



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

## Διδακτορική διατριβή

Διερεύνηση της επίδρασης των χαμηλών δόσεων ιοντίζουσας ακτινοβολίας σε μοριακό (DNA) και κυτταρογενετικό (χρωμοσωματικό) επίπεδο κατά την έκθεση ασθενών σε αιμοδυναμικές πράξεις

ΜΑΡΘΑ ΧΑΜΠΗΜΠΗ

Ακτινοφυσικός, MSc

Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας – 2<sup>ος</sup> Κύκλος» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).

ΑΘΗΝΑ 2021

Η διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιατρικής Φυσικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών και στο Εργαστήριο Υγειοφυσικής, Ραδιοβιολογίας & Κυτταρογενετικής του Ινστιτούτου Πυρηνικών και Ραδιολογικών Επιστημών και Τεχνολογίας, Ενέργειας και Ασφάλειας του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος». Ακόμη η διατριβή συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας – 2<sup>ος</sup> Κύκλος» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).



Επιχειρησιακό Πρόγραμμα  
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,  
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



**ΕΚ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΥ ΟΡΚΟΥ  
ΚΕΙΜΕΝΟ**



« ΟΜΝΥΜΙ ΤΟΝ ΘΕΟΝ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ. ΗΓΗΣΕΣΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΣΚΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ. ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗ ΕΙΡΞΕΙΝ. ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ. ΟΥΔΕ ΥΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ. ΟΜΟΙΟΣ ΔΕ ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ. ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΙΩ. ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ. Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ, Η ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΕΙΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ, ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΕΟΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ. ΤΑΥΤΗΝ ΤΗΝ ΕΠΑΓΓΕΛΙΑΝ ΕΠΙΤΕΛΟΥΝΤΙ ΕΙΗ ΜΟΙ ΤΟΝ ΘΕΟΝ ΑΡΩΓΟΝ ΚΤΗΣΑΣΘΑΙ ΕΝ ΤΩ ΒΙΩ ».

ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ

## ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

**Ημερομηνία αιτήσεως υποψηφίου:** 27/12/2017

**Ημερομηνία Ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:** 15/03/2018

### Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

1. **Επιβλέπων: Δρ. Παπαγιάννης Παναγιώτης**, Αναπληρωτής Καθηγητής, Εργαστήριο Ιατρικής Φυσικής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
2. **Δρ.Τερζούδη Γεωργία**, Ερευνήτρια Α΄, Εργαστήριο Υγειοφυσικής, Ραδιοβιολογίας & Κυτταρογενετικής, ΙΠΡΕΤΕΑ, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»
3. **Δρ. Καραϊσκος Παντελής**, Καθηγητής, Εργαστήριο Ιατρικής Φυσικής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

**Ημερομηνία Ορισμού θέματος Διδακτορικής Διατριβής:** 26/03/2018

**Ημερομηνία Κατάθεσης Διδακτορικής Διατριβής:** 24/09/2021

**Ημερομηνία Υποστήριξης Διδακτορικής Διατριβής:** 27/10/2021

**Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής:** Καθηγητής Γ. Σιάσος

### Επταμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

1. **Δρ. Καραϊσκος Παντελής**, Καθηγητής, Εργαστήριο Ιατρικής Φυσικής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
2. **Δρ. Γεωργακίλας Αλέξανδρος**, Καθηγητής, Σχολή Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών, ΕΜΠ
- 3 **Δρ. Παπαγιάννης Παναγιώτης**, Αναπληρωτής Καθηγητής, Εργαστήριο Ιατρικής Φυσικής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
4. **Δρ. Παντελής Ευάγγελος**, Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Φυσικής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
5. **Δρ. Λυμπεροπούλου Γεωργία**, Λέκτορας, Α΄ Εργαστήριο Ακτινολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
6. **Δρ. Τερζούδη Γεωργία**, Ερευνήτρια Α΄, Εργαστήριο Υγειοφυσικής, Ραδιοβιολογίας & Κυτταρογενετικής, ΙΠΡΕΤΕΑ, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»
7. **Δρ. Παραβατού Μαρία**, Ερευνήτρια Α΄, Εργαστήριο Υγειοφυσικής, Ραδιοβιολογίας & Κυτταρογενετικής, ΙΠΡΕΤΕΑ, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

## ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ ΜΑΡΘΑ ΧΑΜΠΙΜΠΗ

- 2018-2021** Υποψήφια διδάκτωρ στην Ιατρική Σχολή Αθηνών, Εργαστήριο Ιατρικής Φυσικής
- 2018** Συμμετοχή σε 6μηναίο πρόγραμμα μέσω της Γερμανικής Ακαδημαϊκής Ανταλλαγής Φοιτητών (DAAD) Institute of Medical Radiation Biology, University of Duisburg-Essen (Καθηγητής Dr G. Iliakis)  
-Εκπαίδευση σε “Μελέτη των επιδιορθωτικών μηχανισμών του DNA ύστερα από έκθεση σε ακτινοβολία”
- 2016** Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης στην Ιατρική Φυσική-Ακτινοφυσική, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ελλάδα
- 2014** Συμμετοχή και παρακολούθηση του CELOD Course (Cellular effects of low doses and low dose rates) για 2 εβδομάδες: Επίδραση των χαμηλών δόσεων ιοντιζουσών ακτινοβολιών σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο, Κέντρο Έρευνας και Ακτινοπροστασίας, Πανεπιστήμιο Στοκχόλμης, Σουηδία.
- 2014** Αποφοίτηση από το Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών

### ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

#### **English Language Diploma,**

Proficient Communication, Edexcel UK

#### **French Language Diploma**

First Certificate in French, DELF

### ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

- 1) **Martha Habibi**, Panagiotis K. Karyofyllis, Aggeliki Nikolakopoulou, Panagiotis Papagiannis, Pantelis Karaiskos, Alexandros G Georgakilas, Vasiliki I Hatzi, Ioannis Malakos, Nikolaos Kollaros, Irene Mastorakou, Vassilis Voudris, Georgia I. Terzoudi. "The use of genotoxicity endpoints as biomarkers of low dose radiation exposure in interventional cardiology", *Frontiers in Public Health*, section Radiation and Health 2021. doi: 10.3389/fpubh.2021.701878.
- 2) Aggeliki Nikolakopoulou, Aashish Soni, **Martha Habibi**, Pantelis Karaiskos, Gabriel Pantelias, Georgia I Terzoudi, George Iliakis. "G2/M checkpoint abrogation with selective inhibitors results in increased chromatid breaks and radiosensitization of 82-6 hTERT and RPE human cells". *Frontiers in Public Health*, section Radiation and Health 2021. doi: 10.3389/fpubh.2021.675095.
- 3) Karyofyllis P, Kostopoulou A, Thomopoulou S, **Habibi M**, Livanis E, Karavolias G, Voudris V. "Conduction abnormalities after transcatheter aortic valve implantation". *J Geriatr Cardiol.* 2018 Jan;15(1):105-112. doi: 10.11909/j.issn.1671-5411.2018.01.004.
- 4) Voudris KV, **Habibi M**, Karyofyllis P, Vidovich MI. "Radiation Exposures Associated with Radial and Femoral Coronary Interventions". *Curr Treat Options Cardiovasc Med.* 2016;18(12):73 doi: 10.1007/s11936-016-0499-x.

### ΜΟΝΟΓΡΑΦΙΑ

**Habibi M**, Karyofyllis P. Radiation in coronaries angiographies according to access site.

ÉDITIONS UNIVERSITAIRES EUROPÉENNES. (ISBN 978-3-330-86636-2)

## ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΚΑΙ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. “Factors that contribute to radiation doses in patients who undergo primary or ad hoc percutaneous coronary interventions”, poster presentation, P. Karyofyllis, **M. Habibi**, V. Voudris, 35<sup>th</sup> International Congress of Cardiology, Athens, Greece 2014
2. “Interventional Cardiology and Radiation in a Hellenic Hospital Centre”, oral presentation, **M. Habibi**, P. Karyofyllis, V. Voudris, 35<sup>th</sup> International Congress of Cardiology, Athens, Greece 2014
3. “Biological effects of low dose ionizing radiation exposure in interventional cardiology”, oral presentation, **M. Habibi**, P. Karyofyllis, G. Terzoudi, V. Hatzi, A. Georgakilas, G. Pantelias, V. Voudris, 22<sup>nd</sup> Panhellenic Congress of Radiology, Athens, Greece 2015
4. “Ionizing radiation-induced DNA damage after interventional procedures”, oral presentation, **M. Habibi**, P. Karyofyllis, V. Hatzi, G. Terzoudi, A. Georgakilas, G. Pantelias, V. Voudris, 36<sup>th</sup> International Congress of Cardiology, Athens, Greece 2015
5. “Radiation in transfemoral versus transradial access in diagnostic coronary angiography”, poster presentation, P. Karyofyllis, **M. Habibi**, V. Voudris, 26<sup>th</sup> European Days of the French Society of Cardiology, Paris, France, 2016
6. “Factors affecting exposure parameters during diagnostic coronary catheterization”. **M. Habibi**, N. Kollaros, P. Karyofyllis, I. Mastorakou, V. Voudris, oral presentation, 1<sup>st</sup> European Congress of Medical Physics, Athens, Greece 2016
7. Radiation in coronary angiographies according to access site”, oral presentation, **M. Habibi**, P. Karyofyllis, N. Kollaros, I. Mastorakou, V. Voudris, 37th International Congress of Cardiology, Athens, Greece
8. “The use of  $\gamma$ -H2AX and cytogenetics endpoints as biomarkers of low dose exposure in interventional cardiology”, poster presentation, **M. Habibi**, G. Terzoudi, P. Karyofyllis, A. Nikolakopoulou, N. Kollaros, I. Mastorakou, V. Voudris, 3rd ERPW, Rovinja-Rovigno, Croatia 2018
9. “The use of cytogenetic molecular endpoints as biomarkers of low dose exposure in interventional cardiology”, poster presentation, **M. Habibi**, P. Karyofyllis, A. Nikolakopoulou, P. Papagiannis, P. Karaiskos, N. Kollaros, I. Mastorakou, V. Voudris, G. Terzoudi, 16th International Congress of Radiation Research, Manchester, U.K. 2019
10. “The use of G2/M-checkpoint abrogators and cytogenetics to study the mechanisms underlying individual radiosensitivity and tumor resistance”, poster presentation, A. Nikolakopoulou, **M. Habibi**, A. Pantelias, P. Karaiskos, G. Terzoudi, 16<sup>th</sup> International Congress of Radiation Research, Manchester, U.K 2019
11. “Investigation of DSBs repair pathways in translocation formation and the contribution of HRR at low IR doses to the repair of DSBs”, invited oral presentation, **M. Habibi**, DAAD Workshop, Essen, Germany June 2019
12. “Investigation of DSBs repair pathways in translocation formation and  $\gamma$ -H2AX foci”, invited oral presentation, **M. Habibi**, DAAD Workshop, Athens, Greece November 2019
13. “Detection of DNA damage and chromosomal aberrations after exposure to low ionizing radiation doses in interventional cardiology”, oral presentation, **M. Habibi**, P. Karyofyllis, A. Nikolakopoulou, P. Papagiannis, P. Karaiskos, N. Kollaros, I. Mastorakou, V. Voudris, G. Terzoudi, ERRS 2020, virtual conference, Lund, Sweden on 13<sup>th</sup> – 17<sup>th</sup> September 2020
14. “G2/M checkpoint abrogation with selective inhibitors results in chromosome break repair defects in RPE and 82-6 hTERT cells”, oral presentation, A. Nikolakopoulou, A. Soni, G. Pantelias, **M. Habibi**, P. Karaiskos, G. Terzoudi, G. Iliakis, ERRS 2020, virtual conference, Lund, Sweden on 13<sup>th</sup> – 17<sup>th</sup> September 2020

