιπέδων [8-NG] και [8-OHdG] στο πλάσμα των ακτινοβοληθέντων ασθενών σε σχέση με το χρόνο και τη δόση ακτινοβολίας,

- συσχέτιση των ανωτέρω με κλινικές παραμέτρους (ηλικία, ύψος, βάρος, BMI, BSA, HCT, ουρία, κρεατινίνη και GFR) καθώς και με το βαθμό της ακτινικής δερματίτιδας που προκαλείται κατά την ακτινοθεραπεία,
- εκτίμηση της [GSH] σε σχέση με το χρόνο και τη δόση ακτινοβολίας,
- μεταβολές των επιπέδων [GSH] σε σχέση με το χρόνο και τη δόση ακτινοβολίας,
- συσχέτιση της [GSH] με τις προαναφερθείσες κλινικές παραμέτρους καθώς και με το βαθμό ακτινικής δερματίτιδας,
- συσχέτιση των επιπέδων [GSH] με [8-NG] και [8-OHdG] και των μεταβολών τους σε σχέση με το χρόνο και τη δόση ακτινοβολίας,
- ολοκληρωμένη συσχέτιση των συγκεντρώσεων και των μεταβολών των [8-NG], [8-OHdG] και [GSH] με το βαθμό της ακτινικής δερματίτιδας καθώς και διερεύνηση της προγνωστικής αξίας που πιθανό να φέρουν.

Κεφάλαιο 2^ο: Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Υλικά

Για τη διεξαγωγή της εν λόγω μελέτης, οι συμμετέχοντες έπρεπε να πληρούν βασικά κριτήρια εισαγωγής τους όπως: α) ιστολογική τεκμηρίωση του καρκίνου του μαστού, β) ο/η ασθενής να έχει συμπληρώσει το 18^ο έτος της ηλικίας του και γ) να υπάρχει γραπτή συγκατάθεση του/της ασθενούς. Με την υπογραφή του εντύπου συγκατάθεσης ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- ✓ Λήψη πλήρους ιατρικού ιστορικού καθώς και φαρμακευτικής αγωγής
- ✓ Κλινική εξέταση
- ✓ Βασικός αιματολογικός και βιοχημικός έλεγχος
- ✓ Λήψη βιολογικών δειγμάτων (αίμα) προς αρχική μέτρηση προϊόντων βλαβών DNA
- ✓ Καταγραφή και φωτογράφιση του δέρματος περιοχής ακτινοθεραπείας

2.1.1. Κλινικά δείγματα ασθενών

Για τις ανάγκες της συγκεκριμένης έρευνας, συλλέχθηκαν δείγματα πλάσματος από ασθενείς με αδenoκαρκίνωμα μαστού. Τα συγκεκριμένα βιολογικά δείγματα προήλθαν από 33 περιστατικά, τα οποία υπεβλήθησαν σε μετεγχειρητική ακτινοθεραπεία εκ των οποίων το 91% των ασθενών αντιπροσωπεύει εμμηνοπαυσιακές ασθενείς ενώ το 9% προεμμηνοπαυσιακές. Επιπλέον, από το σύνολο των ασθενών, το 52% ανήκει στο στάδιο I, το 45% στο στάδιο II και 3% στάδιο III ενώ το 82% και 12% των ασθενών έλαβαν επικουρική και νεοεπικουρική κυτταροτοξική θεραπεία, αντίστοιχα. Ακόμη, κλινικές παράμετροι που έχουν ληφθεί υπόψη είναι η ηλικία των ασθενών, οι δείκτες BSA, BMI, GFR και HCT(%) καθώς και ο βαθμός της προκληθείσας ακτινικής δερματίτιδας (πίνακας 2.1).

Πίνακας 2.1. Κλινικά δεδομένα ασθενών που συμμετείχαν στην παρούσα μελέτη.

Χαρακτηριστικά ασθενών της μελέτης	
Αριθμός (n)	33 γυναίκες
Πάθηση	Αδενοκαρκίνωμα μαστού
Στάδιο νόσου (n, %)	
Στάδιο I	17 (52%)
Στάδιο II	15 (45%)
Στάδιο III	1 (3%)
Χειρουργική επέμβαση (n, %)	
Ευρεία ογκεκτομή και σύστοιχος λεμφαδενικός καθαρισμός	21 (64%)
Τεταρτεκτομή και σύστοιχος λεμφαδενικός καθαρισμός	11 (33%)
Μαστεκτομή και σύστοιχος λεμφαδενικός καθαρισμός	1 (3%)
Επικουρική κυτταροτοξική θεραπεία (n, %)	27 (82%)
Νεοεπικουρική κυτταροτοξική θεραπεία (n, %)	4 (12%)
Διάμεση ηλικία (έτη) (εύρος)	57 (48-77)
Διάμεση BSA (Body Surface Area)(m ²)(εύρος)	1.77 (1.44-2.02)
Διάμεσος BMI (Body Mass Index) (εύρος)	28.6 (22.2-31.2)
Διάμεσο GFR (Glomerular Filtration Rate) (mL/min) (εύρος)	97.7 (44.8-159.7)
Διάμεσος αιματοκρίτης HCT (%)	39.7 (35.2-44.9)
Εμμηνοπαυσιακές ασθενείς (%)	30 (91%)
Προεμμηνοπαυσιακές ασθενείς (%)	3 (9%)
Βαθμός δερματίτιδας ακτινοβοληθείσας περιοχής (post-radiation dermatitis / burn grade) (n, %)	
Βαθμός 0	4 (11%)
Βαθμός 1	18 (55%)
Βαθμός 2	9 (27%)
Βαθμός 3	2 (6%)
Βαθμός 4	0 (0%)

2.1.2. Αντιδραστήρια

Για την ανίχνευση των βλαβών DNA, 8-OHdG και 8-NG, στο πλάσμα ακτινοβοληθέντων ασθενών, χρησιμοποιήθηκαν τα OxiSelect™ Oxidative DNA Damage ELISA Kit (8-OHdG Quantitation) και OxiSelect™ Nitrosative DNA/RNA Damage ELISA Kit (8-Nitroguanine Quantitation) (Cell Biolabs, Inc. San Diego, USA), αντίστοιχα. Για τον εντοπισμό της GSH επιλέχθηκε το Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Glutathione (GSH) (BIOMATIK, Wilmington, Delaware, USA).

Για τις ανάγκες των παραπάνω πειραμάτων απαραίτητα ήταν τα αντιδραστήρια τα οποία αναγράφονται στους παρακάτω πίνακες 2.2, 2.3 και 2.4.

Πίνακας 2.2. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση της 8-OHdG στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο του μαστού οι οποίοι έχουν λάβει ακτινοθεραπεία.

Αντιδραστήρια	Προέλευση
Αποστειρωμένο H ₂ O	Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΙΑ
1x phosphate buffered saline (PBS)	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
10x Wash Buffer	Cell Biolabs, Inc. San Diego, USA
Assay Diluent	Cell Biolabs, Inc. San Diego, USA
8-OHdG Standard	Cell Biolabs, Inc. San Diego, USA
Anti-8-OHdG antibody	Cell Biolabs, Inc. San Diego, USA
Secondary Antibody, HRP Conjugate (1000X)	Cell Biolabs, Inc. San Diego, USA
Substrate Solution	Cell Biolabs, Inc. San Diego, USA
Stop Solution	Cell Biolabs, Inc. San Diego, USA

Πίνακας 2.3. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση της 8-NG στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο του μαστού οι οποίοι έχουν λάβει ακτινοθεραπεία.

Αντιδραστήρια	Προέλευση
Αποστειρωμένο H ₂ O	Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
1x phosphate buffered saline (PBS)	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
10x Wash Buffer	Cell Biolabs, Inc. San Diego, USA
Assay Diluent	Cell Biolabs, Inc. San Diego, USA
8-NG Standard	Cell Biolabs, Inc. San Diego, USA
Anti-8- NG antibody	Cell Biolabs, Inc. San Diego, USA
Secondary Antibody, HRP Conjugate (1000X)	Cell Biolabs, Inc. San Diego, USA
Substrate Solution	Cell Biolabs, Inc. San Diego, USA
Stop Solution	Cell Biolabs, Inc. San Diego, USA

Πίνακας 2.4. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση της GSH στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο του μαστού οι οποίοι έχουν λάβει ακτινοθεραπεία.

Αντιδραστήρια	Προέλευση
Αποστειρωμένο H ₂ O	Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
1x phosphate buffered saline (PBS)	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
30x Wash Buffer	BIOMATIK, Wilmington, Delaware, USA
Standard	BIOMATIK, Wilmington, Delaware, USA
Standard Diluent	BIOMATIK, Wilmington, Delaware, USA
Detection Reagent A	BIOMATIK, Wilmington, Delaware, USA
Assay Diluent A	BIOMATIK, Wilmington, Delaware, USA
Detection Reagent B	BIOMATIK, Wilmington, Delaware, USA
Assay Diluent B	BIOMATIK, Wilmington, Delaware, USA
Reagent Diluent	BIOMATIK, Wilmington, Delaware, USA
Stop Solution	BIOMATIK, Wilmington, Delaware, USA
TMB Substrate	BIOMATIK, Wilmington, Delaware, USA

2.2. Μέθοδοι

Το πειραματικό μέρος της παρούσας μελέτης απαρτίζεται από τρία κύρια μέρη: 1^ο) τη δειγματοληψία των βιολογικών δειγμάτων, 2^ο) τον εργαστηριακό έλεγχο των βιολογικών δειγμάτων με τη χρήση κατάλληλων ELISA kits και 3^ο) τον έλεγχο για τοξικότητα του δέρματος κατόπιν ακτινοθεραπείας.

2.2.1. Θεραπευτικό σχήμα μετεγχειρητικής ακτινοθεραπείας

Αρχικά, όλοι οι ασθενείς υπεβλήθησαν σε αξονική τομογραφία σχεδιασμού ακτινοθεραπείας και κατόπιν ακολούθησε τρισδιάστατος σχεδιασμός. Το θεραπευτικό σχήμα της ακτινοθεραπείας που εφαρμόστηκε σε μετεγχειρητικό στάδιο, αφορούσε το σύνολο του μαστού ο οποίος ακτινοβολήθηκε με τη χρήση αντίθετων εφαπτόμενων πεδίων, 6 MV φωτονίων, καλύπτοντας τη μασχαλιαία χώρα όπως επίσης και τους υπο- και υπερκλείδιους λεμφαδένες, βάσει των ενδείξεων. Η συνολική χορηγηθείσα δόση ήταν 46-50 Gy και 10 Gy προσαύξηση δόση στην περιοχή της αρχικής νόσου (tumor bed). Οι προαναφερθείσες δόσεις ακτινοβολίας χορηγήθηκαν σε ημερήσιες δόσεις των 2Gy/5 ημέρες την εβδομάδα.

2.2.2 Δειγματοληψία βιολογικών δειγμάτων

Οι δειγματοληψίες των βιολογικών δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν πριν την έναρξη, κατά τη διάρκεια, στο τέλος καθώς και 1 μήνα μετά το πέρας της ακτινοθεραπείας (πίνακας 2.5).

Πίνακας 2.5. Στον παραπάνω πίνακα αναγράφονται οι ημέρες δειγματοληψίας των βιολογικών δειγμάτων των συμμετεχόντων.

	Ημέρα δειγματοληψίας
Πριν την έναρξη της ακτινοθεραπείας	Ημέρα 0
Κατά τη διάρκεια της ακτινοθεραπείας	Ημέρα 15^η
Στο τέλος της ακτινοθεραπείας	Ημέρα 30^η
1 μήνα μετά το τέλος της ακτινοθεραπείας	Ημέρα 60^η

2.2.3. Εργαστηριακός έλεγχος βιολογικών δειγμάτων αίματος

2.2.3.1. Η μέθοδος ELISA

Η μέθοδος ELISA είναι από τις πιο γνωστές εργαστηριακές τεχνικές η οποία χρησιμοποιείται ευρέως στην ανίχνευση και ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων μορίων και βασίζεται στην έμφυτη ικανότητα ενός αντισώματος να δεσμεύεται σε μία συγκεκριμένη περιοχή ενός αντιγονικού μορίου (Cox *et al.*, 2012). Ένα από τα πιο σημαντικά πλεονεκτήματα της συγκεκριμένης μεθόδου, είναι ότι η ποιοτική ή ποσοτική εκτίμηση των υπό μελέτη μορίων δεν απαιτεί υψηλού κόστους εξοπλισμό. Συνήθη μόρια τα οποία μελετώνται με τη μέθοδο ELISA, είναι πρωτεΐνες ή ολόκληρα πρωτεϊνικά συμπλέγματα (Fuller *et al.*, 2006; Mariager *et al.*, 1994; Sletten *et al.*, 2005; Lin, 2017).

Σύμφωνα με τη μέθοδο ELISA, η ανίχνευση του αντιγόνου βασίζεται στην αναγνώριση και πρόσδεσή του με το αντίστοιχο αντίσωμα. Πιο συγκεκριμένα, το υπό μελέτη βιολογικό δείγμα, υδαρούς φύσεως, το οποίο εμπεριέχει το υπό μελέτη αντιγόνο με συγκεκριμένες περιοχές πρόσδεσης, προστίθεται σε μια μικροπλάκα 96 πηγαδίων. Κατόπιν διαδοχικών επώσεων των διαφόρων αντιδραστηρίων τα οποία προστίθενται κατά τη διάρκεια της μεθόδου, προκύπτει μια οπτική αλλαγή η οποία συνδέεται άμεσα με την παραγωγή του προϊόντος της τελευταίας αντιδράσεως που λαμβάνει χώρα. Από την τελευταία αυτή αντίδραση, ενζυμικής φύσεως, καταλύεται ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα με αποτέλεσμα να παράγεται είτε μια φθορίζουσα ένωση ή χημειοφωταύγεια ή πιο συχνά μια χρωμοφόρα ένωση,

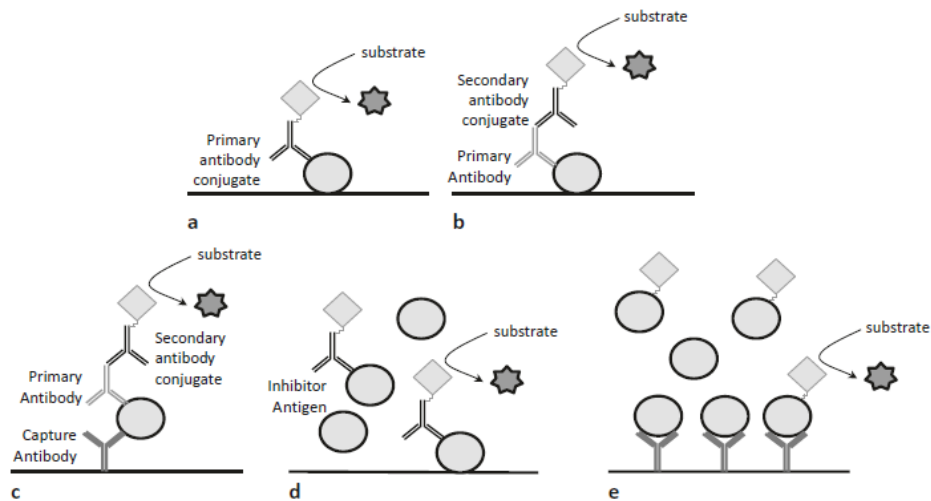
τα οποία αποτελούν μετρήσιμα σήματα. Τα παραπάνω σήματα μετρούνται με κατάλληλα όργανα όπως είναι το φιλτραρισμένο φθορόμετρο, λουμινόμετρο ή φασματοφωτόμετρο αντιστοίχως. Από τα προαναφερόμενα σήματα, η χρωματομετρική προσέγγιση είναι η συνηθέστερη όπου ως χρωματομετρικά υποστρώματα χρησιμοποιούνται οι 2-2'-αζινο-δι-(3-αιθυλοβενζοθειαζολίνη-6-σουλφονικό οξύ (ABTS), 3,3', 5,5'-τετραμεθυλβενζιδίνη (TMB) και Ο-φαινυλ-διαμίνη-διϋδροχλωρίδιο (OPD) για υπεροξειδάση (HRP) και φωσφορικό ρ-νιτροφαινόλιο (pNPP) για την αλκαλική φωσφατάση (AP), σχηματίζοντας ένα διαλυτό έγχρωμο προϊόν το οποίο μετράται είτε άμεσα είτε απαιτεί τη διακοπή της αντίδρασης με κατάλληλο αντιδραστήριο. Η οπτική αυτή αλλαγή ενσωματώνεται ως δυναμική μεταβλητή σε μαθηματικούς τύπους με σκοπό μέσω των οποίων είναι εφικτή αφενός η σύγκριση της οπτικής πυκνότητας (OD) με μια γνωστή τυποποιημένη παράμετρο και αφετέρου η ποσοτικοποίηση του εξεταζόμενου αντιγόνου (Lin, 2017) (Εικόνα 2.1.).



Εικόνα 2.1. Μικροπλάκα 96 πηγαδίων για ELISA μέθοδο όπου απεικονίζεται η προκύπτουσα οπτική αλλαγή της ενζυμικής αντιδράσεως (Labclinics., 2019).

Η μέθοδος ELISA περιλαμβάνει διάφορες παραλλαγές ως προς τον τρόπο ανίχνευσης του υπό μελέτη αντιγόνου και κατηγοριοποιείται σε: α) άμεση, β) έμμεση, γ) ανταγωνιστικού τύπου ELISA και δ) ELISA τύπου sandwich (Cox *et al.*, 2012). Στην περίπτωση της άμεσης ELISA, το πρωτογενές αντίσωμα το οποίο είναι επισημασμένο με κάποιο ένζυμο ή φθορίζουσα χημική ένωση, γνωστό και ως φθοροφόρο, θα αναγνωρίσει και θα προσδεθεί στο υπό μελέτη αντιγόνο. Αντίθετα, η έμμεση ELISA, εκτός από το πρωτογενές αντίσωμα, περιλαμβάνει και τη χρήση δευτερογενούς αντισώματος το οποίο προσδένεται με το πρωτογενές αντίσωμα και είναι συζευγμένο είτε με κάποιο ένζυμο όπως είναι ραφανική υπεροξειδάση (HRP) ή αλκαλική φωσφατάση (AP) είτε με βιοτίνη (Lin, 2017).

Στην περίπτωση της ELISA τύπου *sandwich*, η διαδικασία απαιτεί την απορρόφηση ενός ειδικού ως προς το αντιγόνο αντισώματος (*capture antibody*) από τη στερεά επιφάνεια της μικροπλάκας, το οποίο εν συνεχεία θα ακινητοποιήσει το υπό μελέτη αντιγόνο κατόπιν επώασης με το βιολογικό δείγμα. Εν συνεχεία, ακολουθεί η ανίχνευση και πρόσδεση του αντιγόνου από το πρωτογενές αντίσωμα και τέλος η προσθήκη του ενζυμο-συζευγμένου δευτερογενούς αντισώματος. Δεδομένου ότι το απορροφημένο από τη στερεά επιφάνεια αντίσωμα (*capture antibody*) και το πρωτογενές δεσμεύονται σε διαφορετικούς αντιγονικούς επιτόπους, το αντιγόνο βρίσκεται ανάμεσα σε δύο αντισώματα και γι' αυτό το λόγο χαρακτηρίζεται ως *sandwich* (Cox *et al.*, 2012). Η συγκεκριμένη παραλλαγή της μεθόδου ELISA είναι πιο ευαίσθητη και χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις όπου το αντιγόνο εντοπίζεται σε χαμηλές ποσότητες στο βιολογικό δείγμα, οι φυσικοχημικές ιδιότητές του δεν επιτρέπουν την ακινητοποίησή του στα πηγάδια ή όταν το βιολογικό δείγμα περιλαμβάνει περισσότερες από μια πρωτεΐνες. Με τη συγκεκριμένη μέθοδο δεσμεύεται μόνο το υπό μελέτη αντιγόνο με το ειδικό ως προς το αντιγόνο αντίσωμα (*capture antibody*) (Lin, 2017). Τέλος, η *ανταγωνιστικού τύπου ELISA* χαρακτηρίζεται από τον ανταγωνισμό μεταξύ διαλυτού και ακινητοποιημένου σε στερεή επιφάνεια αντιγόνου για την πρόσδεση τους στο αντίσωμα (Cox *et al.*, 2012). Στην ανταγωνιστικού τύπου ELISA είτε απορροφάται το αντιγόνο αναφοράς ή αντίσωμα από τη στερεά φάση της μικροπλάκας. Στην πρώτη περίπτωση, το αντιγόνο του βιολογικού δείγματος ανταγωνίζεται με το αντιγόνο αναφοράς το οποίο έχει προσροφηθεί από τη στερεά επιφάνεια της μικροπλάκας, ώστε να δεσμευτεί στις περιορισμένες θέσεις του επισημασμένου αντισώματος. Αντίθετα, στη δεύτερη περίπτωση, όπου το αντίσωμα έχει προσροφηθεί από τη στερεά φάση, το σημασμένο αντιγόνο ανταγωνίζεται με το αντιγονικό μόριο του εξεταζόμενου βιολογικού δείγματος για την πρόσδεσή τους στο αντίσωμα (Lin, 2017) (Εικόνα 2.2.).



Εικόνα 2.2. Διάφορες κατηγορίες ELISA. (a) Άμεση ELISA, (b) Έμμεση ELISA, (c) Sandwich ELISA με σημασμένο αντίσωμα (d) Ανταγωνιστικού τύπου ELISA με σημασμένο αντίσωμα, (e) Ανταγωνιστικού τύπου ELISA με σημασμένο αντιγόνο (Lin, 2017).

2.2.4. Ποσοτική εκτίμηση της 8-OHdG

Για την ποσοτική εκτίμηση του δείκτη 8-OHdG επελέγη το OxiSelect™ Oxidative DNA Damage ELISA Kit (8-OHdG Quantitation) όπου το αντιγόνο ανιχνεύεται μέσω ανταγωνιστικού τύπου ELISA και σε εύρος συγκεντρώσεων από 100 pg/mL μέχρι 20 ng/mL. Για το συγκεκριμένο πειραματικό πρωτόκολλο απαιτούνται α) η προετοιμασία των πρότυπων δειγμάτων 8-OHdG, β) η προετοιμασία των βιολογικών δειγμάτων και γ) η προετοιμασία των απαιτούμενων αντιδραστηρίων του ELISA kit.

2.2.4.1. Προετοιμασία βιολογικών δειγμάτων

Τα δείγματα πλάσματος που συλλέχθηκαν από ασθενείς με ακτινοθεραπεία φυγοκεντρήθηκαν στις 3000 g για 10 min.

2.2.4.2. Προετοιμασία Αντιδραστηρίων του OxiSelect™ Oxidative DNA Damage ELISA Kit (8-OHdG Quantitation)

Σύμφωνα με τις οδηγίες του OxiSelect™™ Oxidative DNA Damage ELISA Kit (8-OHdG Quantitation), αντιδραστήρια όπως η συζευγμένη 8-OHdG/BSA, το πρωτογενές αντίσωμα anti-8OHdG, το δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με HRP όπως επίσης και το διάλυμα Wash Buffer αραιώνονται κατάλληλα για το σκοπό του πειράματος. Ακόμη, αναγκαία ήταν η επίστρωση της μικροπλάκας με συζευγμένη 8-OHdG ώστε να φορτωθούν τα δείγματα. Πιο αναλυτικά:

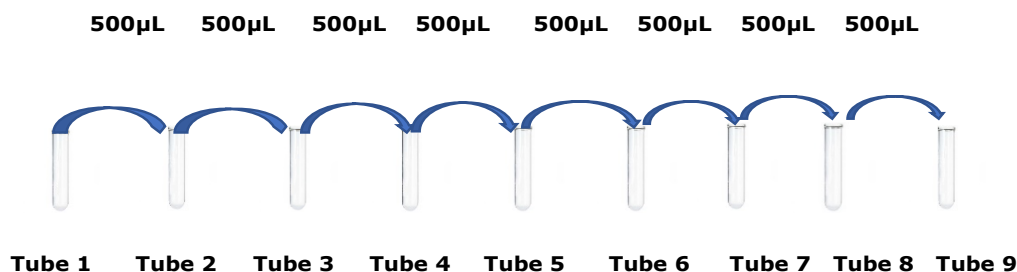
- 1^ο) Για την επίστρωση της μικροπλάκας 8-OHdG, η συζευγμένη 8-OHdG/BSA αραιώνεται από 1 mg/mL σε 1 µg/mL με 1x ρυθμιστικό διάλυμα PBS.
- 2^ο) Ακολούθως, 100 µL συζευγμένης 8-OHdG/BSA συγκεντρώσεως 1 µg/mL προστίθενται σε κάθε πηγάδι και ακολουθεί επώαση όλη τη νύχτα στους 4°C.
- 3^ο) Την επόμενη μέρα, απορρίπτεται το διάλυμα της συζευγμένης 8-OHdG/BSA και ακολουθεί μια μόνο πλύση με αποστειρωμένο νερό (dH₂O).
- 4^ο) Με την απομάκρυνση οποιασδήποτε περίσσειας υγρού, προστίθενται 200 µL διαλύματος Assay Diluent σε κάθε πηγάδι ενώ ακολουθεί επώαση για 1 hr σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να προσροφηθεί η 8-OHdG στα πηγάδια της μικροπλάκας.
- 5^ο) Ύστερα, η μικροπλάκα μεταφέρεται στους 4°C ενώ το διάλυμα Assay Diluent απορρίπτεται πριν τη χρήση της μικροπλάκας.
- 6^ο) Επιπλέον, το διάλυμα 10x Wash Buffer αραιώνεται σε 1x Wash Buffer με αποστειρωμένο νερό και ακολουθεί ομογενοποίηση του εν λόγω διαλύματος.
- 7^ο) Για την προετοιμασία των αντισωμάτων, το πρωτογενές anti-8OHdG καθώς και το δευτερογενές αντίσωμα αραιώνονται 1:500 και 1:1000 με τη χρήση του διαλύματος Assay Diluent, αντιστοίχως.

2.2.4.3. Προετοιμασία πρότυπων δειγμάτων της 8-OHdG

Για την προετοιμασία των πρότυπων δειγμάτων της 8-OHdG, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις, ξεκινώντας από το 8-OHdG Standard. Όλες οι αραιώσεις έγιναν με τη χρήση του διαλύματος Assay diluent και το εύρος της συγκέντρωσής τους κυμάνθηκε από 0 ng/mL – 20 ng/mL όπως φαίνεται στον πίνακα 2.6 (Εικόνα 2.3.).

Πίνακας 2.6. Στον παραπάνω πίνακα αναφέρονται οι διαδοχικές αραιώσεις που ακολουθήθηκαν ώστε να παρασκευαστούν τα πρότυπα δείγματα της 8-OHdG.

Standard Tubes	8-OHdG Standard (μL)	Assay Diluent (μL)	8-OHdG (ng/mL)
1	10	990	20
2	500 από Tube #1	500	10
3	500 από Tube #2	500	5
4	500 of Tube #3	500	2.5
5	500 of Tube #4	500	1.25
6	500 of Tube #5	500	0.625
7	500 of Tube #6	500	0.313
8	500 of Tube #7	500	0.156
9	500 of Tube #8	500	0.078
10	0	500	0



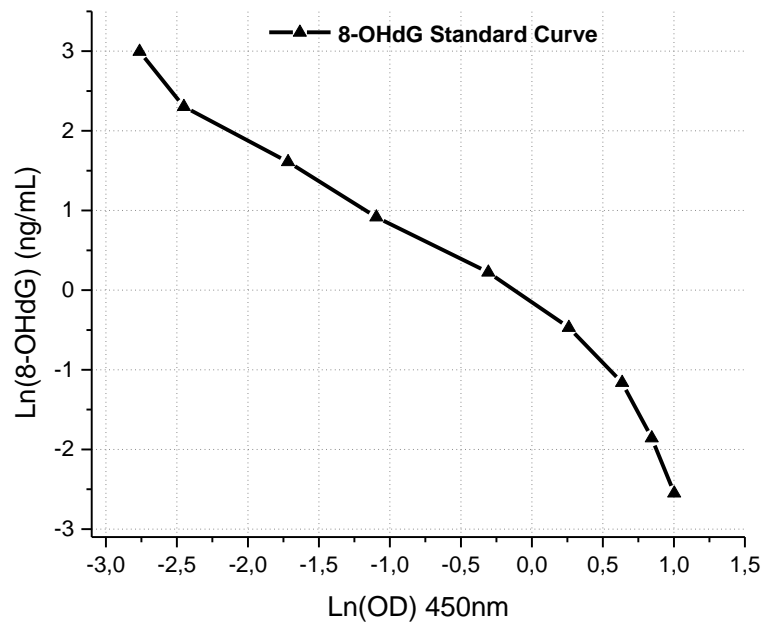
Εικόνα 2.3. Διαδοχικές αραιώσεις των πρότυπων δειγμάτων της 8-OHdG.

2.2.4.4. Πειραματικό Πρωτόκολλο

Σύμφωνα με τις οδηγίες του OxiSelect™™ Oxidative DNA Damage ELISA Kit (8-OHdG Quantitation), τα υπό μελέτη για 8-OHdG καθώς και τα 8-OHdG πρότυπα δείγματα, προστίθενται σε EIA μικροπλάκα στην οποία είναι ήδη προσροφημένη η συζευγμένη 8-OHdG/BSA. Συνοπτικά, μετά από μία σύντομη χρονικά επώαση, ακολουθεί η προσθήκη του anti-8-OHdG αντισώματος, η οποία ακολουθείται από την προσθήκη του δευτερογενούς αντισώματος συζευγμένο με HRP. Τέλος, ο ποσοτικός προσδιορισμός της 8-OHdG στα εξεταζόμενα δείγματα θα προκύψει με σύγκριση των αποτελεσμάτων με τα προκαθορισμένα της πρότυπης καμπύλης. Πιο αναλυτικά, το πειραματικό πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε περιγράφεται παρακάτω:

- 1^ο) Αρχικά, αναδεύονται τα αντιδραστήρια του ELISA kit.
- 2^ο) Τα δείγματα πλάσματος με υψηλή περιεκτικότητα σε 8-OHdG αραιώνονται 10-20 φορές με τη χρήση του διαλύματος Assay Diluent.
- 3^ο) Κατόπιν, προστίθενται 50 μl δείγματος, είτε του εξεταζόμενου είτε πρότυπου δείγματος, σε όλα τα συζευγμένα με 8-OHdG-BSA πηγάδια της μικροπλάκας.
- 4^ο) Ακολουθεί επώαση με ταυτόχρονη ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min.
- 5^ο) Εν συνεχεία, προστίθενται 50 μL πρωτογενούς anti-8-OHdG αντισώματος σε όλα τα δείγματα και επωάζονται με ταυτόχρονη ανάδευση για 1h σε θερμοκρασία δωματίου.
- 6^ο) Ακολουθούν 3 εκπλύσεις σε όλα τα πηγάδια με 250 μL διαλύματος 1x Wash Buffer.
- 7^ο) Μετά την τελευταία έκπλυση, απομακρύνεται τυχόν περίσσεια διαλύματος 1x Wash Buffer.
- 8^ο) Ύστερα, σε όλα τα δείγματα, προστίθενται 100 μL δευτερογενούς αντισώματος συζευγμένο με HRP και επωάζονται με ταυτόχρονη ανάδευση για 1h σε θερμοκρασία δωματίου.
- 9^ο) Έπειτα, ακολουθούν 3 επλύσεις με 1x Wash Buffer όπως αναφέρθηκε παραπάνω στο βήμα 6.
- 10^ο) Προστίθενται 100μL διαλύματος Substrate Solution/πηγάδι.
- 11^ο) Τα δείγματα επωάζονται και αναδεύονται συγχρόνως σε θερμοκρασία δωματίου για 2-30 min.
- 12^ο) Για τον τερματισμό της ενζυμικής αντίδρασης, προστίθενται 100 μL διαλύματος Stop Solution/πηγάδι.
- 13^ο) Τέλος, η απορρόφηση των δειγμάτων μετράται άμεσα ELISA reader στα 450nm (Versamax, Orleans, USA).

2.2.4.5. Πρότυπη καμπύλη 8-OHdG.



Εικόνα 2.4. Πρότυπη καμπύλη για τον ποσοτικό προσδιορισμό της 8-OHdG στα δείγματα πλάσματος.

Στην εικόνα 2.4 απεικονίζεται η πρότυπη καμπύλη της 8-OHdG η οποία προέκυψε από τις μετρήσεις των πρότυπων δειγμάτων και κρίνεται αναγκαία για τον ποσοτικό προσδιορισμό του εν λόγω δείκτη στα δείγματα πλάσματος (ng/ml).

2.2.5. Ποσοτική εκτίμηση της 8-NG

Για την ποσοτική εκτίμηση της 8-NG επελέγη το OxiSelect™ Nitrosative DNA/RNA Damage ELISA kit το οποίο παρέχει τη δυνατότητα ανίχνευσης μέχρι 1 ng/ml ενώ ο εντοπισμός του αντιγόνου γίνεται μέσω ανταγωνιστικού τύπου ELISA. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο απαιτούνται: α) η προετοιμασία των πρότυπων δειγμάτων της 8-NG, β) η προετοιμασία των υπό μελέτη βιολογικών δειγμάτων και γ) η παρασκευή των απαιτούμενων αντιδραστηρίων του ELISA kit.

2.2.5.1. Προετοιμασία βιολογικών δειγμάτων

Τα δείγματα πλάσματος που συλλέχθηκαν από ασθενείς με ακτινοθεραπεία φυγοκεντρήθηκαν στις 3000 g για 10 min.

2.2.5.2. Προετοιμασία Αντιδραστηρίων του OxiSelect™ Nitrosative DNA/RNA Damage ELISA kit

Σύμφωνα με τις οδηγίες του OxiSelect™ Nitrosative DNA/RNA Damage ELISA kit, αντιδραστήρια όπως η συζευγμένη 8-NG/BSA, το πρωτογενές αντίσωμα anti-8-NG, το δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με HRP όπως επίσης και το διάλυμα Wash Buffer αραιώθηκαν κατάλληλα για τις ανάγκες του πειράματος. Ακόμη, αναγκαία ήταν η επίστρωση της μικροπλάκας με συζευγμένη 8-NG/BSA ώστε να φορτωθούν τα δείγματα. Πιο αναλυτικά:

- 1^ο) Για την επίστρωση της μικροπλάκας, η συζευγμένη 8-NG/BSA αραιώνεται 1:400 σε 1x ρυθμιστικό διάλυμα PBS.
- 2^ο) Κατόπιν, προστίθενται 100 μL από το αραιωμένο διάλυμα της συζευγμένης 8-NG/BSA σε όλα τα πηγάδια και ακολουθεί επώαση στους 4°C για όλη τη νύχτα.
- 3^ο) Την επόμενη μέρα απορρίπτεται το διάλυμα της συζευγμένης 8-NG/BSA από τα πηγάδια ενώ ακολουθεί πλύση των πηγαδίων με 1x ρυθμιστικό διάλυμα PBS.
- 4^ο) Μετά την απομάκρυνση οποιασδήποτε περίσσειας υγρού, προστίθενται 200 μL Assay Diluent σε όλα τα πηγάδια ενώ ακολουθεί επώαση για 1-2 hr σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να προσροφηθεί η 8-NG.

5^ο) Κατόπιν, η μικροπλάκα μεταφέρθηκε στους 4°C ενώ απομακρύνεται άμεσα το Assay Diluent προτού χρησιμοποιηθεί η μικροπλάκα.

6^ο) Το ρυθμιστικό διάλυμα Wash Buffer αραιώθηκε από 10x σε 1x με αποστειρωμένο νερό.

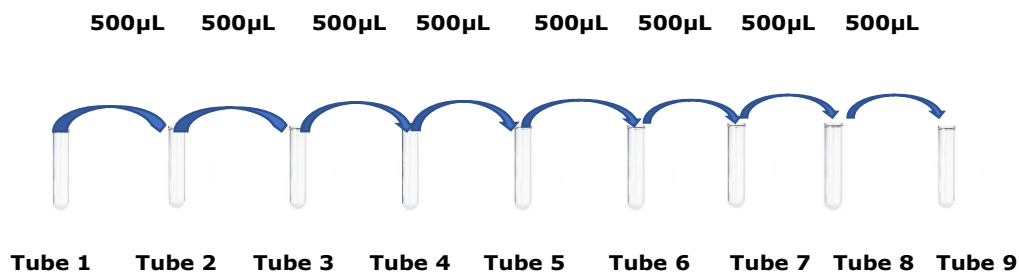
7^ο) Το πρωτογενές anti-8-NG καθώς και το δευτερογενές αντίσωμα αραιώθηκαν 1:2000 και 1:1000 με χρήση του διαλύματος Assay Diluent, αντιστοίχως.

2.2.5.3. Προετοιμασία Πρότυπων δειγμάτων της 8-NG.

Η ετοιμασία των πρότυπων δειγμάτων της 8-NG απαιτούσε την αρχική αραιώση του 8-NG Standard από 1 mg/mL σε 1 µg/mL. Εν συνεχεία, ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις ώστε να προκύψει ένα εύρος συγκεντρώσεων πρότυπων δειγμάτων 8-NG από 0 ng/mL μέχρι 1000 ng/mL όπως αναφέρονται στον πίνακα 2.7 (Εικόνα 2.5.).