### **ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΕΣ ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ**

Άδεια Ασκήσεως Επαγγέλματος Φυσικού Νοσοκομείου-Ακτινοφυσικού εντός περιοχής ιοντιζουσών ακτινοβολιών

Άδεια Ασκήσεως Επαγγέλματος Φυσικού Νοσοκομείου-Ακτινοφυσικού εκτός περιοχής ιοντιζουσών ακτινοβολιών

Εφαρμογή διάφορων μεθόδων βιοδοσιμετρίας για την εκτίμηση της απορροφουμένης δόσης που προσλαμβάνουν επαγγελματικά εκτιθέμενοι και ασθενείς που υποβάλλονται σε επεμβατικές καρδιολογικές πράξεις

### **ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ**

**DAAD programme fellow**, Institute of Medical Radiation Biology, University of Duisburg-Essen, διάρκεια 6 μηνών (2018)

**Hellenic Scholarships Foundation** (2018-2021)

### **ΒΡΑΒΕΙΑ**

1. Βραβείο από την Ελληνική Καρδιολογική Εταιρεία για την έρευνα με θέμα: “Biological effects of low dose ionizing radiation exposure in interventional cardiology” (2015)
2. Βραβείο νέου ερευνητή (Young Investigator Award) από την Ευρωπαϊκή Κοινότητα Έρευνας των Ακτινοβολιών (European Radiation Research Society-ERRS) για την έρευνα με θέμα: “Detection of DNA damage and chromosomal aberrations after exposure to low ionizing radiation doses in interventional cardiology” (2020)

## Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιατρικής Φυσικής της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη του Αν. Καθηγητή Ιατρικής Φυσικής, Δρ. Π. Παπαγιάννη. Η πραγματοποίηση του πειραματικού μέρους έγινε στο Εργαστήριο Υγαιοφυσικής, Ραδιοβιολογίας & Κυτταρογενετικής του Ινστιτούτου Πυρηνικών και Ραδιολογικών Επιστημών και Τεχνολογίας, Ενέργειας και Ασφάλειας του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», με επιστημονικά Υπεύθυνη την Διευθύντρια Ερευνών Δρ. Γ. Τερζούδη σε συνεργασία με το Ωνάσειο Καρδιοχειρουργικό Κέντρο με υπεύθυνο τον Δρ. Β. Βούδρη.

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ Γεωργία Τερζούδη, Κύρια Ερευνήτρια του Ινστιτούτου Πυρηνικών και Ραδιολογικών Επιστημών και Τεχνολογίας, Ενέργειας και Ασφάλειας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε, η οποία υπήρξε πάντα δίπλα μου πολλά χρόνια με συνεχή καθοδήγηση και παρότρυνση για την εκπόνηση της διατριβής, για την διεξαγωγή των πειραμάτων, για τις γνώσεις πάνω στην ραδιοβιολογία, για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων, καθώς και για την συμβολή της στην επιτυχή διεκδίκηση υποτροφίας.

Ευχαριστώ θερμά τον Δρ. Παναγιώτη Παπαγιάννη και τον Δρ. Παντελή Καραϊσκό, καθηγητές του εργαστηρίου Ιατρικής Φυσικής στην Ιατρική Σχολή Αθηνών του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου για τις πολύτιμες γνώσεις που μου προσέφεραν, για την στήριξή τους και για την επίλυση όσων ερωτημάτων προέκυπταν κατά τη διεξαγωγή της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Επίσης, επιθυμώ να ευχαριστήσω τον Διευθυντή του Εργαστηρίου Υγαιοφυσικής, Ραδιοβιολογίας & Κυτταρογενετικής του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» Δρ. Γ. Παντελιά, για τις χρήσιμες συζητήσεις και την υποστήριξη για την υλοποίηση της παρούσας διατριβής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Δρ. Παναγιώτη Καρνοφύλλη, επιμελητή ιατρό του Ωνασείου Καρδιοχειρουργικού Κέντρου, και στον Δρ. Βασίλη Βούδρη, διευθυντή και συντονιστή του καρδιολογικού τομέα του Ωνασείου Καρδιοχειρουργικού Κέντρου,



για το επιστημονικό τους ενδιαφέρον και για την υποστήριξη τους όλα αυτά τα χρόνια.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών για την υποστήριξη της εκπόνησης της παρούσας διδακτορικής εργασίας.

Ευχαριστώ θερμά τον Δρ. Γεωργακίλα γιατί ως καθηγητής από την διατριβή μου στις προπτυχιακές και μεταπτυχιακές σπουδές μου, μου έδωσε θεμελιώδεις γνώσεις ενώ παράλληλα καλλιέργησε το ενδιαφέρον μου στο αντικείμενο αυτό. Επίσης τον ευχαριστώ για την συναίνεση του και την υποστήριξη της συμμετοχής μου στο πρόγραμμα DAAD της Γερμανίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στο προσωπικό του Εργαστηρίου Υγειοφυσικής, Ραδιοβιολογίας & Κυτταρογενετικής του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» για την τεχνική βοήθεια που μου προσέφεραν σε όλη τη διάρκεια της διατριβής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω αλλά και να αφιερώσω τη παρούσα διδακτορική διατριβή στην οικογένειά μου που με στηρίζει σε κάθε προσπάθειά μου όλα αυτά τα χρόνια.

## Περίληψη

Την τελευταία δεκαετία, ο αριθμός των ατόμων που εκτίθενται ετησίως σε ιοντίζουσα ακτινοβολία στο πλαίσιο επεμβατικών καρδιολογικών πράξεων για διαγνωστικούς και θεραπευτικούς σκοπούς, βαίνει διαρκώς αυξανόμενος. Δεδομένα υψηλής στατιστικής ισχύος καταδεικνύουν γραμμική συσχέτιση της έκθεσης σε ιοντίζουσα ακτινοβολία με την αύξηση του κινδύνου καρκινογένεσης σε δόσεις  $\geq 100\text{mSv}$ . Ο καθορισμός της αντίστοιχης συσχέτισης σε χαμηλότερες δόσεις, όπως αυτές ασθενών και προσωπικού στην επεμβατική καρδιολογία, αποτελεί αντικείμενο εντατικής έρευνας διεθνώς. Η συσχέτιση της έκθεσης σε χαμηλές δόσεις με την καρκινογένεση θα μπορούσε να υποστηριχθεί από επιδημιολογικές μελέτες, που όμως απαιτούν αυξημένη στατιστική και πολυετή παρακολούθηση. Εναλλακτικά, η συσχέτιση αυτή θα μπορούσε να υποστηριχθεί από το μηχανισμό καρκινογένεσης με βάση ραδιοβιολογικά πειραματικά δεδομένα, διερευνώντας κατά πόσο οι χαμηλές δόσεις μπορούν να ενεργοποιήσουν το μηχανισμό αυτό, καθώς επίσης και με την ανίχνευση βιολογικών επιπτώσεων μετά από χαμηλές δόσεις για την εκτίμηση του κινδύνου στην επεμβατική καρδιολογία. Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η διερεύνηση της επίδρασης των χαμηλών δόσεων ιοντίζουσας ακτινοβολίας σε μοριακό, χρωμοσωματικό και κυτταρικό επίπεδο. Ο πειραματικός σχεδιασμός επικεντρώνεται στη μελέτη επαγωγής και επιδιόρθωσης βλαβών στο DNA μέσω της φωσφορυλίωσης της ιστόνης  $\gamma\text{-H2AX}$  και τη δημιουργία χρωμοσωματικών αλλοιώσεων, μικροπυρήνων και ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων με πιθανό επακόλουθο τη «χρωμοθρύψη» και την τυχαία αναδιάταξη του γενετικού υλικού. Για το σκοπό αυτό, ελήφθησαν δείγματα περιφερικού αίματος από 30 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε προγραμματισμένες αιμοδυναμικές πράξεις στο Αιμοδυναμικό Εργαστήριο του Ωνασείου Καρδιοχειρουργικού Κέντρου. Επιπρόσθετα, δείγματα αίματος από ανεξάρτητους δότες ακτινοβολήθηκαν *in vitro* με χαμηλές δόσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας στο εργαστήριο του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος». Ο μέσος αριθμός των χρωμοσωματικών αλλοιώσεων, των  $\gamma\text{-H2AX}$  foci και των μικροπυρήνων του δείγματος ασθενών μετά την έκθεσή τους ήταν αυξημένος σε στατιστικά σημαντικό βαθμό έναντι του μέσου αριθμού πριν την αιμοδυναμική πράξη. Ωστόσο, παρατηρήθηκε πως δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στον αριθμό των χρωμοσωματικών αλλοιώσεων ανά κύτταρο σε ατομικό επίπεδο, ενώ στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητα των μικροπυρήνων

παρατηρήθηκε σε ατομικό επίπεδο στο 25% μόλις των ασθενών που μελετήθηκε. Μόνο με τον βιοδείκτη  $\gamma$ -H2AX παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε ατομικό επίπεδο για σχεδόν όλους τους ασθενείς (91%). Αυτά τα ευρήματα καταδεικνύουν το πλεονέκτημα της χρήσης των  $\gamma$ -H2AX foci έναντι των συμβατικών μεθόδων όπως της ανάλυσης δικεντρικών χρωμοσωμάτων και των μικροπυρήνων σε χαμηλές δόσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας, όταν όμως χρησιμοποιηθούν αμέσως μετά την έκθεση. Επιπλέον, 24 ώρες μετά την ιατρική έκθεση διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική μείωση των foci, ο αριθμός των οποίων παρέμεινε ωστόσο στατιστικά σημαντικά υψηλότερος έναντι αυτού πριν την αιμοδυναμική πράξη. Το ποσοστό της επιδιόρθωσης των βλαβών παρουσίασε μεγάλη διακύμανση από 25% έως 95.6%. Τα ακτινοεπαγόμενα αποτελέσματα των  $\gamma$ -H2AX foci ανά κύτταρο στην παρούσα διατριβή δείχνουν μία σημαντική υπερεκτίμηση του κινδύνου για εμφάνιση καρκίνου από τις αιμοδυναμικές πράξεις στο δείγμα των ασθενών που χρησιμοποιήθηκε συγκριτικά με την αντίστοιχη εκτίμηση σύμφωνα με το γραμμικό χωρίς κατώφλι μοντέλο (LNT). Αυτή η υπερεκτίμηση εξηγείται εν μέρει, καθώς η *in vitro* ακτινοβόληση πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο με χρήση πηγής κοβαλτίου ( $^{60}\text{Co}$ ), και ο κίνδυνος από έκθεση σε ακτίνες  $\gamma$ , το RBE, θα ήταν μεγαλύτερος σε σχέση με τον αντίστοιχο κίνδυνο από ακτίνες  $\gamma$  κατά ένα παράγοντα 2 έως 3. Τέλος, προκαταρκτικά αποτελέσματα ανίχνευσης λανθασμένων / ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων στις 72 και 96 ώρες μετά από *in vitro* ακτινοβόληση με δόση 50 mGy υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική αύξηση αυτών έναντι του υποβάθρου. Το γεγονός αυτό αποτελεί προάγγελο της παρουσίας ανευπλοειδίας η οποία αυξάνεται με τη δόση, ενώ δεν ανευρέθηκαν χρωμοσωματικές αλλοιώσεις με χαρακτηριστικά χρωμοθρύψης στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στις 96 και 120 ώρες.

## Abstract

The increase in the number of patients exposed to ionizing radiation in cardiovascular procedures, either diagnostic or therapeutic, is constantly increasing in the last decade. There is a strong linear correlation between the exposure to ionizing radiation and cancer risk for doses  $\geq 100\text{mSv}$ . The respective correlation concerning low doses, such as those very often delivered to patients and medical staff in interventional cardiology, remains ambiguous. The correlation between the exposure to low ionizing radiation doses and carcinogenesis could be underpinned by epidemiological studies, which however demand high statistic power and patients' follow-up for many years. Alternatively, this relationship could be assessed by studying the mechanism of radiation-induced carcinogenesis and its potential activation with radiobiological experiments and also by detecting and quantitating biological effects essential for risk estimation in interventional cardiology.

The aim of the present Ph.D. thesis, is the investigation of the effects of low ionizing radiation doses, at the molecular, chromosomal and cellular level, and the potential activation of carcinogenesis. The experimental design is focused on the radiation-induced DNA damage and repair through the phosphorylation of the H2AX histone to form  $\gamma\text{-H2AX}$  foci and the formation of chromosomal aberrations, micronuclei and asymmetric cell divisions which may lead to «chromothripsis» and the random rearrangement of the genetic material. For this purpose, peripheral blood samples were collected from 30 adult patients, who underwent ordinary interventional cardiology procedures in the laboratory of Onassis Cardiac Surgery Centre.

Blood samples from independent donors were also irradiated in vitro with low doses of ionizing radiation at the laboratory of Health Physics, of the National Centre for Scientific Research «Demokritos». The mean values of all patients as a group for the dicentric analysis, the  $\gamma\text{-H2AX}$  foci and the micronucleus test showed statistically significant increased yields relative to baseline following medical exposure. However, it was observed that there was no significant increase in the number of chromosomal aberrations at the individual level, whereas only a 25% of the whole group studied showed a significant increase in the micronuclei at the individual level. The results of this study demonstrated that only the  $\gamma\text{-H2AX}$  biomarker enables detection of statistically significant differences at the individual level for almost all patients (91%). These observations point up the clear advantage of the use of  $\gamma\text{-H2AX}$  foci over the

conventional dicentric and micronuclei assays for low level doses. Furthermore, 24 hours after exposure, residual  $\gamma$ -H2AX foci were still detectable in irradiated lymphocytes. Their repair kinetics was found to vary significantly among the individuals, and their decline ranged from 25% to 95.6% of the maximum values obtained immediately after the exposure.

Moreover, the Life Attributable Risk from the interventional procedure based on the  $\gamma$ -H2AX foci induction was found considerably greater than the one estimated using the Linear Non Threshold Model assumption. The remarkable difference in the magnitude of this increase is explained, in part, by the use of  $^{60}\text{Co}$  for the in vitro irradiation in this work, since the risk from exposure to x-rays could be greater than that for  $\gamma$  rays.

Finally, the in vitro experiments performed in order to detect the existence of asymmetric cell divisions for several time intervals post-irradiation pointed that there is a significant increase in asymmetric cell division even after a low dose of 50 mGy. However, the hypothesis tested for radiation-induced carcinogenesis after low dose exposure, by detecting chromothripsis-like chromosomal aberrations, could not be supported by the results obtained.

## Περιεχόμενα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	17
Το επιστημονικό πρόβλημα.....	17
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	18
Κεφάλαιο 1: Δοσιμετρία ιοντιζουσών ακτινοβολιών.....	19
1.1 Ιοντίζουσες Ακτινοβολίες .....	19
1.1.1 Φύση των Ιοντιζουσών Ακτινοβολιών .....	19
1.1.2 Παραγωγή ακτινοβολίας-X .....	19
1.2 Δοσιμετρία.....	21
1.3 Βιοδοσιμετρία.....	21
1.4.Απορροφούμενη δόση (D) .....	21
1.5 Ισοδύναμη δόση ( $H_T$ ) .....	22
1.6 Ενεργός δόση ( $E_{eff}$ ).....	22
1.7 Δόση δέρματος .....	23
1.8 Ατομικό ισοδύναμο δόσης (Personal dose equivalent) .....	24
1.9 Γινόμενο δόσης επί επιφάνεια (DAP) .....	24
Κεφάλαιο 2: Βιολογικές επιδράσεις των ιοντιζουσών ακτινοβολιών .....	25
2.1 Γενικά.....	25
2.2 Κυτταρική δομή και κυτταρικός κύκλος.....	26
2.3 Αλληλεπίδραση ακτινοβολίας – βιολογικής ύλης.....	28
2.4. Βιολογικά αποτελέσματα σε μοριακό επίπεδο .....	28
2.5 Βιολογικά αποτελέσματα σε κυτταρικό επίπεδο .....	29
2.6 Βιολογικοί παράγοντες που επηρεάζουν την επίδραση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας .....	30
2.7 Γραμμικό χωρίς κατώφλι μοντέλο (LNT model) .....	31
2.8 Επιπρόσθετος κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου (LAR).....	34
2.9 Κυτταρογενετικές προσεγγίσεις για την εκτίμηση της απορροφούμενης δόσης .....	35
2.9.1 Ανάλυση δικεντρικών χρωμοσωμάτων στη μετάφαση .....	35

2.9.2 Μέθοδος αναστολής της κυτταροκίνησης.....	38
2.9.3 Φωσφορυλιωμένη ιστονική πρωτεΐνη H2A( $\gamma$ -H2AX).....	39
2.9.4 GTG ζωνοποίηση και καρυοτυπική ανάλυση .....	40
2.9.5 Τεχνική φθορισμού με υβριδισμό FISH (Fluorescence in Situ Hybridization).....	41
2.10 Γενωμική αστάθεια και ανευπλοειδία .....	41
2.11 Χρωμοθρύψη.....	43
Κεφάλαιο 3: Εφαρμογές Ιοντίζουσας Ακτινοβολίας στο Αιμοδυναμικό Εργαστήριο.....	44
3.1 Εισαγωγή.....	44
3.1 Αιμοδυναμικό Εργαστήριο.....	46
3.2 Ψηφιακή αγγειογραφία.....	47
3.3 Ακτινοπροστασία σε ένα Αιμοδυναμικό Εργαστήριο.....	48
3.4 Εύρος δόσεων σε ένα αιμοδυναμικό εργαστήριο και όρια δόσεων .....	49
3.5 Επιδημιολογικά δεδομένα .....	51
3.6 Ραδιοβιολογικά δεδομένα.....	52
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	54
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή.....	55
1.1 Καθορισμός ερευνητικού έργου βάσει των κυτταρογενετικών τεχνικών .....	55
1.2 Ανάπτυξη της πρότασης και Μεθοδολογία .....	55
1.3 Περιγραφή της μελέτης .....	57
1.4 Κυτταρογενετική ανάλυση.....	58
1.5 Ανάλυση βλαβών DNA.....	60
1.6 Μέθοδος αναστολής της κυτταροκίνησης.....	61
1.7 Ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση με την μέθοδο αναστολής της κυτταροκίνησης και την FISH .....	61
1.8 Χρωμοθρύψη.....	63
1.9 Στατιστική μεθοδολογία.....	63
1.10 Εκτίμηση του δείκτη LAR.....	64
Κεφάλαιο 2: Αποτελέσματα .....	65

2.1 Χαρακτηριστικά ασθενών .....	65
2.2 Αποτελέσματα δικεντρικής ανάλυσης.....	66
2.3 Αποτελέσματα από την μέθοδο αναστολής της κυτταροκίνησης .....	67
2.4 Αποτελέσματα από την μέθοδο της φωσφορυλιωμένης ιστόνης γ-H2AX .....	68
2.5 Αποτελέσματα από τον υπολογισμό του επιπρόσθετου κινδύνου για καρκίνο (LAR) .	70
2.6 Αποτελέσματα από τα πειράματα CBMN i-FISH και χρωμοθρύψης.....	74
Κεφάλαιο 3: Συζήτηση αποτελεσμάτων .....	78
Βιβλιογραφία.....	87



## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### Το επιστημονικό πρόβλημα

Το ανθρώπινο σώμα υποβάλλεται καθημερινά στην επίδραση ιοντιζουσών ακτινοβολιών τόσο από το φυσικό περιβάλλον όσο και, επιπρόσθετα, από ανθρωπογενείς πηγές. Με την πρόοδο της τεχνολογίας και την ευρεία χρήση των ακτινοβολιών για ειρηνικούς σκοπούς, η πιο συχνή αιτία έκθεσης σε χαμηλές δόσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας ( $\leq 100\text{mSv}$ ) είναι η προγραμματισμένη έκθεση για ιατρικούς λόγους που αφορά ένα πολύ μεγάλο μέρος του πληθυσμού. Η σημαντική αύξηση του αριθμού των πράξεων διαγνωστικής και επεμβατικής ακτινολογίας σε πολλές χώρες, έχει οδηγήσει σε σημαντική αύξηση (40%) της συλλογικής ενεργού δόσης, γεγονός που εντείνει την ανάγκη τεκμηρίωσης της διακινδύνευσης από χαμηλές δόσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Ο κίνδυνος καρκινογένεσης μετά από έκθεση σε υψηλές δόσεις είναι διαπιστωμένος και υπάρχουν ορισμένες, κυρίως επιδημιολογικές μελέτες, που αναφέρουν ότι μπορεί να αυξηθεί και σε χαμηλές δόσεις μεταξύ 20-100 mSv (1-10).