Πίνακας 2.7. Στον παραπάνω πίνακα αναφέρονται οι διαδοχικές αραιώσεις που ακολούθηθηκαν ώστε να παρασκευαστούν τα πρότυπα δείγματα της 8-NG .

Standard Tubes	8-Nitroguanine Standard (µL)	Assay Diluent (µL)	8-Nitroguanine (ng/mL)
1	2	1998	1000
2	500 από Tube# 1	500	500
3	500 από Tube# 2	500	250
4	500 από Tube# 3	500	125
5	500 από Tube# 4	500	62.5
6	500 από Tube# 5	500	31.3
7	500 από Tube# 6	500	15.6
8	500 από Tube# 7	500	7.8
9	500 από Tube# 8	500	3.9
10	0	500	0



Εικόνα 2.5. Διαδοχικές αραιώσεις των πρότυπων δειγμάτων της 8-NG.

2.2.5.4. Πειραματικό Πρωτόκολλο

Σύμφωνα με το OxiSelect™ Nitrosative DNA/RNA Damage ELISA kit, τα υπό μελέτη όπως και τα πρότυπα δείγματα της 8-NG φορτώνονται σε EIA μικροπλάκα στην οποία η συζευγμένη 8-NG/BSA είναι ήδη προσροφημένη. Μετά από μια σύντομη επώαση των δειγμάτων, προστίθεται αρχικά το πρωτογενές anti-8-NG αντίσωμα και εν συνεχεία το δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με HRP. Τέλος, η ποσοτική εκτίμηση της 8-NG στα υπό μελέτη δείγματα θα καθοριστεί με σύγκριση των αποτελεσμάτων με τα προκαθορισμένα της πρότυπης καμπύλης.

Πιο αναλυτικά, το πειραματικό πρωτόκολλο που ακολουθείται ώστε να εκτιμηθεί ποσοτικά η 8-NG είναι το παρακάτω:

- 1^ο) Αρχικά, τα απαιτούμενα αντιδραστήρια αναδεύονται ώστε να είναι έτοιμα προς χρήση.
- 2^ο) Κατόπιν, προστίθενται 50 µL εξεταζόμενου ή πρότυπου δείγματος 8-νιτρογουανίνης σε πηγάδια της μικροπλάκας στα οποία είναι ήδη προσροφημένη η 8-NG.
- 3^ο) Ακολουθεί ανάδευση και επώαση των εξεταζόμενων καθώς και των πρότυπων δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου για 10min.
- 4^ο) Κατόπιν, προστίθενται 50 µL anti-8-NG αντισώματος ανά πηγάδι και ακολουθεί επώαση με ταυτόχρονη ανάδευση για 1 h.
- 5^ο) Ακολουθούν 3 εκπλύσεις όλων των πηγαδίων με 250 µL 1x Wash Buffer.
- 6^ο) Μετά την τελευταία πλύση, απομακρύνεται τυχόν περίσσεια διαλύματος Wash Buffer.

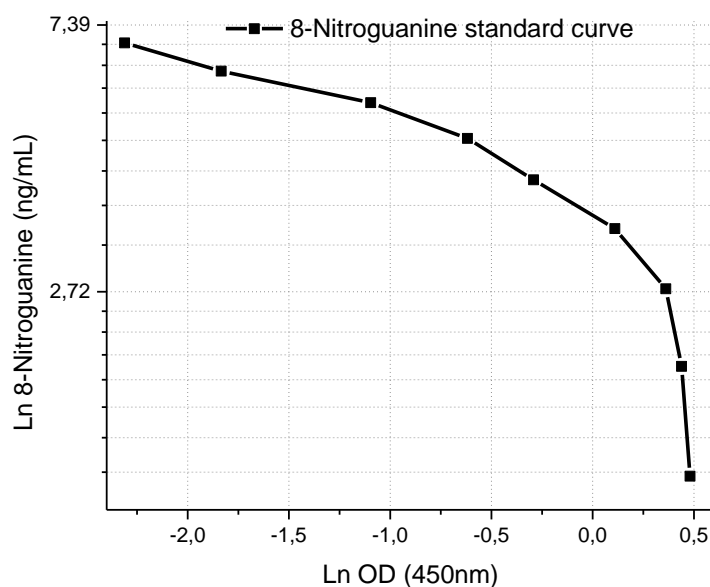
7^ο) Έπειτα, προστίθενται 100 μL δευτερογενούς αντισώματος συζευγμένου με HRP και ακολουθεί επώαση των δειγμάτων για 1h σε θερμοκρασία δωματίου με ταυτόχρονη ανάδευση.

8^ο) Μετά από 3 εκπλύσεις, προστίθενται 100 μL Substrate Solution σε όλα τα πηγάδια και ακολουθεί επώαση των δειγμάτων από 2 μέχρι 30min.

9^ο) Προστίθενται 100 μL Stop Solution/πηγάδι ώστε να τερματιστεί η ενζυμική αντίδραση.

10^ο) Τέλος, η απορρόφηση των δειγμάτων μετράται άμεσα ELISA reader στα 450nm (Versamax, Orleans, USA).

2.2.5.5. Πρότυπη καμπύλη 8-NG.



Εικόνα 2.6. Πρότυπη καμπύλη για τον ποσοτικό προσδιορισμό της 8-NG στα δείγματα πλάσματος.

Στην εικόνα 2.5 απεικονίζεται η πρότυπη καμπύλη της 8-NG η οποία προέκυψε από τις μετρήσεις των πρότυπων δειγμάτων και κρίνεται αναγκαία για τον ποσοτικό προσδιορισμό του εν λόγω δείκτη στα δείγματα πλάσματος (ng/ml).

2.2.6. Ποσοτική εκτίμηση GSH

Για την ποσοτική εκτίμηση της GSH στο πλάσμα των ασθενών, επελέγη το Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Glutathione (GSH) όπου η ανίχνευση του αντιγόνου επιτυγχάνεται με ανταγωνιστικού τύπου ELISA.

2.2.6.1. Προετοιμασία βιολογικών δειγμάτων

Τα δείγματα πλάσματος που συλλέχθηκαν από ασθενείς σε ακτινοθεραπεία φυγοκεντρήθηκαν στις 1000 g στους 2-8°C για 15 min, 30 min μετά από τη συλλογή. Εν συνεχεία, στα δείγματα πλάσματος προστίθεται κατάλληλη ποσότητα EDTA ως αντιθρομβωτικό.

2.2.6.2. Προετοιμασία αντιδραστηρίων Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Glutathione (GSH)

Πριν ξεκινήσει η πειραματική διαδικασία, απαιτείται η προετοιμασία των παρακάτω αντιδραστηρίων:

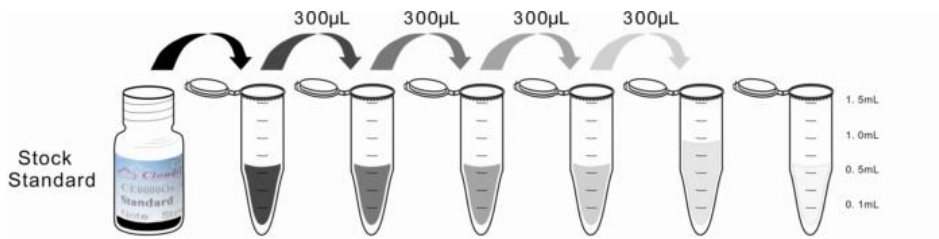
- **Detection Reagent A:** Ανασύσταση του αντιδραστηρίου με 150 μ L Reagent Diluent και ακολουθεί ήπια ανακίνηση. Για τις ανάγκες του πειράματος, απαιτείται αραιώση του Detection Reagent A 1:100 με τη χρήση του διαλύματος Assay Diluent A.
- **Detection Reagent B:** Πριν οποιαδήποτε χρήση, φυγοκεντρείται το Detection Reagent B. Για τις ανάγκες του πειράματος, απαιτείται αραιώση του Detection Reagent B 1:100 με τη χρήση του διαλύματος Assay Diluent B.
- **Wash Solution:** Αραιώση 20mL (30 \times) Wash Solution με 580mL αποστειρωμένου H₂O έτσι ώστε να προκύψει 1 \times Wash Solution 600m.

2.2.6.3. Προετοιμασία πρότυπων δειγμάτων της GSH

Η ετοιμασία των πρότυπων δειγμάτων της GSH απαιτεί την αρχική αραιώση του GSH Standard από 300μg/mL σε 100 μg/mL. Εν συνεχεία, ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις με τη χρήση του διαλύματος Standard diluent ώστε να προκύψει ένα εύρος συγκεντρώσεων πρότυπων δειγμάτων GSH από 0 μg/mL μέχρι 100 μg/mL όπως αναφέρονται στον πίνακα 2.8. Κατόπιν, τα πρότυπα δείγματα ανακινούνται για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου (Εικόνα 2.7.).

Πίνακας 2.8. Στον παραπάνω πίνακα αναφέρονται οι διαδοχικές αραιώσεις που ακολούθησαν ώστε να παρασκευαστούν τα πρότυπα δείγματα της GSH.

Standard tubes	GSH Standard (μL)	Standard diluent (μL)	GSH μg/ml
1	Ανασύσταση του stock	1000	300
2	200 από Tube# 1	600	100
3	300 από Tube# 2	600	33.33
4	300 από Tube# 3	600	11.11
5	300 από Tube# 4	600	3.70
6	300 από Tube# 5	600	1.23
7	0	600	0



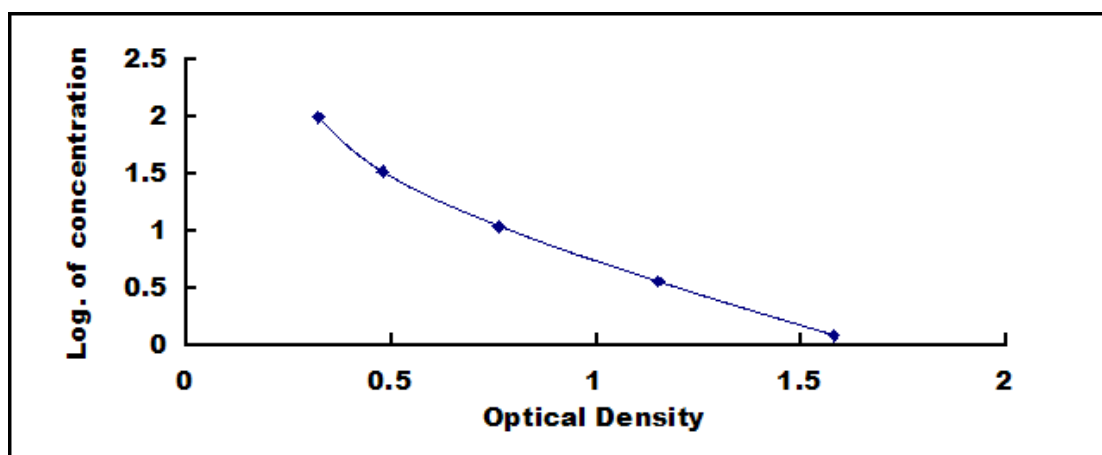
Εικόνα 2.7. Διαδοχικές αραιώσεις των πρότυπων δειγμάτων της GSH (Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Glutathione, BIOMATIK, USA).

2.2.6.4. Πειραματικό πρωτόκολλο

Σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η παρακάτω:

- 1^ο) Αρχικά, τα αντιδραστήρια καθώς και τα δείγματα πρέπει να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου πριν ξεκινήσει η πειραματική διαδικασία.
- 2^ο) Από τη μικροπλάκα, 5 πηγάδια προορίζονται για τα πρότυπα δείγματα, 1 πηγάδι για τυφλό ενώ τα υπόλοιπα για τα υπό μελέτη δείγματα.
- 3^ο) Προστίθενται 50 µL κάθε δείγματος και κατόπιν 50µL Detection Reagent A σε κάθε πηγάδι.
- 4^ο) Έπειτα, ακολουθεί ανακίνηση της μικροπλάκας ενώ η μικροπλάκα καλύπτεται και ακολουθεί επώαση για 1h στους 37^ο C.
- 5^ο) Κατόπιν, απορρίπτεται το διάλυμα από όλα τα πηγάδια και ακολουθούν 3 πλύσεις της μικροπλάκας με 350µL Wash Solution (1x).
- 6^ο) Εν συνεχεία, προστίθενται 100µL Detection Reagent B σε κάθε πηγάδι.
- 7^ο) Ακολουθεί επώαση για 30 min στους 37^ο C ενώ καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης η μικροπλάκα πρέπει να είναι καλυμμένη.
- 8^ο) Ακολουθούν 5 πλύσεις της μικροπλάκας όπως περιγράφεται στο βήμα 5.
- 9^ο) Προστίθενται 90µL Substrate Solution/πηγάδι και η μικροπλάκα καλύπτεται.
- 10^ο) Ακολουθεί επώαση 10 - 20 min στους 37^ο C ενώ καθ' όλη τη διάρκεια επώασης η μικροπλάκα δεν πρέπει να εκτίθεται στο φως.
- 11^ο) Προστίθενται 50µL Stop Solution/πηγάδι και ακολουθεί ήπια ανακίνηση της μικροπλάκας.
- 12^ο) Τέλος, η απορρόφηση μετράται σε ELISA reader στα 450nm (Versamax, Orleans, USA).

2.2.6.5. Πρότυπη καμπύλη GSH



Εικόνα 2.8. Πρότυπη καμπύλη για τον ποσοτικό προσδιορισμό της GSH στα δείγματα πλάσματος.

Στην εικόνα 2.7. απεικονίζεται η πρότυπη καμπύλη της GSH η οποία προέκυψε από τις μετρήσεις των πρότυπων δειγμάτων και κρίνεται αναγκαία για τον ποσοτικό προσδιορισμό του εν λόγω δείκτη στα δείγματα πλάσματος (μg/ml).

2.3. Έλεγχος Τοξικότητας του δέρματος

Έλεγχος και καταγραφή της τοξικότητας ανά εβδομάδα ακτινοθεραπείας καθώς και ένα μήνα μετά το τέλος της, βάσει της Radiation Therapy Oncology Group Acute Skin Toxicity Grades (Bray *et al.*, 2016). Η κλίμακα δερματικής τοξικότητας και τα αντίστοιχα συμπτώματα περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 2.9. Στον παραπάνω αναφέρονται τα κλινικά συμπτώματα που παρουσιάζονται ανά κλίμακα δερματικής τοξικότητας.

Κλίμακα δερματικής τοξικότητας	Κλινική Συμπτωματολογία
0	Καμία αλλαγή
1	Θυλακιώδες ερύθημα, απόπτωση, απόπτωση τριχωτού, ξηρά απολέπιση, μειωμένη εφίδρωση
2	Ερύθημα, κατά τόπους απολέπιση, μέτριο οίδημα
3	Συρρέουσα υγρή απολέπιση, εκτός πτυχές του δέρματος, οίδημα με εντόπωμα
4	Εξέλκωση, αιμορραγία, νέκρωση
5	Θάνατος

2.4 Μαθηματικές εξισώσεις κλινικών παραμέτρων

Οι παρακάτω μαθηματικές εξισώσεις εφαρμόστηκαν για τον υπολογισμό των κλινικών παραμέτρων BMI, BSA, GFR και αιματοκρίτη.

- **BMI** = kg/m²
- **BSA (m²)** = $\sqrt{\text{height (cm)} \times \text{weight (kg)}} / 3600$
- **Αιματοκρίτης**= RBC (κύτταρα/ Lt) x MCV (Lt/κύτταρα) , όπου MCV μέσος κυτταρικός όγκος και RBC τα ερυθροκύτταρα
- **GFR** = κρεατινίνη - ουρία (μmol/L) x όγκο – ουρία (mL) / κρεατινίνη – ορός (μmol/L) x 1440 (min)

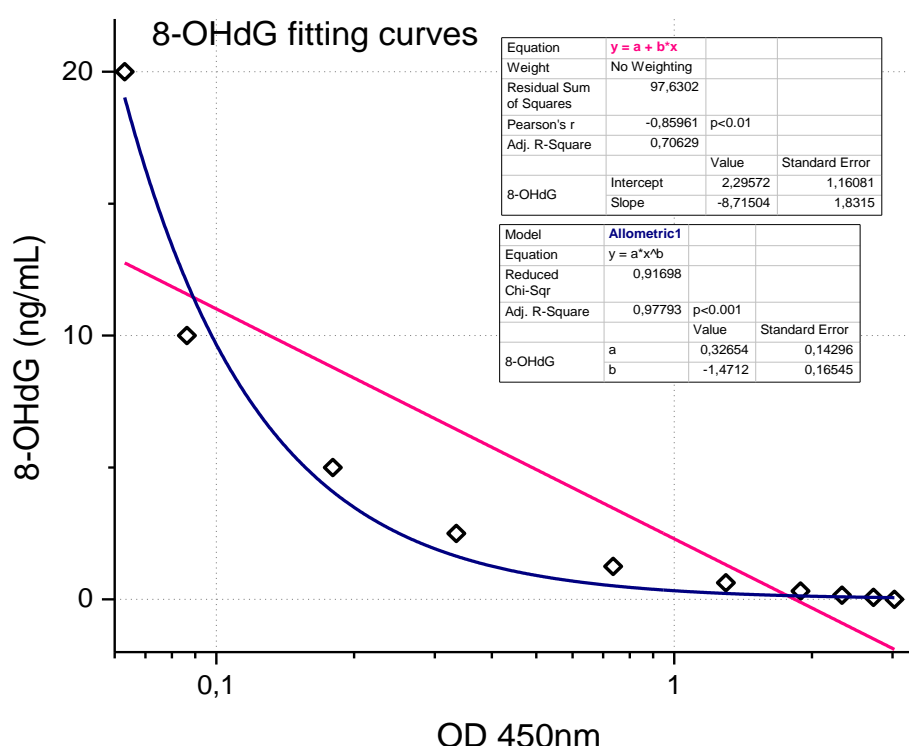
2.5. Στατιστική ανάλυση και επεξεργασία

Η στατιστική ανάλυση και επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Microsoft Excel (Microsoft Hellas, Athens, Greece). Η παραγωγή των 8-OHdG, 8-NG και GSH καθώς και η μεταβολή των συγκεντρώσεων τους κατά το χρόνο και δόσεις ακτινοθεραπείας εκτιμήθηκε με τη λογαριθμοκανονική κατανομή (lognormal fit). Η συσχέτιση των [8-OHdG] και [8-NG] με τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών εκτιμήθηκε με το συντελεστή γραμμικής συσχέτισης r του Pearson τεστ. Επιπρόσθετα, με γραμμική προσαρμογή εξετάστηκε η συσχέτιση των % μεταβολών των [8-OHdG], [8-NG] και [GSH] με το βαθμό ακτινικής δερματίτιδας. Μοντέλο δόσης-ανταπόκρισης (dose response) καθώς και πολυωνυμική προσαρμογή εφαρμόστηκαν για τη συσχέτιση των % μεταβολών [8-OHdG] ως προς το συντελεστή συσχέτισης r για την ανάπτυξη ακτινικής δερματίτιδας. Αντίθετα, η συσχέτιση των % μεταβολών [8-NG] ως προς το συντελεστή συσχέτισης r για την ανάπτυξη ακτινικής δερματίτιδας υπολογίστηκε με βάση την εκθετική προσαρμογή. Όσον αφορά τη μελέτη μεταβολών [GSH] ανάλογα με τις δόσεις ακτινοβολίας, ακολουθήθηκαν τα μοντέλα της γραμμικής καθώς και της εκθετικής προσαρμογής. Με γραμμική συσχέτιση μελετήθηκε η πολυπαραγοντική συσχέτιση των % [8-OHdG] και [8-NG] ως προς % [GSH] με το βαθμό ακτινικής δερματίτιδας. Σε κάθε περίπτωση, αποδεκτό επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε το $p < 0.05$, με διάστημα εμπιστοσύνης 95%.

Κεφάλαιο 3^ο: Αποτελέσματα

3.1. Αποτελέσματα εκτίμησης της [8-OHdG] καθώς και μεταβολής της [8-OHdG] κατά το χρόνο και τη δόση ακτινοβολίας, συσχέτιση της [8-OHdG] με κλινικές παραμέτρους (BMI, BSA, HCT, GFR και ηλικία) καθώς και με το βαθμό εμφάνισης ακτινικής δερματίτιδας.

3.1.1. Καμπύλη προσαρμογής του δείκτη 8-OHdG

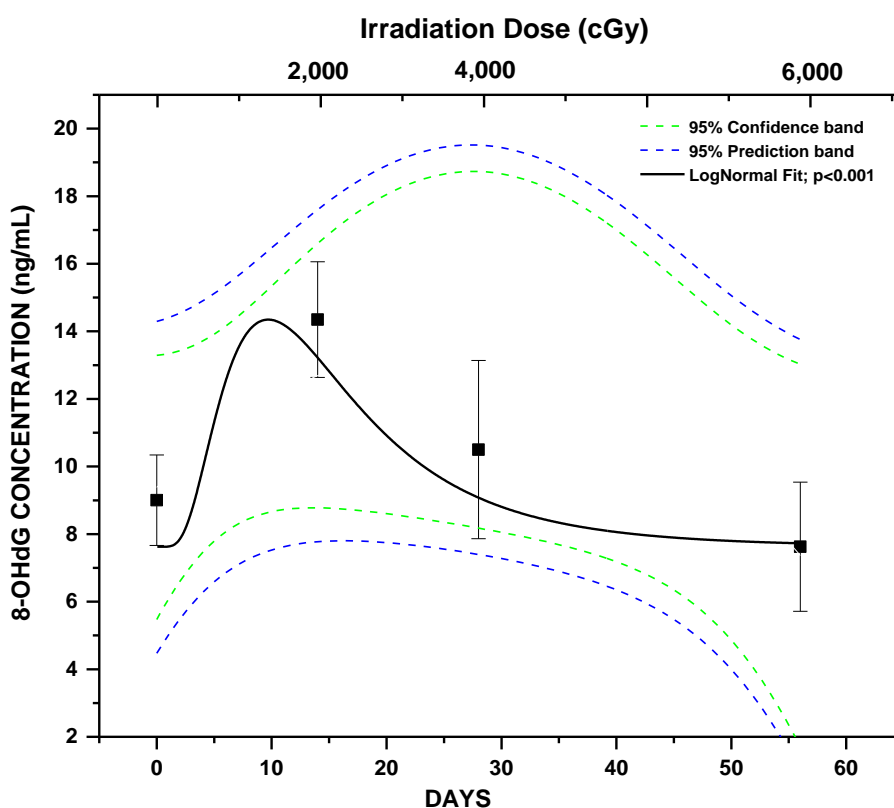


Εικόνα 3.1. Καμπύλη προσαρμογής του δείκτη 8-OHdG όπου απεικονίζεται η καμπύλη του γραμμικού καθώς και αλλομετρικού μαθηματικού μοντέλου. Η κόκκινη καμπύλη αντιστοιχεί στο γραμμικό μοντέλο ενώ η μπλε καμπύλη στο αλλομετρικό.

Καμπύλη προσαρμογής (*fitting curve*) της 8-OHdG, η οποία προέκυψε με βάση την πρότυπη καμπύλη της 8-OHdG (*standard curve*). Στην παραπάνω καμπύλη παρουσιάζονται οι καμπύλες των δύο μαθηματικών μοντέλων που ακολουθήθηκαν, του γραμμικού και αλλομετρικού. Για το γραμμικό μοντέλο, η μαθηματική εξίσωση που εφαρμόστηκε είναι η $y=a+b \cdot x$, με υπολειπόμενο άθροισμα τετραγώνων 97,6302, συντελεστή συσχέτισης Pearson $r = -0,85961$ ($p < 0.01$) και προσαρμοσμένο $r^2 = 0,70629$. Για το αλλομετρικό μοντέλο, η

μαθηματική εξίσωση που εφαρμόστηκε είναι η $y=a*x^b$, με ελάχιστο $x^2=0,91698$ και προσαρμοσμένο $r^2 =0.97793$ ($p<0.001$).

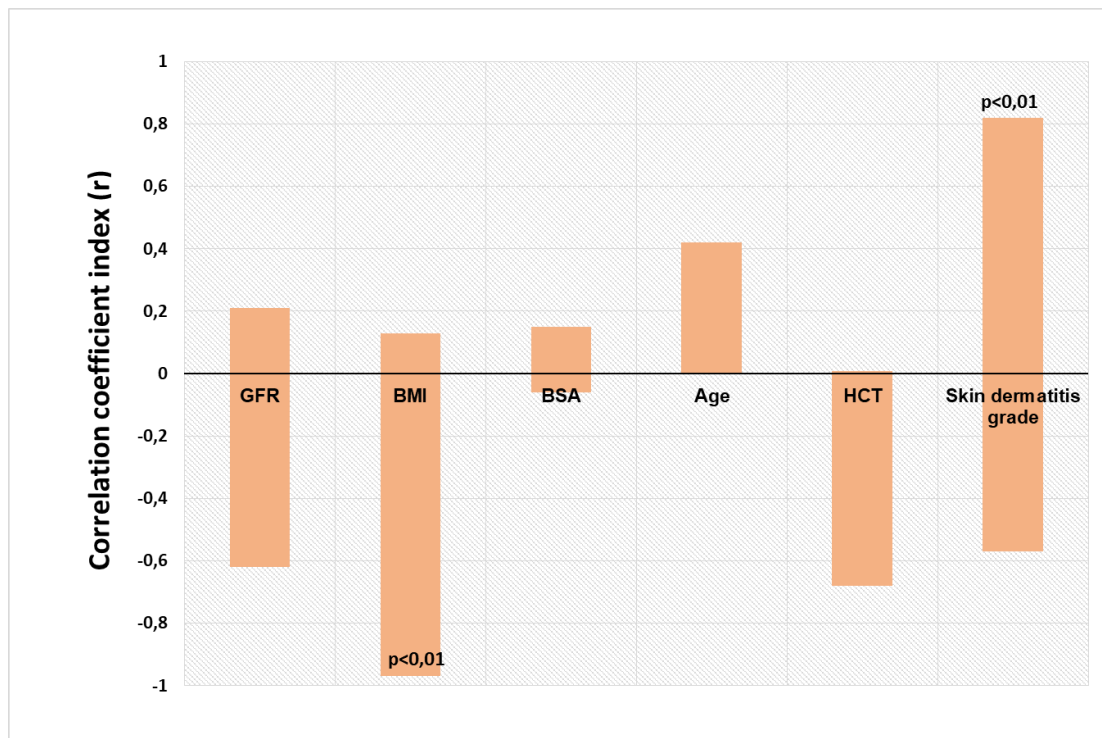
3.1.2. Οι μεταβολές [8-OHdG] στο χρόνο και στη δόση ακτινοβολίας



Εικόνα 3.2. Καμπύλη υπολογισμού των μεταβολών [8-OHdG] στο πλάσμα των ακτινοβοληθέντων ασθενών ανάλογα με το χρόνο και τη δόση ακτινοβολίας.

Στο παραπάνω διάγραμμα απεικονίζονται οι καμπύλες υπολογισμού μεταβολών των [8-OHdG] σε σχέση με το χρόνο και τη δόση ακτινοβολίας (cGy). Η προσαρμογή έγινε με βάση το μαθηματικό μοντέλο LogNormal ($p<0.001$) και με όρια εμπιστοσύνης 95%. Στα δείγματα των ακτινοβοληθέντων ασθενών υπάρχει σημαντική αύξηση της [8-OHdG] από την 5^η έως 15^η μέρα όπου η δόση ακτινοβολίας κυμαινόταν από 1000 έως 3000 cGy. Αντίθετα, από την 15^η μέρα έως 28^η μέρα προκύπτει σημαντική μείωση στη [8-OHdG] όπου η δόση της χορηγηθείσας ακτινοβολίας κυμαινόταν από 3000 έως 4000(cGy). Τέλος, όπως απεικονίζεται στο διάγραμμα, τα επίπεδα [8-OHdG] παραμένουν σταθερά από την 28^η μέρα έως 60^η μέρα όπου η χορηγηθείσα δόση από 4500 έως 6000 (cGy).

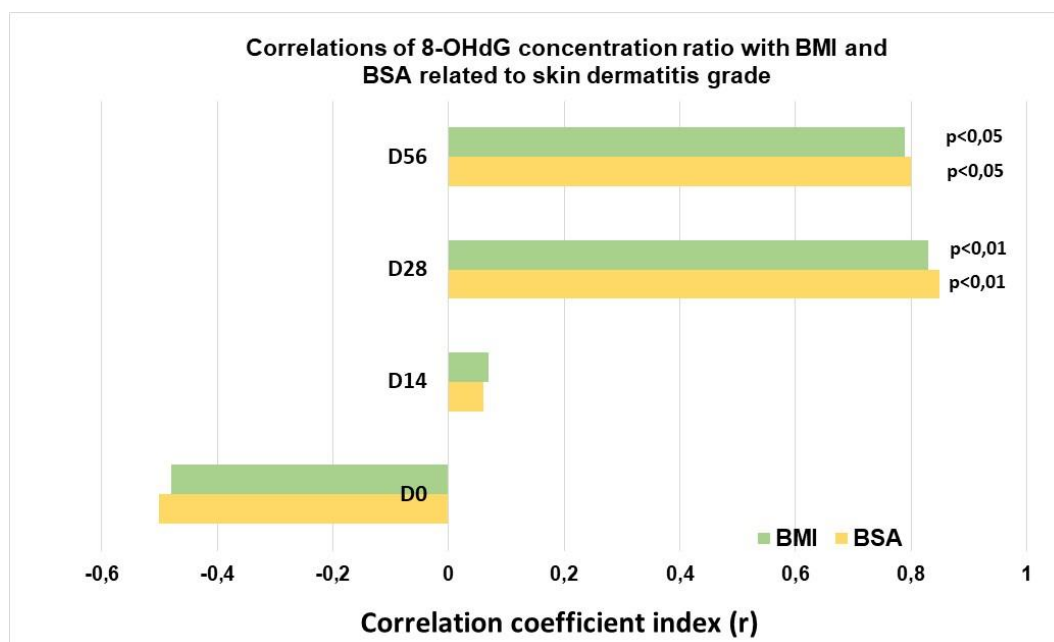
3.1.3. Συσχέτιση [8-OHdG] με τις υπό μελέτη κλινικές παραμέτρους



Εικόνα 3.3. Ο συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson r με βάσει τον οποίο συσχετίζεται η [8-OHdG] με τις εξεταζόμενες κλινικές παραμέτρους.

Στο παραπάνω διάγραμμα απεικονίζεται η συσχέτιση της [8-OHdG] ως προς το συντελεστή συσχέτισης r με τις κλινικές παραμέτρους GFR, BMI, BSA, ηλικία, HCT και βαθμό ακτινικής δερματίτιδας. Παρατηρείται εύρος συσχετίσεων μεταξύ των επιπέδων [8-OHdG] που παράγεται κατόπιν ακτινοθεραπείας με τις προαναφερθείσες κλινικές παραμέτρους. Ωστόσο, η [8-OHdG] συσχετίζεται αρνητικά με την παράμετρο BMI ($p<0.01$) δεδομένου ότι η παραγόμενη 8-OHdG σε ασθενείς με μεγαλύτερο BMI υφίσταται μεγαλύτερη αραίωση συγκριτικά με ασθενείς με μικρότερο BMI. Επιπλέον, στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση ($p<0.01$) υπάρχει μεταξύ της παραγωγής της 8-OHdG η οποία παράγεται μετά από ακτινοθεραπεία, με το βαθμό ακτινικής δερματίτιδας που προκλήθηκε. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η παραγωγή της 8-OHdG συνδέεται με την πρόκληση της ακτινικής δερματίτιδας μετά από ακτινοθεραπεία ενώ δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση είτε αρνητική είτε θετική μεταξύ της παραγωγής της 8-OHdG και των υπολοίπων κλινικών παραμέτρων όπως είναι η ηλικία, GFR, HCT και BSA.

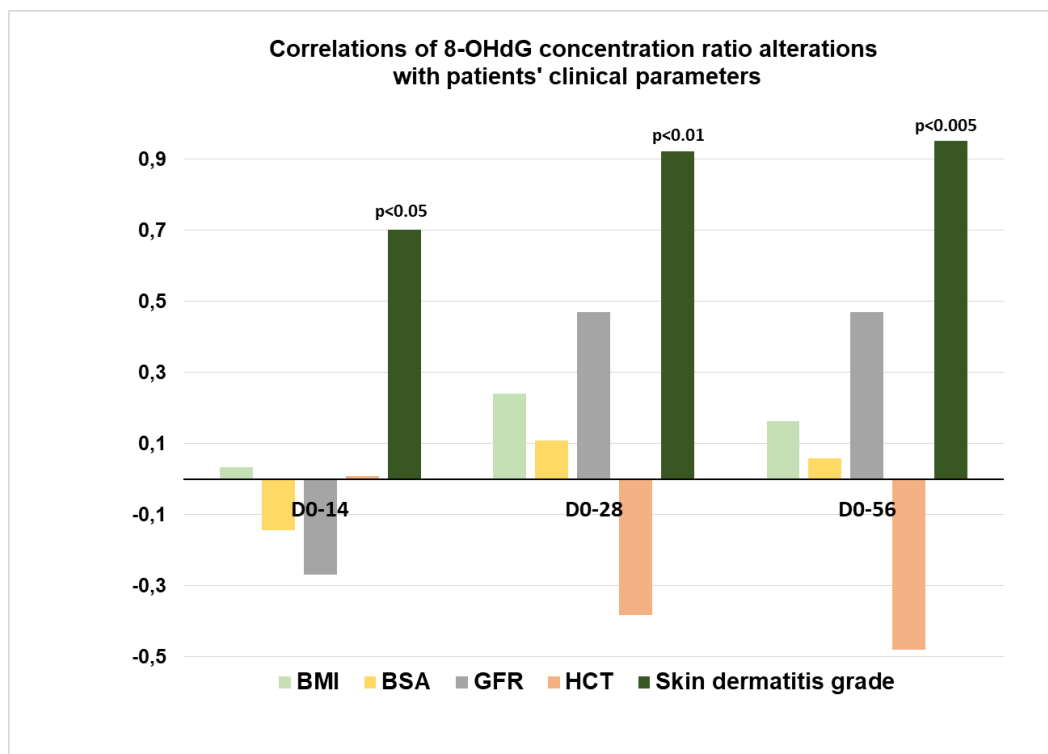
3.1.4. Συσχέτιση των πηλίκων [8-OHdG]/BMI και [8-OHdG]/BSA με το βαθμό ακτινικής δερματίτιδας.



Εικόνα 3.4. Συσχέτιση του πηλίκου [8-OHdG]/BMI και [8-OHdG]/BSA με το βαθμό ακτινικής δερματίτιδας σε σχέση με το χρόνο και τη δόση ακτινοβολίας.

Στο παραπάνω διάγραμμα, συσχετίζεται το πηλίκo [8-OHdG] με τις κλινικές παραμέτρους BMI και BSA ανάλογα με τις ημέρες και τη δόση ακτινοβολίας. Όπως προέκυψε από τα αμέσως παραπάνω αποτελέσματα (**Εικόνα 3.3.**), η [8-OHdG] σχετίζεται με ανάλογο τρόπο με το βαθμό της ακτινικής δερματίτιδας ενώ αντιστρόφως ανάλογα με την BMI παράμετρο. Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα (**Εικόνα 3.4.**), παρατηρείται σημαντική συσχέτιση του πηλίκου [8-OHdG]/BMI καθώς και του πηλίκου [8-OHdG]/BSA με το βαθμό της προκληθείσας ακτινικής δερματίτιδας την 28^η μέρα όπου η χορηγηθείσα δόση ακτινοβολίας ήταν 4000 cGy ($p<0.01$). Επιπρόσθετα, σημαντική συσχέτιση παρατηρείται με το πηλίκo [8-OHdG]/BMI καθώς και του πηλίκου [8-OHdG]/BSA με το βαθμό της προκληθείσας ακτινικής δερματίτιδας την 56^η μέρα όπου η χορηγηθείσα δόση ακτινοβολίας ήταν 6000 cGy ($p<0.05$).

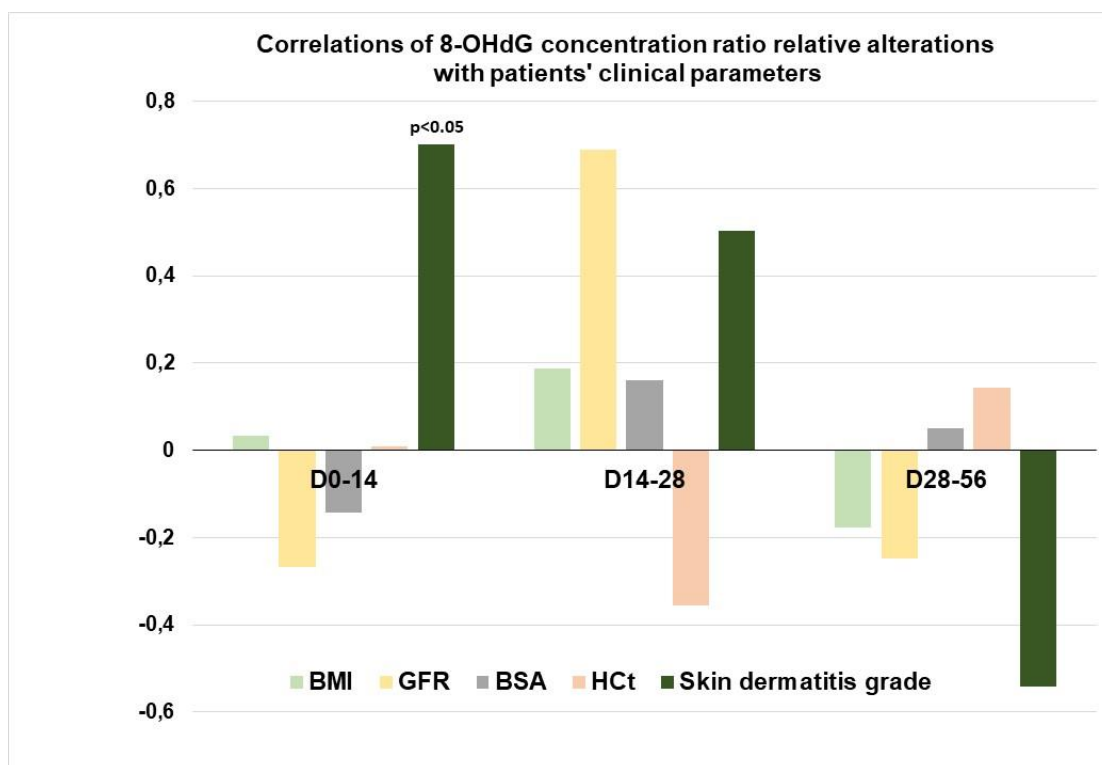
3.1.5. Συσχέτιση του πηλίκου μεταβολής [8-OHdG] με τις υπό μελέτη κλινικές παραμέτρους



Εικόνα 3.5. Συσχέτιση του πηλίκου της συνολικής μεταβολής [8-OHdG] με τις κλινικές παραμέτρους κατά το χρόνο και τη δόση ακτινοθεραπείας.

Στο παραπάνω διάγραμμα απεικονίζεται η συσχέτιση του πηλίκου μεταβολής [8-OHdG] στο χρόνο και στη δόση ακτινοβολίας με τις κλινικές παραμέτρους που μελετήθηκαν. Παρατηρείται στατιστικώς σημαντική συσχέτιση της μεταβολής [8-OHdG] με το βαθμό της ακτινικής δερματίτιδας που αναπτύχθηκε την 14^η μέρα ($p<0.01$), την 28^η μέρα ($p<0.01$) καθώς και την 56^η μέρα ($p<0.05$). Αντίθετα, δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική συσχέτιση του πηλίκου μεταβολής [8-OHdG] με κλινικές παραμέτρους όπως είναι η BMI, BSA, GFR και HCT.

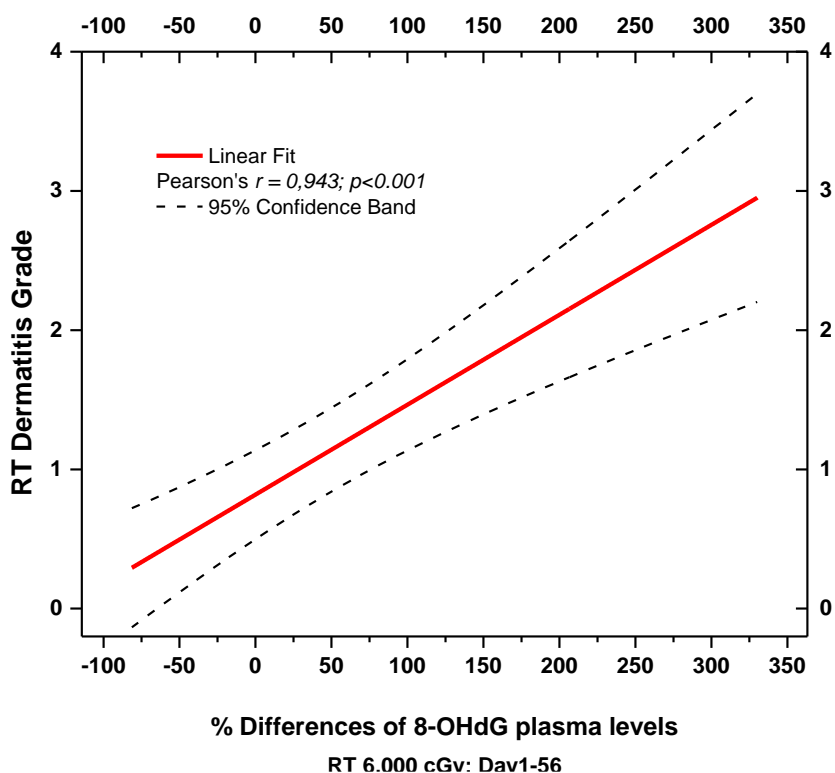
3.1.6. Συσχέτιση των σχετικών μεταβολών [8-OHdG] με τις υπό μελέτη κλινικές παραμέτρους



Εικόνα 3.6. Οι σχετικές μεταβολές της [8-OHdG] στο πλάσμα ασθενών σε συσχέτιση με τις εξεταζόμενες κλινικές παραμέτρους κατά το χρόνο και δόση ακτινοθεραπείας.

Στο παραπάνω διάγραμμα απεικονίζονται οι σχετικές μεταβολές [8-OHdG] σε σχέση με το χρόνο και τη δόση ακτινοθεραπείας. Όπως παρουσιάζεται, σύμφωνα με τις σχετικές μεταβολές των [8-OHdG] κατά τη διάρκεια των δύο πρώτων εβδομάδων ακτινοθεραπείας, κρίνεται δυνατή η πρόβλεψη ακτινικής δερματίτιδας με στατιστική σημασία $p<0.05$. Όσον αφορά τις υπόλοιπες κλινικές παραμέτρους BMI, BSA, GFR και HCT, δεν προκύπτει δυνατή η πρόβλεψη για μεταβολή των προαναφερθέντων παραμέτρων σε σχέση με τη σχετική μεταβολή της [8-OHdG] στο χρόνο και στις δόσεις που έλαβαν οι ακτινοβοληθέντες ασθενείς.

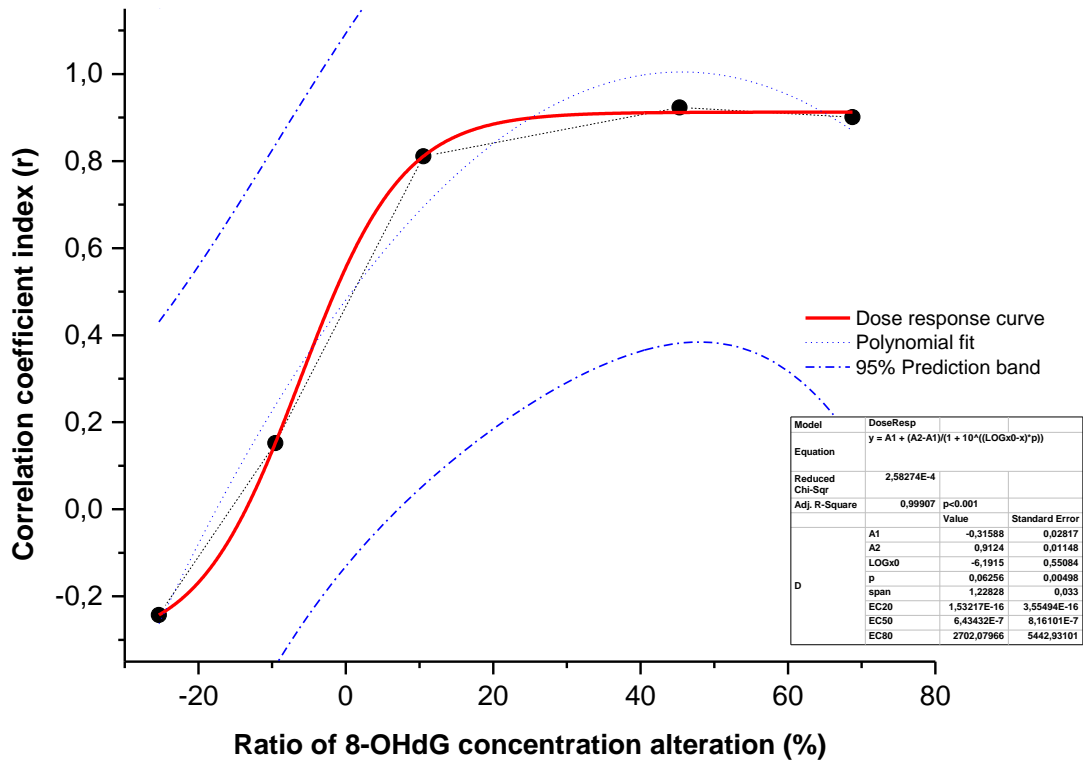
3.1.7. Συσχέτιση των % μεταβολών [8-OHdG] με το βαθμό ακτινικής δερματίτιδας



Εικόνα 3.7. Γραμμική συσχέτιση των % μεταβολών των επιπέδων [8-OHdG] στο πλάσμα ασθενών με το βαθμό ακτινικής δερματίτιδας.

Το παραπάνω διάγραμμα υποδεικνύει τη γραμμική συσχέτιση των % σχετικών μεταβολών των επιπέδων [8-OHdG] στο πλάσμα των ακτινοβοληθέντων ασθενών με το βαθμό ακτινικής δερματίτιδας (Pearson's $r=0.943$, $p<0.001$ και όρια εμπιστοσύνης 95%). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, παρατηρείται σημαντική γραμμική συσχέτιση στις % σχετικές μεταβολές [8-OHdG] κατά το χρόνο (D1-D56 μέρες) και τη δόση ακτινοθεραπείας (0-6000 cGy), με το βαθμό της ακτινικής δερματίτιδας. Συμπερασματικά, μέσω των % σχετικών μεταβολών των επιπέδων [8-OHdG] δίνεται η δυνατότητα πρόβλεψης του βαθμού της ακτινικής δερματίτιδας στους ασθενείς με ακτινοθεραπεία.

3.1.8. Συσχέτιση των % μεταβολών [8-OHdG] ως προς το συντελεστή συσχέτισης r με την πρόκληση ακτινικής δερματίτιδας

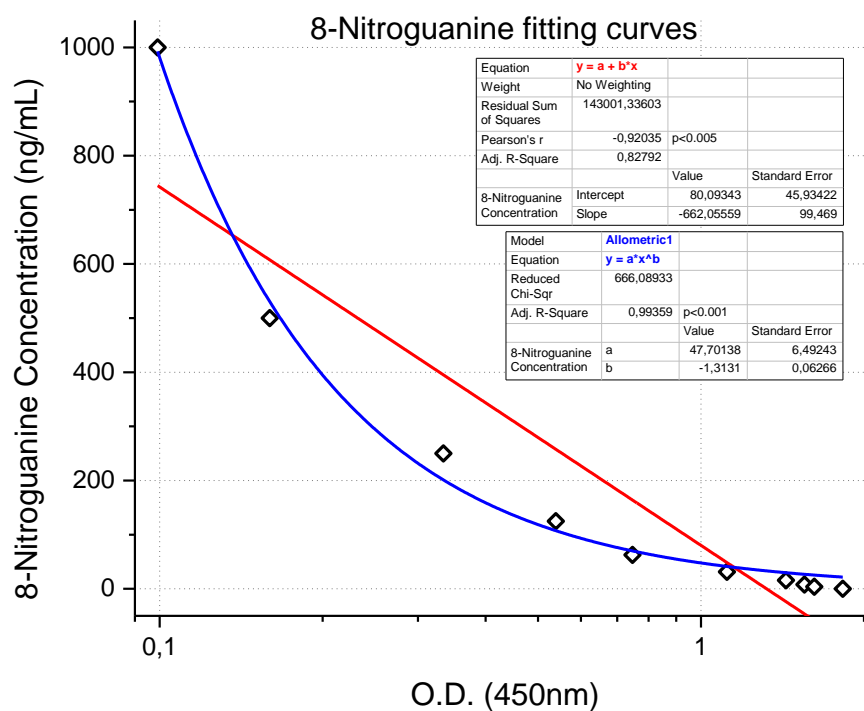


Εικόνα 3.8. Οι % μεταβολές [8-OHdG] ως προς το συντελεστή συσχέτισης r με την ανάπτυξη ακτινικής δερματίτιδας.

Στο παραπάνω διάγραμμα απεικονίζεται η συσχέτιση των % μεταβολών [8-OHdG] ως προς το συντελεστή συσχέτισης r με την ανάπτυξη ακτινικής δερματίτιδας. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, παρατηρείται στατιστικά σημαντική συσχέτιση της ανωτέρου περιγραφόμενης παραμέτρου με τις % μεταβολές [8-OHdG]. Το μοντέλο που αναπτύχθηκε είναι το μοντέλο δόσης ανταπόκρισης το οποίο αναπτύχθηκε με πολυωνυμική προσαρμογή σύμφωνα με την εξίσωση $y=A1+(A2-A1)/(1+10^{(LOGx0-x)*p})$, με ελάχιστο $\chi^2=2.58274E-4$ και προσαρμοσμένο $r^2=0,99907$ ($p<0.001$).

3.2. Αποτελέσματα εκτίμησης της [8-NG] καθώς και μεταβολής της [8-NG] κατά το χρόνο και τη δόση ακτινοβολίας, συσχέτιση της [8-NG] με κλινικές παραμέτρους (BMI, BSA, HCT, GFR και ηλικία) καθώς και με το βαθμό εμφάνισης ακτινικής δερματίτιδας.

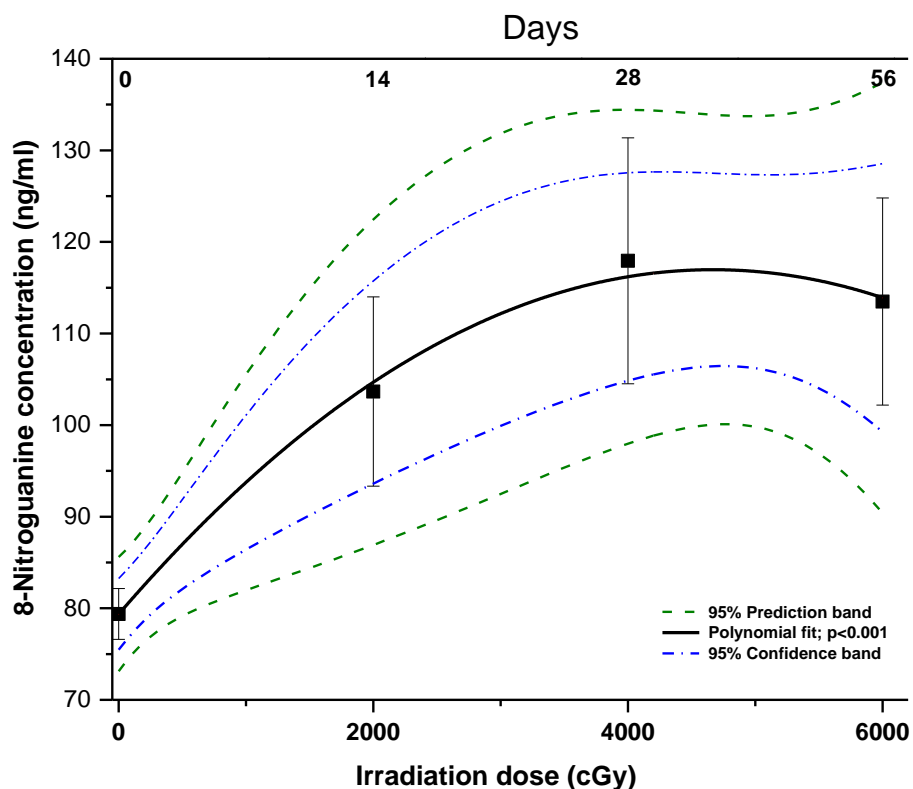
3.2.1. Καμπύλη προσαρμογής του δείκτη 8- NG



Εικόνα 3.9. Καμπύλη προσαρμογής του δείκτη 8-NG όπου απεικονίζεται η καμπύλη του γραμμικού καθώς και αλλομετρικού μαθηματικού μοντέλου. Η κόκκινη καμπύλη αντιστοιχεί στο γραμμικό μοντέλο ενώ η μπλε καμπύλη στο αλλομετρικό.

Καμπύλη προσαρμογής (*fitting curve*) του ανεξάρτητου δείκτη 8-NG, η οποία προέκυψε με βάση την πρότυπη καμπύλη της 8-NG (*standard curve*). Στην παραπάνω καμπύλη παρουσιάζονται οι καμπύλες των δύο μαθηματικών μοντέλων που ακολουθήθηκαν, του γραμμικού και αλλομετρικού. Για το γραμμικό μοντέλο, η μαθηματική εξίσωση που εφαρμόστηκε είναι η $y=a+b \cdot x$, με υπολειπόμενο άθροισμα τετραγώνων 143001,33603, συντελεστή συσχέτισης Pearson's $r=-0,92035$ ($p<0.005$) και προσαρμοσμένο $r^2=0,82792$. Για το αλλομετρικό μοντέλο, η μαθηματική εξίσωση που εφαρμόστηκε είναι η $y=a \cdot x^b$, με ελάχιστο $\chi^2=666,08933$ και προσαρμοσμένο $r^2=0.99359$ ($p<0.001$).

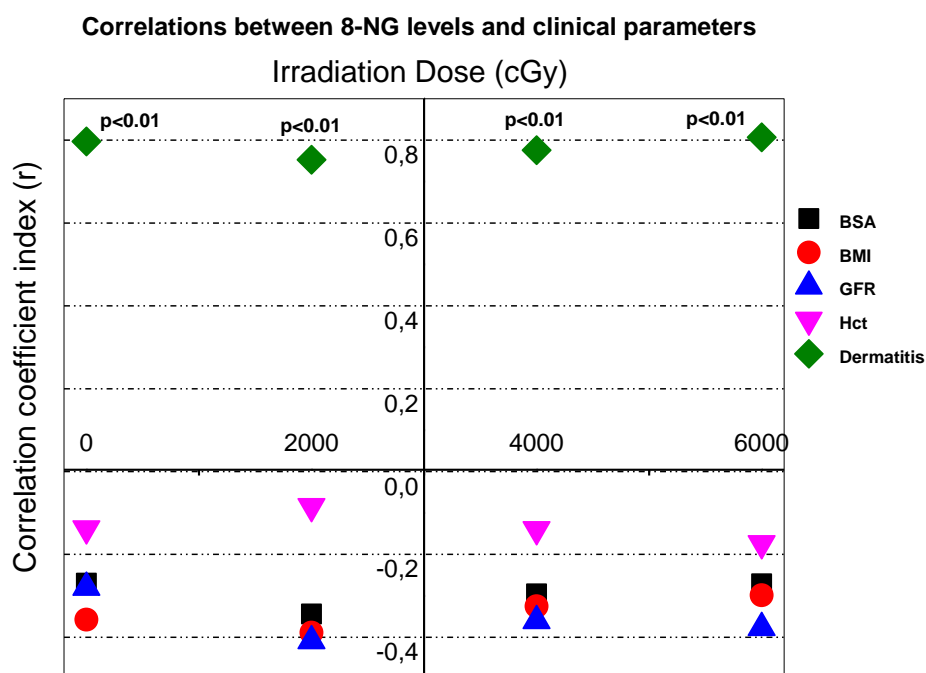
3.2.2. Η μεταβολή [8-NG] κατά το χρόνο και τις δόσεις ακτινοβολίας



Εικόνα 3.10. Πολυωνυμικό μοντέλο προσαρμογής κατά το οποίο όπου συσχετίζεται η [8-NG] με το χρόνο και τη δόση ακτινοβολίας.

Στο παραπάνω διάγραμμα απεικονίζεται η πολυωνυμική προσαρμογή συσχέτισης των επιπέδων [8-NG] που παράγονται κατόπιν ακτινοβόλησης σε σχέση με το χρόνο και τη δόση ακτινοβολίας (polynomial fit με $p < 0.001$, 95% προβλεπτικά όρια και 95% όρια εμπιστοσύνης). Σύμφωνα με την καμπύλη, προκύπτει στατιστικά σημαντική αύξηση [8-NG] ($p < 0.001$) κατά τις τρεις πρώτες εβδομάδες όπου η δόση ακτινοθεραπείας κυμαινόταν από 0 έως 3000 cGy. Ωστόσο, κατά τις ημέρες D21-D56 όπου η χορηγηθείσα ακτινοβολία κυμαινόταν από 3000-6000 cGy η καμπύλη συσχέτισης [8-NG] καταλήγει σε οριζόντιο βήμα γνωστό και ως πλατό.

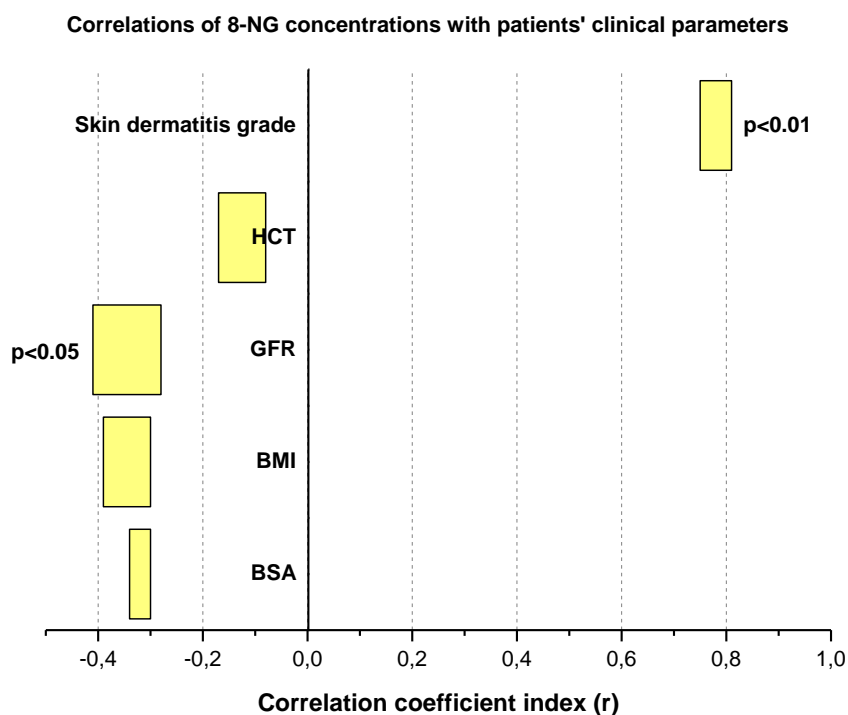
3.2.3. Συσχέτιση των επιπέδων [8-NG] με τις υπό μελέτη κλινικές παραμέτρους κατά τη χορήγηση των διαφόρων δόσεων ακτινοβολίας



Εικόνα 3.11. Συσχέτιση των επιπέδων [8-NG] ως προς το συντελεστή συσχέτισης (r) με τις εξεταζόμενες κλινικές παραμέτρους (BMI, BSA, GFR, HCT ακτινική δερματίτιδα).

Στο παραπάνω διάγραμμα απεικονίζεται η συσχέτιση των επιπέδων [8-NG] στο χρόνο και στη δόση ακτινοβολίας με τις υπό μελέτη κλινικές παραμέτρους (BMI, BSA, GFR, HCT ακτινική δερματίτιδα). Πιο συγκεκριμένα, παρουσιάζεται σημαντική θετική συσχέτιση των επιπέδων [8-NG] με την πρόκληση ακτινικής δερματίτιδας κατά τη χορήγηση των δόσεων ακτινοβολίας 2000 cGy ($p < 0.01$), 4000 cGy ($p < 0.01$) και 6000 cGy ($p < 0.01$). Ωστόσο, δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική συσχέτιση είτε αρνητική είτε θετική μεταξύ της παραγωγής 8-NG και των υπολοίπων κλινικών παραμέτρων. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί η στατιστικά σημαντική συσχέτιση των επιπέδων [8-NG] ($p < 0.01$) στο αίμα των ασθενών πριν την έναρξη της ακτινοθεραπείας (D0) με την εμφάνιση ακτινικής δερματίτιδας, προσδίδοντας στον εν λόγω δείκτη προβλεπτική αξία. Πιθανότατα, η αυξημένη παραγωγή της 8-NG να οφείλεται σε προηγηθείσα χορήγηση επικουρικής χημειοθεραπείας.

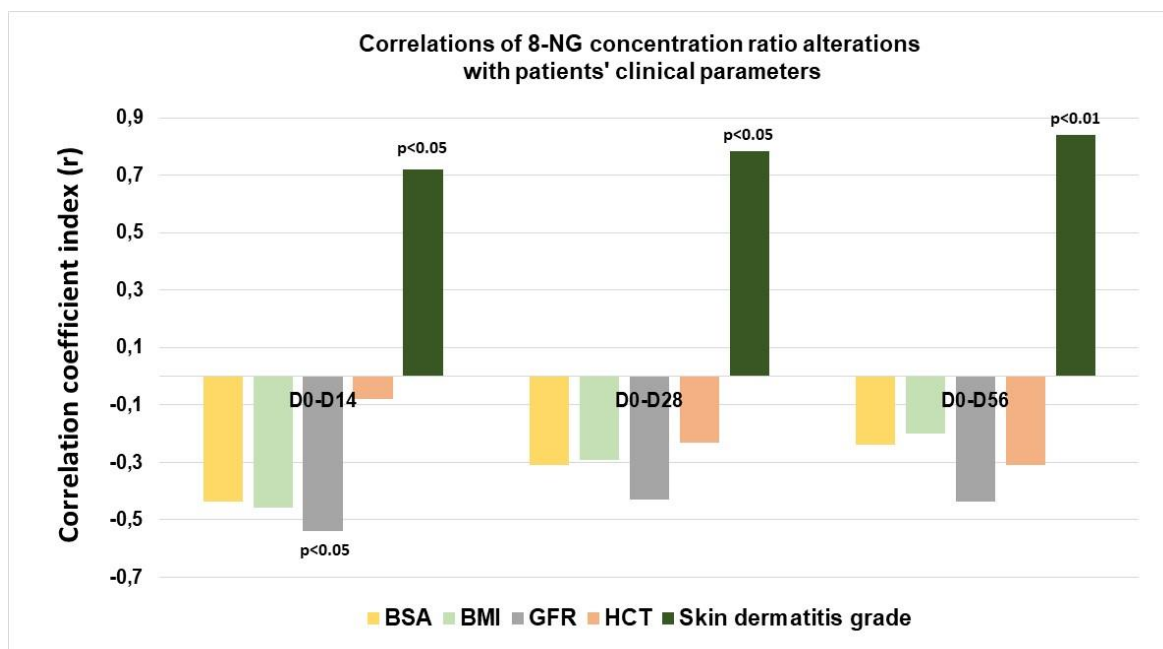
3.2.4. Συνολική παρουσίαση του εύρους συσχετίσεων των επιπέδων [8-NG] με τις υπό μελέτη κλινικές παραμέτρους



Εικόνα 3.12. Εύρος συσχετίσεων [8-NG] ως προς το συντελεστή συσχέτισης (r) με τις εξεταζόμενες κλινικές παραμέτρους.

Το διάγραμμα παρουσιάζει συνολικά το εύρος συσχετίσεων των επιπέδων [8-NG] με τις κλινικές παραμέτρους. Παρατηρείται σημαντική θετική συσχέτιση των αυξανόμενων επιπέδων [8-NG] με την παρουσία ακτινικής δερματίτιδας ($r=0.78$). Επιπλέον, παρουσιάζεται σημαντική αρνητική συσχέτιση των επιπέδων [8-NG] με την παράμετρο GFR ($p<0.05$), υποδεικνύοντας ότι αυξημένη GFR μειώνει τη [8-NG] στο πλάσμα των ακτινοβοληθέντων ασθενών. Ωστόσο, δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική συσχέτιση είτε αρνητική είτε θετική μεταξύ της παραγωγής 8-NG με τις υπόλοιπες κλινικές παραμέτρους.

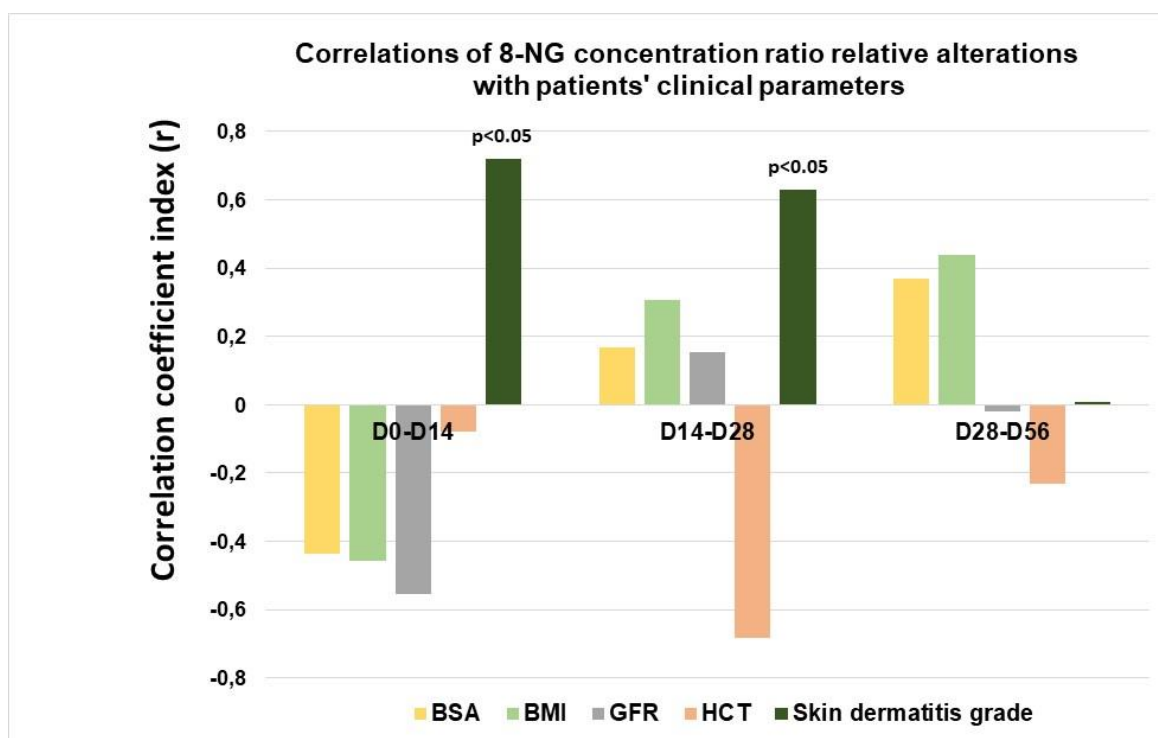
3.2.5. Συσχέτιση του ηλικίου μεταβολής [8-NG] με τις εξεταζόμενες κλινικές παραμέτρους



Εικόνα 3.13. Συσχέτιση του ηλικίου συνολικής μεταβολής [8-NG] ως προς το συντελεστή συσχέτισης r με τις κλινικές παραμέτρους σε σχέση με το χρόνο και τη δόση της ακτινοβολίας.

Το παραπάνω διάγραμμα απεικονίζει τη συσχέτιση του ηλικίου των συνολικών μεταβολών [8-NG] με κλινικές παραμέτρους ανάλογα με το χρόνο και τη δόση ακτινοβολίας. Πιο αναλυτικά, το ηλικίο της συνολικής μεταβολής [8-NG] εμφανίζει στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την πρόκληση ακτινικής δερματίτιδας στα χρονικά διαστήματα D0-D14 ($p<0.05$), D0-D28 ($p<0.05$) και D0-D56 ($p<0.01$). Αντίθετα με την ακτινική δερματίτιδα, δεν προκύπτει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του ηλικίου της συνολικής μεταβολής [8-NG] με τις προαναφερθείσες κλινικές παραμέτρους (BMI, BSA, GFR και HCT).

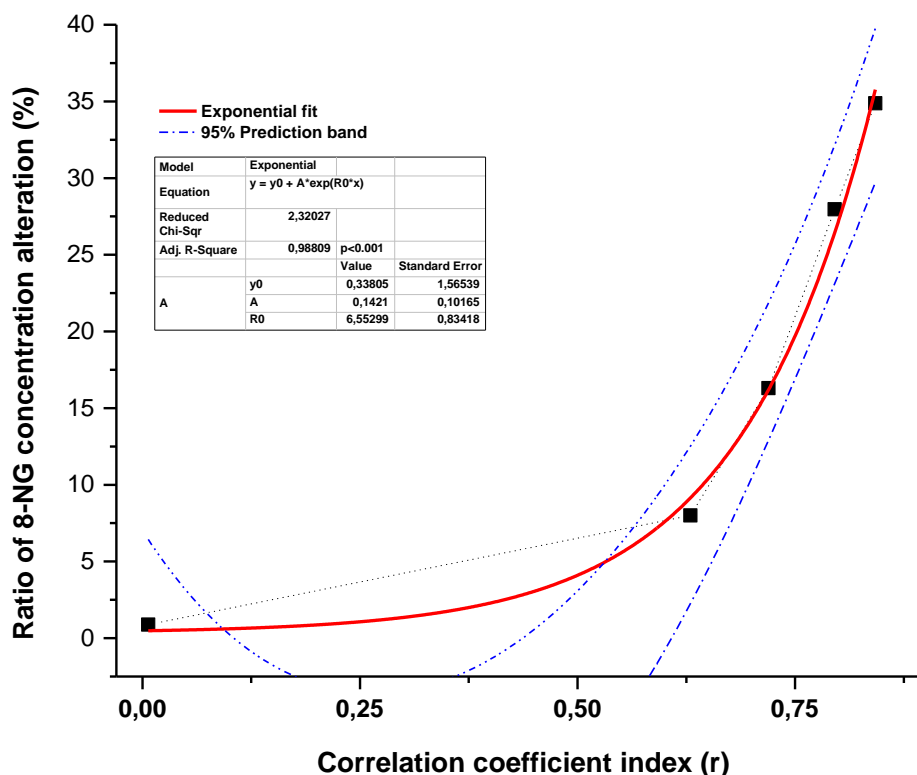
3.2.6. Συσχέτιση των σχετικών μεταβολών των επιπέδων [8-NG] με τις υπό μελέτη κλινικές παραμέτρους



Εικόνα 3.14. Συσχέτιση των σχετικών μεταβολών των επιπέδων [8-NG] κατά το χρόνο και δόση ακτινοβολίας με κλινικές παραμέτρους.

Στο παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζεται η συσχέτιση των σχετικών μεταβολών των επιπέδων [8-NG] κατά τη δόση και διάρκεια ακτινοθεραπείας με τις υπό μελέτη κλινικές παραμέτρους. Από όλες τις κλινικές παραμέτρους, προκύπτει σημαντική συσχέτιση των σχετικών μεταβολών [8-NG] κατά τις μέρες D0-D14 ($p < 0.05$) και D14-D28 ($p < 0.05$) με την παρουσία ακτινικής δερματίτιδας. Ωστόσο, σημειώνεται μη στατιστικά σημαντική αλλά υψηλή συσχέτιση της σχετικής μεταβολής των επιπέδων [8-NG] με την παράμετρο HCT των ακτινοβοληθέντων ασθενών κατά το χρονικό διάστημα D14 – D28. Η παραπάνω συσχέτιση της σχετικής μεταβολής των επιπέδων [8-NG] με την παράμετρο HCT ενδεχομένως να ερμηνεύεται ως αποτέλεσμα τοξικότητας της ακτινοβολίας και συγχρόνως αυξημένης παραγωγής της 8-NG η οποία ανήκει στις βλάβες του DNA που προκαλούνται κατά την ακτινοθεραπεία.

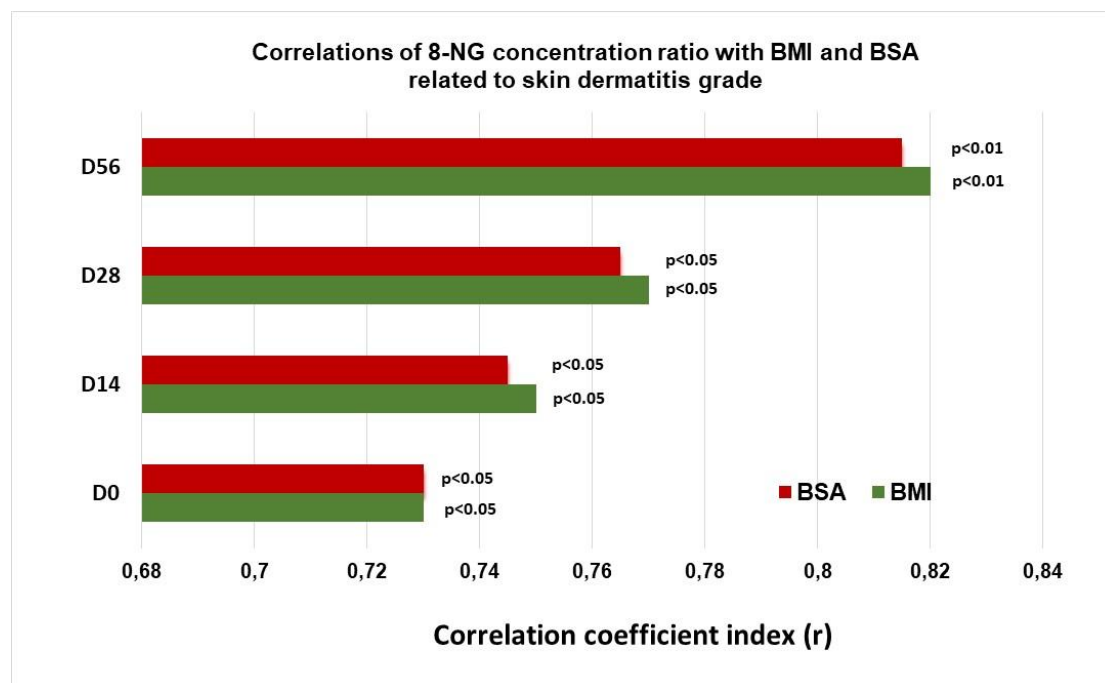
3.2.7. Συσχέτιση των % μεταβολών [8-NG] με την πρόκληση ακτινικής δερματίτιδας



Εικόνα 3.15. Συσχέτιση του πηλίκου των % μεταβολών [8-NG] ως προς το συντελεστή συσχέτισης r με την πρόκληση ακτινικής δερματίτιδας.