Το πρόβλημα σχετικά με την επίδραση των χαμηλών δόσεων ιοντιζουσών ακτινοβολιών είναι πως δεν υπάρχει ασφαλής δόση σύμφωνα με το γραμμικό και χωρίς κατώφλι μοντέλο (LNT) που χρησιμοποιείται στην ακτινοπροστασία. Όλες οι δόσεις μπορούν να συμβάλλουν σε κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου ενώ ο κίνδυνος αυτός αυξάνεται γραμμικά με την αύξηση της δόσης της ακτινοβολίας (11).

Συγκεκριμένα, η συσχέτιση της έκθεσης σε χαμηλές δόσεις με την καρκινογένεση θα μπορούσε να υποστηριχθεί από επιδημιολογικές μελέτες, που όμως απαιτούν αυξημένη στατιστική και πολυετή παρακολούθηση. Ωστόσο, πέρα από τις επιδημιολογικές μελέτες, έχουν πραγματοποιηθεί ραδιοβιολογικές μελέτες ώστε να ελεγχθεί κυτταρογενετικά η επίδραση των ιοντιζουσών ακτινοβολιών στους ανθρώπους αλλά και να συσχετιστεί η επίδραση αυτή με πιθανή εμφάνιση καρκινογένεσης.

# **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

# Κεφάλαιο 1: Δοσιμετρία ιοντιζουσών ακτινοβολιών

## 1.1 Ιοντιζουσες Ακτινοβολίες

### 1.1.1 Φύση των Ιοντιζουσών Ακτινοβολιών

Ιοντιζουσες είναι οι ακτινοβολίες που μεταφέρουν ενέργεια ικανή να εισχωρήσει στην ύλη, να προκαλέσει ιονισμό των ατόμων, να διασπάσει βίαια χημικούς δεσμούς και να προκαλέσει βιολογικές βλάβες στον ανθρώπινο οργανισμό. Οι ιοντιζουσες ακτινοβολίες προέρχονται από το φυσικό περιβάλλον ή από τεχνητές πηγές (13).

Η ακτινοβολία που παρατηρείται στο περιβάλλον έχει δύο δυνατές προελεύσεις. Μια πηγή της αποτελεί η κοσμική και ηλιακή ακτινοβολία, που προέρχεται από το διάστημα και τον ήλιο και προσπίπτει στα ανώτερα στρώματα της ατμόσφαιρας της γης. Η άλλη προέλευση φυσικής πηγής των ιοντιζουσών ακτινοβολιών προέρχεται από τα πετρώματα και το έδαφος της γης (13).

Οι τεχνητές (ανθρωπογενείς) πηγές ιοντιζουσας ακτινοβολίας περιλαμβάνουν: την διαγνωστική και θεραπευτική ακτινολογία, την χρήση ραδιοϊσοτόπων στην ιατρική, τα ραδιενεργά απόβλητα, τη ραδιενεργή σκόνη στην ατμόσφαιρα απο δοκιμές πυρηνικών όπλων, πυρηνικούς αντιδραστήρες και επιταχυντές (13).

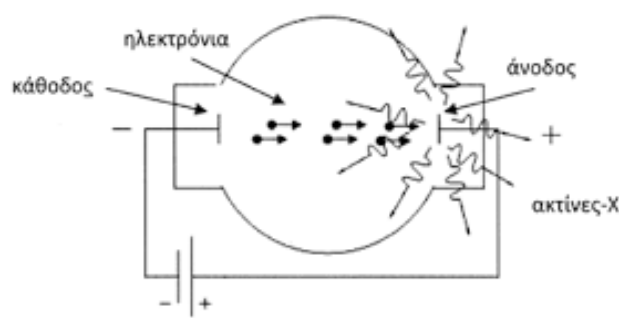
### 1.1.2 Παραγωγή ακτινοβολίας-X

Η ακτινοβολία-X παράγεται στις ηλεκτρονιακές στιβάδες των ατόμων (χαρακτηριστική ακτινοβολία ατόμου) ή σε στόχους επιβράδυνσης ταχέως κινουμένων φορτισμένων σωματιδίων (ακτινοβολία πέδης ή πέδησης) σε ειδικές διατάξεις (λυχνίες ακτίνων-X, επιταχυντές σωματιδίων). Η ενέργεια των φωτονίων είναι από λίγα keV έως πολλά MeV (15).

Αναδρομικά οι πρώτες λυχνίες που κατασκευάστηκαν (λυχνίες Crookes), ενώ μετέπειτα κατασκευάστηκαν οι πιο σύγχρονες λυχνίες παραγωγής ακτίνων-X (λυχνίες Coolidge). Πρόκειται για ένα γυάλινο σωλήνα (σχήμα 1.1) που στο εσωτερικό του επικρατούν συνθήκες κενού. Ο σωλήνας περιέχει δύο ηλεκτρόδια, την άνοδο (αντικάθοδο) και την κάθοδο. Η κάθοδος, η οποία είναι νήμα βολφραμίου, θερμαίνεται ώστε να παρέχει ηλεκτρόνια, τα οποία επιταχύνονται με υψηλή τάση και προσπίπτουν στην άνοδο. Η κάθοδος έχει κατάλληλη κατασκευή ώστε τα ηλεκτρόνια που εξέρχονται από αυτή να εστιάζονται σε συγκεκριμένο σημείο της ανόδου. Η

άνοδος είναι κατασκευασμένη από δύστηκτο μέταλλο, συνήθως βολφράμιο. Η τάση ανόδου-καθόδου είναι υψηλή ώστε τα ηλεκτρόνια που εξέρχονται από την κάθοδο να προσπίπτουν στην άνοδο με μεγάλη κινητική ενέργεια. Η ένταση του ρεύματος των ηλεκτρονίων που προσπίπτουν στην άνοδο εξαρτάται από τον αριθμό των ηλεκτρονίων που εξέρχονται από την κάθοδο, δηλαδή από τη θέρμανση του νήματος της καθόδου, η οποία καθορίζεται από το ρεύμα που διαρρέει το νήμα της καθόδου. Η ακτινοβολία X παράγεται κατά την πρόσπτωση των ηλεκτρονίων με την άνοδο (14, 14).

Το μεγαλύτερο ποσοστό της ενέργειας των ηλεκτρονίων που προσπίπτουν στην άνοδο μετατρέπεται σε θερμότητα και μικρό μέρος εμφανίζεται σε μορφή ακτίνων X. Για παράδειγμα στις ακτινοδιαγνωστικές λυχνίες τα ποσοστά αυτά είναι 99% και 1% αντίστοιχα. Στους αξονικούς τομογράφους, επειδή η λυχνία υφίσταται μεγάλο θερμικό φόρτο, χρησιμοποιείται περιστρεφόμενη άνοδο από κράμα βολφραμίου-ρηνίου για ευκολότερη απαγωγή της προκύπτουσας θερμότητας. Στους αγγειογράφους, η αναγκαιότητα της ακτινοκαταγραφής οδήγησε στην ανάπτυξη και χρήση ειδικών μεταλλικών κεραμικών λυχνίων οι οποίες φέρουν μεγάλη άνοδο. Μεταξύ ανόδου και καθόδου υπάρχει ένα πλέγμα το οποίο βοηθά στη δημιουργία παλμών ακτίνων-X καθώς επίσης και ένας περιστρεφόμενος απομονωτήρας έτσι ώστε να βελτιστοποιηθεί η αποδοτικότητα του μηχανήματος (14, 14). Η λυχνία ακτίνων-X μπορεί να λειτουργεί κατά συνεχή ή παλμικό τρόπο, συνεπώς η ακτινοσκόπηση είναι συνεχής ή παλμική.



**Σχήμα 1.1:** Σχεδιάγραμμα λυχνίας για παραγωγή ακτίνων X.

(Πηγή: Ιατρική Φυσική. Διαγνωστικές και Θεραπευτικές Εφαρμογές των Ακτινοβολιών. Ευάγγελος Γεωργίου, Εκδόσεις Πασχαλίδη, ISBN:978-960-489-274-7).

## 1.2 Δοσιμετρία

Η δοσιμετρία ιοντιζουσών ακτινοβολιών είναι η επιστήμη που μελετά και ασχολείται με τον ποσοτικό προσδιορισμό της ενέργειας που εναποτίθεται σε ένα υλικό μέσο. Τα φυσικά δοσιμετρικά μεγέθη αποσκοπούν στην διασύνθεση του είδους και της ενέργειας της προσπίπτουσας ακτινοβολίας με την πιθανότητα δημιουργίας βλάβης στον ιστό και κατ' επέκταση στο άτομο. Τα μεγέθη αυτά εκφράζουν την επικινδυνότητα της ακτινοβολίας για την ανθρώπινη υγεία και χρησιμεύουν στην λήψη μέτρων ακτινοπροστασίας (12, 16).

## 1.3 Βιοδοσιμετρία

Όταν η ιοντίζουσα ακτινοβολία αλληλεπιδράσει με βιολογικό υλικό τότε μπορεί να προκληθούν βιολογικές μεταβολές οι οποίες χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση των δόσεων που έχουν απορροφηθεί. Βιοδοσιμετρία ιοντιζουσών ακτινοβολιών είναι η μεθοδολογία εκτίμησης της απορροφούμενης δόσης με βάση την απόκριση ενός βιολογικού δοσιμέτρου. Ως βιολογικά δοσίμετρα χρησιμοποιούνται διάφορες ουσίες ή κυτταρικά συστήματα των οποίων η απόκριση μετά από έκθεση σε ακτινοβολία σχετίζεται ποσοτικά με την απορροφούμενη δόση. Η μέτρηση της δόσης ακτινοβολίας με βιολογικές μεθόδους αποτελεί μοναδική προσέγγιση σε περιπτώσεις όπου έχουμε απουσία φυσικού δοσιμέτρου προσωπικού, μερικής έκθεσης ανθρώπινου σώματος όπου το φυσικό δοσίμετρο είναι εκτός πεδίου, και συσχέτισης δόσεων με επιπτώσεις στην υγεία για την κατανόηση του μηχανισμού καρκινογένεσης από ακτινοβολίες (17).

## 1.4 Απορροφούμενη δόση (D)

Ορίζεται ως το πηλίκο της μέσης τιμής της στοιχειώδους ενέργειας  $d_e$  που προσλαμβάνει στοιχειώδης μάζα  $dm$  ενός όγκου, προς τη μάζα αυτή. Η προσλαμβανόμενη ενέργεια στην ύλη που περιλαμβάνεται σε δοθέντα όγκο, ισούται με την ενέργεια όλων των φορτισμένων και μη σωματιδίων που εισέρχονται στον όγκο, μείον την ενέργεια όλων των φορτισμένων και μη σωματιδίων που εξέρχονται από τον όγκο αυτό (εξαιρώντας την ενέργεια ηρεμίας). Δηλαδή,  $D = d_e/dm$  με μονάδα μέτρησης το Gray (Gy), όπου  $1\text{Gy} = 1\text{ J/kg}$ . Επειδή σαν μονάδα μέτρησης το Gy είναι μεγάλο στις διαγνωστικές εφαρμογές χρησιμοποιούνται υποπολλαπλάσιά του:  $1\text{cGy} = 0.01\text{Gy}$  ή  $1\text{mGy} = 0.001\text{Gy}$  (18, 19).

### 1.5 Ισοδύναμη δόση ( $H_T$ )

Είναι το δοσιμετρικό μέγεθος που σχετίζεται με τη βλάβη που μπορεί να προκαλέσει σε έναν ιστό η απορροφούμενη δόση  $D$  ενός συγκεκριμένου είδους ακτινοβολίας ( $R$ ). Συγκεκριμένα, η βιολογική επιβάρυνση της ακτινοβολίας σε κάποιο ιστό ποσοτικοποιείται με τη βοήθεια της δόσης  $D$  που λαμβάνει ένας ιστός  $T$  πολλαπλασιασμένης με ένα παράγοντα βαρύτητας ή συντελεστή στάθμισης ακτινοβολίας  $w_R$  που χαρακτηρίζει την ακτινοβολία. Σύμφωνα με την Διεθνή Επιτροπή Ραδιολογικής Προστασίας (ICRP) ο παράγοντας βαρύτητας της ακτινοβολίας  $w_R$ , εξαρτάται από το είδος της ακτινοβολίας. Μονάδα μέτρησης της ισοδύναμης δόσης είναι το Sievert (Sv) το οποίο έχει διαστάσεις Gy. Η ισοδύναμη δόση χρησιμοποιείται ως μέγεθος για τη δοσιμετρία των οργάνων του ανθρώπινου σώματος, για εξωτερικές και εσωτερικές εκθέσεις στην ακτινοθεραπεία, στην ακτινοδιάγνωση και στην πυρηνική ιατρική (**Error! Reference source not found.**,19, 20).

$$H_T = w_R \cdot D \quad (1.1)$$

**Πίνακας 1.1:** Παράγοντας βαρύτητας (στάθμισης) για τις ακτινοβολίες.

Είδος ακτινοβολίας	$w_R$
Φωτόνια (X και $\gamma$ )	1
Ηλεκτρόνια	1
Πρωτόνια	2-5
Σωματία $\alpha$ , θραύσματα σχάσης, βαρέα ιόντα	20
Νετρόνια	5-20

### 1.6 Ενεργός δόση ( $E_{eff}$ )

Είναι το δοσιμετρικό μέγεθος που σχετίζεται με την συνολική βλάβη που μπορεί να προκαλέσει η ισοδύναμη δόση που προκύπτει από την ακτινοβολία συγκεκριμένου ιστού. Ο συνολικός κίνδυνος από την απορρόφηση ακτινοβολίας εξαρτάται όχι μόνο από το είδος και την ενέργεια της ακτινοβολίας, αλλά και από το είδος του ιστού (ή των ιστών) που εκτέθηκαν. Συγκεκριμένα, οι διάφοροι ανθρώπινοι ιστοί παρουσιάζουν διαφορετική ευαισθησία στην ακτινοβολία, συνεπώς ο κάθε ιστός συμβάλλει με διαφορετική βαρύτητα στον συνολικό κίνδυνο που διατρέχει από την

ακτινοβόλησή του η υγεία του ανθρώπου. Η ενεργός δόση ( $E_{\text{eff}}$ ) περιγράφει την επιβάρυνση αυτή της υγείας από την ακτινοβολία και ορίζεται ως:

$$E_{\text{eff}} = \sum_T w_T \sum_R w_R D \quad (1.2)$$

Όπου  $w_T$  ο παράγοντας βαρύτητας που χαρακτηρίζει τον ιστό. Σύμφωνα με την Διεθνή Επιτροπή Ραδιολογικής Προστασίας (ICRP) το άθροισμα των παραγόντων βαρύτητας οργάνων και ιστών  $w_T$  ισούται με 1. Ουσιαστικά πρόκειται για τιμή που βασίζεται στη φυσική δόση που κατανέμεται σε κάθε ένα από τους ανθρώπινους ιστούς και τροποποιείται από την ευαισθησία του κάθε ιστού ως προς την εμφάνιση καρκίνου. Με την αναφορά στην ενεργό δόση είναι εφικτή η αποτίμηση του συνολικού κινδύνου που διατρέχει η υγεία του ανθρώπου από την ακτινοβόληση με σκοπό την λήψη κατάλληλων μέτρων ακτινοπροστασίας. Η ενεργός δόση μετριέται σε Sv (19, 19, 20).

**Πίνακας 1.2:** Παράγοντας βαρύτητας (στάθμισης) για διάφορους ιστούς.

Ιστός	$w_T$
Μυελός των οστών, Κόλον, Πνεύμονες, Στομάχι, Μαστός, Εναπομένοντες ιστοί*.	0.12
<i>*Εναπομένοντες ιστοί: επινεφρίδια, εξωθωρακική περιοχή, χοληδόχος, καρδιά, νεφροί, λεμφικοί αδένες, μύες, επιθήλιο στόματος, πάγκρεας, προστάτης (♂), λεπτό έντερο, σπλήνας, θύμος αδένας, μήτρα / τράχηλος</i>	
Γονάδες	0.08
Ουροδόχος κύστη, οισοφάγος, ήπαρ θυρεοειδής	0.04
Επιφάνεια οστών, εγκέφαλος, σιελογόνοι αδένες, δέρμα	0.01

## 1.7 Δόση δέρματος

Η δόση που απορροφάται από το δέρμα σε βάθος 0.07mm ονομάζεται δόση δέρματος. Δείχνει την επιβάρυνση του δέρματος κατά την ακτινοβόληση αλλά χρησιμοποιείται και για υπολογισμούς συνολικής δόσης του εκτιθέμενου. Σε ακτινοσκοπικές κυρίως εξετάσεις, η διάρκεια της ακτινοβόλησης του ασθενούς είναι ιδιαίτερα μεγάλη με αποτέλεσμα την πιθανή δημιουργία ερυθήματος. Συνεπώς είναι επιτακτική ανάγκη η συνεχής παρακολούθηση της δόσης δέρματος κατά την διάρκεια των ακτινοσκοπικών πράξεων (18, 19).

## 1.8 Ατομικό ισοδύναμο δόσης (Personal dose equivalent)

Το ατομικό ισοδύναμο δόσης,  $H_p(d)$ , ορίζεται ως η ισοδύναμη δόση σε μαλακούς ιστούς στο κατάλληλο βάθος  $d$  (10mm, 0.07mm, 3mm) κάτω από ένα συγκεκριμένο σημείο του σώματος. Οι δύο συνηθέστερες ποσότητες που χρησιμοποιούνται σύμφωνα με την Διεθνή Επιτροπή Ακτινοπροστασίας είναι το ατομικό ισοδύναμο δόσης  $H_p(0,07)$  το οποίο χρησιμεύει για υπολογισμό δόσης στο δέρμα, στα χέρια και στα πόδια, καθώς και το ατομικό ισοδύναμο δόσης  $H_p(10)$  που χρησιμεύει στον υπολογισμό της ενεργού δόσης. Ακόμη υπάρχει και το ατομικό ισοδύναμο δόσης  $H_p(3)$  το οποίο χρησιμεύει στον υπολογισμό δόσης για τους φακούς των ματιών. Η τιμή της  $H_p(d)$  μετράται σε Sv. Για αρκετά διεισδυτική ακτινοβολία συνίσταται το βάθος των 10 mm. Το ατομικό ισοδύναμο δόσης εκτιμάται για όλους τους επαγγελματικά εκτιθέμενους που ενδέχεται να λαμβάνουν δόσεις υψηλότερες από 6 mSv ανά έτος. Ειδικότερα, ένα ατομικό δοσίμετρο σώματος φοριέται στο ύψος του στήθους, εκτός ακτινοπροστατευτικής ποδιάς. Σκοπός είναι η επιβεβαίωση της τήρησης των ορίων δόσης και η προαγωγή της βελτιστοποίησης της ακτινοπροστασίας, ενώ αποτελεί και ένα μέσο πληροφόρησης σε περίπτωση ατυχήματος (16, 18, 19).