Στο παραπάνω διάγραμμα απεικονίζεται η συσχέτιση του πηλίκου των % μεταβολών [8-NG] ως προς το συντελεστή συσχέτισης r με την εμφάνιση ακτινικής δερματίτιδας. Το μαθηματικό μοντέλο εκθετικής προσαρμογής εφαρμόστηκε σύμφωνα με την εξίσωση $y = y_0 + A \cdot \exp(R_0 \cdot x)$, με ελάχιστο χ^2 ίσο με 2,32027, προσαρμοσμένο χ^2 ίσο με 0,98809, $p < 0.001$ και 95% προβλεπτικά όρια. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, προκύπτει σημαντική εκθετική αύξηση στη συσχέτιση των επιπέδων [8-NG] με την πιθανότητα εμφάνισης ακτινικής δερματίτιδας, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι τα επίπεδα [8-NG] έχουν προβλεπτική αξία όσον αφορά την εμφάνιση της ακτινικής δερματίτιδας.

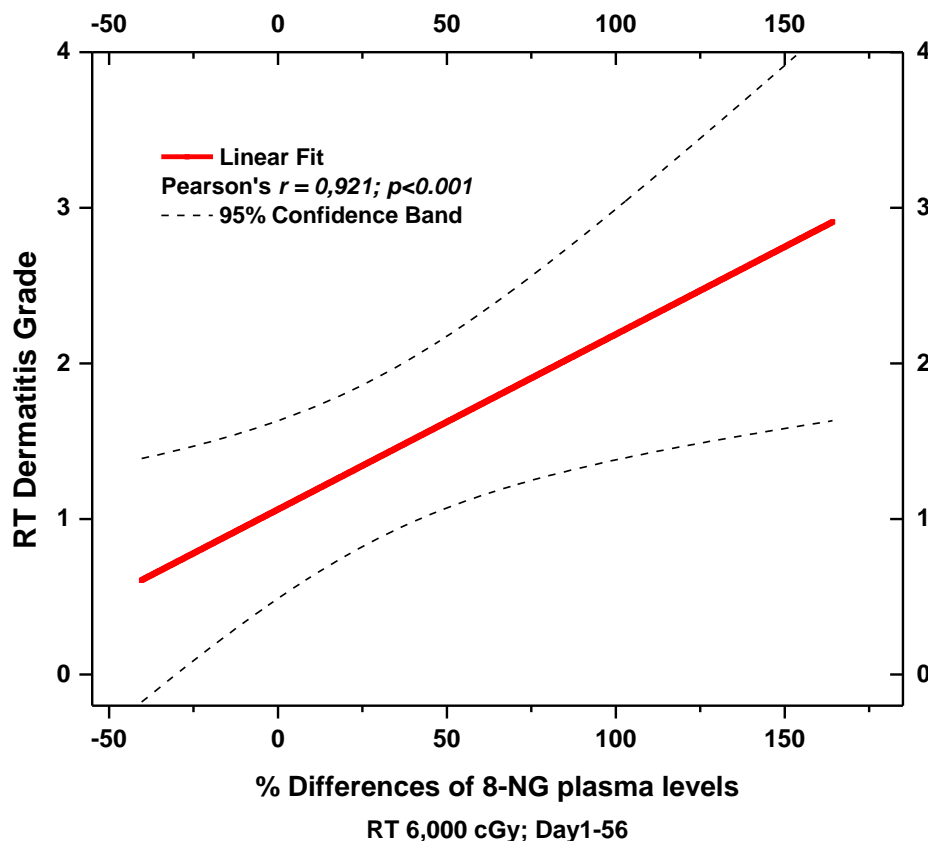
3.2.8. Συσχέτιση του πηλίκου [8-NG] ως προς BMI και BSA με το βαθμό ακτινικής δερματίτιδας



Εικόνα 3.16. Συσχέτιση του πηλίκου [8-NG] ως προς BMI και BSA με το βαθμό ακτινικής δερματίτιδας στο χρόνο και στη δόση ακτινοβολίας.

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα, το πηλίκo [8-NG] ως προς BMI και BSA κατά το χρόνο και δόση ακτινοθεραπείας συσχετίζεται με το βαθμό ακτινικής δερματίτιδας. Πιο συγκεκριμένα, προκύπτει σημαντική συσχέτιση του πηλίκου μεταβολών [8-NG] προς BMI κατά τις ημέρες D0 και D14 όπου η δόση της χορηγηθείσας ακτινοβολίας ήταν 0 cGy ($p<0.05$) και 2000 cGy ($p<0.05$), αντιστοίχως. Ομοίως, παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση του πηλίκου μεταβολών [8-NG] προς BMI κατά τις ημέρες D28 και D56 όπου η ακτινοβολία που χορηγήθηκε ήταν 4000 cGy ($p<0.05$) και 6000 cGy ($p<0.01$), αντιστοίχως. Επίσης, παρουσιάζεται σημαντική συσχέτιση του πηλίκου των μεταβολών [8-NG] ως προς BSA τις ημέρες D0 και D14 όπου η ακτινοβολία που χορηγήθηκε στους ασθενείς ήταν 0 cGy ($p<0.05$) και 2000 cGy ($p<0.05$), αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, σημαντική συσχέτιση προκύπτει μεταξύ του πηλίκου των μεταβολών [8-NG] ως προς BSA τις ημέρες D28 και D56 με χορηγηθείσα ακτινοβολία 4000 cGy ($p<0.05$) και 6000 cGy ($p<0.01$), αντιστοίχως. Τέλος, αξιοσημείωτη είναι η θετική συσχέτιση του πηλίκου των μεταβολών [8-NG] ως προς BMI αλλά και ως προς BSA με την ανάπτυξη της ακτινικής δερματίτιδας πριν την έναρξη της ακτινοθεραπείας (D0).

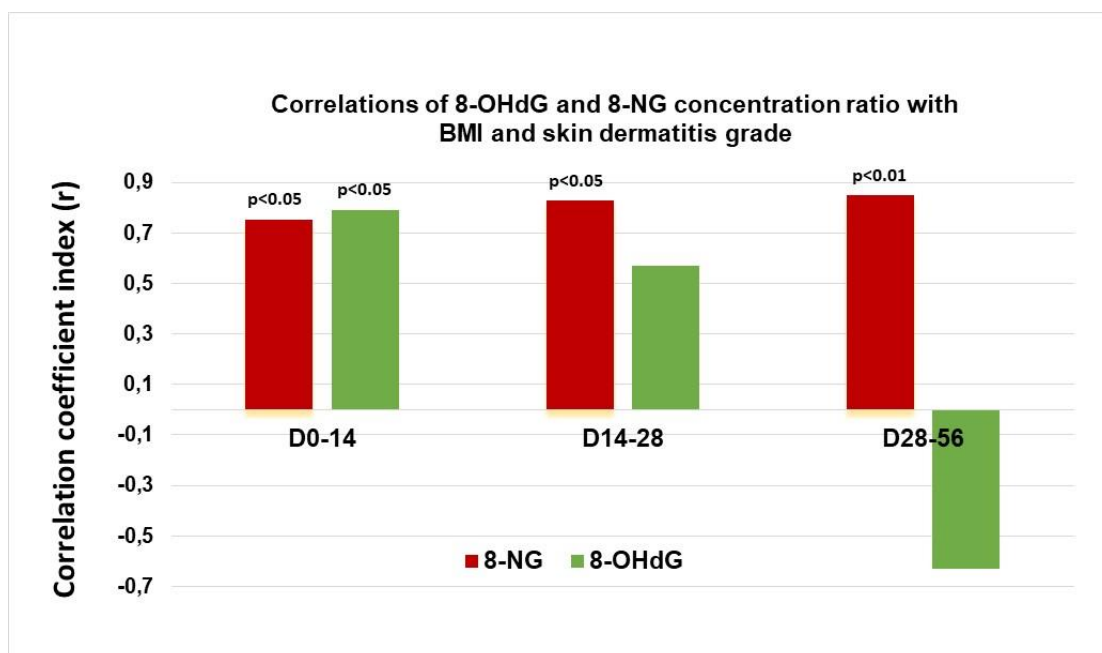
3.2.9. Γραμμική σχέση των % μεταβολών [8-NG] με το βαθμό της προκληθείσας ακτινικής δερματίτιδας



Εικόνα 3.17. Γραμμική σχέση των % μεταβολών [8-NG] με το βαθμό εμφανιζόμενης ακτινικής δερματίτιδας.

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα, οι % μεταβολές [8-NG] στο πλάσμα των ακτινοβοληθέντων ασθενών σχετίζονται γραμμικά (pearson's test, $r = 0.921$, $p < .001$, 95% όρια εμπιστοσύνης) με το βαθμό της εμφανιζόμενης ακτινικής δερματίτιδας. Ωστόσο, σημαντική γραμμική σχέση παρουσιάζεται μεταξύ των % μεταβολών [8-NG] και του βαθμού της αναπτυσσόμενης ακτινικής δερματίτιδας κατά το χρόνο D0-D56 όπου η δόση της ακτινοβολίας κυμαινόταν από 0-6000 cGy.

3.2.10. Συσχετίσεις του πηλίκου των σχετικών μεταβολών των επιπέδων [8-NG] και [8-OHdG] ως προς BMI με το βαθμό της προκληθείσας ακτινικής δερματίτιδας

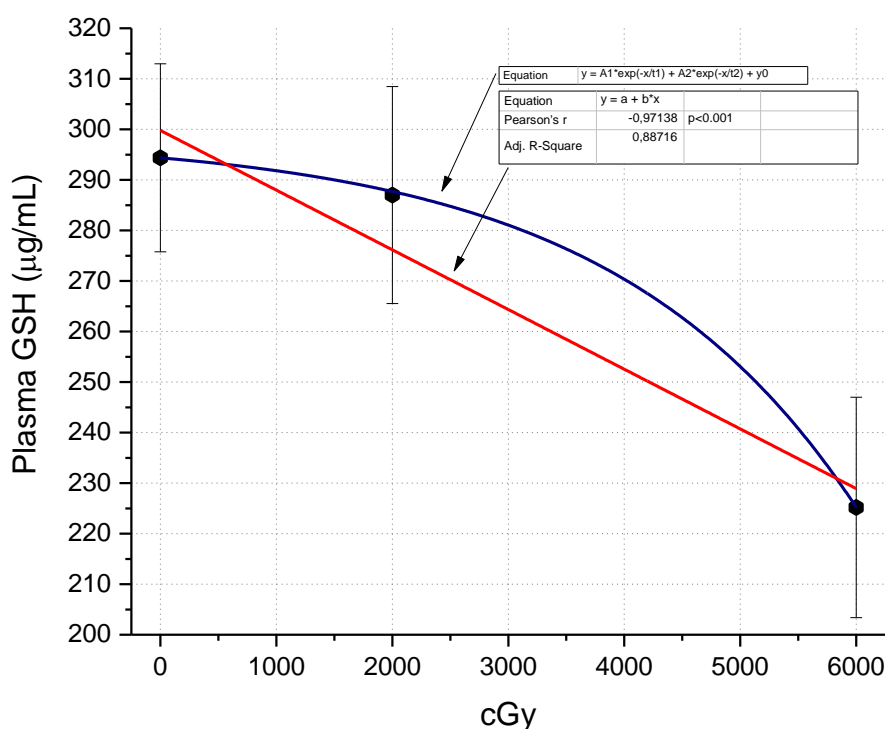


Εικόνα 3.18. Συσχετίσεις του πηλίκου των σχετικών μεταβολών των επιπέδων [8-NG] και [8-OHdG] ως προς BMI με το βαθμό της προκληθείσας ακτινικής δερματίτιδας.

Στο παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζονται συνδυαστικά οι συσχετίσεις του πηλίκου των σχετικών μεταβολών των επιπέδων [8-NG] και [8-OHdG] ως προς BMI με την ανάπτυξη ακτινικής δερματίτιδας ανάλογα με το χρόνο και δόση ακτινοβολίας. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, προκύπτουν σημαντικές συσχετίσεις του πηλίκου [8-NG] προς BMI με την εμφάνιση ακτινικής δερματίτιδας για τα χρονικά διαστήματα D0-D14 ($p<0.05$), D14-D28 ($p<0.05$) και D28-D56 ($p<0.01$) όπου οι δόσεις της ακτινοβολίας ήταν 2000 cGy, 4000 cGy και 6000 cGy, αντιστοίχως. Επιπλέον, παρουσιάζονται σημαντικές συσχετίσεις του πηλίκου [8-OHdG] ως προς BMI με την εμφάνιση ακτινικής δερματίτιδας για το χρονικό διάστημα D0-D14 όπου η χορηγηθείσα ακτινοβολία ήταν 0-2000 cGy ($p<0.05$). Ωστόσο, δεν προκύπτει στατιστικά σημαντική συσχέτιση του πηλίκου [8-OHdG] ως προς BMI με την εμφάνιση ακτινικής δερματίτιδας για τα χρονικά διαστήματα D14-D28 και D28-D56 όπου η ακτινοβολία την οποία έλαβαν οι ασθενείς ήταν 4000 cGy και 6000 cGy, αντιστοίχως. Συμπερασματικά, η 8-NG, ως συνέπεια της βλάβης του DNA, παρουσιάζει σημαντικές συσχετίσεις με την εμφάνιση ακτινικής δερματίτιδας καθ' όλη τη διάρκεια του προγράμματος της ακτινοθεραπείας εν αντιθέσει με την 8-OHdG η οποία παρουσιάζει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μόνο κατά τις 2 πρώτες εβδομάδες ακτινοθεραπείας.

3.3. Αποτελέσματα εκτίμησης της [GSH] καθώς και των μεταβολών της [GSH] με το χρόνο και τη δόση ακτινοβολίας, συσχέτιση της [GSH] με κλινικές παραμέτρους (BMI, BSA, HCT, GFR, ηλικία και βαθμό ακτινικής δερματίτιδας) καθώς και πολυπαραγοντική συσχέτιση των [8-OHdG], [8-NG] και [GSH] με το βαθμό της ακτινικής δερματίτιδας.

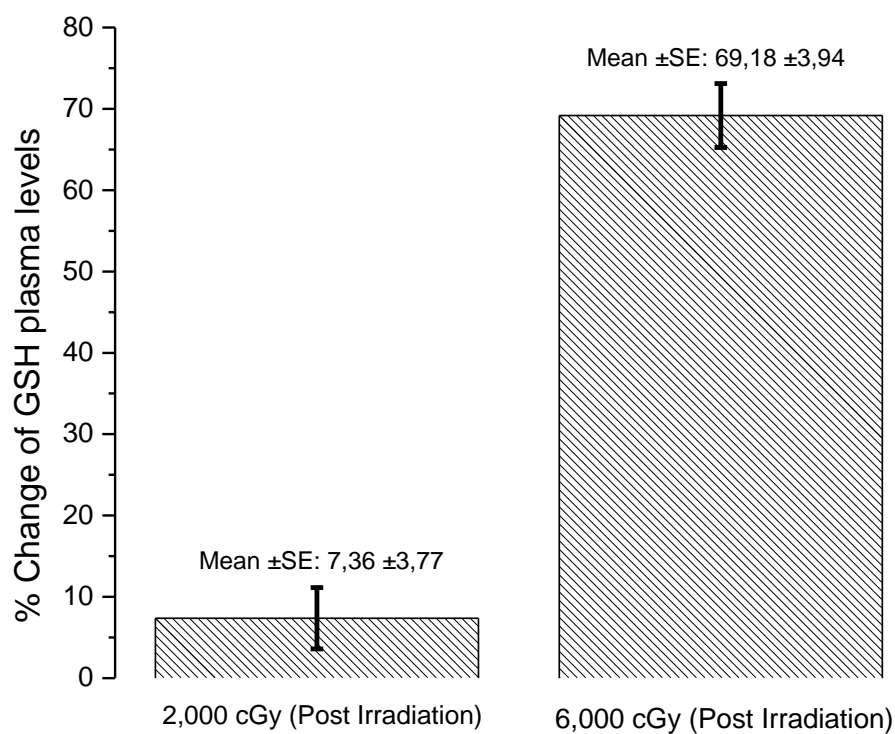
3.3.1. Μεταβολές των επιπέδων [GSH] στο χρόνο και στις δόσεις ακτινοβολίας.



Εικόνα 3.19. Γραμμική και εκθετική προσαρμογή των μεταβολών των επιπέδων [GSH] σε σχέση με τη δόση και το χρόνο ακτινοθεραπείας.

Στο παραπάνω διάγραμμα απεικονίζονται οι μεταβολές των επιπέδων [GSH] στο πλάσμα των ακτινοβοληθέντων ασθενών σε σχέση με τη δόση ακτινοβολίας. Για την παραπάνω μελέτη εφαρμόστηκε η γραμμική και εκθετική προσαρμογή. Για το γραμμικό μοντέλο, η εξίσωση που εφαρμόστηκε $y=a+b \cdot x$, με Pearson's $r=-0.97138$ και $p<0.001$. Όσον αφορά την εκθετική εφαρμογή, η εξίσωση που εφαρμόστηκε ήταν η $y=A1 \cdot \exp(-x/t1)+A2 \cdot \exp(-x/t2)+y0$. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, προκύπτει σημαντική μείωση των επιπέδων [GSH] σε σχέση με τη δόση ακτινοβολίας κατά τη διάρκεια του προγράμματος της ακτινοθεραπείας.

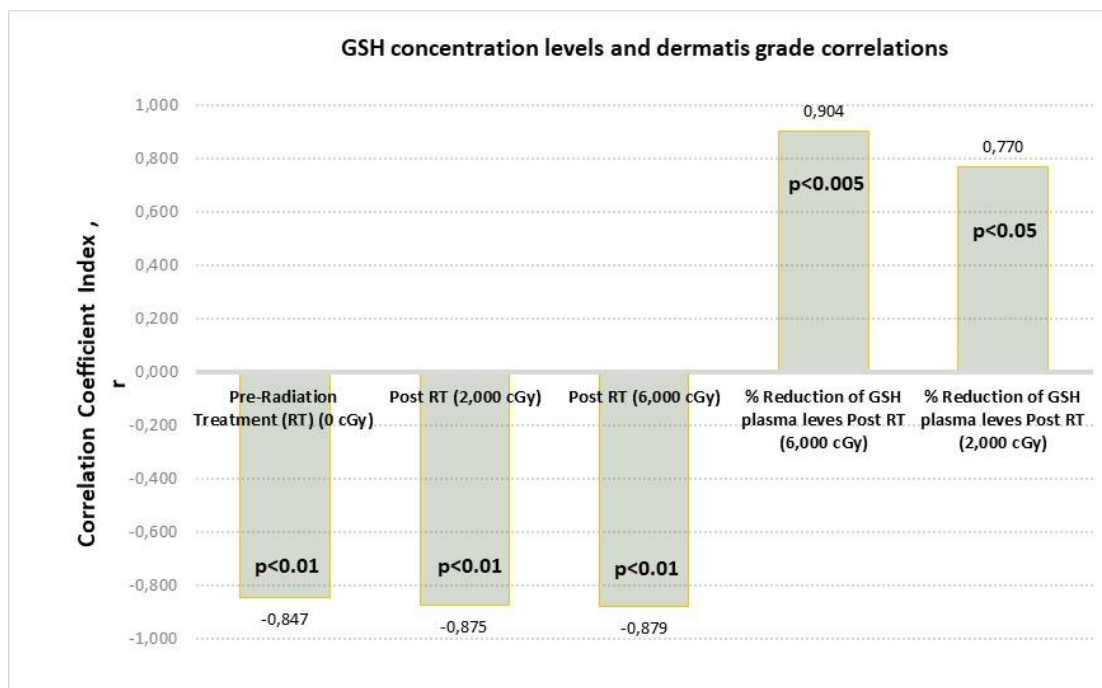
3.3.2. Μεταβολή των επιπέδων [GSH] κατόπιν χορηγήσεως των διαφόρων δόσεων ακτινοβολίας.



Εικόνα 3.20. Μεταβολή [GSH] στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο του μαστού κατά τη χορήγηση των διαφόρων δόσεων του ακτινοθεραπευτικού σχήματος.

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζεται στατιστικά σημαντική μεταβολή στα επίπεδα [GSH] στο πλάσμα των ακτινοβοληθέντων ασθενών οι οποίοι έλαβαν τις δόσεις ακτινοβολίας 2000 cGy καθώς και 6000 cGy ($p < 0.001$).

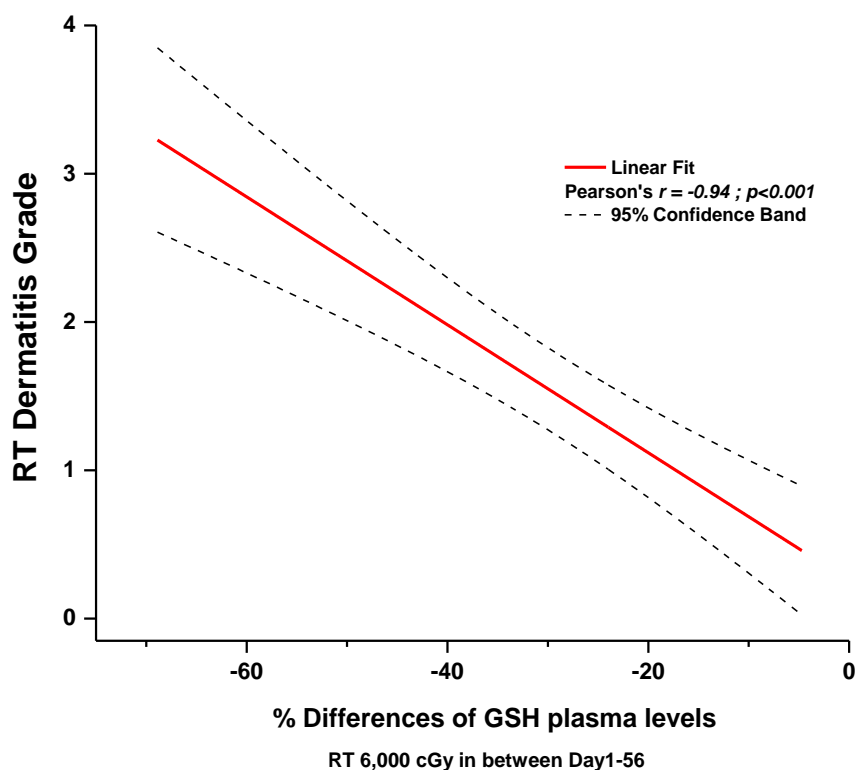
3.3.3. Συσχέτιση των επιπέδων [GSH] με κλινικές παραμέτρους



Εικόνα 3.21. Συσχέτιση των επιπέδων [GSH] ως προς το συντελεστή συσχέτισης r με το βαθμό ακτινικής δερματίτιδας.

Στο παραπάνω διάγραμμα απεικονίζονται οι συσχετίσεις των επιπέδων [GSH] στο πλάσμα των ακτινοβοληθέντων ασθενών με το βαθμό εμφάνισης ακτινικής δερματίτιδας. Πιο συγκεκριμένα, παρουσιάζονται σημαντικές αρνητικές συσχετίσεις των επιπέδων [GSH] με το βαθμό ακτινικής δερματίτιδας κατόπιν χορηγήσεως των δόσεων ακτινοβολίας 2000 cGy ($p < 0.01$) και 6000 cGy ($p < 0.01$). Συνεπώς, μείωση [GSH] στο πλάσμα των ασθενών οδηγεί σε αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ακτινικής δερματίτιδας. Ωστόσο, σημαντικές θετικές συσχετίσεις εμφανίζονται με τις συνολικές μειώσεις των % επιπέδων [GSH] στο πλάσμα ασθενών με το βαθμό ακτινικής δερματίτιδας μετά από τη χορήγηση δόσεων ακτινοβολίας 2000 cGy ($p < 0.05$) και 6000 cGy ($p < 0.005$). Συμπερασματικά, όσο αυξάνεται η μείωση των % επιπέδων [GSH] τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα για εμφάνιση ακτινικής δερματίτιδας. Αξίζει να σημειωθεί ότι πριν την έναρξη ακτινοθεραπείας (D0) τα επίπεδα [GSH] συσχετίζονται αρνητικά σημαντικά με την εμφάνιση ακτινικής δερματίτιδας.

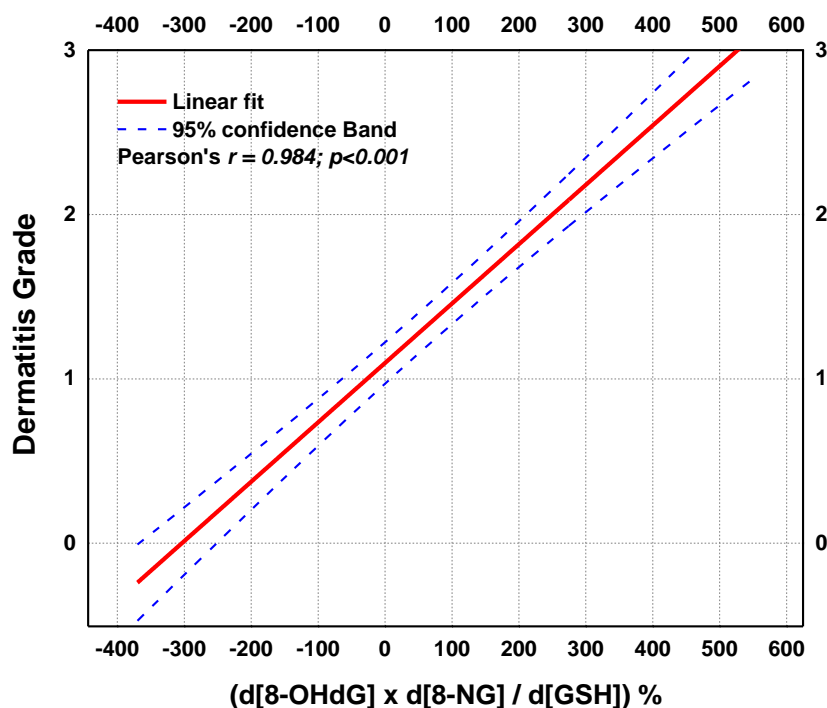
3.3.4. Συσχέτιση των % επιπέδων [GSH] με το βαθμό εμφανιζόμενης ακτινικής δερματίτιδας



Εικόνα 3.22. Γραμμική συσχέτιση της % μείωσης [GSH] με το βαθμό εμφανιζόμενης ακτινικής δερματίτιδας.

Γραμμική συσχέτιση (Pearson's $r=0.94$, $p<0.001$, 95% όρια εμπιστοσύνης) της % μείωσης [GSH] στο πλάσμα των ακτινοβοληθέντων ασθενών με το βαθμό εμφανιζόμενης ακτινικής δερματίτιδας. Παρουσιάζεται στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($p<0.001$) της % μείωσης [GSH] με το βαθμό ακτινικής δερματίτιδας κατόπιν χορήγησης δόσεως ακτινοβολίας καθ' όλη τη διάρκεια του ακτινοθεραπευτικού προγράμματος.

3.3.5. Ολοκληρωμένη συσχέτιση [8-NG], [8-OHdG] και [GSH] καθώς και των μεταβολών των συγκεντρώσεών τους με το βαθμό της ακτινικής δερματίτιδας



Εικόνα 3.23. Πολυπαραγοντική συσχέτιση των % μεταβολών των επιπέδων [8-OHdG] και [8-NG] ως προς % μεταβολές [GSH] με το βαθμό εμφάνισης ακτινικής δερματίτιδας στις διάφορες δόσεις ακτινοβολίας.

Πολυπαραγοντική συσχέτιση των % μεταβολών των επιπέδων [8-OHdG] και [8-NG] ως προς % μεταβολές [GSH] με το βαθμό εμφάνιση ακτινικής δερματίτιδας. Παρουσιάζεται σημαντική γραμμική συσχέτιση (pearson's $r=0.984$, $p<0.001$, 95% όρια εμπιστοσύνης) του πηλίκου των μεταβολών της [8-OHdG] και της [8-NG] ως προς τις μεταβολές % [GSH] με το βαθμό εμφάνισης ακτινικής δερματίτιδας κατά τη διάρκεια χορήγησης δόσεων ακτινοθεραπείας.

Κεφάλαιο 4^ο: Συζήτηση

Πολύτιμο εργαλείο στη θεραπεία κατά του καρκίνου αποτελεί η ακτινοθεραπεία, στόχος της οποίας είναι είτε η καταστροφή ενός όγκου είτε η συρρίκνωση του, είτε η εξάλειψη εναπομεινάντων καρκινικών κυττάρων μετεγχειρητικά, χρησιμοποιώντας κυρίως την ιονίζουσα ακτινοβολία συμπεριλαμβανομένου των ακτινών X και γάμμα (Masuda and Kamiya, 2012). Η ακτινοθεραπεία μπορεί να έχει ριζικό, προληπτικό ή παρηγορητικό χαρακτήρα, καταστρέφοντας, μειώνοντας τον κίνδυνο υποτροπής του όγκου ή εξαλείφοντας συμπτώματα τα οποία σχετίζονται με την νεοπλασία, αντιστοίχως (Delaney *et al.*, 2005). Σε ασθενείς με κακοήθεια του μαστού οι οποίοι υπόκεινται σε ακτινοθεραπεία, το 50% παρουσιάζει καλή ανοχή ενώ σημειώνονται αρκετές περιπτώσεις ασθενών οι οποίοι υποφέρουν από παρενέργειες σχετιζόμενες με την ακτινοβολία. Παράγοντες όπως η ηλικία, ο τρόπος ζωής, οι φλεγμονώδεις αποκρίσεις, το οξειδωτικό στρες, η γενετική προδιάθεση και τα αλληλόμορφα γονιδίων διαφοροποιούν την απόκριση των ασθενών τόσο ως προς την ακτινοθεραπεία όσο και ως προς τις DNA βλάβες οι οποίες προκλήθηκαν κατά την έκθεση στην ακτινοβολία (Smirnov *et al.*, 2012; Hornhardt *et al.*, 2014). Η ανάπτυξη κατάλληλων μοριακών τεχνικών διάγνωσης ως προγνωστικά εργαλεία θα παρέχει τη δυνατότητα θεραπευτικής πρόβλεψης και ταυτοποίησης των ασθενών με αυξημένες πιθανότητες τοξικότητας κατόπιν ακτινοθεραπείας (Borrego-Soto *et al.*, 2015).

Η έκθεση των κυττάρων στην ακτινοβολία διεγείρει τη ραδιόλυση του νερού κατά την οποία πυροδοτείται η παραγωγή των ROS ενώσεων μέσω διάσπασης του μορίου H₂O σε ελεύθερες ρίζες (Azzam *et al.*, 2012). Οι ROS ενώσεις και ειδικότερα η ρίζα του OH· εμπλέκονται σημαντικά στην πρόκληση βλαβών στο DNA και σε τραυματισμούς που προκαλούνται από την έκθεση σε ακτινοβολία. Δεδομένου ότι τα μιτοχόνδρια καταναλώνουν το 90% του οξυγόνου, αποτελούν την βασική πηγή παραγωγής των ROS ενώσεων των οποίων η σύνθεσή επιτυγχάνεται μέσω της διαρροής ηλεκτρονίων από την αναπνευστική αλυσίδα (Yamamoto *et al.*, 2012). Οι ROS ενώσεις προσβάλλουν το DNA καθώς και ελεύθερες βάσεις που εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα και στα μιτοχόνδρια. Από όλες τις νουκλεοτιδικές βάσεις, η γουανίνη ως πιο ευάλωτη στην οξειδωτική δράση των ROS ενώσεων, αποτελεί τον πιο συνήθη στόχο με αποτέλεσμα το σχηματισμό προϊόντος αποδόμησης του DNA, την 8-OHdG. Η παραγωγή της 8-OHdG προκαλεί μεταλλάξεις μέσω μεταστροφής του ζεύγους βάσεως από G:C σε A:T με αποτέλεσμα την ένταξη λανθασμένου ζεύγους βάσεων στην αντιγραφόμενη αλυσίδα του DNA και κατά επέκταση την ανάπτυξη κακοήθειας, κυτταρικής γήρανσης και εκφυλιστικών ασθενειών (Qing *et al.*, 2019).

Εκτός από την οξειδωτική βλάβη της 8-OHdG, η ιονίζουσα ακτινοβολία επάγει το σχηματισμό της 8-NG διαμέσου των RNS ενώσεων. Η ακτινοβολία πυροδοτεί τη δράση του iNOS ενζύμου μέσω του οποίου παράγονται μεγάλες ποσότητες RNS ενώσεων όπως είναι η

ρίζα του •NO. Αν και η ρίζα του •NO εμφανίζει χημική αδράνεια με τα περισσότερα κυτταρικά συστατικά, παρουσιάζει υψηλή δραστηριότητα με $O_2^{\cdot-}$ σχηματίζοντας $ONOO^-$. Η υψηλή δραστηριότητα του $ONOO^-$ παρέχει τη δυνατότητα προσβολής πλήθους κυτταρικών στόχων συμπεριλαμβανομένου και των νουκλεοτιδικών βάσεων (Mikkelsen *et al.*, 2003; Jay-Gerin *et al.*, 2000; Frongillo *et al.*, 1998). Η 8-νιτρογουανίνη, προϊόν αντίδρασης μεταξύ γουανίνης και $ONOO^-$, χαρακτηρίζεται από χημική αστάθεια η οποία ωθεί την αυθόρμητη απελευθέρωση της νιτρώδους γουανυλικής βάσεως, καταλήγοντας σε αποπουρινική βάση. Κατά τη διάρκεια σύνθεσης του DNA, η αποπουρινική βάση σχηματίζει ζεύγος βάσεων με αδενίνη, προκαλώντας μεταστροφές του ζεύγους βάσεων από G:C σε T:A (Yermilov *et al.*, 1995a; Yermilov *et al.*, 1995b; Loeb *et al.*, 1986).

Στην παρούσα εργασία, οι οξειδωτικές βλάβες του DNA, 8-OHdG και 8-NG, ανιχνεύθηκαν στο πλάσμα των ακτινοβοληθέντων ασθενών με τη μέθοδο ELISA. Μελέτες αμφισβητούν το βαθμό ευαισθησίας της τεχνικής ως προς την ανίχνευση της 8-OHdG ενώ αρκετοί συγγραφείς υποστηρίζουν ότι η συγκεκριμένη μέθοδος παρουσιάζει μειονεκτήματα όπως η μεγάλη μεταβλητότητα και η απουσία της ακριβούς ποσοτικοποίησης της 8-OHdG. Παρόλα αυτά, η μέθοδος ELISA χρησιμοποιείται στην ανίχνευση της 8-OHdG λόγω γρήγορης ανίχνευσης, εύκολης εφαρμογής, χαμηλού κόστους και του μεγάλου αριθμού δειγμάτων που εξετάζονται, διευκολύνοντας τη διαλογή των ακτινοβοληθέντων ατόμων (Gao *et al.*, 2019).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα επίπεδα της 8-OHdG μεταβάλλονται κατά τη διάρκεια της ακτινοθεραπείας, ανάλογα με το χρόνο και τη δόση ακτινοθεραπείας. Σημαντική αύξηση της [8-OHdG] παρατηρήθηκε κατά το χρονικό διάστημα D5-D15 όπου η δόση ακτινοβολίας κυμαινόταν από 1000 έως 3000 cGy ενώ πτωτική τάση καταγράφηκε κατά τις ημέρες D15 έως D28 με χορηγηθείσα ακτινοβολία 3000 έως 4000(cGy). Σταθεροποίηση της [8-OHdG] παρατηρήθηκε τις 2 τελευταίες εβδομάδες της ακτινοθεραπείας, D28-D60, όπου οι ασθενείς έλαβαν δόση ακτινοβολίας 4500 έως 6000 (cGy) (Εικόνα 3.2).

Προηγούμενες μελέτες απέδειξαν ότι αυξανόμενες δόσεις ακτινοβολίας πυροδοτούν αύξηση των βλαβών του DNA, υποδεικνύοντας ξεκάθαρα μια σχέση δόσης-απόκρισης. Σύμφωνα με αποτελέσματα μελετών σε ομάδες υγιών εθελοντών και ατόμων που είχαν εκτεθεί σε υψηλές δόσεις ακτινοβολίας, το μοντέλο δόσης-ανταπόκρισης αναπτύχθηκε με πολυωνυμική προσαρμογή ενώ παρατηρήθηκε συσχέτιση των επιπέδων της 8-OHdG με τη δόση ακτινοβολίας (Gao *et al.*, 2019). Ωστόσο, τα επίπεδα της 8-OHdG πιθανόν να μειώνονται μετά από έκθεση σε δόση ακτινοβολίας μέχρι 3 Gy, υποδηλώνοντας ένα όριο στη συσχέτιση οξειδωτικών βλαβών του DNA με τη δόση ακτινοβολίας. Οι Gao *et al.* υποστηρίζουν ότι η μείωση των επιπέδων της 8-OHdG πιθανόν να οφείλεται στο υψηλό ποσοστό κυτταρικού θανάτου που προκλήθηκε λόγω έκθεσης σε υψηλές δόσεις ακτινοβολίας. *In vitro* πειράματα σε ορό αίματος από ασθενείς με καρκίνο οι οποίοι έλαβαν ακτινοθεραπεία εμφάνισαν χαμηλότερα επίπεδα της 8-OHdG, κατά τη διάρκεια καθώς και μετά το πέρας 4 συνεδριών, συγκριτικά με

άτομα που δεν έλαβαν ακτινοθεραπεία. Το παραπάνω επιστημονικό εύρημα εξηγείται με διάφορους τρόπους. Αρχικά, όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί διαθέτουν μηχανισμούς άμυνας για την αποφυγή λαθών και την ελαχιστοποίηση συσσωρευμένων οξειδωτικών βλαβών του DNA οι οποίες προκλήθηκαν από την ακτινοβολία. Δεδομένου ότι η επιδιόρθωση των DNA βλαβών απαιτεί χρόνο, η αποκατάστασή τους επιτυγχάνεται μεταγενέστερα, κατά την περίοδο ανάρρωσης του ασθενούς, επεξηγώντας τα χαμηλά επίπεδα 8-OHdG μετά την ολοκλήρωση του ακτινοθεραπευτικού προγράμματος. Από την άλλη μεριά, η 8-OHdG σχετίζεται με την ανάπτυξη καρκινογένεσης και κατά επέκταση τα επίπεδα της 8-OHdG είναι υψηλότερα σε καρκινοπαθείς από ότι σε υγιή άτομα. Ωστόσο, η έκθεση των καρκινικών κυττάρων σε ακτινοθεραπεία μειώνει τα επίπεδα της 8-OHdG στον ορό του αίματος. Μειωμένα επίπεδα 8-OHdG ανιχνεύθηκαν σε ούρα ασθενών που έλαβαν ακτινοθεραπεία ενώ δεν παρατηρήθηκε γραμμική συσχέτιση μεταξύ 8-OHdG και συσσωρευμένης δόσης ακτινοβολίας (Gao *et al.*, 2019).

Η μεταβολή των επιπέδων των οξειδωτικών βλαβών του DNA, τόσο της 8-OHdG όσο και της 8-NG, συσχετίστηκε με εύρος κλινικών χαρακτηριστικών των ασθενών (Πίνακας 2.1). Στην περίπτωση της 8-OHdG, οι σημαντικότερες συσχετίσεις μεταβολών της συγκέντρωσής της προέκυψαν με τις παραμέτρους BMI και το βαθμό ακτινικής δερματίτιδας. Συγκεκριμένα, η [8-OHdG] μεταβάλλεται αντιστρόφως ανάλογα με τη BMI παράμετρο εν αντιθέσει με τη δερματική τοξικότητα όπου τα επίπεδα της 8-OHdG στο πλάσμα των ακτινοβοληθέντων ασθενών μεταβάλλονται ανάλογα με το βαθμό της ακτινικής δερματίτιδας. Η αρνητική συσχέτιση που προκύπτει μεταξύ της μεταβολής της [8-OHdG] και της BMI παραμέτρου θεωρείται αναμενόμενη δεδομένου ότι η 8-OHdG αραιώνεται σε σημαντικότερο βαθμό σε ασθενείς με μεγαλύτερο BMI δείκτη. Η θετική συσχέτιση της μεταβολής των επιπέδων της 8-OHdG με το βαθμό δερματικής τοξικότητας υποδεικνύει ότι η παραγωγή της 8-OHdG συνδέεται με την ακτινική δερματίτιδα ασθενών που υποβάλλονται σε ακτινοθεραπεία (Εικόνα 3.3).

Κανονικοποίηση των μεταβολών της [8-OHdG] με τις παραμέτρους BMI και BSA ανέδειξε σημαντική συσχέτιση της μεταβολής των επιπέδων της 8-OHdG με το βαθμό δερματικής τοξικότητας τις ημέρες D28 καθώς και τη D56 όπου οι ασθενείς έλαβαν δόση ακτινοβολίας 4000 cGy και 6000 cGy, αντιστοίχως (Εικόνα 3.4). Επιπλέον, η συνολική μεταβολή της [8-OHdG] συσχετίζεται σημαντικά με το βαθμό δερματικής τοξικότητας τις ημέρες D14, D28 και D56 ενώ σημαντική συσχέτιση παρατηρείται μεταξύ των σχετικών μεταβολών των επιπέδων 8-OHdG με το βαθμό ακτινικής δερματίτιδας κατά τις 2 πρώτες εβδομάδες, καθιστώντας δυνατή την πρόβλεψη δερματικής τοξικότητας (Εικόνες 3.5 και 3.6). Επιπρόσθετα, η προγνωστική αξία της 8-OHdG ανακύπτει από τη σημαντική γραμμική συσχέτιση των % σχετικών μεταβολών της [8-OHdG] με το βαθμό ακτινικής δερματίτιδας καθ' όλη τη διάρκεια του ακτινοθεραπευτικού προγράμματος με χορηγηθείσα δόση ακτινοβολίας

0-6000 cGy (Εικόνα 3.7). Σύμφωνα με την πολυωνυμική προσαρμογή, με βάσει την οποία αναπτύχθηκε η καμπύλη δόσης-ανταπόκρισης, προκύπτει σημαντική συσχέτιση του βαθμού ακτινικής δερματίτιδας με τις % μεταβολές της [8-OHdG] (Εικόνα 3.8).

Όσον αφορά την οξειδωτική βλάβη, 8-NG, κατά τις 3 πρώτες εβδομάδες ακτινοθεραπείας σημειώνεται σημαντική αύξηση των επιπέδων [8-NG] όπου η δόση ακτινοβολίας κυμαινόταν 0 έως 3000 cGy (Εικόνα 3.10). Μελέτες σε κύτταρα από το μυελό των οστών ποντικών έδειξαν ότι χορηγηθείσες δόσεις ακτινοβολίας από 2 έως 50 Gy επάγουν την έκφραση του iNOS ενζύμου με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων NO. Επιπλέον, η αύξηση των επιπέδων NO *in vitro* και των νιτροποιημένων καταλοίπων τυροσίνης *in vivo* διέπεται από μια δοσο-εξαρτώμενη σχέση ακτινοβολίας και παραγωγής NO (Gorbunov *et al.*, 2000). Τα αυξημένα επίπεδα νιτρικών και νιτρωδών τα οποία συνδέονται με την επιθηλιακή δυσλειτουργία εντέρου, προκύπτουν από την ενζυμική δράση της iNOS πρωτεΐνης η οποία πυροδοτείται μετά από έκθεση σε ακτινοβολία (Freeman and MacNaughton, 2000). Λαμβάνοντας υπόψιν τη δοσο-εξαρτώμενη σχέση μεταξύ της ακτινοβολίας και παραγωγής NO καθώς και τον σχηματισμό της 8-NG μέσω ONOO⁻, ασθενείς που λαμβάνουν ακτινοθεραπεία πιθανόν να παράγουν αυξημένα επίπεδα 8-NG ανάλογα με τη δόση ακτινοβολίας που λαμβάνουν.

Αυξημένη ενζυμική δραστηριότητα της iNOS πρωτεΐνης παρατηρείται στην καρκινογένεση καθώς και σε φλεγμονώδη αντιδράσεις, με αποτέλεσμα την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων NO από φλεγμονώδη και επιθηλιακά κύτταρα (Fukumura *et al.*, 2006). Οι Akaike *et al.* απέδειξαν *in vivo* την αυξημένη παραγωγή NO και κατά επέκταση της 8-NG σε ποντίκια τα οποία έφεραν φλεγμονή από ιογενή πνευμονία. Διάφοροι μεταγραφικοί παράγοντες όπως ο NF-κB, HIF1- α , STAT και TNF- α διεγείρουν τη δράση του iNOS ενζύμου. Από τους μεταγραφικούς παράγοντες που αναφέρθηκαν, ο NF-κB πυροδοτεί τη μεταγραφή του προφλεγμονώδους γονιδίου, iNOS, προάγοντας τη σχετιζόμενη με φλεγμονή καρκινογένεση (Wang *et al.*, 2009). Συνεπώς, η 8-NG διαδραματίζει διττό ρόλο καθότι αποτελεί συγχρόνως έναν δείκτη φλεγμονής και μία μεταλλαξιγόνο βλάβη στο DNA η οποία προκαλεί την καρκινογένεση (Ma *et al.*, 2012).

Σημαντική θετική συσχέτιση προκύπτει μεταξύ των επιπέδων 8-NG και της εμφάνισης ακτινικής δερματίτιδας κατά τη χορήγηση δόσεων ακτινοβολίας 2000 cGy, 4000 cGy και 6000 cGy. Η μεταβολή της [8-NG] ανάλογα με την εμφάνιση ακτινικής δερματίτιδας πριν την έναρξη της ακτινοθεραπείας, αναδεικνύει τη 8-NG ως προβλεπτικό δείκτη για δερματική τοξικότητα αναδεικνύεται (Εικόνα 3.11). Η παρουσία των αυξημένων επιπέδων 8-NG, πριν την έκθεση των ασθενών σε ακτινοβολία, πιθανόν να οφείλεται σε προηγηθείσα χορήγηση επικουρικής χημειοθεραπείας.

Η χημειοθεραπεία ενισχύει την παραγωγή των ROS/RNS δραστικών ενώσεων, επιφέροντας βλάβες τόσο σε όγκους όσο και σε βιολογικά συστήματα. Χημειοθεραπευτικοί

παράγοντες οι οποίοι παράγουν υψηλά επίπεδα οξειδωτικού στρες είναι οι ανθρακυκλίνες, οι αλκυλιωτικοί παράγοντες, τα σύμπλοκα πλατίνας, οι επιποδοφυλλοτοξίνες και οι καμπθοθεκίνες. Ωστόσο, ROS/RNS ενώσεις δεν παράγονται στον ίδιο βαθμό από όλα τα αντινεοπλασματικά φάρμακα. Μέτρια επίπεδα οξειδωτικού στρες προκύπτουν κατά τη θεραπεία με σύμπλοκα πλατίνας, καμπθοθεκίνες, ταξάνες, αλκαλοειδή της βίνκα και αντιμεταβολίτες (Conklin, 2000; Conklin, 2004; Conklin and Nicolson, 2008; Nicolson and Conklin, 2008). Δεδομένου ότι τα αντικαρκινικά φάρμακα είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση οξειδωτικού στρες, ασθενείς που έχουν λάβει χημειοθεραπεία πιθανόν να αναπτύξουν αυξημένα επίπεδα RNS ενώσεων οι οποίες είναι απαραίτητες για το σχηματισμό της 8-NG.

Η [8-NG] στο πλάσμα των ακτινοβοληθέντων ασθενών μεταβάλλεται αντιστρόφως ανάλογα με τη GFR παράμετρο καθώς τα επίπεδα της 8-NG μειώθηκαν σημαντικά σε ασθενείς με αυξημένη GFR (Εικόνα 3.12). Στατιστικά σημαντική συσχέτιση προκύπτει μεταξύ της συνολικής μεταβολής της [8-NG] με την πρόκληση δερματικής τοξικότητας καθ' όλη τη διάρκεια του ακτινοθεραπευτικού σχήματος (D0-D14, D0-D28 και D0-D56) (Εικόνα 3.13). Οι σχετικές μεταβολές της [8-NG] στο χρόνο και δόση ακτινοθεραπείας σχετίζονται σημαντικά με την ανάπτυξη ακτινικής δερματίτιδας κατά τις ημέρες D0-D14 και D14-D28. Στην περίπτωση συσχέτισης των σχετικών μεταβολών [8-NG] με την HCT παράμετρο, παρατηρήθηκε μη στατιστικά σημαντική αλλά υψηλή συσχέτιση κατά το χρονικό διάστημα D14-D28 (Εικόνα 3.14). Η συσχέτιση της σχετικής μεταβολής των επιπέδων [8-NG] με την HCT παράμετρο προκύπτει από την πτωτική τάση της HCT παραμέτρου ως αποτέλεσμα τοξικότητας της ακτινοθεραπείας και της ταυτόχρονης αυξημένης παραγωγής της 8-NG.

Λόγω της υψηλής ευαισθησίας που παρουσιάζει ο μυελός των οστών και τα κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος, οι επιπτώσεις της ιονίζουσας ακτινοβολίας στο αιμοποιητικό σύστημα καθίστανται ιδιαίτερα σημαντικές. Συγκεκριμένα, η ιονίζουσα ακτινοβολία καταστρέφει τα ώριμα αιμοποιητικά κύτταρα καθώς και τα προγονικά/βλαστικά κύτταρα του μυελού των οστών. Εάν και η μείωση του αριθμού των αιμοποιητικών κυττάρων θεωρείται υπεύθυνη για την προκληθείσα από την ακτινοθεραπεία νοσηρότητα, η θνησιμότητα επέρχεται από παρατεταμένη καταστολή του μυελού των οστών και κατά επέκταση απώλεια των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων (HPC) και των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων (HSC). Μελέτες σχετικά με την επίδραση της ιονίζουσας ακτινοβολίας στο μυελό των οστών έχουν διεξαχθεί τόσο στον άνθρωπο όσο και σε διάφορα είδη ζώων εργαστηρίου. Αν και οι πρόσφατες έρευνες επικεντρώνονται στον ανθρώπινο μυελό των οστών, οι περισσότερες αρχικές μελέτες διεξήχθησαν σε ζώα εργαστηρίου όπου διαπιστώθηκε η μείωση του αριθμού των αιμοποιητικών κυττάρων και των μεγαλοκυττάρων καθώς και η αυξημένη αναλογία μυελοειδών/ερυθροειδών εξαιτίας της ερυθροειδούς υποπλασίας που είχε προκληθεί κατά την έκθεση ποντικών στην ακτινοβολία (Akeem *et al.*, 2019).

Η προβλεπτική αξία της 8-NG στην εμφάνιση ακτινικής δερματίτιδας ανεδείχθη από την εκθετική προσαρμογή σύμφωνα με την οποία παρατηρήθηκε σημαντική εκθετική αύξηση στη συσχέτιση των % μεταβολών [8-NG] με την πρόκληση δερματικής τοξικότητας (Εικόνα 3.15). Από την κανονικοποίηση των μεταβολών [8-NG] με τις BMI και BSA παραμέτρους αποδεικνύεται σημαντική συσχέτιση της μεταβολής των επιπέδων 8-NG με την εμφάνιση ακτινικής δερματίτιδας κατά τις ημέρες D0 και D14 με δόση ακτινοβολίας 0 και 2000 cGy, αντιστοίχως. Κανονικοποιώντας τις μεταβολές της [8-NG] με BMI και BSA προκύπτει σημαντική συσχέτιση των μεταβολών των επιπέδων 8-NG με την ανάπτυξη ακτινικής δερματίτιδας κατά τις ημέρες D28 και D56 με χορηγηθείσες δόσεις ακτινοβολίας 4000 cGy και 6000 cGy, αντιστοίχως. Αξιοσημείωτη είναι η θετική συσχέτιση του πηλίκου των μεταβολών [8-NG] ως προς BMI αλλά και ως προς BSA με την ανάπτυξη δερματικής τοξικότητας πριν την έναρξη της ακτινοθεραπείας (D0) (Εικόνα 3.16). Με βάση το γραμμικό μοντέλο που αναπτύχθηκε, σημαντική γραμμική σχέση προκύπτει μεταξύ των % μεταβολών [8-NG] και του βαθμού της ακτινικής δερματίτιδας καθ' όλη τη διάρκεια του ακτινοθεραπευτικού σχήματος όπου η χορηγηθείσα ακτινοβολία κυμαινόταν από 0 έως 6000 cGy (Εικόνα 3.17).

Σημαντική συσχέτιση του πηλίκου μεταβολών [8-NG] προς BMI με την εμφάνιση ακτινικής δερματίτιδας παρουσιάζεται τα χρονικά διαστήματα D0-D14 (0-2000 cGy), D14-D28 (2000-4000 cGy) και D28-D56 (4000-6000 cGy). Αντίθετα, σημαντική συσχέτιση του πηλίκου [8-OHdG] προς BMI με την εμφάνιση δερματικής τοξικότητας προκύπτει μόνο κατά το χρονικό διάστημα D0-D14 με χορηγηθείσα δόση ακτινοβολίας 0-2000 cGy. Συνεπώς, τα επίπεδα της 8-NG συσχετίζονται με την εμφάνιση της ακτινικής δερματίτιδας σε όλη τη διάρκεια της ακτινοθεραπείας εν αντιθέσει με την 8-OHdG η οποία σχετίζεται στατιστικώς σημαντικά μόνο κατά τις 2 πρώτες εβδομάδες ακτινοθεραπείας (Εικόνα 3.18).

Ο οργανισμός σε μία προσπάθεια να αντιμετωπίσει το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από την ακτινοθεραπεία, επιστρατεύει κυτταρικούς μεταγραφικούς παράγοντες όπως είναι ο NRF2 και NF-κB με απώτερο σκοπό την αύξηση των επιπέδων έκφρασης αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως της καταλάσης, της δισμουτάσης του σουπεροξειδίου, της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης, της οξυγονάσης της αίμης και άλλων (McDonald *et al.*, 2010; Patwardhan *et al.*, 2013). Μελέτες αναφέρουν αυξημένη έκφραση της περοξυρεδοξίνης μετά από έκθεση σε δόση ακτινοβολίας 10 Gy, ενισχύοντας την άμυνα του οργανισμού απέναντι στην ακτινοβολία (An *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2002; Woolston *et al.*, 2011). Επιπλέον, αντιοξειδωτικά ένζυμα όπως οι δισμουτάσες του σουπεροξειδίου διασπούν το $O_2^{\cdot -}$ σε H_2O_2 και O_2 ενώ η καταλάση, οι υπεροξειδωροξίνες και οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης εξουδετερώνουν την οξειδωτική δράση του H_2O_2 . Ωστόσο, τα αντιοξειδωτικά ένζυμα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο όχι μόνον σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες αλλά και υπό φυσιολογικές συνθήκες, διατηρώντας σε κανονικά επίπεδα τις ROS ενώσεις και θέτοντας υπό έλεγχο τους προ-οξειδωτικούς

μηχανισμούς (Houée-Levin and Bobrowski, 2013; Tan *et al.*, 2007). Η συσσώρευση των δόσεων ακτινοβολίας ή η οξεία έκθεση σε ακτινοβολία διαταράσσει το κυτταρικό αντιοξειδωτικό σύστημα προκαλώντας οξειδοαναγωγική ανισοροπία η οποία με τη σειρά της προκαλεί τροποποιήσεις σε νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες και άλλα βιομόρια (Reisz *et al.*, 2014).

Εκτός από τα αντιοξειδωτικά ένζυμα τα οποία επιστρατεύονται εναντίον του οξειδωτικού στρες, επιπλέον μηχανισμοί άμυνας περιλαμβάνουν ενδογενή μόρια τα οποία μεταβολίζουν τις ROS ενώσεις. Ενδογενή μόρια μικρού μοριακού βάρους όπως η GSH στοχεύει σε προϊόντα ραδιόλυσης του H₂O, μερικώς οξειδωμένα βιομόρια και στον ONOO⁻ (Traber and Atkinson, 2007). Ωστόσο, σημαντική μείωση των επιπέδων GSH παρατηρείται μετά από έκθεση των κυττάρων στην ακτινοβολία (Lee *et al.*, 2002)

Μείωση του δείκτη υπεροξειδωσης των λιπιδίων (MDA) και αύξηση των αντιοξειδωτικών συμπεριλαμβανομένου της δισμουτάσης του σουπεροξειδίου, βιταμίνης C, βιταμίνης A και της κερουλοπλασμίνης παρατηρήθηκαν σε μελέτη ασθενών με καρκίνο στην κεφαλή και στο λαιμό οι οποίοι υπεβλήθησαν σε ακτινοθεραπεία. Αυξημένα επίπεδα της δισμουτάσης του σουπεροξειδίου, της κερουλοπλασμίνης, της γλουταθειόνης, της καταλάσης και της αναγωγάσης της γλουταθειόνης κατόπιν ακτινοθεραπείας έχουν παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες (Malathi *et al.*, 2011). Ωστόσο, οι Kasarovic *et al.* αναφέρουν ότι στις αποκρίσεις της ακτινοθεραπείας ανήκει και η μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας η οποία σχετίζεται με την ηλικία και επιφέρει οξειδωτική καταστροφή στα κύτταρα του αίματος. Όπως έχει διαπιστωθεί, η κυτταροτοξική επίδραση της ακτινοβολίας στους φυσιολογικούς ιστούς είναι πιο έντονη κατά τη διάρκεια της γήρανσης. Ωστόσο, τα αποτελέσματα σχετικά με την επίδραση της ακτινοθεραπείας στα επίπεδα των οξειδωτικών-αντιοξειδωτικών ποικίλουν (Malathi *et al.*, 2011).

Με βάση τη γραμμική και εκθετική προσαρμογή, παρατηρείται σημαντική μείωση των επιπέδων [GSH] σε σχέση με τις δόσεις ακτινοβολίας που έλαβαν οι ασθενείς κατά τη διάρκεια του προγράμματος της ακτινοθεραπείας (Εικόνα 3.19). Σημαντικές αρνητικές συσχετίσεις προκύπτουν μεταξύ της [GSH] με το βαθμό ακτινικής δερματίτιδας, κατόπιν χορηγήσεως δόσεων ακτινοβολίας 2000 cGy και 6000 cGy. Η μείωση των επιπέδων GSH στο πλάσμα των ακτινοβοληθέντων ασθενών ενισχύει τον κίνδυνο για ανάπτυξη ακτινικής δερματίτιδας. Οι θετικές συσχετίσεις μεταξύ των συνολικών μειώσεων των % [GSH] με το βαθμό ακτινικής δερματίτιδας μετά από λήψη δόσεων ακτινοβολίας 2000 cGy και 6000 cGy, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι όσο αυξάνεται η μείωση των % επιπέδων GSH τόσο ενισχύονται οι πιθανότητες για πρόκληση δερματικής τοξικότητας. Αξιοσημείωτη είναι η αρνητική συσχέτιση των επιπέδων GSH με την εμφάνιση ακτινικής δερματίτιδας πριν την έναρξη ακτινοθεραπείας (D0) (Εικόνα 3.21). Επιπλέον, η γραμμική προσαρμογή υποδεικνύει σημαντική συσχέτιση της % μείωσης της [GSH] στο πλάσμα των ακτινοβοληθέντων ασθενών με την ανάπτυξη ακτινικής δερματίτιδας σε όλη τη διάρκεια του ακτινοθεραπευτικού σχήματος (Εικόνα 3.22).

Τέλος, σύμφωνα με τη γραμμική προσαρμογή όπου εξετάζεται η πολυπαραγοντική συσχέτιση των % μεταβολών των [8-OHdG] και [8-NG] ως προς % μεταβολές [GSH] με το βαθμό εμφάνισης ακτινικής δερματίτιδας, προκύπτει σημαντική συσχέτιση του πηλίκου των μεταβολών της [8-OHdG] και της [8-NG] ως προς τις μεταβολές % [GSH] με το βαθμό εμφάνισης ακτινικής δερματίτιδας κατά τη διάρκεια χορήγησης δόσεων ακτινοθεραπείας (Εικόνα 3.23).

Οι επαγόμενες από την ακτινοβολία ιστικές βλάβες είναι τα καταστρεπτικά αποτελέσματα της ακτινοθεραπείας που εμφανίζονται κυρίως στο δέρμα και εκδηλώνονται μετά από κάποιες μέρες έκθεσης (Valentin, 2000; Laborda et al., 2015; Balter *et al.*, 2010). Οι σχετιζόμενες με την ακτινοβολία δερματικές αντιδράσεις διαχωρίζονται σε ταχείες, οξείες και υποξείες με διάρκεια εμφάνισης από 24 ώρες έως 2 μήνες ενώ οι χρόνιες συνεχίζουν για περισσότερο από 2 μήνες έως χρόνια (Hamada and Fujimichi, 2014; Balter *et al.*, 2010). Η ταχεία τοξικότητα εκδηλώνεται σε λιγότερο από 2 εβδομάδες ενώ το κύριο σύμπτωμα της ερυθματώδους αντίδρασης εκδηλώνεται σε μερικές ώρες ή 24 ώρες και προκύπτει μετά από έκθεση σε δόση ακτινοβολίας 2 Gy. Η οξεία δερματική βλάβη περιλαμβάνει συμπτώματα με διάρκεια εμφάνισης 9 εβδομάδων και περιλαμβάνει ερύθημα με κυστίδια, διάβρωση, προσωρινή αποτρίχωση, πόνο και κνησμό. Η χρόνια δερματική βλάβη οφείλεται σε επανειλημμένες εκθέσεις του δέρματος σε υψηλές δόσεις ακτινοβολίας ή σε μια μόνο υψηλή έκθεση ακτινοβολίας με μέγιστη αθροιστική δόση 10 Gy. Τα συμπτώματα της χρόνιας δερματικής βλάβης διαρκούν από μήνες έως χρόνια και περιλαμβάνουν ερύθημα, ατροφία, αποτρίχωση, κνησμό, τηλεαγγειακτασία, πόνο λόγω δερματικής νέκρωσης και ουλές (National Center for Environmental Health (NCEH), 2005). Ωστόσο, οι ουλές είναι υψίστης σημασίας σύμπτωμα και προκαλούνται μετά από έκθεση του δέρματος σε υπερβολικά υψηλής αθροιστικής δόσης ακτινοβολίας (Wei *et al.*, 2015).

Η τοξικότητα της ακτινοθεραπείας συνδέεται με την ακτινοευαισθησία και εκδηλώνεται μέσω των παρενεργειών της ακτινοβολίας σε φυσιολογικούς ιστούς. Ανάλογα με το χρόνο εκδήλωσης, η προκληθείσα τοξικότητα διαφοροποιείται σε οξεία και όψιμη. Στην περίπτωση της οξείας τοξικότητας, εκδηλώνεται είτε κατά τη διάρκεια είτε πολύ σύντομα μετά το πέρας της ακτινοθεραπείας, είναι αναστρέψιμη και εντοπίζεται σε ταχέως αναπτυσσόμενους ιστούς όπως είναι το δέρμα, ο γαστρεντερικός σωλήνας και οι αιμοποιητικοί ιστοί. Όσον αφορά την όψιμη τοξικότητα, παρουσιάζεται σε διάστημα ≥ 6 μηνών, είναι μη αναστρέψιμη και επηρεάζει τους πιο αργά αναπτυσσόμενους ιστούς όπως οι νεφροί, η καρδιά, το νευρικό σύστημα και το ενδοκρινικό σύστημα (Barnett *et al.*, 2009).

Η χημειοθεραπεία ενισχύει την ακτινοευαισθησία προκαλώντας την ανάπτυξη της οξείας φλεγμονώδους αντίδρασης (radiation recall) κατά την οποία οι ήδη ακτινοβοληθείσες περιοχές εκτίθενται εκ νέου σε θεραπευτικούς παράγοντες όπως τα αντικαρκινικά φάρμακα. Ορισμένα από τα κυτταροτοξικά φάρμακα τα οποία εμπλέκονται στην αντίδραση 'radiation

recall' είναι η ακτινομυκίνη D, οι ταξάνες, οι ανθρακυκλίνες, η βινμπλαστίνη, η ετοποσίδη, η μεθοτρεξάτη, η οξαλοπλατίνη, η μελφαλάνη, η 5-φθοροουρακίλη, η καψιταμπίνη, η κυταραβίνη, η 5-υδροξουρία, η δακαρβαζίνη και η μπλεομυκίνη ενώ μη κυτταροτοξικά όπως η ταμοξιφένη, η η σιμβαστατίνη, η ριφαμπικίνη και η πυραζιναμίδη είναι υπό έρευνα (Jaschke, *et al.*, 2017). Σε μοριακό επίπεδο, η ιονίζουσα ακτινοβολία επιδρά στη διπλή έλικα του DNA προκαλώντας θραύσεις και κατά επέκταση διαταράσσοντας τη γονιδιωματική ακεραιότητα (Chistiakov *et al.*, 2008; Rube *et al.*, 2008; Henríquez-Hernández *et al.*, 2011). Ωστόσο, οι μηχανισμοί υπερευαισθησίας στην ιονίζουσα ακτινοβολία παραμένουν άγνωστοι ενώ το 70% της τοξικότητας οφείλεται στην ποικιλότητα των αλληλομόρφων (Turesson *et al.*, 1996). Στον καρκίνο του μαστού, μεταλλάξεις του ATM γονιδίου και οι πολυμορφισμοί των γονιδίων XRCC3 και RAD51 ενισχύουν σημαντικά τον κίνδυνο για ανάπτυξη ακτινοευαισθησίας (Masuda and Kamiya, 2012; Vral *et al.*, 2011). Οι Mayer *et al.* ανέλυσαν τη γονιδιακή έκφραση σε λεμφοκύτταρα του περιφερειακού αίματος ασθενών με καρκίνο του μαστού κατόπιν εκθέσεως στην ιονίζουσα ακτινοβολία όπου ανακαλύφθηκε η τροποποίηση 153 γονιδίων με 67 γονίδια να διαφοροποιούν τους ασθενείς από άτομα με σοβαρά συμπτώματα ακτινοευαισθησίας.

Η ακτινική δερματίτιδα αποτελεί το πιο σύνηθες αποτέλεσμα της τοξικής επίδρασης της ακτινοθεραπείας. Όπως είναι γνωστό, η ακτινοβολία προκαλεί τον ιονισμό του νερού και την παραγωγή ελευθέρων ριζών τα οποία με τη σειρά τους προκαλούν δερματικές φλεγμονές και μη αναστρέψιμες θραύσεις στη διπλή έλικα τόσο του πυρηνικού όσο και του μιτοχονδριακού DNA. Ωστόσο, η επαναλαμβανόμενη έκθεση σε χαμηλές δόσεις ιονίζουσας ακτινοβολίας δεν επιτρέπει την επιδιόρθωση των βλαβών στο DNA και στους ιστούς. Η μη αποκατάσταση οδηγεί σε συσσώρευση μεταβολών στα αγγεία του δέρματος, αποκόλληση δερματικών δομών και απώλεια βλαστικών κυττάρων του δέρματος με αποτέλεσμα την ανάπτυξη ακτινικής δερματίτιδας. Η συνολική δόση ακτινοβολίας, η δόση ανά κλάσμα και η δόση-όγκου σε επιφάνειες που εκτίθενται στην ακτινοβολία επηρεάζουν τον κίνδυνο ακτινικής δερματίτιδας καθιστώντας την ακτινική δερματίτιδα ως δοσο-εξαρτώμενη παρενέργεια της ακτινοθεραπείας (Kawamura *et al.*, 2019).

Μελέτες σχετικά με τη δερματική τοξικότητα από ακτινοθεραπεία αναδεικνύουν τη χρησιμότητα κλινικών χαρακτηριστικών και βιολογικών παραγόντων ως δείκτες ακτινικής δερματίτιδας. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η BMI παράμετρος η οποία λειτουργεί ως προγνωστικός δείκτης στην εμφάνιση οξείας δερματικής τοξικότητας. Σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού, το μέγεθος του μαστικού αδένα συνδέεται σημαντικά με τον κίνδυνο ανάπτυξης ακτινικής δερματίτιδας, καθιστώντας αναγκαία την ακριβή μέτρηση μαστών μεγάλου μεγέθους ώστε να επιτευχθεί η ταυτοποίηση ασθενών με υψηλό κίνδυνο δερματικής τοξικότητας. Εκτός από τη BMI παράμετρο, τρία επιπλέον ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά τα οποία εμπλέκονται με την οξεία ακτινική δερματίτιδα είναι τα εξής: 1) το πάχος του αριστερού μασχάλιου

λίπους, 2) το πάχος του δεξιού μασχαλιαίου λίπους και 3) η απόσταση της θηλής από το θωρακικό μυ, όπου η τελευταία παράμετρος θεωρείται μια νέα και αξιόπιστη μέθοδος εκτίμησης του μεγέθους του μαστικού αδένου (Méry *et al.*, 2015).

Η πρόβλεψη της οξείας ακτινικής δερματίτιδας μέσω των προαναφερθέντων ανθρωπομετρικών παραμέτρων προσφέρει τη δυνατότητα συνταγογράφησης κατάλληλων ακτινοθεραπευτικών σχημάτων για τις ομάδες υψηλού κινδύνου. Ασθενείς που φέρουν μαστό μεγάλου μεγέθους με δέρμα τύπου 1 σύμφωνα με τη Fitzpatrick κλίμακα και είναι πρώην ή ενεργοί καπνιστές ανήκουν στις ομάδες υψηλού κινδύνου και απαιτούν ειδικό πρωτόκολλο ακτινοθεραπείας. Σύμφωνα με τους Moody *et al.* η υψηλού βαθμού ακτινική δερματίτιδα σε ασθενείς με μαστό μεγάλου μεγέθους συνδέεται σημαντικά με ετερογένεια στη δόση ακτινοβολίας και στην έκθεση περιοχών υγιούς ιστού σε υψηλές δόσεις ακτινοβολίας (hot spots) (Méry *et al.*, 2015).

Ο μαστός μεγάλου μεγέθους και ο υψηλός δείκτης BMI σχετίζονται με την οξεία δερματική τοξικότητα, καθιστώντας τη συμβατική κλασματοποιημένη θεραπεία κατάλληλη σε ασθενείς με τα παραπάνω χαρακτηριστικά. Σύμφωνα με τις παραπάνω συσχετίσεις, απαιτείται ομοιογενής χορήγηση δόσης ακτινοβολίας σε μαστούς μεγάλου μεγέθους. Ωστόσο, αποτελέσματα πρόσφατων μελετών αμφισβητούν τη σχέση υψηλού δείκτη BMI με την ακτινική δερματίτιδα. Σύμφωνα με μελέτη των Parekh *et al.* υπέρβαρες ασθενείς με μέσο όρο BMI πάνω από το όριο και BMI > 30 για το 38.6% των ασθενών, ο υψηλός δείκτης BMI δε σχετίστηκε με την πρόκληση βαθμού ακτινικής δερματίτιδας ≥ 2 αλλά με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης υγρής απολέπισης λόγω των αυξημένων δερματικών πτυχών που έφεραν οι ασθενείς.

Οι Wright *et al.* εξέτασαν μία σειρά από χαρακτηριστικά σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού τα οποία πιθανόν να συνεισφέρουν στην πρόβλεψη της ακτινικής δερματίτιδας όπως ο δείκτης BMI, το στάδιο της ασθένειας και η έκφραση υποδοχέων προγεστερόνης. Η ηλικία, η φυλή και το μέγεθος του όγκου στο μαστό δεν αποτελούν παράγοντες πρόβλεψης ακτινικής δερματίτιδας. Εκτός από τη BMI παράμετρο που αποτελεί προγνωστικό δείκτη κυρίως για την εμφάνιση υγρής απολέπισης, η πρόβλεψη δερματικής τοξικότητας πιθανόν να σχετίζεται με την έκφραση ορμονικών υποδοχέων. Η αρνητική έκφραση υποδοχέων προγεστερόνης σε καρκίνο του μαστού αποτελεί σημαντικό προγνωστικό δείκτη για σοβαρή δερματική αντίδραση. Οι Wright *et al.* μελέτησαν το ρόλο των υποδοχέων προγεστερόνης σε συνάρτηση με την έκφραση των οιστρογονικών υποδοχέων μέσω διαφόρων συνδυασμών (ER+/PR- έναντι ER+/PR+ και ER-/PR- έναντι ER+/PR+). Με βάση τα αποτελέσματα, η αρνητική έκφραση του υποδοχέα προγεστερόνης ενισχύει τον κίνδυνο για ανάπτυξη ακτινικής δερματίτιδας ενώ η συνύπαρξη οιστρογονικών υποδοχέων με προγεστερονικούς δεν εμπλέκεται σε δερματικές αντιδράσεις οι οποίες προκαλούνται κατά την έκθεση στην ακτινοβολία. Ωστόσο, δεν υπάρχουν ανάλογες βιβλιογραφικές αναφορές οι οποίες να υποστηρίζουν το ρόλο των

ορμονικών υποδοχέων ως προβλεπτικοί δείκτες δερματικής τοξικότητας (Wright *et al.*, 2016).