## 1.9 Γινόμενο δόσης επί επιφάνεια (DAP)

Το γινόμενο δόσης (D) επί επιφάνεια (A) ορίζεται ως DAP (Dose Area Product) :

$$DAP = D \cdot A \quad (1.3)$$

Και μετριέται σε  $Gy \cdot cm^2$  ή σε  $\mu Gy \cdot m^2$

Η μέτρηση του μεγέθους αυτού είναι ανεξάρτητη της απόστασης από την πηγή της ακτινοβολίας (εξαιτίας του ορισμού του). Οι συσκευές που μετρούν το DAP τοποθετούνται στην κεφαλή του ακτινοσκοπικού μηχανήματος και οι ενδείξεις τους χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της δόσης δέρματος (18, 19).



## Κεφάλαιο 2: Βιολογικές επιδράσεις των ιοντιζουσών ακτινοβολιών

### 2.1 Γενικά

Το ανθρώπινο σώμα σε διάφορες περιπτώσεις δέχεται την επίδραση ιοντιζουσών ακτινοβολιών. Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί από εξωτερικές πηγές, όπως η κοσμική ακτινοβολία, τις ακτινογραφίες, την ακτινοβολία από τα πετρώματα, ή εσωτερική πηγή όπως από ραδιενεργή μόλυνση, από ραδιενεργές ουσίες και πηγές. Ο μηχανισμός που οδηγεί σε οποιοδήποτε είδος βιολογικού αποτελέσματος ξεκινά με την απορρόφηση ενέργειας κατά την αλληλεπίδραση της ιοντιζουσας ακτινοβολίας με τα άτομα της ύλης όπως έχει ήδη αναφερθεί. Από ποσοτικής απόψεως, η ενέργεια που απορροφάται και εκδηλώνεται τελικά με τη μορφή θερμότητας είναι σχετικά μικρή, και ακίνδυνη βιολογικά. Από ποιοτικής απόψεως, το ποσοστό της ενέργειας που θα απορροφηθεί μέσω ιοντισμών μπορεί να προκαλέσει χημικές μεταβολές. Τα άτομα και τα μόρια των χημικών ενώσεων της οργανικής ύλης κατά τον ιοντισμό τους οδηγούν σε μεταβολές οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε βλάβες στα κύτταρα. Αν και σε κυτταρικό επίπεδο διατίθενται αποδοτικοί μηχανισμοί επιδιόρθωσης για τις διάφορες βλάβες, ωστόσο σε κάποιες περιπτώσεις οι βλάβες που δε θα επιδιορθωθούν σωστά, μπορεί να οδηγήσουν σε βιολογικά αποτελέσματα σε κυτταρικό επίπεδο, οι οποίες μπορεί να περιλαμβάνουν γονιδιακές μεταλλάξεις, χρωμοσωματικές ανωμαλίες, καθυστέρηση της διαίρεσης, μεταβολικές διαταραχές και κυτταρικό θάνατο. Αν και τα περισσότερα όργανα και οι ιστοί μπορούν να ανταπεξέλθουν σε απώλεια μεγάλου αριθμού κυττάρων, αν ο αριθμός αυτός ξεπεράσει κάποιο όριο παρατηρείται μειωμένη λειτουργικότητα του ιστού. Συνεπώς, η θανάτωση σημαντικού αριθμού κυττάρων οδηγεί στα άμεσα βιολογικά αποτελέσματα τα οποία μπορεί να εκδηλωθούν στις επόμενες εβδομάδες ή και μήνες μετά την έκθεση σε ιοντιζουσα ακτινοβολία (21).

Τέτοιου είδους βλάβη έχει σχεδόν μηδενική πιθανότητα σε μικρές δόσεις ακτινοβολίας, πάνω από μια τιμή κατωφλίου όμως η πιθανότητα αυξάνει με την αύξηση της δόσης. Τα βιολογικά αποτελέσματα σε αυτή την περίπτωση καλούνται καθορισμένα.

Εάν η ακτινοβολία έχει οδηγήσει σε βιώσιμα αλλά τροποποιημένα σωματικά κύτταρα με γενετικές μεταλλάξεις, τότε οι κυτταρικοί κλώνοι τους, παρά τους

αμυντικούς μηχανισμούς, μπορούν να οδηγήσουν στην εμφάνιση κατάστασης κακοήθειας, δηλαδή καρκίνου. Σε αυτή την περίπτωση, η πιθανότητα εμφάνισης κακοήθειας αυξάνει με τη δόση ακτινοβολίας. Τα βιολογικά αποτελέσματα αυτής της μορφής καλούνται στοχαστικά. Εάν η βλάβη είναι σε γενετικά κύτταρα, τα οποία μεταφέρουν πληροφορία σε επόμενες γενιές, κάθε βλάβη που μπορεί να εμφανιστεί στους απογόνους είναι στοχαστικής φύσεως αλλά καλείται κληρονομική (17, 21).

Οι επιδράσεις χαμηλών δόσεων ακτινοβολίας είναι δύσκολο να καθοριστούν, σε αντίθεση με αυτές των υψηλών δόσεων που είναι γνωστές σε ικανοποιητικό βαθμό. Ανάλογα με τη δόση και το ρυθμό χορήγησής της, την κατατάσσουμε σε οξεία και χρόνια δόση. Οι οξείες δόσεις είναι σχετικά υψηλές (>0.1 Gy) σε όλο το σώμα, οι οποίες απορροφήθηκαν σε μικρό χρονικό διάστημα. Αν είναι αρκετά υψηλές μπορεί να οδηγήσουν σε εμφανή συμπτώματα μέσα σε ώρες ή εβδομάδες. Οι χρόνιες δόσεις είναι σχετικά χαμηλές (mGy) που λαμβάνονται για μεγάλη χρονική διάρκεια. Ο οργανισμός σε αυτή την περίπτωση διαθέτει χρόνο να επιδιορθώσει τη βλάβη και είναι πιο εύκολο να αντέξει τις χρόνιες δόσεις από ότι τις οξείες (17, 21).

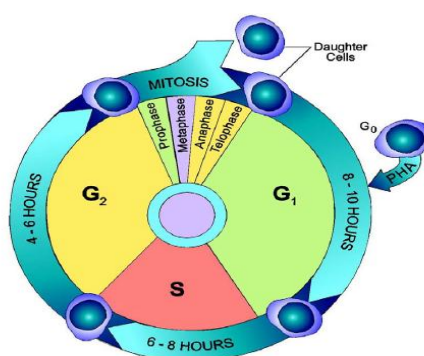
## 2.2 Κυτταρική δομή και κυτταρικός κύκλος

Το ανθρώπινο σώμα αποτελείται από πολλά διαφορετικά είδη κυττάρων τα οποία παρουσιάζουν ομοιότητες αλλά και διαφορές στην δομή και την λειτουργία τους. Τα κύτταρα κινούνται, μεγαλώνουν, αυτοπροστατεύονται, συνεργάζονται μεταξύ τους ώστε να μπορεί να λειτουργήσει και να επιβιώσει ολόκληρος ο οργανισμός και φυσικά αναπαράγονται. Μέσα στο κύτταρο βρίσκονται πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λιπίδια, νουκλεϊκά οξέα (DNA, RNA), ανόργανες ενώσεις όπως οξέα, βάσεις και η κυριότερη ένωση, το νερό (22).

Τα κύτταρα αναπαράγονται διπλασιάζοντας το περιεχόμενό τους και διαιρούμενο στα δύο. Αυτός ο κύκλος αντιγραφής και διαίρεσης είναι γνωστός ως κυτταρικός κύκλος. Οι λεπτομέρειες του κυτταρικού κύκλου ποικίλλουν από οργανισμό σε οργανισμό όπως επίσης και ανάλογα με τη διαφορετική φάση της ζωής του. Ωστόσο, ορισμένα χαρακτηριστικά είναι οικουμενικά: ο κυτταρικός κύκλος περιλαμβάνει ορισμένες διεργασίες που πρέπει να διεκπεραιώσει ένα κύτταρο για να επιτύχει το βασικότερο στόχο του, δηλαδή να αντιγράψει τις γενετικές πληροφορίες του και να τις μεταβιβάσει στην επόμενη κυτταρική γενιά. Ο κυτταρικός κύκλος αποτελείται από

διάφορες φάσεις που μπορούν να διακριθούν από την εμφάνιση και τη λειτουργία τους. Δύο γνωστά γεγονότα είναι η διαίρεση του πυρήνα, γνωστή ως μίτωση και η διαίρεση του κυττάρου, γνωστή ως κυτταροκίνηση. Οι δύο αυτές φάσεις συνιστούν τη φάση M του κυτταρικού κύκλου. Κατά το στάδιο της φάσης M, διακρίνονται φάσεις όπως η πρόφαση, η μετάφαση, η ανάφαση και η τελόφαση (22).

Η περίοδος που παρεμβάλλεται ανάμεσα σε δύο φάσεις M αποκαλείται μεσόφαση. Η μεσόφαση διαιρείται στις υπόλοιπες τρεις φάσεις του κυτταρικού κύκλου:



**Εικόνα 2.1:**Κυτταρικός κύκλος.

(Πηγή: Βιβλιογραφική αναφορά Νο 38)

- Η φάση G<sub>1</sub> είναι το μεσοδιάστημα ανάμεσα στο τέλος της φάσης M και την αρχή της φάσης S. Κατά τη φάση G<sub>1</sub> το κύτταρο υπόκειται σε πολύπλοκες βιοχημικές διαδικασίες που το προετοιμάζουν για την είσοδό του στην φάση εκείνη της σύνθεσης του θυγατρικού DNA.
- Στη φάση S το κύτταρο αντιγράφει με μεγάλη ακρίβεια το DNA του πυρήνα του.
- Η φάση G<sub>2</sub> είναι το μεσοδιάστημα ανάμεσα στο τέλος της φάσης S και την αρχή της φάσης M. Κατά τη φάση G<sub>2</sub> το κύτταρο προετοιμάζεται για τη διαδικασία της μίτωσης.
- Στη διάρκεια όλης της μεσόφασης (G<sub>1</sub>-S-G<sub>2</sub>), ένα κύτταρο συνεχίζει να μεταγράφει τα γονιδιά του, να συνθέτει πρωτεΐνες και να αυξάνει σε μάζα.

Από κοινού, οι φάσεις G<sub>1</sub> και G<sub>2</sub> προσφέρουν στο κύτταρο επιπρόσθετο χρόνο για να αυξηθεί και να διπλασιάσει τα κυτταροπλασματικά οργανίδια του (22).