Εκτός από τους ανθρωπομετρικούς δείκτες που αναφέρθηκαν παραπάνω, ο φωτότυπος δέρματος αποτελεί βασικό προβλεπτικό παράγοντα δερματικής ακτινοευαισθησίας ενώ παράγοντες όπως ο διαβήτης, η ανοσοκαταστολή, τα αυτοάνοσα νοσήματα, ο υποσιτισμός, το κάπνισμα ή η παχυσαρκία μεταβάλλουν τον κίνδυνο ανάπτυξης δερματικής τοξικότητας (Mégy *et al.*, 2015). Όσον αφορά την παχυσαρκία και το κάπνισμα επηρεάζουν κατά 30% την απόκριση των ασθενών στα είδη ακτινοβολιών της ακτινοθεραπείας. Στην περίπτωση του παράγοντα της παχυσαρκίας, οι Chang-Claude *et al.* απέδειξαν ότι σε γυναίκες με φυσιολογικό βάρος, ο πολυμορφισμός των γονιδίων επιδιόρθωσης DNA (XRCC1 και APE1) διαδραματίζει προστατευτικό ρόλο απέναντι στην ακτινική δερματίτιδα εν αντιθέσει στις παχύσαρκες ή υπέρβαρες ασθενείς όπου δεν έχει διαπιστωθεί η προστατευτική επίδραση των XRCC1 και XPD πρωτεϊνών.

Διαταραχή του επιδερμικού φραγμού κατά την έκθεση σε ακτινοθεραπεία προκαλεί αύξηση της διαδερμικής απώλειας νερού (TEWL) η οποία με τη σειρά της αποτελεί δείκτη ακτινικής δερματίτιδας. Σε μελέτη ασθενών με καρκίνο του μαστού, οι οποίοι έλαβαν κλασματοποιημένη ακτινοθεραπεία σε δόσεις από 50 έως 60 Gy, προκλήθηκε διατάραξη του φραγμού της επιδερμικής διαπερατότητας. Σύμφωνα με το ακτινοθεραπευτικό σχήμα, οι ασθενείς έλαβαν στην περιοχή του θωρακικού τοιχώματος εξωτερική ακτινοβολία εφαιπόμενων πεδίων, φωτονίων 8 MV, σε εφάπαξ δόσεις των 2 Gy μέσω γραμμικού επιταχυντή, 5 φορές την εβδομάδα (Jaschke *et al.*, 2017; Schmuth *et al.*, 2001a). Η βλάβη στην επιδερμίδα επιβαρυνόταν καθ' όλη τη διάρκεια της θεραπείας ενώ η μέγιστη βλάβη παρατηρήθηκε κατά την 27^η μέρα. Η δυσλειτουργία του επιδερμικού φραγμού οδηγεί σε φλεγμονή, αυξημένη διαδερμική απώλεια νερού (TEWL) και ενισχυμένη απώλεια λειτουργίας του φραγμού. Δεδομένου ότι η αύξηση του TEWL δείκτη σηματοδοτεί την εμφάνιση ακτινικής δερματίτιδας, πρόωμη αύξηση TEWL προβλέπει μεγαλύτερης διάρκειας συμπτώματα στο δέρμα ενώ η διατήρηση της λειτουργίας φραγμού της επιδερμικής διαπερατότητας μπορεί να μειώσει την επαγομένη από ακτινοβολία βλάβη (Schmuth *et al.*, 2001b).

Τα αυξημένα επίπεδα φλεγμονωδών κυτοκινών αποτελούν δείκτες δερματικής τοξικότητας σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε ακτινοθεραπεία. Προ-φλεγμονώδη κυτοκίνες όπως η IL-1β, TNF-α, TGF-β1 και IL-6 εμπλέκονται στη δημιουργία δερματικών φλεγμονών ενώ αποτελέσματα *in vivo* πειραμάτων υποστηρίζουν την άμεση εμπλοκή των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών και του TGF-β1 προ-ινογόνου στην ανάπτυξη της οξείας και όψιμης τοξικότητας μετά από έκθεση σε ακτινοθεραπεία. Από τις προαναφερθείσες κυτοκίνες, η TGF-β1 διαδραματίζει πρωταρχικό ρόλο καθότι η ενεργοποίησή της πυροδοτεί μία αλυσίδα κυτταρικών γεγονότων τα οποία καταλήγουν σε ίνωση που προκαλείται λόγω έκθεσης στην ακτινοβολία. Κλινικές μελέτες υποδεικνύουν ότι οι μεταβολές στις συγκεντρώσεις των TGF-β1 και IL-6 στο πλάσμα των ακτινοβοληθέντων ασθενών υποδεικνύουν τους ασθενείς με

υψηλό κίνδυνο δερματικής τοξικότητας. Επιπλέον, *in vivo* μελέτες δείχνουν ότι η έκθεση ζώων εργαστηρίου σε ακτινοβολία συνοδεύεται από αυξημένη έκφραση κυκλοοξυγονάσης 2 (COX2), TGF-β1 και φλεγμονωδών κυτοκινών, αναδεικνύοντας τους εν λόγω βιολογικούς παράγοντες ως πιθανούς δείκτες δερματικής τοξικότητας η οποία έχει επαχθεί από την ακτινοθεραπεία (Chen *et al.*, 2010).

Τροποποιήσεις σε ιστόνες συμπεριλαμβανομένου της μεθυλίωσης, της φωσφορυλίωσης και της ακετυλίωσης δεν έχουν διερευνηθεί ιδιαίτερα ως προς το ρόλο που πιθανόν να διαδραματίζουν σε ιστικές βλάβες προκληθείσες από την ακτινοβολία (Halicka *et al.*, 2005; Maroschik *et al.*, 2014; Matsuda *et al.*, 2015). Οι Herberg *et al.* έδειξαν ότι η μικροδουρφορική αστάθεια προκαλεί μεθυλίωση της H3 ιστόνης πριν η καρκινογένεση λάβει χώρα. Οι Zhang *et al.* απέδειξαν ότι η έκθεση σε συνθήκες προσομοίωσης υπερϊώδους ηλιακής ακτινοβολίας επηρεάζει την ενζυμική δραστηριότητα της ακετυλοτρασφεράσης και της αποακετυλάσης ιστονών (HDAC) με αποτέλεσμα τη μείωση της ακετυλιωμένης ιστόνης η οποία με τη σειρά της αποτελεί βασική βλάβη στο DNA των δερματικών κυττάρων. Ανάλογες τροποποιήσεις ιστονών θεωρούνται επιγενετικά χαρακτηριστικά τα οποία προκαλούνται από την έκθεση σε ακτινοβολία ενώ απαιτούνται επιπρόσθετες έρευνες για τη συμμετοχή των τροποποιημένων ιστονών στις ιστικές βλάβες (Herberg *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2016).

Τόσο το οξειδωτικό όσο και το νιτρώδες στρες δημιουργούν βλάβες στο DNA, η συσσώρευση των οποίων οδηγεί σε καρκινογένεση (Suzuki *et al.*, 2005). Μολονότι, μελέτες υποστηρίζουν τη συσχέτιση μεταξύ της 8-OHdG και της καρκινογένεσης, δεν έχει διερευνηθεί ο ακριβής μηχανισμός μέσω του οποίου επάγεται η καρκινογένεση. Ωστόσο, πρόσφατες έρευνες αποδεικνύουν την ύπαρξη συσχέτισης της αυξημένης έκφρασης 8-OHdG με την καρκινογένεση όπως στην περίπτωση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως όπου η εξέλιξη της νόσου και η κακή πρόγνωση συνδέονται με τα υψηλά επίπεδα της 8-OHdG. Σύμφωνα με τους Chiang *et al.* τα υψηλά επίπεδα 8-OHdG τα οποία ανιχνεύθηκαν σε ούρα ασθενών συνδέονται με υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης ουροθηλιακού καρκινώματος. Οι Wu and Ni απέδειξαν τη συσχέτιση της 8-OHdG με την καρκινογένεση υποθέτοντας ότι η υπομεθυλίωση και τοπική υπερμεθυλίωση του DNA επάγονται από τα επίπεδα της 8-OHdG, καταλήγοντας σε καρκινογένεση. Οι Kuo *et al.* εντόπισαν συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων 8-OHdG με την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού σε ασθενείς οι οποίοι κατηγοριοποιήθηκαν με βάση το στάδιο της νόσου. Τέλος, μελέτες με καρκίνο του προστάτη αναδεικνύουν τη 8-OHdG ως πιθανό καρκινικό δείκτη προκύπτει μέσω συσχέτισης της συγκεκριμένης οξειδωτικής βλάβης με την καρκινογένεση (Ohtake *et al.*, 2018). Ωστόσο, δεν έχει εξακριβωθεί η ακριβή τιμή της 8-OHdG με βάση την οποία μπορεί να προβλεφθεί η καρκινογένεση (Nanashima *et al.*, 2016). Όσον αφορά τη 8-NG σχηματίζεται υπό φλεγμονώδεις συνθήκες ενώ σημαντικό ρόλο διαδραματίζει σε καρκινογένεση που σχετίζεται με φλεγμονή. Έρευνες υποδεικνύουν την εμπλοκή σηματοδοτικού μονοπατιού υποξίας όπου HIF-α μεταγραφικός παράγοντας πυροδοτεί την

έκφραση του iNOS ενζύμου με αποτέλεσμα την παραγωγή της 8-NG, διευκολύνοντας κατά επέκταση την καρκινογένεση. Επιπλέον, ένα δεύτερο σηματοδοτικό μονοπάτι το οποίο σχετίζει τη φλεγμονώδη απόκριση με την καρκινογένεση αφορά την έκφραση του iNOS ενζύμου μέσω του NF-κB μεταγραφικού παράγοντα ο οποίος ενεργοποιείται φλεγμονώδη κυτοκίνες. Έρευνες υποστηρίζουν τον εντοπισμό της 8-NG με το iNOS ένζυμο και τον NF-κB παράγοντα σε ασθενείς με κακήθες ινώδες ιστιοκύττωμα. Ωστόσο, οι μέχρι τώρα μελέτες αναδεικνύουν τη 8-NG με τον HIF-α παράγοντα ως πιθανούς προγνωστικούς και προβλεπτικούς δείκτες καρκινογένεσης η οποία έχει προκύψει από φλεγμονή (Hoki *et al.*, 2007).

Οι 8-OHdG και 8-NG σηματοδοτούν την έκταση της οξειδωτικής βλάβης που έχει υποστεί το DNA ενώ συγχρόνως αποτελούν δείκτες καρκινογένεσης σε διάφορα είδη κακοηθειών. Με βάσει τα αποτελέσματα μελετών, τα επίπεδα των 8-OHdG και 8-NG σε ούρα ασθενών με καρκίνο είναι υψηλότερα συγκριτικά με των υγιών ατόμων (Li *et al.*, 2011). Επιπλέον, οι Mei *et al.* αναφέρουν ότι τα επίπεδα της 8-OHdG μπορούν να λειτουργήσουν ως χρήσιμα εργαλεία πρόβλεψης της θεραπευτικής απόκρισης των ασθενών δεδομένου ότι υψηλότερα επίπεδα εντοπίστηκαν στα ούρα ασθενών με καρκίνο σε σχέση με των υγιών ατόμων. Συνεπώς, οι δείκτες οξειδωτικής βλάβης του DNA, 8-OHdG και 8-NG, παρέχουν τη δυνατότητα διάγνωσης ασθενών με καρκίνο ακόμα και σε αρχικό στάδιο ενώ το θεραπευτικό αποτέλεσμα εκτιμάται μέσω των μεταβολές των συγκεντρώσεών τους (Li *et al.*, 2011).

Η υπάρχουσα βιβλιογραφική αναφορά παρουσιάζει τα προϊόντα βλαβών του DNA, 8-OHdG και 8-NG, ως δείκτες του οξειδωτικού και νιτρώδους στρες που προκαλούνται από την έκθεση στην ιονίζουσα ακτινοβολία, αντιστοίχως. Επιπλέον, έρευνες αναφέρουν την πιθανή συσχέτισή τους με την καρκινογένεση ενώ τα υψηλά επίπεδα που ανιχνεύονται σε καρκινοπαθείς τα καθιστούν ως δείκτες καρκινογένεσης. Ωστόσο, τα επιστημονικά δεδομένα που ανακύπτουν από την παρούσα εργασία προσδίδουν στην 8-OHdG και 8-NG προβλεπτική αξία για εμφάνιση ακτινικής δερματίτιδας σε ασθενείς που υποβάλλονται σε ακτινοθεραπεία. Οι συσχετίσεις των μεταβολών των [8-OHdG] και [8-NG] με το βαθμό ακτινικής δερματίτιδας σε σχέση με το χρόνο και τη δόση που έλαβαν οι ασθενείς κατά τη διάρκεια του ακτινοθεραπευτικού προγράμματος, προβάλλουν τις εν λόγω βλάβες του DNA ως προβλεπτικούς δείκτες για ανάπτυξη ακτινικής δερματίτιδας.

Συμπεράσματα

- Αρνητική συσχέτιση παρατηρείται μεταξύ της μεταβολής [8-OHdG] και της BMI παραμέτρου ενώ θετική συσχέτιση προκύπτει με το βαθμό ακτινικής δερματίτιδας (Εικόνα 3.3).
- Η προβλεπτική αξία της 8-OHdG ως δείκτη ακτινικής δερματίτιδας προκύπτει από τις κανονικοποιήσεις των μεταβολών της [8-OHdG] με τις παραμέτρους BMI και BSA καθώς και από συσχετίσεις της συνολικής μεταβολής και των σχετικών μεταβολών των επιπέδων της 8-OHdG με το βαθμό ακτινικής δερματίτιδας οι οποίες παρουσιάζουν στατιστική σημασία (Εικόνες 3.4, 3.5 και 3.6).
- Η γραμμική συσχέτιση των % σχετικών μεταβολών [8-OHdG] με το βαθμό ακτινικής δερματίτιδας καθ' όλη τη διάρκεια του ακτινοθεραπευτικού προγράμματος υποδεικνύει τη σημαντική προβλεπτική αξία της 8-OHdG για την εμφάνιση δερματικής τοξικότητας (Εικόνα 3.7).
- Θετική συσχέτιση προκύπτει μεταξύ των μεταβολών της [8-NG] με την ανάπτυξη ακτινικής δερματίτιδας καθ' όλη τη διάρκεια της ακτινοθεραπείας και σε όλες τις δόσεις που έλαβαν οι ασθενείς (Εικόνα 3.11).
- Η σημαντική συσχέτιση της μεταβολής των επιπέδων της 8-NG με την εμφάνιση ακτινικής δερματίτιδας πριν την έναρξη του ακτινοθεραπευτικού σχήματος προσδίδει προβλεπτική αξία στην 8-NG (Εικόνα 3.11).
- Η 8-NG καθίσταται προβλεπτικός δείκτης για ανάπτυξη ακτινικής δερματίτιδας λόγω των στατιστικά σημαντικών συσχετίσεων που ανακύπτουν μεταξύ της συνολικής μεταβολής καθώς και των σχετικών μεταβολών των επιπέδων [8-NG] με την εμφάνιση δερματικής τοξικότητας (Εικόνες 3.13 και 3.14).
- Η σημαντική εκθετική αύξηση στη συσχέτιση των % μεταβολών της [8-NG] με το βαθμό ακτινικής δερματίτιδας καθιστά τη 8-NG προβλεπτικό δείκτη για δερματική τοξικότητα (Εικόνα 3.15).
- Η προβλεπτική αξία της 8-NG για την εμφάνιση ακτινικής δερματίτιδας ανακύπτει μέσα από τις κανονικοποιήσεις των μεταβολών της [8-NG] με τις BMI και BSA παραμέτρους όπου σημαντικές συσχετίσεις προκύπτουν μεταξύ των μεταβολών των επιπέδων της 8-NG και του βαθμού ακτινικής δερματίτιδας πριν την έναρξη και κατά τη διάρκεια του ακτινοθεραπευτικού σχήματος (Εικόνα 3.16).
- Σημαντική γραμμική συσχέτιση ανακύπτει μεταξύ των % μεταβολών της [8-NG] με το βαθμό ακτινικής δερματίτιδας στο χρόνο και στις δόσεις ακτινοβολίας που έλαβαν οι ασθενείς (Εικόνα 3.17).
- Τα επίπεδα της 8-NG συσχετίζονται στατιστικώς σημαντικά με την εμφάνιση της ακτινικής δερματίτιδας καθ' όλη τη διάρκεια του ακτινοθεραπευτικού σχήματος ενώ τα

επίπεδα της 8-OHdG μόνο κατά τις 2 πρώτες εβδομάδες ακτινοθεραπείας όπως υπέδειξαν οι συσχετίσεις των ηλίικων των μεταβολών των [8-NG] και [8-OHdG] προς BMI με την ανάπτυξη δερματικής τοξικότητας (Εικόνα 3.18).

- Η αύξηση του κινδύνου για δερματική τοξικότητα εκφράζεται μέσω των αρνητικών συσχετίσεων που προκύπτουν μεταξύ της μεταβολής [GSH] και του βαθμού ακτινικής δερματίτιδας καθώς και μέσω των θετικών συσχετίσεων μεταξύ των συνολικών μειώσεων των % [GSH] και του βαθμού ακτινικής δερματίτιδας (Εικόνα 3.21).
- Σημαντική συσχέτιση του ηλίικου των μεταβολών της [8-OHdG] και της [8-NG] ως προς τις μεταβολές % [GSH] με την εμφάνιση ακτινικής δερματίτιδας προκύπτει με βάση τη γραμμική προσαρμογή (Εικόνα 3.23).

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί τη συχνότερη εμφανιζόμενη μορφή καρκίνου παγκοσμίως. Η ακτινοθεραπεία διαδραματίζει επικουρικό ρόλο στην αντιμετώπισή του. Κατά την έκθεση των κυττάρων στην ακτινοβολία, οι παραγόμενες δραστικές ενώσεις οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS) προκαλούν το σχηματισμό της 8-υδροξυδεοξυγουανίνης (8-OHdG) και 8-νιτρογουανίνης (8-NG), αντιστοίχως. Δεδομένου ότι κατά την ακτινοθεραπεία χορηγείται ιονίζουσα ακτινοβολία, το επιστημονικό ενδιαφέρον της παρούσας εργασίας εστιάζει στην ανίχνευση της 8-OHdG και 8-NG σε ακτινοβοληθέντες ασθενείς με καρκίνο του μαστού και στη διερεύνηση των παραπάνω ως προβλεπτικούς δείκτες της ακτινικής δερματίτιδας, η οποία ανήκει στις πλέον συνήθεις παρενέργειες της ακτινοθεραπείας.

Το ερευνητικό ερώτημα απαντήθηκε με τη μέθοδο ELISA όπου εξετάστηκαν δείγματα πλάσματος από 33 ασθενείς οι οποίοι υπεβλήθησαν σε μετεγχειρητική ακτινοθεραπεία. Ο εργαστηριακός έλεγχος επικεντρώθηκε στην ανίχνευση των βλαβών DNA, 8-OHdG και 8-NG καθώς και της γλουταθειόνης (GSH) η οποία είναι γνωστή για την αντιοξειδωτική της δράση.

Από τις κλινικές παραμέτρους που μελετήθηκαν, οι μεταβολές των [8-OHdG] και [8-NG] συσχετίζονται σημαντικά κυρίως με την ακτινική δερματίτιδα. Κανονικοποιήσεις των μεταβολών των [8-OHdG] και [8-NG] με τις BMI και BSA παραμέτρους ανέδειξαν σημαντικές συσχετίσεις με την προκληθείσα δερματική τοξικότητα. Επιπλέον, τα πηλίκα των [8-NG]/BMI και [8-NG]/BSA συσχετίζονται σημαντικά με την ακτινική δερματίτιδα πριν την έναρξη ακτινοθεραπείας ($P < 0.05$). Οι συνολικές μεταβολές των [8-OHdG] και [8-NG] συσχετίζονται στατιστικώς σημαντικά με την ακτινική δερματίτιδα κατά τα χρονικά διαστήματα D0-D14, D0-28 και D0-D56. Αντίθετα, οι σχετικές μεταβολές των [8-OHdG] συσχετίζονται σημαντικά με τη δερματική τοξικότητα μόνο κατά το χρονικό διάστημα D0-D14 ($P < 0.05$) ενώ οι σχετικές μεταβολές των [8-NG] κατά τις ημέρες D0-D14 ($P < 0.05$) και D14-D28 ($P < 0.05$). Η δυνατότητα πρόβλεψης της αναπτυσσόμενης ακτινικής δερματίτιδας μέσω των 8-OHdG και 8-NG ανακύπτει από τη σημαντική γραμμική συσχέτιση των % σχετικών μεταβολών της [8-OHdG] και [8-NG] με το βαθμό ακτινικής δερματίτιδας ($P < 0.001$). Θετικές χαρακτηρίζονται οι συσχετίσεις των συνολικών μειώσεων των % επιπέδων της [GSH] με το βαθμό ακτινικής δερματίτιδας στις δόσεις ακτινοβολίας 2000 cGy ($P < 0.05$) και 6000 cGy ($P < 0.005$).

Συμπερασματικά, η 8-OHdG και 8-NG μπορούν να προταθούν ως προβλεπτικοί δείκτες ακτινικής δερματίτιδας σε ασθενείς που υποβάλλονται σε ακτινοθεραπεία. Τέλος, όσον αφορά τη GSH, η αυξημένη μείωση των % επιπέδων της, σηματοδοτεί μεγαλύτερη πιθανότητα ανάπτυξης δερματικής τοξικότητας κατόπιν ακτινοθεραπείας.

SUMMARY

Breast cancer belongs to the most common malignancies worldwide. Radiation therapy plays an adjuvant role in anticancer treatment. During cell exposure to radiation, the produced reactive oxygen (ROS) and nitrogen species (RNS) induce the formation of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) and 8-nitroguanine (8-NG), respectively. Taking into consideration that ionizing radiation is administered during radiotherapy, the scientific interest of the present study focuses on the detection of 8-OHdG and 8-NG in irradiated breast cancer patients and the investigation of the above DNA lesions as predictive markers of radiation dermatitis, one of most common side-effects induced by radiation therapy.

This research hypothesis was explored according to the ELISA method which was conducted in order to test the blood serum samples collected from 33 patients who had underwent postoperative radiotherapy. The laboratory analysis was concentrated on the detection of DNA damage products, 8-OHdG and 8-NG, as well as glutathione (GSH) which is known for its antioxidant activity.

Among all the tested clinical parameters, alterations in [8-OHdG] and [8-NG] levels are significantly associated with radiation dermatitis. Normalizing the altered [8-OHdG] and [8-NG] with BMI and BSA parameters, considerable correlations with radiation-induced dermal toxicity were revealed. Furthermore, the ratios [8-NG]/BMI and [8-NG]/BSA are strongly correlated with radiation dermatitis before the initiation of radiotherapy ($P < 0.05$). Overall alterations in [8-OHdG] and [8-NG] levels are statistically correlated with the dermal toxicity during the time intervals D0-D14, D0-D28 and D0-D56 ($P < 0.005$ and $P < 0.01$, respectively). By contrast, relative alterations in [8-OHdG] levels are remarkably associated with dermal toxicity only during the time interval D0-D14 ($P < 0.05$) while relative alterations in [8-NG] levels are correlated with radiation dermatitis during D0-D14 ($P < 0.05$) and D14-D28 ($P < 0.05$). The ability to predict the radiation-induced dermatitis based on 8-OHdG and 8-NG arises from the significant linear correlation between % relative alterations in [8-OHdG] and [8-NG] levels with dermatitis grade ($P < 0.001$). As positive can be considered the correlations between % [GSH] overall reductions and dermatitis grade in the administered radiation doses of 2000 cGy ($P < 0.05$) and 6000 cGy ($P < 0.005$).

To conclude, 8-OHdG and 8-NG may be suggested as predictive markers of radiation dermatitis in patients who undergo radiation therapy. Finally, with regard to GSH, the increased reduction of % [GSH] levels indicates a greater probability of developing dermal toxicity upon radiation treatment.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Abdollahi, A., Li, M., Ping, G., Plathow, C., Domhan, S., Kiessling, F., Lee, L. B., McMahon, G., Gröne, H. J., Lipson, K. E. and Huber, P. E. (2005). Inhibition of platelet-derived growth factor signaling attenuates pulmonary fibrosis. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(6), pp. 925–935.
2. Agarwal, A., Prabakaran, S. and Allamaneni, S. (2006). What an andrologist/urologist should know about free radicals and why. *Urology*, 67(1), pp.2–8.
3. Agnihotri, N. and Mishra, P. (2010). Formation of 8-nitroguanine due to reaction between guanyl radical and nitrogen dioxide: Catalytic Role of Hydration. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114(21), pp.7391-7404.
4. Ahmad, I., Muneer, K. M., Chang, M. E., Nasr, H. M., Clay, J. M., Huang, C. C. and Yusuf, N. (2017). Ultraviolet Radiation-Induced Downregulation of SERCA2 Mediates Activation of NLRP3 Inflammasome in Basal Cell Carcinoma. *Photochemistry and photobiology*, 93(4), pp. 1025–1033.
5. Akaike, T., Fujii, S., Kato, A., Yoshitake, J., Miyamoto, Y., Sawa, T., Okamoto, S., Suga, M., Asakawa, M., Nagai, Y. and Maeda, H. (2000). Viral mutation accelerated by nitric oxide production during infection in vivo. *FASEB Journal*, 14(10), pp.1447-1454.
6. Akeem, S., Lukman, O., Eltahir, K., Fatai, O., Abiola, B. and Khadijat, O. (2019). Bone Marrow and peripheral blood cells toxicity of a single 2.0 Gy cobalt⁶⁰ ionizing radiation: An animal model. *Ethiopian Journal of health sciences*, 29(2), pp.195-202.
7. Alfassi, Z.B.E. (1997). *The chemistry of free radicals: Peroxyl Radicals*. Chichester: Wiley.
8. Allam, R., Lawlor, K. E., Yu, E. C., Mildenhall, A. L., Moujalled, D. M., Lewis, R. S., Ke, F., Mason, K. D., White, M. J., Stacey, K. J., Strasser, A., O'Reilly, L. A., Alexander, W., Kile, B. T., Vaux, D. L. and Vince, J. E. (2014). Mitochondrial apoptosis is dispensable for NLRP3 inflammasome activation but non-apoptotic caspase-8 is required for inflammasome priming. *EMBO reports*, 15(9), pp. 982–990.
9. Amols, H. I. (2008). New technologies in radiation therapy: ensuring patient safety, radiation safety and regulatory issues in radiation oncology. *Health physics*, 95(5), pp. 658–665.
10. An, J.H., Kim, J. and Seong, J. (2004). Redox signaling by ionizing radiation in mouse liver. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1030, pp. 86–94.
11. Ang, K. and Wilder, R. (2003). The skin. In: Cox, J. and Ang, K. (eds) *Radiation oncology*. St. Louis: Mosby.

12. Antoniou, A., Pharoah, P.D., Narod, S., Risch, H.A., Eyfjord, J.E., Hopper, J.L., Loman, N., Olsson, H., Johannsson, O., Borg, A., Pasini, B., Radice, P., Manoukian, S., Eccles, D.M., Tang, N., Olah, E., Anton-Culver, H., Warner, E., Lubinski, J., Gronwald, J., Gorski, B., Tulinius, H., Thorlacius, S., Eerola, H., Nevanlinna, H., Syrjäkoski, K., Kallioniemi, O.P., Thompson, D., Evans, C., Peto, J., Lalloo, F., Evans, D.G. and Easton, D.F. (2003). Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *American Journal of Human Genetics*, 72(5), pp.1117-1130.
13. Archambeau, J. O., Pezner, R. and Wasserman, T. (1995). Pathophysiology of irradiated skin and breast. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 31(5), pp. 1171–1185.
14. Astley, S. B., Elliott, R. M., Archer, D. B. and Southon, S. (2004). Evidence that dietary supplementation with carotenoids and carotenoid-rich foods modulates the DNA damage: repair balance in human lymphocytes. *The British journal of nutrition*, 91(1), pp. 63–72.
15. Azzam, E.I., Jay-Gerin, J.P. and Pain, D. (2012). Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Letter*, 327(1-2), pp. 48-60.
16. Bae, Y. S., Oh, H., Rhee, S. G., and Yoo, Y. D. (2011). Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling. *Molecules and cells*, 32(6), pp. 491–509.
17. Balter, S., Hopewell, J.W., Miller, D.L., Wagner, L.K. and Zelefsky, M.J. (2010). Fluoroscopically guided interventional procedures: a review of radiation effects on patients' skin and hair. *Radiology*, 254(2), pp. 326–341.
18. Barnett, G.C., West, C.M.L., Dunning, A.M., Elliott, R.M., Coles, C.E., Pharoah, P.D.P. and Burnet, N.G. (2009). Normal tissue reactions to radiotherapy: Towards tailoring treatment dose by genotype. *Nature Reviews. Cancer*, 9(2), pp.134-142.
19. Baskar, R., Lee, K. A., Yeo, R. and Yeoh, K. W. (2012). Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *International journal of medical sciences*, 9(3), pp. 193–199.
20. Becker, S. (2015) A historic and scientific review of breast cancer: The next global healthcare challenge. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, 131 Suppl 1, pp.S36-S39.
21. Barbusiński, K. (2009). Fenton reaction controversy concerning the chemistry. *Ecological Chemistry and Engineering Science*, 16(3), pp. 309–314.

22. Barney, B. M., Lee, R. J., Handrahan, D., Welsh, K. T., Cook, J. T. and Sause, W. T. (2011). Image-guided radiotherapy (IGRT) for prostate cancer comparing kV imaging of fiducial markers with cone beam computed tomography (CBCT). *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 80(1), pp. 301–305.
23. Baskar, R. (2010). Emerging role of radiation induced bystander effects: Cell communications and carcinogenesis. *Genome integrity*, 1(1), p. 13.
24. Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A. and Freeman, B. A. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(4), pp. 1620–1624.
25. Bedard, K. and Krause, K. H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews*, 87(1), pp.245–313.
26. Begg, A. C., Stewart, F. A. and Vens, C. (2011). Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. *Nature reviews. Cancer*, 11(4), pp. 239–253.
27. Bentzen, S. M. (2006). Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology. *Nature reviews. Cancer*, 6(9), pp.702–713.
28. Berkey, F. J. (2010). Managing the adverse effects of radiation therapy. *American family physician*, 82(4), pp. 381–394.
29. Bernier, J., Hall, E. J. and Giaccia, A. (2004). Radiation oncology: a century of achievements. *Nature reviews. Cancer*, 4(9), pp. 737–747.
30. Bickelhaupt, S., Erbel, C., Timke, C., Wirkner, U., Dadrich, M., Flechsig, P., Tietz, A., Pfhler, J., Gross, W., Peschke, P., Hoeltgen, L., Katus, H. A., Gröne, H. J., Nicolay, N. H., Saffrich, R., Debus, J., Sternlicht, M. D., Seeley, T. W., Lipson, K. E. and Huber, P. E. (2017). Effects of CTGF blockade on attenuation and reversal of radiation-induced pulmonary fibrosis. *Journal of the National Cancer Institute*, 109(8), djw339.
31. Bielski, B.H.J., Cabelli, D.E., Arudi, R.L. and Ross, A.B. (1985). Reactivity of HO₂/O₂⁻ radicals in aqueous solution. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 14 (4), pp.1041–1100.
32. Bolisetty, S. and Jaimes, E. A. (2013). Mitochondria and reactive oxygen species: physiology and pathophysiology. *International journal of molecular sciences*, 14(3), pp. 6306–6344.
33. Borrego-Soto, G., Ortiz-López, R. and Rojas-Martínez, A. (2015). Ionizing radiation-induced DNA injury and damage detection in patients with breast cancer. *Genetics and Molecular Biology*, 38(4), pp. 420-432.

34. Brand, M., Sommer, M., Ellmann, S., Wuest, W., May, M. S., Eller, A., Vogt, S., Lell, M. M., Kuefner, M. A. and Uder, M. (2015). Influence of different antioxidants on X-Ray induced DNA double-strand breaks (DSBs) using γ -H2AX immunofluorescence microscopy in a preliminary study. *PloS one*, 10(5), e0127142.
35. Brandsma, D., Stalpers, L., Taal, W., Sminia, P. and van den Bent, M. J. (2008). Clinical features, mechanisms, and management of pseudoprogression in malignant gliomas. *The Lancet. Oncology*, 9(5), pp. 453–461.
36. Breast cancer.org. 2020. *Diagnosis Of DCIS*. [online] Available at: <<https://www.breastcancer.org/symptoms/types/dcis/diagnosis>> [Accessed 11 February 2020].
37. Bray, F.N., Simmons, B.J., Wolfson, A.H. and Nouri, K. (2016). Acute and Chronic Cutaneous Reactions to Ionizing Radiation Therapy. *Dermatology and therapy*, 6(2), pp. 185–206.
38. British Columbia Cancer Agency. *Care of radiation skin reactions*. [online] Available at:<<http://www.bccancer.bc.ca/HPI/CancerManagementGuidelines/SupportiveCare/RadiationSkinReactions>> [Accessed July 4, 2020].
39. Bruner, S. D., Norman, D. P. and Verdine, G. L. (2000). Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA. *Nature*, 403(6772), pp. 859–866.
40. Buist, D.S., Abraham, L.A., Barlow, W.E., Krishnaraj, A., Holdridge, R.C., Sickles, E.A., Carney, P.A., Kerlikowske, K., Geller, B.M. and Breast cancer surveillance consortium. (2010). Diagnosis of second breast cancer events after initial diagnosis of early stage breast cancer. *Breast cancer research treatment*, 124(3), pp. 863-873.
41. Buonocore, G., Perrone, S. and Tataranno, M. L. (2010). Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Seminars in fetal and neonatal medicine*, 15(4), pp.186–190.
42. Burnet, N. G., Thomas, S. J., Burton, K. E. and Jefferies, S. J. (2004). Defining the tumour and target volumes for radiotherapy. *Cancer imaging*, 4(2), pp. 153–161.
43. Campa, A., Ballarini, F., Belli, M., Cherubini, R., Dini, V., Esposito, G., Friedland, W., Gerardi, S., Molinelli, S., Ottolenghi, A., Paretzke, H., Simone, G. and Tabocchini, M. A. (2005). DNA DSB induced in human cells by charged particles and gamma rays: experimental results and theoretical approaches. *International journal of radiation biology*, 81(11), pp. 841–854.
44. Chang-Claude J, Popanda O, Tan XL, Kropp S, Helmbold I, von Fournier, D., Haase, W., Sautter-Bihl, M.L., Wenz, F., Schmezer, P. and Ambrosone, C.B. Association between polymorphisms in the DNA repair genes, XRCC1, APE1, and XPD and acute

- side effects of radiotherapy in breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2005; 11(13): 4802–4809.
46. Chattopadhyay, A., Deb, S. and Chatterjee, A. (1999). Modulation of the clastogenic activity of gamma-irradiation in buthionine sulphoximine-mediated glutathione depleted mammalian cells. *International journal of radiation biology*, 75(10), pp. 1283–1291.
 47. Chen, J., Delannoy, M., Odwin, S., He, P., Trush, M. A. and Yager, J. D. (2003). Enhanced mitochondrial gene transcript, ATP, bcl-2 protein levels, and altered glutathione distribution in ethinyl estradiol-treated cultured female rat hepatocytes. *Toxicological sciences*, 75(2), pp. 271–278.
 48. Chen, M. F., Chen, W. C., Lai, C. H., Hung, C. H., Liu, K. C. and Cheng, Y. H. (2010). Predictive factors of radiation-induced skin toxicity in breast cancer patients. *BMC cancer*, 10(1), p.508.
 49. Chen, W.Y., Rosner, B., Hankinson, S.E., Colditz, G.A. and Willett, W.C. (2011). Moderate alcohol consumption during adult life, drinking patterns, and breast cancer risk. *JAMA*, 306(17), pp. 1884-1890.
 50. Chiang, C.I., Huang, Y.L., Huang, C.Y., Shiue, H.S., Chen, W.J., Pu, Y.S., Lin, W.C. and Hsueh, Y.M. (2015). XRCC1 polymorphisms and urinary 8-hydroxydeoxyguanine levels are associated with urothelial carcinoma. *PLOS one*, 10(5), e0124066.
 51. Chistiakov, D.A., Voronova, N.V. and Chistiakov, P.A. (2008). Genetic variations in DNA repair genes, radiosensitivity to cancer and susceptibility to acute tissue reactions in radiotherapy treated cancer patients. *Acta Oncologica*, 47(5), pp. 809-824.
 52. Clark, R. M., McCulloch, P. B., Levine, M. N., Lipa, M., Wilkinson, R. H., Mahoney, L. J., Basrur, V. R., Nair, B. D., McDermot, R. S. and Wong, C. S. (1992). Randomized clinical trial to assess the effectiveness of breast irradiation following lumpectomy and axillary dissection for node-negative breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 84(9), pp. 683-689.
 53. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. (2002). Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. *Lancet*, 360(9328), pp.187-195.
 54. Coleman, M.P., Quaresma, M., Berrino, F., Lutz, J.M., De Angelis, R., Capocaccia, R., Baili, P., Rachet, B., Gatta, G., Hakulinen, T., Micheli, A., Sant, M., Weir, H.K., Elwood, J.M., Tsukuma, H., Koifman, S., E Silva, G.A., Francisci, S., Santaquilani, M., Verdecchia, A., Storm, H.H., Young, J.L. and CONCORD working group. (2008). Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *Lancet Oncology*, 9(8), pp.730-756.