### 2.3 Αλληλεπίδραση ακτινοβολίας – βιολογικής ύλης

Οι βιολογικές επιδράσεις της ιοντίζουσας ακτινοβολίας σχετίζονται με την απορροφούμενη δόση στους ιστούς ή τα κύτταρα, αλλά και με άλλους παράγοντες, όπως είναι το είδος της ακτινοβολίας, η σχετική βιολογική επίδρασή της, η χωρική και χρονική κατανομή της εναποτιθέμενης ενέργειας και ο συνολικός αριθμός των κυττάρων που ακτινοβολούνται. Βιολογικές επιδράσεις, όπως η καρκινογένεση, έχουν πιθανότητα εμφάνισης η οποία δεν είναι πάντα απλά ανάλογη της απορροφούμενης δόσης στην περίπτωση των χαμηλών δόσεων ιοντιζουσών ακτινοβολιών. Σε αυτή την περίπτωση η πιθανότητα της εμφάνισης καρκίνου μετά από ακτινοβολία είναι τυχαία ή στατιστικής φύσεως και περιγράφεται με όρους πιθανοτήτων. Η πιθανότητα επαγωγής στοχαστικού αποτελέσματος αυξάνεται με την δόση, αλλά η ακριβής σχέση μεταξύ δόσης και επίδρασης δεν είναι γνωστή σε δόσεις κάτω από 100 mSv (17).

### 2.4. Βιολογικά αποτελέσματα σε μοριακό επίπεδο

Οι πιο σημαντικές βλάβες που μπορεί να επιφέρει η ιοντίζουσα ακτινοβολία αφορούν τον πυρήνα του κυττάρου. Υπάρχουν δύο τρόποι δράσης της ακτινοβολίας σε αυτόν, ο άμεσος και ο έμμεσος. Ο όρος άμεση δράση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας αναφέρεται στην απευθείας δράση της ακτινοβολίας στο μόριο του DNA ή σε άλλα μόρια του κυττάρου όπως ενζυμικές, δομικές πρωτεΐνες και RNA. Η άμεση δράση είναι η κύρια διαδικασία που συμβαίνει όσον αφορά τις ακτινοβολίες με υψηλό LET. Η έμμεση δράση της ακτινοβολίας αφορά την πρόκληση βιολογικής βλάβης λόγω της χημικής αντίδρασης οργανικών μορίων του κυττάρου με δραστικές ελεύθερες ρίζες, πιο σημαντικές, τις ρίζες υδροξυλίου (OH) και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), που σχηματίζονται κατά τη ραδιόλυση του νερού το οποίο βρίσκεται άφθονο εντός του κυττάρου. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι πολύ δραστική ένωση και ιδιαίτερα τοξική. Οι ρίζες αυτές προσβάλλουν το DNA και του προκαλούν θραύσεις. Ο οργανισμός μπορεί να προστατευθεί από αυτό με τη βοήθεια αντιοξειδωτικών ενζύμων τα οποία είναι ειδικευμένα για την εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών. Οι δύο παραπάνω ρίζες παράγονται κατά τον ιοντισμό του νερού. Μία μεγάλη ποικιλία βλαβών μπορεί να επαχθούν στους δύο κλώνους (αλυσίδες) DNA όπως αλλοιώσεις (οξειδώσεις) βάσεων, μονόκλωνες (SSBs: Single Strand Breaks) και δίκλωνες (DSBs: Double Strand Breaks) θραύσεις αλλά και συνδυασμός αυτών σε μία μικρή περιοχή

του DNA 5-20 nm, οι λεγόμενες ομαδοποιημένες ή σύνθετες βλάβες OCDLs (Oxidatively-induced Clustered DNA Lesions) (24, 25).

## **2.5 Βιολογικά αποτελέσματα σε κυτταρικό επίπεδο**

Θεωρείται πως οι DSBs είναι από τις πιο σοβαρές ακτινοεπαγόμενες βλάβες αφού επιδιορθώνονται πιο δύσκολα. Συγκεκριμένα, μετά από την εφάπαξ απορρόφηση σημαντικής δόσης ιοντίζουσας ακτινοβολίας, η έκταση της βλάβης στο DNA και κατ'επέκταση στα χρωμοσώματα, η οποία θα εκδηλωθεί κατά την επόμενη μίτωση, είναι ο παράγοντας που συσχετίζεται καλύτερα από κάθε άλλο με την νέκρωση του κυττάρου (μη ελεγχόμενος μηχανισμός κυτταρικού θανάτου).

Ο κυτταρικός θάνατος που προκαλείται από ιοντίζουσες ακτινοβολίες χωρίζεται σε δύο κατηγορίες με βάση το χρόνο της αποσύνθεσης των κυττάρων μετά την ακτινοβόληση: α) στο θάνατο κατά τη διάμεση φάση (interphase) και β) στον αναπαραγωγικό (μιτωτικό) θάνατο. Ο πρώτος είναι μια μη αντιστρεπτή κατάρρευση του κυτταρικού μεταβολισμού και της δομής πριν την πρώτη διαίρεση μετά την ακτινοβόληση, ενώ ο δεύτερος, συμβαίνει μετά από αρκετές διαιρέσεις.

Χαμηλότερες τιμές δόσης που θα οδηγήσουν σε σχετικά μικρότερη, αλλά μη επιδιορθώσιμη, βλάβη του DNA θα προκαλέσουν άμεση απόπτωση (ελεγχόμενος μηχανισμός κυτταρικού θανάτου) δηλαδή του λεγόμενου προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου.

Σε κάθε περίπτωση, μετά τη βλάβη των μοριακών σχηματισμών ακολουθούν οι ενζυμικοί επιδιορθωτικοί μηχανισμοί. Η διάρκεια της επιδιόρθωσης είναι κατά το κύριο μέρος 15-60 min ενώ ολοκληρώνεται σε διάστημα 24h αλλά για τις πιο σύνθετες βλάβες μπορεί να διαρκέσει μέχρι και 72 h (26). Για την αποτελεσματικότερη δράση των επιδιορθωτικών μηχανισμών υπάρχει καθυστέρηση στον κυτταρικό κύκλο. Σε περίπτωση ανεπιτυχούς επιδιόρθωσης μπορεί να οδηγήσουν σε αλλαγή στην αλληλουχία των βάσεων του γενετικού υλικού και συνεπώς μετάλλαξη. Αυτό μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την ανικανότητα αναπαραγωγής ή την ανεξέλεγκτη αναπαραγωγή και τη δημιουργία προ-κακοηθών ιστών. Οι μη επιτυχώς επιδιορθωμένες DSBs μπορεί να οδηγήσουν σε χρωμοσωματικές ανωμαλίες που θα γίνουν εμφανείς στην επόμενη διαίρεση του κυττάρου, στην φάση της μετάφασης. Οι χρωμοσωματικές ανωμαλίες περιλαμβάνουν ανταλλαγές των θραυσμάτων του DNA είτε μεταξύ διαφορετικών χρωμοσωμάτων,

είτε μεταξύ των χρωματίδων του ίδιου χρωμοσώματος ή ακόμα και μεταξύ περιοχών της ίδιας χρωματίδας. Διακρίνονται σε χρωμοσωματικές ανωμαλίες όπως είναι οι δακτύλιοι και τα δικεντρικά χρωμοσώματα, και σε χρωματιδικές ανωμαλίες όπως είναι οι χρωματιδικές θραύσεις, ανάλογα με το αν η βλάβη συμβαίνει κατά την G1 φάση ή τη G2 φάση αντίστοιχα (17, 21).

## **2.6 Βιολογικοί παράγοντες που επηρεάζουν την επίδραση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας**

Η φάση του κυτταρικού κύκλου καθώς και το είδος των κυττάρων αποτελούν βασικούς παράγοντες που επηρεάζουν την επίδραση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Θεωρητικά το κύτταρο είναι ευπρόσβλητο από την ιοντίζουσα ακτινοβολία σε όλες τις φάσεις του κύκλου του, όμως η ευαισθησία ποικίλλει από φάση σε φάση. Στα θηλαστικά, ο πυρήνας του κυττάρου προστατεύεται συνεχώς από μια μεμβράνη εκτός από τη φάση της διαίρεσης του κυττάρου. Η μεμβράνη αυτή ελαττώνει δραστικά τις έμμεσες επιδράσεις της ακτινοβόλησης του κυττάρου, αφού ελεύθερες ρίζες όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου διεισδύει ελάχιστα σε αυτή. Ο πυρήνας όμως εκτίθεται στις τοξίνες κατά τη διαίρεση του κυττάρου αφού η μεμβράνη του αποσυντίθεται. Τα κύτταρα που διαιρούνται με γρήγορους ρυθμούς είναι συνεπώς πιο ευαίσθητα στις ακτινοβολίες. Τα κύτταρα των μυών και των νεύρων αναπαράγονται με αργούς ρυθμούς και έτσι δεν καταστρέφονται εύκολα. Τα κύτταρα των πνευμόνων κινδυνεύουν από πολλές τοξίνες γιατί είναι ζωντανά κύτταρα άμεσα εκτεθειμένα στο περιβάλλον (σε αντιδιαστολή με τα κύτταρα του δέρματος που είναι νεκρά κύτταρα). Παράδειγμα οργανισμού με ταχέως αναπαραγόμενα κύτταρα αποτελεί το έμβρυο. Γενικά, η φάση της μεγαλύτερης ευαισθησίας είναι η G2 και η μίτωση, ενώ τα κύτταρα είναι σχετικά λιγότερο ευαίσθητα στη φάση S. Αυτό συμβαίνει διότι αν και οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί της κυτταρικής βλάβης λειτουργούν σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου, εντούτοις είναι αποδοτικότεροι στην φάση S. Ακόμη, το είδος των κυττάρων καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την σχετική τους ευαισθησία στην ακτινοβολία. Συγκεκριμένα, η ακτινοευαισθησία του κυττάρου είναι ανάλογη της μιτωτικής του δραστηριότητας και αντιστρόφως ανάλογη του βαθμού διαφοροποίησής του σύμφωνα με το νόμο των Bergonie και Tribondeau. Χαρακτηριστικό παράδειγμα εξαίρεσης του νόμου αποτελούν τα λεμφοκύτταρα και τα ώριμα ωοκύτταρα (17, 22, 22).