55. Conklin, K.A. (2000). Dietary antioxidants during cancer chemotherapy: impact on chemotherapeutic effectiveness and development of side effects. *Nutrition and cancer*, 37(1), pp. 1-18.
56. Conklin, K.A. (2004). Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness. *Integrative cancer therapies*, 3(4), pp. 294-300.
57. Conklin, K.A and Nicolson, G.L. (2008). Molecular replacement in cancer therapy: reversing cancer metabolic and mitochondrial dysfunction, fatigue and the adverse effects of therapy. *Current cancer therapy reviews*, 4(1), pp. 66-76.
58. Cooke, M. S., Evans, M. D., Burd, R. M., Patel, K., Barnard, A., Lunec, J. and Hutchinson, P. E. (2001). Induction and excretion of ultraviolet-induced 8-oxo-2'-deoxyguanosine and thymine dimers in vivo: implications for PUVA. *The Journal of investigative dermatology*, 116(2), pp. 281–285.
59. Cotgrave, I. A. (2003). Analytical developments in the assay of intra- and extracellular GSH homeostasis: specific protein S-glutathionylation, cellular GSH and mixed disulphide compartmentalisation and interstitial GSH redox balance. *BioFactors*, 17(1-4), pp. 269–277.
60. Cox, K.L., Devanarayan, V., Kriauciunas, A., Manetta, J., Montrose, C. and Sittampalam, S. (2012). Immunoassay Methods. In: Markossian, S., Sittampalam, G.S., Grossman, A., Brimacombe, K., Arkin, M., Auld, D., Austin, C.P., Baell, J., Caaveiro, J.M.M., Chung, T.D.Y., Coussens, N.P., Dahlin, J.L., Devanaryan, V., Foley, T.L., Glicksman, M., Hall, M.D., Haas, J.V., Hoare, S.R.J., Inglese, J., Iversen, P.W., Kahl, S.D., Kales, S.C., Kirshner, S., Lal-Nag, M., Li, Z., McGee, J., McManus, O., Riss, T., Saradjian, P., Trask, O.J. Jr, Weidner, J.R., Wildey, M.J., Xia, M. and Xu, X. (eds) *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
61. Cragg, M. S., Harris, C., Strasser, A. and Scott, C. L. (2009). Unleashing the power of inhibitors of oncogenic kinases through BH3 mimetics. *Nature reviews. Cancer*, 9(5), pp. 321–326.
62. Crow, J. P. and Beckman, J. S. (1995). The role of peroxynitrite in nitric oxide-mediated toxicity. *Current topics in microbiology and immunology*, 196, pp.57–73.
63. Curtis, R. (2006). *New Malignancies Among Cancer Survivors*. [Bethesda, Md.]: [National Cancer Institute, U.S. Dept. of Health and Human Services, National Institutes of Health].
64. De Ruyscher, D., Niedermann, G., Burnet, N. G., Siva, S., Lee, A. and Hegi-Johnson, F. (2019). Radiotherapy toxicity. *Nature reviews. Disease primers*, 5(1), p.13.

65. Delaney, G., Jacob, S., Featherstone, C. and Barton, M. (2005). The role of radiotherapy in cancer treatment estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. *Cancer*, 104(6), pp.1129-1137.
66. DeWeese, T. L., Shipman, J. M., Larrier, N. A., Buckley, N. M., Kidd, L. R., Groopman, J. D., Cutler, R. G., te Riele, H. and Nelson, W. G. (1998). Mouse embryonic stem cells carrying one or two defective Msh2 alleles respond abnormally to oxidative stress inflicted by low-level radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(20), pp. 11915–11920.
67. Dewey, W. C., Ling, C. C. and Meyn, R. E. (1995). Radiation-induced apoptosis: relevance to radiotherapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 33(4), pp.781–796.
68. Dickinson, D. A. and Forman, H. J. (2002). Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochemical pharmacology*, 64(5-6), pp. 1019–1026.
69. Ding, M., Newman, F., Chen, C., Stuhr, K. and Gaspar, L. E. (2009). Dosimetric comparison between 3DCRT and IMRT using different multileaf collimators in the treatment of brain tumors. *Medical dosimetry*, 34(1), pp. 1–8.
70. Ding, C., Saw, C. B. and Timmerman, R. D. (2018). Cyberknife stereotactic radiosurgery and radiation therapy treatment planning system. *Medical dosimetry*, 43(2), pp. 129–140.
71. Dörr, W., Baumann, M. and Herrmann, T. (1996). Nomenclature of modified fractionation protocols in radiotherapy. *Strahlentherapie und Onkologie*, 172(7), pp. 353–355.
72. Drew, B. and Leeuwenburgh, C. (2002). Aging and the role of reactive nitrogen species. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 959, pp. 66–81.
73. Drummond, G. R., Selemidis, S., Griendling, K. K. and Sobey, C. G. (2011). Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nature reviews. Drug discovery*, 10(6), pp. 453–471.
74. Du, J. and Gebicki, J. M. (2004). Proteins are major initial cell targets of hydroxyl free radicals. *The international journal of biochemistry and cell biology*, 36(11), pp. 2334–2343.
75. Duma, M. N., Kampfer, S., Wilkens, J. J., Schuster, T., Molls, M. and Geinitz, H. (2010). Comparative analysis of an image-guided versus a non-image-guided setup approach in terms of delivered dose to the parotid glands in head-and-neck cancer IMRT. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 77(4), pp.1266–1273.
76. Dumitrescu, R.G. and Cotarla, I. (2005). Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005?. *Journal of cellular and molecular medicine*, 9(1), pp.208-221.

77. Dupont, W.D., Parl, F.F., Hartmann, W.H., Brinton, L.A., Winfield, A.C., Worrell, J.A., Schuyler, P.A. and Plummer, W.D. (1993). Breast cancer risk associated with proliferative breast disease and atypical hyperplasia. *Cancer*, 71(4), pp.1258-1265.
78. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. (1995). Effects of radiotherapy and surgery in early breast cancer. An overview of the randomized trials. *The New England Journal of Medicine*, 333(22), pp.1444-1455.
79. Edgren, M., Révész, L. and Larsson, A. (1981). Induction and repair of single-strand DNA breaks after X-irradiation of human fibroblasts deficient in glutathione. *International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine*, 40(4), pp. 355–363.
80. Eifel P, Axelson JA, Costa J, Crowley J, Curran WJ Jr, Deshler A, Fulton S, Hendricks CB, Kemeny M, Kornblith AB, Louis TA, Markman M, Mayer R, Roter D. (2001). National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: adjuvant therapy for breast cancer, November 1-3, 2000. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(13), pp.979-989.
81. Emami, B., Lyman, J., Brown, A., Coia, L., Goitein, M., Munzenrider, J. E., Shank, B., Solin, L. J. and Wesson, M. (1991). Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 21(1), pp. 109–122.
82. Eriksson, D. and Stigbrand, T. (2010). Radiation-induced cell death mechanisms. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 31(4), pp.363–372.
83. Estrela, J. M., Obrador, E., Navarro, J., Lasso De la Vega, M. C. and Pellicer, J. A. (1995). Elimination of Ehrlich tumours by ATP-induced growth inhibition, glutathione depletion and X-rays. *Nature medicine*, 1(1), pp. 84–88.
84. Felley-Bosco, E. (1998). Role of nitric oxide in genotoxicity: implication for carcinogenesis. *Cancer metastasis reviews*, 17(1), pp. 25–37.
85. Feng, F. Y., Kim, H. M., Lyden, T. H., Haxer, M. J., Feng, M., Worden, F. P., Chepeha, D. B. and Eisbruch, A. (2007). Intensity-modulated radiotherapy of head and neck cancer aiming to reduce dysphagia: early dose-effect relationships for the swallowing structures. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 68(5), pp. 1289–1298.
86. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D. and Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*, 136(5), E359–E386.

87. Ferradini, C. and Jay-Gerin, J.P. (1999). Radiolysis of water and aqueous solutions: history and present state of the science. *Canadian Journal of Chemistry*, 77(9), pp. 1542–1575.
88. Fogg, V. C., Lanning, N. J. and Mackeigan, J. P. (2011). Mitochondria in cancer: at the crossroads of life and death. *Chinese journal of cancer*, 30(8), pp.526–539.
89. Fojo, T. and Bates, S. (2003). Strategies for reversing drug resistance. *Oncogene*, 22(47), pp. 7512–7523.
90. Ford, D., Easton, D.F., Stratton, M., Narod, S., Goldgar, D., Devilee P., Bishop, D.T., Weber, B., Lenoir, G., Chang-Claude, J., Sobol, H., Teare, M.D., Struewing, J., Arason, A., Scherneck, S., Peto, J., Rebbeck, T.R., Tonin, P., Neuhausen, S., Barkardottir, R., Eyfjord, J., Lynch, H., Ponder, B.A., Gayther, S.A. and Zelada-Hedman, M. (1998). Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *American Journal of Human Genetics*, 62(3), pp. 676-689.
91. Freeman, D. E. and King, C. R. (2011). Stereotactic body radiotherapy for low-risk prostate cancer: five-year outcomes. *Radiation oncology*, 6, p.3.
92. Freeman, S.L. and MacNaughton, W.K. (2000). Ionizing radiation induces iNOS-mediated epithelial dysfunction in the absence of an inflammatory response. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 278(2), pp. G243-G250.
93. Frey, B., Rückert, M., Deloch, L., Rühle, P. F., Derer, A., Fietkau, R. and Gaipl, U. S. (2017). Immunomodulation by ionizing radiation-impact for design of radio-immunotherapies and for treatment of inflammatory diseases. *Immunological reviews*, 280(1), pp. 231–248.
94. Frongillo, Y., Goulet, T., Fraser, M.J., Cobut, V., Patau, J.P., Jay-Gerin, J.P. (1998). Monte Carlo simulation of fast electron and proton tracks in liquid water-II. Nonhomogeneous chemistry. *Radiation Physics and Chemistry*, 51(3), pp. 245–254.
95. Fukumura, D., Kashiwagi, S. and Jain, R.K. (2006). The role of nitric oxide in tumour progression. *Nature Reviews. Cancer*, 6(7), pp. 521-534.
96. Fuller, H.R., Goodwin, P.R. and Morris, G.E. (2006). An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the major crustacean allergen, tropomyosin in food. *Food and Agricultural Immunology*, 17(1), pp. 43–52.
97. Gancberg, D., Lespagnard, L., Rouas, G., Paesmans, M., Piccart, M., Di Leo, A., Nogaret, J. M., Hertens, D., Verhest, A. and Larsimont, D. (2000). Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples of invasive breast carcinomas. Correlation with oncogene amplification in 160 cases. *American Journal of Clinical Pathology*, 113(5), pp. 675-682.

98. Gao, Y., Wang, P., Wang, Z., Han, L., Li, J., Tian, C., Zhao, F., Wang, J., Zhao, F., Zhang, Q. and Lyu, Y. (2019). Serum 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine level as a potential biomarker of oxidative DNA damage induced by ionizing radiation in human peripheral blood. *Dose Response*, 17(1), 1559325818820649.
99. Gao, M.C., Jia, X.D., Wu, Q.F., Cheng, Y., Chen, F.R. and Zhang, J. (2011). Silencing Prx1 and/or Prx5 sensitizes human esophageal cancer cells to ionizing radiation and increases apoptosis via intracellular ROS accumulation. *Acta Pharmacologica Sinica*, 32(4), pp. 528–536.
100. Gerber, D. E. and Chan, T. A. (2008). Recent advances in radiation therapy. *American family physician*, 78(11), pp. 1254–1262.
101. Gill, S., Thomas, J., Fox, C., Kron, T., Rolfo, A., Leahy, M., Chander, S., Williams, S., Tai, K. H., Duchesne, G. M. and Foroudi, F. (2011). Acute toxicity in prostate cancer patients treated with and without image-guided radiotherapy. *Radiation oncology*, 6, p.145.
102. Giordano, S.H., Buzdar, A.U. and Hortobagyi, G.N. (2002). Breast cancer in men. *Annals of Internal Medicine*, 137(8), pp. 678-687.
103. Golden, E. B., Pellicciotta, I., Demaria, S., Barcellos-Hoff, M. H. and Formenti, S. C. (2012). The convergence of radiation and immunogenic cell death signaling pathways. *Frontiers in oncology*, 2, p.88.
104. Gómez-Raposo, C., Zambrana Tévar, F., Sereno Moyano, M., López Gómez, M. and Casado, E. (2010). Male breast cancer. *Cancer treatment reviews*, 36(6), pp. 451–457.
105. Goodhead, D. T. (1989). The initial physical damage produced by ionizing radiations. *International journal of radiation biology*, 56(5), pp. 623–634.
106. Goodhead, D. (1995). Physics of radiation action: microscopic features that determine biological consequences. In: Hagen, U., Harder, D., Jung, H., Streffer, C. and International association for radiation research. (eds) *Radiation research 1895-1995: proceedings of the 10th international congress of radiation research*. Würzburg:10th ICRR Society, p 43.
107. Gorbunov, N.V., Pogue-Geile, K.L., Epperly, M.W., Bigbee, W.L., Draviam, R., Day, B.W., Wald, N., Watkins, S.C. and Greenberger, J.S. (2000). Activation of the nitric oxide synthase 2 pathway in the response of bone marrow stromal cells to high doses of ionizing radiation. *Radiation Research*, 154(1), pp. 73–86.
108. Griffith, O. W. and Meister, A. (1979). Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine). *The Journal of biological chemistry*, 254(16), pp. 7558–7560.
109. Gudkov, A. V. and Komarova, E. A. (2003). The role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy. *Nature reviews. Cancer*, 3(2), pp. 117–129.

110. Guibout, C., Adjadj, E., Rubino, C., Shamsaldin, A., Grimaud, E., Hawkins, M., Mathieu, M. C., Oberlin, O., Zucker, J. M., Panis, X., Lagrange, J. L., Daly-Schweitzer, N., Chavaudra, J. and de Vathaire, F. (2005). Malignant breast tumors after radiotherapy for a first cancer during childhood. *Journal of clinical oncology*, 23(1), pp. 197–204.
111. Gunderson, L. and Tepper, J. (2007). *Clinical Radiation Oncology*. Philadelphia, PA: Elsevier Churchill Livingstone.
112. Gupta, S., King, W.D., Korzeniowski, M., Wallace, D.L. and Mackillop, W.J. (2016). The effect of waiting times for postoperative radiotherapy on outcomes for women receiving partial mastectomy for breast cancer: a systematic review and meta-Analysis. *Clinical Oncology (Royal College of Radiologists)*, 28(12), pp. 739-749.
113. Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y. and Longaker, M. T. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature*, 453(7193), pp. 314–321.
114. Halicka, H.D., Huang, X., Traganos, F., King, M.A., Dai, W. and Darzynkiewicz, Z. (2005). Histone H2AX phosphorylation after cell irradiation with UV-B: relationship to cell cycle phase and induction of apoptosis. *Cell Cycle*, 4(2), pp. 339-345.
115. Hall, E. J. (2007). Cancer caused by x-rays--a random event?. *The Lancet Oncology*, 8(5), pp. 369–370.
116. Hall, E. and Cox, J. (2003). Physical and biological basis of radiation therapy. In: Cox, J. and Ang, K. (eds) *Radiation oncology*. St. Louis: Mosby, pp. 3–62.
117. Hall, E.J. and Giaccia AJ. (2006). *Radiobiology for the Radiologist*, 6th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 16-180.
118. Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society transactions*, 35(Pt 5), pp. 1147–1150.
119. Halliwell, B. (2002). Effect of diet on cancer development: is oxidative DNA damage a biomarker?. *Free radical biology and medicine*, 32(10), pp. 968–974.
120. Halliwell, B. (1999). Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. *Mutation research*, 443(1-2), pp. 37–52.
121. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th edition. Oxford: Oxford University Press.
122. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1999). Free Radicals in Biology and Medicine. In: Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (Eds) *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd Edition. Oxford: Oxford University Press, pp.1-25.
123. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. (1992). Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS letters*, 307(1), pp. 108–112.

- 124.** Hamada, N. and Fujimichi, Y. (2014). Classification of radiation effects for dose limitation purposes: history, current situation and future prospects. *Journal of Radiation Research*, 55(4), pp. 629–640.
- 125.** Han, R., Wu, D., Deng, S., Liu, T., Zhang, T. and Xu, Y. (2017). NLRP3 inflammasome induces pyroptosis in lung tissues of radiation-induced lung injury in mice. *Chinese journal of cellular and molecular immunology*, 33(9), pp.1206–1211.
- 126.** Hartmann, L. C., Sellers, T. A., Frost, M. H., Lingle, W. L., Degenim, A. C., Ghosh, K., Vierkant, R. A., Maloney, S. D., Pankratz, V. S., Hillman, D. W., Suman, V. J., Johnson, J., Blake, C., Tlsty, T., Vachon, C. M., Melton, L. J., 3rd, and Visscher, D. W. (2005). Benign breast disease and the risk of breast cancer. *The New England journal of medicine*, 353(3), pp. 229–237.
- 127.** Henderson, T. O., Amsterdam, A., Bhatia, S., Hudson, M. M., Meadows, A. T., Neglia, J. P., Diller, L. R., Constine, L. S., Smith, R. A., Mahoney, M. C., Morris, E. A., Montgomery, L. L., Landier, W., Smith, S. M., Robison, L. L. and Oeffinger, K. C. (2010). Systematic review: surveillance for breast cancer in women treated with chest radiation for childhood, adolescent, or young adult cancer. *Annals of internal medicine*, 152(7), 444–W154.
- 128.** Henríquez-Hernández, L.A., Carmona-Vigo, R., Pinar, B., Bordón, E., Lloret, M., Núñez, M.I., Rodríguez-Gallego, C. and Lara, P.C. (2011). Combined low initial DNA damage and high radiation-induced apoptosis confers clinical resistance to longterm toxicity in breast cancer patients treated with high-dose radiotherapy. *Radiation Oncology*, 6, p.60.
- 129.** Herberg, M., Siebert, S., Quaas, M., Thalheim, T., Rother, K., Hussong, M., Altmüller, J., Kerner, C., Galle, J., Schweiger, M. R. and Aust, G. (2019). Loss of Msh2 and a single-radiation hit induce common, genome-wide, and persistent epigenetic changes in the intestine. *Clinical epigenetics*, 11(1), p.65.
- 130.** Hiraku, Y. (2010). Formation of 8-nitroguanine, a nitrative DNA lesion, in inflammation-related carcinogenesis and its significance. *Environmental health and preventive medicine*, 15(2), pp. 63–72.
- 131.** Houée-Levin, C. and Bobrowski, K. (2013). The use of the methods of radiolysis to explore the mechanisms of free radical modifications in proteins. *Journal of Proteomics*, 92, pp. 51-62.
- 132.** Hoki, Y., Murata, M., Hiraku, Y., Ma, N., Matsumine, A., Uchida, A. and Kawanishi, S. (2007). 8-Nitroguanine as a potential biomarker for progression of malignant fibrous histiocytoma, a model of inflammation-related cancer. *Oncology reports*, 18(5), pp. 1165–1169.

133. Holley, A. K., Miao, L., St Clair, D. K. and St Clair, W. H. (2014). Redox-modulated phenomena and radiation therapy: the central role of superoxide dismutases. *Antioxidants & redox signaling*, 20(10), pp. 1567–1589.
134. Hornhardt, S., Rößler, U., Sauter, W., Rosenberger, A., Illig, T., Bickeböller, H., Wichmann, H. and Gomolka, M. (2014). Genetic factors in individual radiation sensitivity. *DNA Repair*, 16, pp. 54-65.
135. Hotchkiss, R. S., Strasser, A., McDunn, J. E. and Swanson, P. E. (2009). Cell death. *The New England journal of medicine*, 361(16), pp. 1570–1583.
136. Hsieh, C.C., Trichopoulos, D., Katsouyanni, K. and Yuasa, S. (1990). Age at menarche, age at menopause, height and obesity as risk factors for breast cancer: associations and interactions in an international case-control study. *International Journal of Cancer*, 46(5), pp.796-800.
137. Huang, L., Kim, P. M., Nickoloff, J. A. and Morgan, W. F. (2007). Targeted and nontargeted effects of low-dose ionizing radiation on delayed genomic instability in human cells. *Cancer research*, 67(3), pp.1099–1104.
138. Hung, M.C. and Lau, Y.K. (1999). Basic science of HER-2/neu: a review. *Seminars in Oncology*, 26(4 Suppl 12), pp. 51-59.
139. Huang, L., Snyder, A. R. and Morgan, W. F. (2003). Radiation-induced genomic instability and its implications for radiation carcinogenesis. *Oncogene*, 22(37), pp. 5848–5854.
140. Hymes, S. R., Strom, E. A. and Fife, C. (2006). Radiation dermatitis: clinical presentation, pathophysiology, and treatment 2006. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 54(1), pp. 28–46.
141. Inic, Z., Zegarac, M., Inic, M., Markovic, I., Kozomara, Z., Djuricic, I., Inic, I., Pupic, G. and Jancic, S. (2014). Difference between Luminal A and Luminal B subtypes according to Ki-67, tumor Size, and progesterone receptor negativity providing prognostic information. *Clinical Medicine Insights. Oncology*, 8, pp.107–111.
142. Ito, H., Daido, S., Kanzawa, T., Kondo, S. and Kondo, Y. (2005). Radiation-induced autophagy is associated with LC3 and its inhibition sensitizes malignant glioma cells. *International journal of oncology*, 26(5), pp.1401–1410.
143. Jackson, S. P. and Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461(7267), pp. 1071–1078.
144. Jacobson, L. K., Johnson, M.B., Dedhia, R.D., Niknam-Bienia S. and Wong A. K. (2017). Impaired wound healing after radiation therapy: A systematic review of pathogenesis and treatment. *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery*, 13, pp. 92-105.

145. Jaffray, D. A., Siewerdsen, J. H., Wong, J. W. and Martinez, A. A. (2002). Flat-panel cone-beam computed tomography for image-guided radiation therapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 53(5), pp.1337–1349.
146. Janko, M., Ontiveros, F., Fitzgerald, T. J., Deng, A., DeCicco, M. and Rock, K. L. (2012). IL-1 generated subsequent to radiation-induced tissue injury contributes to the pathogenesis of radiodermatitis. *Radiation research*, 178(3), pp. 166–172.
147. Jaschke, W., Schmuth, M., Trianni, A. and Bartal, G. (2017). Radiation-induced skin injuries to patients: What the interventional radiologist needs to know. *Cardiovascular and Interventional Radiology*, 40(8), pp. 1131-1140.
148. Jay-Gerin, J.P. and Ferradini, C. (2000). Are there protective enzymatic pathways to regulate high local nitric oxide (\bullet NO) concentrations in cells under stress conditions?. *Biochimie*, 82(2), pp. 161–166.
149. Jonathan, E. C., Bernhard, E. J. and McKenna, W. G. (1999). How does radiation kill cells?. *Current opinion in chemical biology*, 3(1), pp. 77–83.
150. Joubert, A. and Foray, N. (2007). Intrinsic radiosensitivity and DNA double-strand breaks in human cells. *Cancer radiotherapie*, 11(3), pp. 129–142.
151. Kasapovic, J., Pejic, S., Todorovic, A., Stojiljkovic, V., Radosevic-Jelic, L. and Pajovic, S.B. (2009). Antioxidant status in breast cancer patients of different ages after radiotherapy. *Archives of Biological Sciences*, 61(1), pp. 23-28.
152. Kasai, H. (1997). Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutation research*, 387(3), pp.147–163.
153. Kawamura, M., Yoshimura, M., Asada, H., Nakamura, M., Matsuo, Y. and Mizowaki, T. (2019). A scoring system predicting acute radiation dermatitis in patients with head and neck cancer treated with intensity-modulated radiotherapy. *Radiation Oncology*, 14(1), p.14.
154. Kawanishi, S. and Hiraku, Y. (2006). Oxidative and nitrative DNA damage as biomarker for carcinogenesis with special reference to inflammation. *Antioxidants & redox signaling*, 8(5-6), pp. 1047–1058.
155. Kawanishi, S., Hiraku, Y., Pinlaor, S. and Ma, N. (2006). Oxidative and nitrative DNA damage in animals and patients with inflammatory diseases in relation to inflammation-related carcinogenesis. *Biological chemistry*, 387(4), pp. 365–372.
156. Kawanishi, S., Ohnishi, S., Ma, N., Hiraku, Y., Oikawa, S. and Murata, M. (2017). Nitrative and oxidative DNA damage in infection-related carcinogenesis in relation to cancer stem cells. *Genes and environment*, 38, p. 26.
157. Kelsey, J.L., Gammon, M.D. and John, E.M. (1993). Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiologic Reviews*, 15(1), pp. 36-47.

158. Kensler, T. W., Wakabayashi, N. and Biswal, S. (2007). Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 47, pp. 89–116.
159. Khanna, A. (2015). DNA damage in cancer therapeutics: a boon or a curse?. *Cancer research*, 75(11), pp. 2133–2138.
160. King, M.C., Marks, J.H., Mandell, J.B., New York Breast Cancer Study Group. (2003). Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science*, 302(5645), pp.643-646.
161. Klebanoff, S. J. (1980). Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Annals of internal medicine*, 93(3), pp.480–489.
162. Klungland, A., Rosewell, I., Hollenbach, S., Larsen, E., Daly, G., Epe, B., Seeberg, E., Lindahl, T. and Barnes, D. E. (1999). Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(23), pp. 13300–13305.
163. Kondo, Y., Kanzawa, T., Sawaya, R. and Kondo, S. (2005). The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nature reviews. Cancer*, 5(9), pp.726–734.
164. Kondziolka, D. (2019). Current and novel practice of stereotactic radiosurgery. *Journal of Neurosurgery*, 130(6), pp.1789-1798.
165. Kron, T. and Chua, B. (2014). Radiotherapy for breast cancer: How can it benefit from advancing technology?. *EMG Oncology*, 2(1), pp. 83-90.
166. Kryston, T. B., Georgiev, A. B., Pissis, P. and Georgakilas, A. G. (2011). Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutation research*, 711(1-2), pp. 193–201.
167. Kuefner, M. A., Brand, M., Engert, C., Schwab, S. A. and Uder, M. (2015). Radiation induced DNA double-strand breaks in radiology. *RoFo*, 187(10), pp. 872–878.
168. Kuo, H.W., Chou, S.Y., Hu, T.W., Wu, F.Y. and Chen, D.J. (2007). Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) and genetic polymorphisms in breast cancer patients. *Mutation Research*, 631(1), pp.62-68.
169. Kuwahara, Y., Oikawa, T., Ochiai, Y., Roudkenar, M. H., Fukumoto, M., Shimura, T., Ohtake, Y., Ohkubo, Y., Mori, S., Uchiyama, Y. and Fukumoto, M. (2011). Enhancement of autophagy is a potential modality for tumors refractory to radiotherapy. *Cell death and disease*, 2(6), e177.
170. La Verne, J.A. (2004). Radiation chemical effects of heavy ions. In: Mozumder, A. and Hatano, Y. (eds) *Charged Particle and Photon Interactions with Matter Chemical, Physicochemical, and Biological Consequences with Applications*. New York: Marcel Dekker, pp. 403-429.

171. Laborda, A., De Assis, A.M., Ioakeim, I., Sánchez-Ballestín, M., Carnevale, F.C. and De Gregorio, M.A. (2015). Radiodermatitis after prostatic artery embolization: case report and review of the literature. *Cardiovascular and Interventional Radiology*, 38(3), pp. 755-759.
172. Lahmann PH, Hoffmann K, Allen N, van Gils CH, Khaw KT, Tehard B, Berrino F, Tjønneland A, Bigaard J, Olsen A, Overvad K, Clavel-Chapelon F, Nagel G, Boeing H, Trichopoulos D, Economou G, Bellos G, Palli D, Tumino R, Panico S, Sacerdote C, Krogh V, Peeters PH, Bueno-de-Mesquita HB, Lund E, Ardanaz E, Amiano P, Pera G, Quirós JR, Martínez C, Tormo MJ, Wirfält E, Berglund G, Hallmans G, Key TJ, Reeves G, Bingham S, Norat T, Biessy C, Kaaks R, Riboli E. (2004). Body size and breast cancer risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer And Nutrition (EPIC). *International Journal of Cancer*, 111(5), pp.762-771.
173. Lala, P. K. and Chakraborty, C. (2001). Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. *The Lancet. Oncology*, 2(3), pp. 149–156.
174. Langlands, F.E., Horgan, K., Dodwell, D.D. and Smith, L. (2013). Breast cancer subtypes: response to radiotherapy and potential radiosensitisation. *British Journal of Radiology*, 86(1023), 20120601.
175. Laramore, G. E. (2009). Role of particle radiotherapy in the management of head and neck cancer. *Current opinion in oncology*, 21(3), pp. 224–231.
176. Larsson, A. (1981). 5-oxoprolinuria and other inborn errors related to the γ -glutamyl cycle. In: Belton, N.R. and Toothill, C. (eds) *Transport and Inherited Disease*. Cambridge, MA: MIT Press, pp. 277–294.
177. Lee, J., Koo, N. and Min, D.B. (2004). Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3(1), pp. 21–33.
178. Lee, K., Park, J. S., Kim, Y. J., Soo Lee, Y. S., Sook Hwang, T. S., Kim, D. J., Park, E. M. and Park, Y. M. (2002). Differential expression of Prx I and II in mouse testis and their up-regulation by radiation. *Biochemical and biophysical research communications*, 296(2), 337–342.
179. Lester, S. C., Bose, S., Chen, Y. Y., Connolly, J. L., de Baca, M. E., Fitzgibbons, P. L., Hayes, D. F., Kleer, C., O'Malley, F. P., Page, D. L., Smith, B. L., Tan, L. K., Weaver, D. L., Winer, E. and Members of the Cancer Committee, College of American Pathologists. (2009). Protocol for the examination of specimens from patients with invasive carcinoma of the breast. *Archives of pathology and laboratory medicine*, 133(10), pp. 1515–1538.

- 180.** Li, M. J., Zhang, J. B., Li, W. L., Chu, Q. C. and Ye, J. N. (2011). Capillary electrophoretic determination of DNA damage markers: content of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and 8-nitroguanine in urine. *Journal of chromatography B*, 879(32), pp. 3818–3822.
- 181.** Lin, J. and Alcocer, M. (2017). *Food Allergens: Methods and Protocols*. NY: Humana Press, 1592, pp. 79-94.
- 182.** Liochev, S. I. and Fridovich, I. (2002). The Haber-Weiss cycle -- 70 years later: an alternative view. *Redox report: communications in free radical research*, 7(1), pp. 55–60.
- 183.** Lo, S. S., Fakiris, A. J., Chang, E. L., Mayr, N. A., Wang, J. Z., Papiez, L., Teh, B. S., McGarry, R. C., Cardenes, H. R. and Timmerman, R. D. (2010). Stereotactic body radiation therapy: a novel treatment modality. *Nature reviews. Clinical oncology*, 7(1), pp. 44–54.
- 184.** Lo, S. S., Moffatt-Bruce, S. D., Dawson, L. A., Schwarz, R. E., Teh, B. S., Mayr, N. A., Lu, J. J., Grecula, J. C., Olencki, T. E. and Timmerman, R. D. (2011). The role of local therapy in the management of lung and liver oligometastases. *Nature reviews. Clinical oncology*, 8(7), pp. 405–416.
- 185.** Loeb, L.A. and Preston, B.D. (1986). Mutagenesis by apurinic/aprimidinic sites. *Annual Review of Genetics*, 20, pp. 201-230.
- 186.** Loft, S., Vistisen, K., Ewertz, M., Tjønneland, A., Overvad, K. and Poulsen, H. E. (1992). Oxidative DNA damage estimated by 8-hydroxydeoxyguanosine excretion in humans: influence of smoking, gender and body mass index. *Carcinogenesis*, 13(12), pp. 2241–2247.
- 187.** Logan, G. J., Dabbs, D. J., Lucas, P. C., Jankowitz, R. C., Brown, D. D., Clark, B. Z., Oesterreich, S. and McAuliffe, P. F. (2015). Molecular drivers of lobular carcinoma in situ. *Breast cancer research*, 17, p.76.
- 188.** Lomax, M. E., Folkes, L. K. and O'Neill, P. (2013). Biological consequences of radiation-induced DNA damage: relevance to radiotherapy. *Clinical oncology (Royal College of Radiologists)*, 25(10), pp. 578–585.
- 189.** Louie, K. G., Behrens, B. C., Kinsella, T. J., Hamilton, T. C., Grotzinger, K. R., McKoy, W. M., Winker, M. A. and Ozols, R. F. (1985). Radiation survival parameters of antineoplastic drug-sensitive and -resistant human ovarian cancer cell lines and their modification by buthionine sulfoximine. *Cancer research*, 45(5), pp. 2110–2115.
- 190.** Lu, S.C. (2009). Regulation of glutathione synthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, 30 (1-2), pp. 42–59.
- 191.** Lu, S.C. (1999). Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *The FASEB Journal*, 13 (10), pp. 1169–1183.

- 192.** Luo, J. L., Hammarqvist, F., Andersson, K. and Wernerman, J. (1998). Surgical trauma decreases glutathione synthetic capacity in human skeletal muscle tissue. *American Journal of Physiology*, 275 (2), pp. E359–E365.
- 193.** Lynch, H.T. and Lynch, J.F. (1986). Breast cancer genetics in an oncology clinic: 328 consecutive patients. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 22(4), pp. 369-371.
- 194.** Ma, C. M. and Maughan, R. L. (2006). Within the next decade conventional cyclotrons for proton radiotherapy will become obsolete and replaced by far less expensive machines using compact laser systems for the acceleration of the protons. *Medical physics*, 33(3), pp. 571–573.
- 195.** Ma, N., Murata, M., Ohnishi, S., Thanan, R., Hiraku, Y. and Kawanishi, S. (2012). 8-Nitroguanine, a potential biomarker to evaluate the risk of inflammation-related carcinogenesis. In: Kahn, T. K.(ed) *Biomarker*. Rijeka: InTech, pp. 201–224.
- 196.** McCart Reed, A.E., Kutasovic, J.R., Lakhani, S.R. and Simpson, P.T. (2015). Invasive lobular carcinoma of the breast: morphology, biomarkers and 'omics. *Breast Cancer Research*, 17(1), p.12.
- 197.** McDonald, J. T., Kim, K., Norris, A. J., Vlashi, E., Phillips, T. M., Lagadec, C., Della Donna, L., Ratikan, J., Szelag, H., Hlatky, L. and McBride, W. H. (2010). Ionizing radiation activates the Nrf2 antioxidant response. *Cancer research*, 70(21), pp. 8886–8895.
- 198.** Malathi, M., Vijay, M. and Shivashankara, A.R. (2011). The Role of oxidative stress and the effect of radiotherapy on the plasma oxidant-antioxidant status in head and neck. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 5(2), pp.249-251.
- 199.** Margolin, S., Johansson, H., Rutqvist, L. E., Lindblom, A. and Fornander, T. (2006). Family history, and impact on clinical presentation and prognosis, in a population-based breast cancer cohort from the Stockholm County. *Familial cancer*, 5(4), pp. 309–321.
- 200.** Mariager, B., SØlve, M., Eriksen, H. and Brogren, C.H. (1994). Bovine β -lactoglobulin in hypoallergenic and ordinary infant formulas measured by an indirect competitive ELISA using monoclonal and polyclonal antibodies. *Food and Agricultural Immunology*, 6(1), pp.73–83.
- 201.** Maroschik, B., Gürtler, A., Krämer, A., Rößler, U., Gomolka, M., Hornhardt, S., Mörtl, S. and Friedl, A. A. (2014). Radiation-induced alterations of histone post-translational modification levels in lymphoblastoid cell lines. *Radiation oncology*, 9(1), p.15.
- 202.** Martin, M. T., Vulin, A. and Hendry, J. H. (2016). Human epidermal stem cells: Role in adverse skin reactions and carcinogenesis from radiation. *Mutation research*, 770(Pt B), pp. 349–368.

- 203.** Martin, M., Lefaix, J. and Delanian, S. (2000). TGF-beta1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target?. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 47(2), pp. 277–290.
- 204.** Masuda, Y. and Kamiya, K. (2012). Molecular nature of radiation injury and DNA repair disorders associated with radiosensitivity. *International Journal of Hematology*, 95(3), pp. 239-245.
- 205.** Matsuda, S., Furuya, K., Ikura, M., Matsuda, T. and Ikura, T. (2015). Absolute quantification of acetylation and phosphorylation of the histone variant H2AX upon ionizing radiation reveals distinct cellular responses in two cancer cell lines. *Radiation and Environmental Biophysics*, 54(4), pp. 403-411.
- 206.** Mayer, C., Popanda, O., Greve, B., Fritz, E., Illig, T., Eckardt-Schupp, F., Gomolka, M., Benner, A. and Schmezer, P. (2011). A radiation-induced gene expression signature as a tool to predict acute radiotherapy-induced adverse side effects. *Cancer Letters*, 302(1), pp. 20-28.
- 207.** Mazurek, A., Berardini, M. and Fishel, R. (2002). Activation of human MutS homologs by 8-oxo-guanine DNA damage. *The Journal of biological chemistry*, 277(10), pp. 8260–8266.
- 208.** Meesungnoen, J. and Jay-Gerin, J.P. (2011). Radiation chemistry of liquid water with heavy ions: Monte Carlo simulation studies. In: Hatano, Y., Katsumura, Y. and Mozumder, A. (eds) *Charged Particle and Photon Interactions with Matter. Recent Advances, Applications, and Interfaces*. Boca Raton: Taylor and Francis, pp. 355-400.
- 209.** Mehta, S. R., Suhag, V., Semwal, M. and Sharma, N. (2010). Radiotherapy: Basic Concepts and Recent Advances. *Medical journal, Armed Forces India*, 66(2), pp. 158–162.
- 210.** Mei, S., Yao, Q., Wu, C. and Xu, G. (2005). Determination of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by two approaches-capillary electrophoresis and GC/MS: an assay for in vivo oxidative DNA damage in cancer patients. *Journal of Chromatography B. Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 827(1), pp. 83-87.
- 211.** Meister, A. (1988). On the discovery of glutathione. *Trends in Biochemical Sciences*, 13 (5), pp. 185–188.
- 212.** Meister, A. (1983). Selective modification of glutathione metabolism. *Science*, 220 (4596), pp. 472–477.
- 213.** Mendelsohn, F. A., Divino, C. M., Reis, E. D. and Kerstein, M. D. (2002). Wound care after radiation therapy. *Advances in skin & wound care*, 15(5), 216–224.
- 214.** Méry, B., Vallard, A., Trone, J., Pacaut, C., Guy, J., Espenel, S., Langrand-Escure, J., Ollier, E., Wang, G., Diao, P., Bigot, L., Mengue Ndong, S., Bosacki, C., Ben Mrad, M. and Magné, N. (2015). Correlation between anthropometric parameters and acute

- skin toxicity in breast cancer radiotherapy patients: a pilot assessment study. *The British Journal of Radiology*, 88(1055), 20150414.
215. Mesía, R., Vilajosana, E., Lozano, A., Esteller, L. and Silvia, V. (2009). Management of cutaneous toxicity and radiation dermatitis in patients with squamous cancer of the head and neck undergoing concurrent treatment with cetuximab and radiotherapy. *Journal of Cancer Science and Therapy*, 1(1), pp. 028- 033.
 216. Meyer, Y., Buchanan, B. B., Vignols, F. and Reichheld, J. P. (2009). Thioredoxins and glutaredoxins: unifying elements in redox biology. *Annual review of genetics*, 43, pp. 335–367.
 217. Middlesex Health. 2020. *Lobular Carcinoma In Situ (LCIS)*. [online] Available at: <<https://middlesexhealth.org/learning-center/diseases-and-conditions/lobular-carcinoma-in-situ-lcis>> [Accessed 11 February 2020].
 218. Mikkelsen, R.B. and Wardman, P. (2003). Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene*, 22(37), pp. 5734-5754.
 219. Milazzo, G., Giorgino, F., Damante, G., Sung, C., Stampfer, M.R., Vigneri, R., Goldfine, I.D. and Belfiore, A. (1992). Insulin receptor expression and function in human breast cancer cell lines. *Cancer Research*, 52(14), pp.3924-3930.
 220. Minafra, L. and Bravatà, V. (2014). Cell and molecular response to IORT treatment. *Translational Cancer Research*, 3(1), pp. 32-47.
 221. Mitchell, J. B. and Russo, A. (1987). The role of glutathione in radiation and drug induced cytotoxicity. *The British journal of cancer. Supplement*, 8, 96–104.
 222. Moding, E. J., Kastan, M. B. and Kirsch, D. G. (2013). Strategies for optimizing the response of cancer and normal tissues to radiation. *Nature reviews. Drug discovery*, 12(7), pp. 526–542.
 223. Mladenov, E., Magin, S., Soni, A. and Iliakis, G. (2013). DNA double-strand break repair as determinant of cellular radiosensitivity to killing and target in radiation therapy. *Frontiers in oncology*, 3, p.113.
 224. Modig, H. G., Edgren, M. and Révész, L. (1972). Release of thiols from cellular mixed disulphides and its possible role in radiation protection. *International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine*, 22(3), pp. 257–268.
 225. Moody, A. M., Mayles, W. P., Bliss, J. M., A'Hern, R. P., Owen, J. R., Regan, J., Broad, B. and Yarnold, J. R. (1994). The influence of breast size on late radiation effects and association with radiotherapy dose inhomogeneity. *Radiotherapy and oncology*, 33(2), pp.106–112.

226. Morgan-Fletcher, S. (2001). Prescribing, Recording and Reporting Photon Beam Therapy (Supplement to ICRU Report 50), ICRU Report 62. ICRU, pp. ix+52, 1999 (ICRU Bethesda, MD). *The British Journal of Radiology*, 74(879), pp.294-294.
227. Mukundan, H., Bahadur, A. K., Kumar, A., Sardana, S., Naik, S. L., Ray, A. and Sharma, B. K. (1999). Glutathione level and its relation to radiation therapy in patients with cancer of uterine cervix. *Indian journal of experimental biology*, 37(9), pp. 859–864.
228. Multhoff, G. and Radons, J. (2012). Radiation, inflammation, and immune responses in cancer. *Frontiers in oncology*, 2, p.58.
229. Mundt, A. J., Lujan, A. E., Rotmensch, J., Waggoner, S. E., Yamada, S. D., Fleming, G. and Roeske, J. C. (2002). Intensity-modulated whole pelvic radiotherapy in women with gynecologic malignancies. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 52(5), pp. 1330–1337.
230. Nabavi, M., Nedaie, H., Salehi, N. and Naderi, M. (2014). Stereotactic Radiosurgery/Radiotherapy: A Historical Review. *Iranian Journal of Medical Physics*, 11(1), pp. 156-167.
231. Najafi, M., Motevaseli, E., Shirazi, A., Geraily, G., Rezaeyan, A., Norouzi, F., Rezapoor, S. and Abdollahi, H. (2018). Mechanisms of inflammatory responses to radiation and normal tissues toxicity: clinical implications. *International Journal of Radiation Biology*, 94(4), pp.335–356.
232. Najafi, M., Shirazi, A., Motevaseli, E., Geraily, G., Norouzi, F., Heidari, M. and Rezapoor, S. (2017). The melatonin immunomodulatory actions in radiotherapy. *Biophysics Review*, 9(2), pp.139–148.
233. National Center for Environmental Health (NCEH) /Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) NCFIPaCN. (2005). *Cutaneous radiation injury. Fact sheet for physicians*. Available at: <<https://emergency.cdc.gov/radiation/cri.asp>> [Accessed 31. 08. 2016].
234. National radiotherapy implementation group report. (2010). Stereo-tactic body radiotherapy: Clinical review of the evidence for SBRT. UK: NRIg, pp.1-106.
235. Nanashima, A., Izumino, H., Sumida, Y., Tominaga, T., Wakata, K., Hidaka, S., Tsuchiya, T. and Nagayasu, T. (2016). Relationship between urinary 8-hydroxydeoxyguanine (8-OHdG) levels and clinicopathological findings in hepatobiliary malignancies. *Anticancer research*, 36(8), pp.3899–3903.
236. Naylor, W. and Mallett, J. (2001). Management of acute radiotherapy induced skin reactions: a literature review. *European journal of oncology nursing*, 5(4), pp. 221–233.

237. Nicolson, G.L. and Conklin, K.A. (2008). Reversing mitochondrial dysfunction, fatigue and the adverse effects of chemotherapy of metastatic disease by molecular replacement therapy. *Clinical and Experimental Metastasis*, 25(2), pp.161-169.
238. Norton, K.A., Wininger, M., Bhanot,G., Ganesan, S., Barnard, N. and Shinbrot, T. (2010). A 2D mechanistic model of breast ductal carcinoma in situ (DCIS) morphology and progression. *Journal of Theoretical Biology*, 263(4), pp. 393-406.
239. Nounou, M.I., ElAmrawy, F., Ahmed, N., Abdelraouf, K., Goda, S. and Syed-Sha-Qhattal, H. (2015). Breast Cancer: Conventional Diagnosis and Treatment Modalities and Recent Patents and Technologies. *Breast Cancer: basic and clinical research*, 9(Suppl 2), pp.17-34.
240. Ohta, S., Matsuda, S., Gunji, M. and Kamogawa, A. (2007). The role of nitric oxide in radiation damage. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30(6), pp. 1102–1107.
241. Ohtake, S., Kawahara, T., Ishiguro, Y., Takeshima, T., Kuroda, S., Izumi, K., Miyamoto, H. and Uemura, H. (2018). Oxidative stress marker 8-hydroxyguanosine is more highly expressed in prostate cancer than in benign prostatic hyperplasia. *Molecular and clinical oncology*, 9(3), pp. 302–304.
242. O'Neill, P. and Wardman, P. (2009). Radiation chemistry comes before radiation biology. *International journal of radiation biology*, 85(1), pp. 9–25.
243. Oppenheimer, L., Wellner, V.P., Griffith, O.W. and Meister, A. (1979). Glutathione synthetase. Purification from rat kidney and mapping of the substrate binding sites. *The Journal of Biological Chemistry*, 254(12), pp. 5184–5190.
244. Panday, A., Sahoo, M. K., Osorio, D. and Batra, S. (2015). NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. *Cellular and Molecular Immunology*, 12(1), pp. 5–23.
245. Panganiban, R. A., Mungunsukh, O. and Day, R. M. (2013). X-irradiation induces ER stress, apoptosis, and senescence in pulmonary artery endothelial cells. *International journal of radiation biology*, 89(8), pp. 656–667.
246. Parekh, A., Dholakia, A. D., Zabransky, D. J., Asrari, F., Camp, M., Habibi, M., Zellars, R. and Wright, J. L. (2017). Predictors of radiation-induced acute skin toxicity in breast cancer at a single institution: Role of fractionation and treatment volume. *Advances in radiation oncology*, 3(1), pp. 8–15.
247. Patel, R. R. and Arthur, D. W. (2006). The emergence of advanced brachytherapy techniques for common malignancies. *Hematology/oncology clinics of North America*, 20(1), pp. 97–118.
248. Patwardhan RS, Checker R, Sharma D, Sandur SK, Sainis, KB. (2013). Involvement of ERK-Nrf-2 signaling in ionizing radiation induced cell death in normal and tumor cells. *PLoS One*, 8(6), e65929.

249. Pei, H., Chen, W., Hu, W., Zhu, M., Liu, T., Wang, J. and Zhou, G. (2014). GANRA-5 protects both cultured cells and mice from various radiation types by functioning as a free radical scavenger. *Free radical research*, 48(6), pp. 670–678.
250. Peng, Y., Zhang, M., Zheng, L., Liang, Q., Li, H., Chen, J. T., Guo, H., Yoshina, S., Chen, Y. Z., Zhao, X., Wu, X., Liu, B., Mitani, S., Yu, J. S. and Xue, D. (2017). Cysteine protease cathepsin B mediates radiation-induced bystander effects. *Nature*, 547(7664), pp. 458–462.
251. Perez, C.A., Brady, L.W., Halperin, H.G. and Schmidt-Ullrich, R.K. (2004). *Principles and practice of radiation oncology*, 4th Edition. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.
252. Perrone, S., Tataranno, M. L., Negro, S., Longini, M., Marzocchi, B., Proietti, F., Iacoponi, F., Capitani, S. and Buonocore, G. (2010). Early identification of the risk for free radical-related diseases in preterm newborns. *Early human development*, 86(4), pp. 241–244.
253. Peter, R.U. (2015). Diagnosis and treatment of cutaneous radiation injuries. In: Panizzon, R.G. and Seegenschmiedt, M.H. (eds) *Radiation Treatment and Radiation Reactions in Dermatology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp.185–188.
254. Phipps, A.I. and Li, C.I. (2010). Breast cancer biology and clinical characteristics. In: Li, C.I. (eds) *Breast Cancer Epidemiology*. New York: Springer, pp. 21–46.
255. Platzman, R. (1958). The physical and chemical basis of mechanisms in radiation biology. In: Claus, W. (ed) *Radiation Biology and Medicine. Selected Reviews in the Life Sciences*. Reading, MA: Addison-Wesley, pp. 15-72.
256. Pohlars, D., Brenmoehl, J., Löffler, I., Müller, C. K., Leipner, C., Schultze-Mosgau, S., Stallmach, A., Kinne, R. W. and Wolf, G. (2009). TGF-beta and fibrosis in different organs - molecular pathway imprints. *Biochimica et biophysica acta*, 1792(8), pp. 746–756.
257. Poulsen, H. E., Prieme, H. and Loft, S. (1998). Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. *European journal of cancer prevention*, 7(1), pp. 9–16.
258. Pour Khavari, A., Liu, Y., He, E., Skog, S. and Haghdoost, S. (2018). Serum 8-Oxo-dG as a predictor of sensitivity and outcome of radiotherapy and chemotherapy of upper gastrointestinal tumours. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018, 4153574.
259. Prabhakar, R., Ganesh, T., Rath, G. K., Julka, P. K., Sridhar, P. S., Joshi, R. C. and Thulkar, S. (2009). Impact of different CT slice thickness on clinical target volume for 3D conformal radiation therapy. *Medical dosimetry*, 34(1), pp. 36–41.

- 260.** Prasanna, A., Ahmed, M. M., Mohiuddin, M. and Coleman, C. N. (2014). Exploiting sensitization windows of opportunity in hyper and hypo-fractionated radiation therapy. *Journal of thoracic disease*, 6(4), pp. 287–302.
- 261.** Preston, D. L., Ron, E., Tokuoka, S., Funamoto, S., Nishi, N., Soda, M., Mabuchi, K. and Kodama, K. (2007). Solid cancer incidence in atomic bomb survivors: 1958-1998. *Radiation research*, 168(1), pp. 1–64.
- 262.** Prise, K.M., Davies, S., Stratford, M.R.L., Michael, B.D. (1992). The role of non-protein sulphhydryl in determining the chemical repair rates of free radical precursors of DNA damage and cell killing in Chinese hamster V79 cells. *International Journal of Radiation Biology*, 62, pp. 297–306.
- 263.** Pryor, W. A. and Squadrito, G. L. (1995). The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *The American journal of physiology*, 268(5 Pt 1), L699–L722.
- 264.** Pugin, J. (2012). How tissue injury alarms the immune system and causes a systemic inflammatory response syndrome. *Annals of intensive care*, 2(1), p.27.
- 265.** Pukkala, E., Kesminiene, A., Poliakov, S., Ryzhov, A., Drozdovitch, V., Kovgan, L., Kyryönen, P., Malakhova, I. V., Gulak, L. and Cardis, E. (2006). Breast cancer in Belarus and Ukraine after the Chernobyl accident. *International journal of cancer*, 119(3), pp.651–658.
- 266.** Qing, X., Shi, D., Lv, X., Wang, B., Chen, S. and Shao, Z. (2019). Prognostic significance of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in solid tumors: a meta-analysis. *BMC Cancer*, 19(1), p. 997.
- 267.** Radi, R., Cosgrove, T. P., Beckman, J. S. and Freeman, B. A. (1993). Peroxynitrite-induced luminol chemiluminescence. *The Biochemical journal*, 290 (Pt1)(Pt1), pp. 51–57.
- 268.** Reisz, J.A., Bansal, N., Qian, J., Zhao, W. and Furdui, C.M. (2014). Effects of ionizing radiation on biological molecules-mechanisms of damage and emerging methods of detection. *Antioxidants and Redox Signaling*, 21(2), pp. 260-292.
- 269.** Révész, L., Bergstrand, H. and Modig, H. (1963). Intrinsic non-protein sulphhydryl levels and cellular radiosensitivity. *Nature*, 198, pp.1275–1277.
- 270.** Ritte, R., Lukanova, A., Berrino, F., Dossus, L., Tjønneland, A., Olsen, A., Overvad, T.F., Overvad, K., Clavel-Chapelon, F., Fournier, A., Fagherazzi, G., Rohrmann, S., Teucher, B., Boeing, H., Aleksandrova, K., Trichopoulou, A., Lagiou, P., Trichopoulos, D., Palli, D., Sieri, S., Panico, S., Tumino, R., Vineis, P., Quirós, J.R., Buckland, G., Sánchez, M.J., Amiano, P., Chirlaque, M.D., Ardanaz, E., Sund, M., Lenner, P., Bueno-de-Mesquita, B., van Gils, C.H., Peeters, P.H., Krum-Hansen, S., Gram, I.T., Lund, E., Khaw, K.T., Wareham, N., Allen, N.E., Key, T.J., Romieu, I.,

- Rinaldi, S., Siddiq, A., Cox, D., Riboli, E. and Kaaks, R. (2012). Adiposity, hormone replacement therapy use and breast cancer risk by age and hormone receptor status: a large prospective cohort study. *Breast Cancer Research*, 14(3), R76.
271. Roninson, I. B. (2003). Tumor cell senescence in cancer treatment. *Cancer research*, 63(11), pp. 2705–2715.
272. Rosner, B., Colditz, G.A. and Willett, W.C. (1994). Reproductive risk factors in a prospective study of breast cancer: the Nurses' Health Study. *American Journal of Epidemiology*, 139(8), pp. 819-835.
273. Rube, C.E., Grudzenski, S., Kühne, M., Dong, X., Rief, N., Löbrich, M. and Rube, C. (2008). DNA double-strand break repair of blood lymphocytes and normal tissues analysed in a preclinical mouse model: implications for radiosensitivity testing. *Clinical Cancer Research*, 14(20), pp. 6546-6555.
274. Rudolph, R., Vande Berg, J., Schneider, J. A., Fisher, J. C. and Poolman, W. L. (1988). Slowed growth of cultured fibroblasts from human radiation wounds. *Plastic and reconstructive surgery*, 82(4), pp. 669–677.
275. Rudolph, R., Arganese, T. and Woodward, M. (1982). The ultrastructure and etiology of chronic radiotherapy damage in human skin. *Annals of plastic surgery*, 9(4), 282–292.
276. Rupnow, B. A. and Knox, S. J. (1999). The role of radiation-induced apoptosis as a determinant of tumor responses to radiation therapy. *Apoptosis*, 4(2), pp.115–143.
277. Sáez, G. T., Valls, V., Muñoz, P., Perez-Broseta, C., Iradi, A., Oliva, M. R., Bannister, J. V. and Bannister, W. H. (1993). The role of glutathione in protection against DNA damage induced by rifamycin SV and copper(II) ions. *Free radical research communications*, 19(2), pp. 81–92.
278. Sahin, E., Colla, S., Liesa, M., Moslehi, J., Müller, F.L., Guo, M., Cooper, M., Kotton, D., Fabian, A.J., Walkey, C., Maser, R.S., Tonon, G., Foerster, F., Xiong, R., Wang, Y.A., Shukla, S.A., Jaskelioff, M., Martin, E.S., Heffernan, T.P., Protopopov, A., Ivanova, E., Mahoney, J.E., Kost-Alimova, M., Perry, S.R., Bronson, R., Liao, R., Mulligan, R., Shirihai, O.S., Chin, L. and DePinho RA. (2011).Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. *Nature*, 470(7334), pp. 359-365.
279. Sale, J. E., Lehmann, A. R. and Woodgate, R. (2012). Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13(3), pp. 141–152.
280. Salman, K.A. and Ashraf, S. (2013). Reactive oxygen species: A link between chronic inflammation and cancer. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 21(2), pp. 42-49.

- 281.** Sato, N., Mizumoto, K., Nakamura, M., Ueno, H., Minamishima, Y. A., Farber, J. L. and Tanaka, M. (2000). A possible role for centrosome overduplication in radiation-induced cell death. *Oncogene*, 19(46), pp. 5281–5290.
- 282.** Schmitt, C. A. (2007). Cellular senescence and cancer treatment. *Biochimica et biophysica acta*, 1775(1), pp. 5–20.
- 283.** Schmitt, C. A. (2003). Senescence, apoptosis and therapy--cutting the lifelines of cancer. *Nature reviews. Cancer*, 3(4), pp. 286–295.
- 284.** Schmitt, C. A., Fridman, J. S., Yang, M., Lee, S., Baranov, E., Hoffman, R. M. and Lowe, S. W. (2002). A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell*, 109(3), pp. 335–346.
- 285.** Schmuth, M., Sztankay, A., Weinlich, G., Linder, D. M., Wimmer, M. A., Fritsch, P. O. and Fritsch, E. (2001a). Permeability barrier function of skin exposed to ionizing radiation. *Archives of Dermatology*, 137(8), pp. 1019-1023.
- 286.** Schmuth, M., Yosipovitch, G., Williams, M. L., Weber, F., Hintner, H., Ortiz-Urda, S., Rappersberger, K., Crumrine, D., Feingold, K. R. and Elias, P. M. (2001). Pathogenesis of the permeability barrier abnormality in epidermolytic hyperkeratosis. (2001b). Pathogenesis of the permeability barrier abnormality in epidermolytic hyperkeratosis. *Journal of Investigative Dermatology*, 117(4), pp. 837–847.
- 287.** Schulz-Ertner, D. and Tsujii, H. (2007). Particle radiation therapy using proton and heavier ion beams. *Journal of clinical oncology*, 25(8), pp.953–964.
- 288.** Seal, S., Thompson, D., Renwick, A., Elliott, A., Kelly, P., Barfoot, R., Chagtai, T., Jayatilake, H., Ahmed, M., Spanova, K., North, B., McGuffog, L., Evans, D. G., Eccles, D., Breast Cancer Susceptibility Collaboration (UK), Easton, D. F., Stratton, M. R. and Rahman, N. (2006). Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles. *Nature Genetics*, 38(11), pp.1239-1241.
- 289.** Seibert, J. A. (2004). X-ray imaging physics for nuclear medicine technologists. Part 1: Basic principles of x-ray production. *Journal of nuclear medicine technology*, 32(3), pp. 139–147.
- 290.** Senkus, E., Kyriakides, S., Penault-Llorca, F., Poortmans, P., Thompson, A., Zackrisson, S., Cardoso, F. and ESMO Guidelines Working Group. (2013). Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*, 24 (Suppl 6), vi7–vi23.
- 291.** Shah, R., Rosso, K. and Nathanson, S.D. (2014). Pathogenesis, prevention, diagnosis and treatment of breast cancer. *World Journal of Clinical Oncology*, 5(3), pp. 283-298.

- 292.** Sharif, S., Moran, A., Huson, S. M., Iddenden, R., Shenton, A., Howard, E. and Evans, D. G. (2007). Women with neurofibromatosis 1 are at a moderately increased risk of developing breast cancer and should be considered for early screening. *Journal of Medical Genetics*. 2007;44(8), pp. 481-484.
- 293.** Shibutani, S., Takeshita, M. and Grollman, A. P. (1991). Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature*, 349(6308), pp. 431–434.
- 294.** Shin, D., Lee, G., Sohn, S. H., Park, S., Jung, K. H., Lee, J. M., Yang, J., Cho, J. and Bae, H. (2016). Regulatory T Cells contribute to the inhibition of radiation-induced acute lung inflammation via bee venom phospholipase A₂ in mice. *Toxins*, 8(5), p.131.
- 295.** Shuryak, I. and Brenner, D.J. (2012). Mechanistic analysis of the contributions of DNA and protein damage to radiation-induced cell death. *Radiation Research*, 178(1), pp. 17-24.
- 296.** Siegel, R., Naishadham, D. and Jemal, A. (2013). Cancer statistics, 2013. *CA Cancer Journal for Clinicians*, 63(1), pp.11-30.
- 297.** Sieri, S., Krogh, V., Bolelli, G., Abagnato, C. A., Grioni, S., Pala, V., Evangelista, A., Allemani, C., Micheli, A., Tagliabue, G., Schunemann, H. J., Menard, S., Berrino, F. and Muti, P. (2009). Sex hormone levels, breast cancer risk, and cancer receptor status in postmenopausal women: the ORDET cohort. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 18(1), pp. 169-176.
- 298.** Sletten, G.B., Lovberg, K.E., Moen, L.H., Skarpeid, H.J. and Egaas, E. (2005). A comparison of time-resolved fluoroimmunoassay and ELISA in the detection of casein in foodstuffs. *Food and Agricultural Immunology*, 16(3), pp. 235–243.
- 299.** Smith, T. A., Kirkpatrick, D. R., Smith, S., Smith, T. K., Pearson, T., Kailasam, A., Herrmann, K. Z., Schubert, J., and Agrawal, D. K. (2017). Radioprotective agents to prevent cellular damage due to ionizing radiation. *Journal of translational medicine*, 15(1), p. 232.
- 300.** Smirnov, D.A., Brady, L., Halasa, K., Morley, M., Solomon, S. and Cheung, V.G. (2012). Genetic variation in radiation-induced cell death. *Genome Research*, 22(2), pp. 332-339.
- 301.** Sodum, R.S. and Fiala, E.S. (2001). Analysis of peroxynitrite reactions with guanine, xanthine, and adenine nucleosides by high-pressure liquid chromatography with electrochemical detection: C8-nitration and -oxidation. *Chemical Research in Toxicology*, 14(4), pp. 438–450.
- 302.** Spinks, J.W.T. and Wodds, R.J. (1990). *An introduction to radiation chemistry*. 3rd edition. New York: Wiley.

- 303.** Sterzing, F., Engenhardt-Cabillic, R., Flentje, M. and Debus, J. (2011). Image-guided radiotherapy: a new dimension in radiation oncology. *Deutsches Arzteblatt international*, 108(16), pp. 274–280.
- 304.** Sterzing, F., Herfarth, K. and Debus, J. (2007). IGRT with helical tomotherapy--effort and benefit in clinical routine. *Strahlentherapie and Onkologie*, 183 Spec No 2, pp. 35-37.
- 305.** Straub, J. M., New, J., Hamilton, C. D., Lominska, C., Shnayder, Y. and Thomas, S. M. (2015). Radiation-induced fibrosis: mechanisms and implications for therapy. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 141(11), pp. 1985–1994.
- 306.** Suzuki, N., Yasui, M., Geacintov, N.E., Shafirovich, V. and Shibutani, S. (2005). Miscoding events during DNA synthesis past the nitration-damaged base 8-nitroguanine. *Biochemistry*, 44 (25), pp. 9238–9245.
- 307.** Swanson, E. L., Indelicato, D. J., Louis, D., Flampouri, S., Li, Z., Morris, C. G., Paryani, N. and Slopsema, R. (2012). Comparison of three-dimensional (3D) conformal proton radiotherapy (RT), 3D conformal photon RT, and intensity-modulated RT for retroperitoneal and intra-abdominal sarcomas. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 83(5), pp. 1549–1557.
- 308.** Tamir, S. and Tannenbaum, S. R. (1996). The role of nitric oxide (NO) in the carcinogenic process. *Biochimica et biophysica acta*, 1288(2), F31–F36.
- 309.** Tan, D.X., Manchester, L.C., Terron, M.P., Flores, L.J. and Reiter, R.J. (2007). One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species?. *Journal of Pineal Research*, 42(1), pp. 28-42.
- 310.** Thompson, D., Duedal, S., Kirner, J., McGuffog, L., Last, J., Reiman, A., Byrd, P., Taylor, M. and Easton, D.F. (2005). Cancer risks and mortality in heterozygous ATM mutation carriers. *Journal of National Cancer Institute*, 97(11), pp. 813-822.
- 311.** Tibbs M. K. (1997). Wound healing following radiation therapy: a review. *Radiotherapy and oncology: journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 42(2), pp. 99–106.
- 312.** Tipton, K., Launders, J. H., Inamdar, R., Miyamoto, C. and Schoelles, K. (2011). Stereotactic body radiation therapy: scope of the literature. *Annals of internal medicine*, 154(11), pp. 737–745.
- 313.** Toft, D.J. and Cryns, V.L. (2011) Minireview: Basal-like breast cancer: from molecular profiles to targeted therapies. *Molecular Endocrinology*, 25(2), pp. 199-211.
- 314.** Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J. and Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for Clinicians*, 65(2), pp. 87-108.
- 315.** Traber, M.G. and Atkinson, J. (2007). Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(1), pp. 4-15.

- 316.** Turella, P., Cerella, C., Filomeni, G., Bullo, A., DeMaria, F., Ghibelli, L., Ciriolo, M.R., Cianfriglia, M., Mattei, M., Frederici, G., Ricci, G. and Caccuri, A.M. (2005). Proapoptotic activity of new glutathione S-Transferase inhibitors. *Cancer Research*, 65(9), pp. 3751–3761.
- 317.** Turesson, I., Nyman, J., Holmberg, E. and Odén, A. (1996). Prognostic factors for acute and late skin reactions in radiotherapy patients. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 36(5), pp.1065-1075.
- 318.** Vakifahmetoglu, H., Olsson, M. and Zhivotovsky, B. (2008). Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell death and differentiation*, 15(7), pp.1153–1162.
- 319.** Valentin, J. (2000). Avoidance of radiation injuries from medical interventional procedures. *Annals of the ICRP*, 30(2), pp. 7-67.
- 320.** Valerie, K., Yacoub, A., Hagan, M. P., Curiel, D. T., Fisher, P. B., Grant, S. and Dent, P. (2007). Radiation-induced cell signaling: inside-out and outside-in. *Molecular cancer therapeutics*, 6(3), pp. 789–801.
- 321.** Varnes, E.M., Biaglow, J.E., Koch, E.J. and Hall, E.J. (1980). Depletion of nonprotein thiols of hypoxic cells by misonidazole and metronidazole. In: Brady, L.W. (eds) *Radiation Sensitizers*. New York: Masson, pp. 121–134.
- 322.** Vaz, A. F., Pinto-Neto, A. M., Conde, D. M., Costa-Paiva, L., Morais, S. S. and Esteves, S. B. (2007). Quality of life of women with gynecologic cancer: associated factors. *Archives of gynecology and obstetrics*, 276(6), pp. 583–589.
- 323.** Ventura, J., Lobachevsky, P. N., Palazzolo, J. S., Forrester, H., Haynes, N. M., Ivashkevich, A., Stevenson, A. W., Hall, C. J., Ntargaras, A., Kotsaris, V., Pollakis, G. C., Potsi, G., Skordylis, K., Terzoudi, G., Pateras, I. S., Gorgoulis, V. G., Georgakilas, A. G., Sprung, C. N. and Martin, O. A. (2017). Localized synchrotron irradiation of mouse skin induces persistent systemic genotoxic and immune responses. *Cancer research*, 77(22), pp. 6389–6399.
- 324.** Verheij, M. (2008). Clinical biomarkers and imaging for radiotherapy-induced cell death. *Cancer metastasis reviews*, 27(3), pp. 471–480.
- 325.** Vral, A., Willems, P., Claes, K., Poppe, B., Perletti, G. and Thierens, H. (2011). Combined effect of polymorphisms in Rad51 and Xrcc3 on breast cancer risk and chromosomal radiosensitivity. *Molecular Medicine Reports*, 4(5), pp. 901-912.
- 326.** Vorotnikova, E., Rosenthal, R. A., Tries, M., Doctrow, S. R. and Braunhut, S. J. (2010). Novel synthetic SOD/catalase mimetics can mitigate capillary endothelial cell apoptosis caused by ionizing radiation. *Radiation research*, 173(6), pp. 748–759.
- 327.** Wang, S., Liu, Z., Wang, L. and Zhang, X. (2009). NF-kappaB signaling pathway, inflammation and colorectal cancer. *Cellular and Molecular Immunology*, 6(5), pp. 327-334.

328. Wang, H., Mu, X., He, H. and Zhang, X. D. (2018). Cancer Radiosensitizers. *Trends in pharmacological sciences*, 39(1), pp.24–48.
329. Wang-Chesebro, A., Xia, P., Coleman, J., Akazawa, C. and Roach, M., 3rd (2006). Intensity-modulated radiotherapy improves lymph node coverage and dose to critical structures compared with three-dimensional conformal radiation therapy in clinically localized prostate cancer. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 66(3), 654–662.
330. Webster, G. J., Rowbottom, C. G. and Mackay, R. I. (2009). Accuracy and precision of an IGRT solution. *Medical dosimetry*, 34(2), pp. 99–106.
331. Wei, J., Meng, L., Hou, X., Qu, C., Wang, B., Xin, Y. and Jiang, X. (2018). Radiation-induced skin reactions: mechanism and treatment. *Cancer management and research*, 11, pp.167–177.
332. Wei, K. C., Yang, K. C., Mar, G. Y., Chen, L. W., Wu, C. S., Lai, C. C., Wang, W. H. and Lai, P. C. (2015). STROBE-radiation ulcer: an overlooked complication of fluoroscopic intervention: A cross-sectional study. *Medicine*, 94(48), e2178.
333. Wirsdörfer, F. and Jendrossek, V. (2017). Modeling DNA damage-induced pneumopathy in mice: insight from danger signaling cascades. *Radiation oncology*, 12(1), p.142.
334. Wiseman, H., Kaur, H. and Halliwell, B. (1995). DNA damage and cancer: Measurement and mechanism. *Cancer Letters*, 93(1), pp.113-120.
335. Wood, J. G., Rogina, B., Lavu, S., Howitz, K., Helfand, S. L., Tatar, M. and Sinclair, D. (2004). Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature*, 430(7000), pp. 686–689.
336. Woolston, C.M., Storr, S.J., Ellis, I.O., Morgan, D.A. and Martin, S.G. (2011). Expression of thioredoxin system and related peroxiredoxin proteins is associated with clinical outcome in radiotherapy treated early stage breast cancer. *Radiotherapy and Oncology: journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 100(2), pp. 308-313.
337. Wong, M.W., Nordfors, C., Mossman, D., Pecenetelovska, G., Avery-Kiejda, K.A., Talseth-Palmer, B., Bowden, N.A. and Scott, R.J. (2011). BRIP1, PALB2, and RAD51C mutation analysis reveals their relative importance as genetic susceptibility factors for breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 127(3), pp. 853-859.
338. Wright, J.L., Takita, C., Reis, I.M., Zhao, W., Lee, E., Nelson, O.L., Hu, J.J. (2016). Prospective evaluation of radiation-induced skin toxicity in a race/ethnically diverse breast cancer population. *Cancer Medicine*, 5(3), pp.454-464.

- 339.** Wu, L. L., Chiou, C. C., Chang, P. Y. and Wu, J. T. (2004). Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clinica chimica acta*, 339(1-2), pp. 1–9.
- 340.** Wu, Q. and Ni, X. (2015). ROS-mediated DNA methylation pattern alterations in carcinogenesis. *Current Drug Targets*, 16(1), pp. 13-19.
- 341.** Wu, X., Takenaka, K., Sonoda, E., Hochegger, H., Kawanishi, S., Kawamoto, T., Takeda, S. and Yamazoe, M. (2006). Critical roles for polymerase zeta in cellular tolerance to nitric oxide-induced DNA damage. *Cancer research*, 66(2), pp. 748–754.
- 342.** Wu, Y., Zhang, D. and Kang, S (2013). Physical activity and risk of breast cancer: a meta-analysis of prospective studies. *Breast cancer research and treatment*, 137(3), pp. 869-882.
- 343.** Wu, Q. J., Thongphiew, D., Wang, Z., Chankong, V. and Yin, F. F. (2008). The impact of respiratory motion and treatment technique on stereotactic body radiation therapy for liver cancer. *Medical physics*, 35(4), pp. 1440–1451.
- 344.** Www2011.mpe.mpg.de. 2020. *MPE: High-Energy Astrophysics - What Is High-Energy?*. [online] Available at: <<https://www2011.mpe.mpg.de/heg/www/he.html>> [Accessed 13 October 2020].
- 345.** Yahyapour, R., Motevaseli, E., Rezaeyan, A., Abdollahi, H., Farhood, B., Cheki, M., Rezapoor, S., Shabeeb, D., Musa, A. E., Najafi, M. and Villa, V. (2018a). Reduction-oxidation (redox) system in radiation-induced normal tissue injury: molecular mechanisms and implications in radiation therapeutics. *Clinical and translational oncology*, 20(8), pp.975–988.
- 346.** Yahyapour, R., Amini, P., Rezapoor, S., Rezaeyan, A., Farhood, B., Cheki, M., Fallah, H. and Najafi, M. (2018b). Targeting of inflammation for radiation protection and mitigation. *Current molecular pharmacology*, 11(3), pp. 203–210.
- 347.** Yamamori, T., Yasui, H., Yamazumi, M., Wada, Y., Nakamura, Y., Nakamura, H. and Inanami, O. (2012). Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(2), pp. 260-270.
- 348.** Yermilov, V., Rubio, J., Becchi, M., Friesen, M.D., Pignatelli, B. and Ohshima. H. (1995a). Formation of 8-nitroguanine by the reaction of guanine with peroxynitrite *in vitro*. *Carcinogenesis*, 16(9), pp. 2045–2050.
- 349.** Yermilov, V., Rubio, J., Becchi, M., Friesen, M. D., Pignatelli, B. and Ohshima, H. (1995a). Formation of 8-nitroguanine by the reaction of guanine with peroxynitrite *in vitro*. *Carcinogenesis*, 16(9), pp. 2045–2050.

350. Yermilov, V., Rubio, J. and Ohshima, H. (1995b). Formation of 8- nitroguanine in DNA treated with peroxydinitrite in vitro and its rapid removal from DNA by depurination. *The FEBS Letters*, 376(3), pp. 207–210.
351. Zhang, X., Kluz, T., Gesumaria, L., Matsui, M.S., Costa, M., Sun, H. (2016). Solar simulated ultraviolet radiation induces global histone hypoacetylation in human keratinocytes. *PLoS One*, 11(2), e0150175.
352. Zhao, W., Diz, D. I. and Robbins, M. E. (2007). Oxidative damage pathways in relation to normal tissue injury. *The British journal of radiology*, 80 Spec No 1, S23–S31.
353. Zhao, W. and Robbins, M. E. (2009). Inflammation and chronic oxidative stress in radiation-induced late normal tissue injury: therapeutic implications. *Current medicinal chemistry*, 16(2), pp.130–143.
354. Zhou, R., Si, J., Zhang, H., Wang, Z., Li, J., Zhou, X., Gan, L. and Liu, Y. (2014). The effects of x-ray radiation on the eye development of zebrafish. *Human and experimental toxicology*, 33(10), pp.1040–1050.