## 2.7 Γραμμικό χωρίς κατώφλι μοντέλο (LNT model)

Είναι γνωστό πως σε υψηλές δόσεις, δηλαδή για δόσεις πάνω από 1Sv, υπάρχουν τα καθορισμένα αποτελέσματα τα οποία μπορεί να διαπιστωθούν κλινικά. Υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της πιθανότητας εμφάνισης αποτελεσμάτων στον ανθρώπινο οργανισμό και της απορροφούμενης δόσης (27). Για δόσεις κάτω από 1Sv, υπάρχουν στοχαστικά αποτελέσματα, με πιο σημαντικό αυτό της καρκινογένεσης. Η επιπλέον πιθανότητα για θάνατο από καρκίνο εξαιτίας της ακτινοβολήσης μπορεί να εκτιμηθεί με τη βοήθεια στατιστικής μεσά από διάφορες επιδημιολογικές μελέτες 27, 28).

Οι επιδημιολογικές μελέτες βασίζονται σε πληθυσμούς που εκτέθηκαν σε ιοντίζουσα ακτινοβολία, όπως τα θύματα της χρήσης των ατομικών βομβών (Hiroshima και Nagasaki στην Ιαπωνία), περιοχές πυρηνικών δοκιμών, περιοχές μεγάλων πυρηνικών ατυχημάτων (Chernobyl στην Ουκρανία). Επίσης θεμελιώδεις για την κατανόηση των κινδύνων είναι οι επιδημιολογικές μελέτες που αναφέρονται σε άτομα που υποβλήθηκαν κατά το παρελθόν σε ακτινοθεραπεία για ασθένειες που σήμερα δεν αντιμετωπίζονται πλέον ακτινοθεραπευτικά (π.χ αιμαγγειώματα, φυματίωση κ.α), αλλά και ογκολογικοί ασθενείς που υποβλήθηκαν σε ακτινοθεραπεία (καρκίνος μήτρας και μαστού, λέμφωμα Hodgkin's) (28).

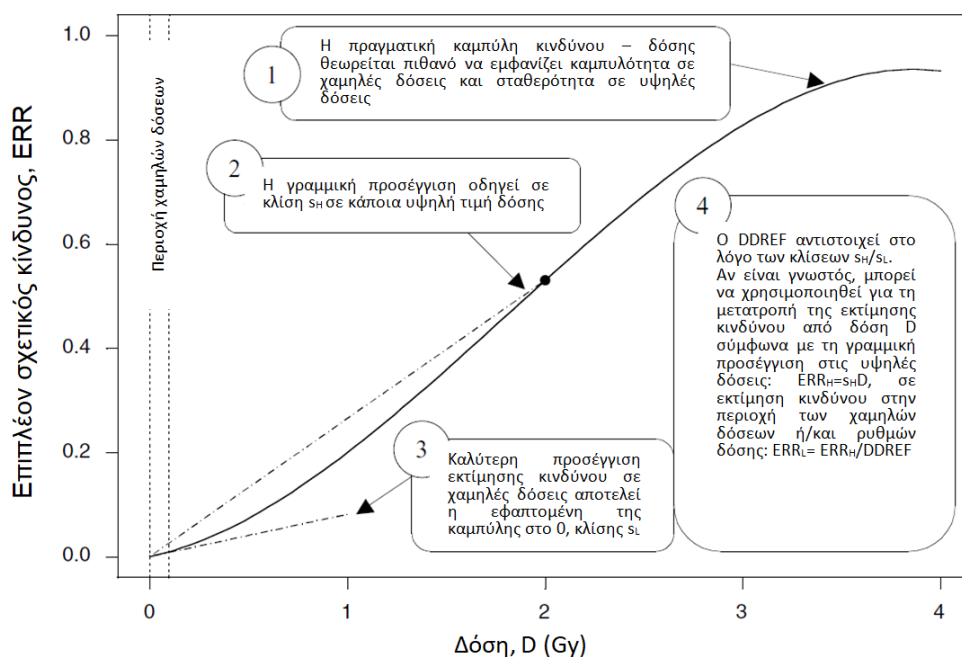
Ωστόσο, υπάρχουν δημοσιευμένες μελέτες, όπως αυτές του Nair.R.R και των συνεργατών του (30) καθώς και του Tao Z. και των συνεργατών του (31), που αναλύουν την επίδραση της χρόνιας έκθεσης των κατοίκων που ζουν σε περιοχές με χαμηλές δόσεις ακτινοβολίας, αναφέροντας πως δεν υπήρχε αυξημένη θνησιμότητα λόγω του καρκίνου. Για την έκβαση ασφαλών συμπερασμάτων ως προς τη συσχέτιση της δόσης ακτινοβολίας με τα στοχαστικά αποτελέσματα, είναι σημαντικός ο περιορισμός της στατιστικής αδυναμίας, όμως η αδυναμία αυτή παρατηρείται να αυξάνεται με την μείωση της δόσης (28).

Παρά τις αμφιλεγόμενες απόψεις, η επιδημιολογική μελέτη που αφορά τους επιζήσαντες μετά την έκρηξη των δύο ατομικών βομβών στη Hiroshima και το Nagasaki (LSS μελέτη), παρουσιάζει με καλύτερη προσέγγιση την σχέση μεταξύ βιολογικών αποτελεσμάτων και δόσης, αφού αφορά έναν πολύ μεγάλο αριθμό ατόμων που εκτέθηκε σε δόσεις από 0 έως 6 Gy. Για δόσεις πάνω από 0.5 Gy η σχέση αυτή είναι αδιαμφισβήτητα γραμμική. Ωστόσο σε πολύ μεγαλύτερες δόσεις, φαίνεται να υπάρχει μείωση της κλίσης της καμπύλης αφού ο αριθμός των νεκρών

κυττάρων αυξάνεται. Στις χαμηλές δόσεις όπου μελετήθηκε ένα μέρος των επιζήσαντων, η εκτίμηση της σχέσης όχι μόνο δεν είναι σαφής, αλλά η στατιστική αβεβαιότητα είναι μεγάλη. Θεωρήθηκε ότι η σχέση της πιθανότητας εμφάνισης καρκίνου είναι γραμμική με την δόση και η κλίση της ευθείας εκφράζεται από ένα παράγοντα αποτελεσματικότητας δόσης και ρυθμού δόσης DDREF. Ο παράγοντας αυτός είναι το πηλίκο της κλίσης της καμπύλης στις υψηλές δόσεις ( $S_H$ ) προς την κλίση της καμπύλης στις χαμηλές δόσεις ( $S_L$ ) **Σχήμα 2.1**. Ο DDREF κυμαίνεται μεταξύ 1.1-2.3 και σύμφωνα με το Διεθνές Σύστημα Ακτινοπροστασίας (ICRP) έχει εκτιμηθεί ότι DDREF=2, ενώ σύμφωνα με το UNSCEAR, έχει εκτιμηθεί ότι DDREF=1.5. Η θεωρία αυτή ονομάζεται γραμμικό χωρίς κατώφλι μοντέλο (LNT-Linear Non Threshold model) (28).

**Σχήμα 2.1 Καμπύλη του επιπλέον σχετικού κινδύνου σε σχέση με την δόση**

(Πηγή: Βιβλιογραφική αναφορά Νο 28)



Υπάρχουν τρεις υποθετικές θεωρίες σχετικά με την γραμμική σχέση στην περιοχή των χαμηλών δόσεων (27, 28). Το υπεργραμμικό μοντέλο υποστηρίζει την ύπαρξη αυξημένου κινδύνου σε χαμηλές δόσεις ακτινοβολίας λόγω της αυξημένης ατομικής επιδεκτικότητας σε ακτινοπροκλητές βλάβες που στηρίζονται σε γενετική προδιάθεση (Ατομική Ακτινοευαισθησία). Επιπλέον, βασίζεται στην γενωμική αστάθεια που μπορεί να δημιουργηθεί μετά την επιδιόρθωση μιας μετάλλαξης (Genomic Instability) αλλά και στην πιθανή ύπαρξη των bystander effects (28).

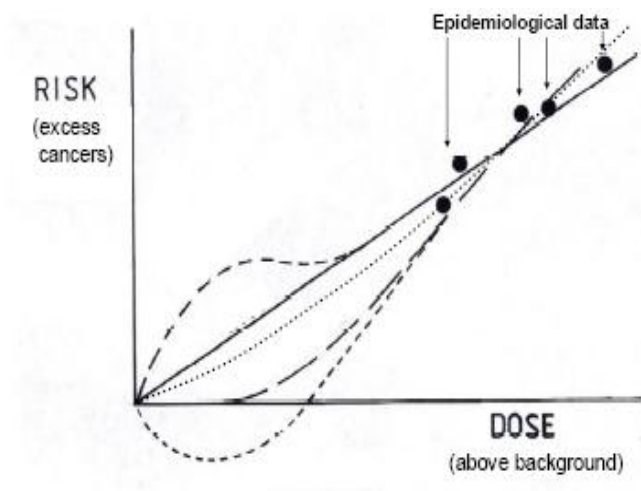


Σύμφωνα με το υπογραμμικό μοντέλο ή αλλιώς θεωρία της όρμισης (hormesis), οι πολύ μικρές εκθέσεις είναι ακίνδυνες ενώ ταυτόχρονα μπορεί να θεωρηθούν ευεργετικές. Η υπόθεση αυτή βασίζεται στην προσαρμοστικότητα, την ευαισθητοποίηση και την εγρήγορση των κυτταρικών μηχανισμών σε χαμηλούς ρυθμούς δόσεων. Θεωρείται εφικτή η πιθανή ύπαρξη χαμηλού καταωφλίου δόσης, κάτω από το οποίο επιδιορθώνονται όλες οι κυτταρικές οι βλάβες. Επίσης, βασίζεται στην πιθανότητα ενεργοποίησης του μηχανισμού απόπτωσης των κυττάρων ο οποίος οδηγεί σε θανάτωση τα κύτταρα με βλάβες (28).

Τέλος, η τρίτη θεωρία, το μοντέλο LNT, παραμένει το πρότυπο μοντέλο για την ακτινοπροστασία (27) και βασίζεται στην υπόθεση ότι δεν υπάρχει κατώτερο όριο από το οποίο ξεκινούν οι στοχαστικές επιπτώσεις. Θεωρείται λοιπόν η ύπαρξη γραμμικής σχέσης μεταξύ της δόσης και του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου που στηρίζεται στην προεκβολή αποτελεσμάτων στην περιοχή χαμηλών δόσεων από επιδημιολογικές μελέτες για υψηλές δόσεις. Η σχέση όμως που συνδέει τις χαμηλές δόσεις με τον κίνδυνο καρκινογένεσης τίθεται υπό αμφισβήτηση λόγω της ασυνέπειας του προτύπου LNT με τη ραδιοβιολογία και με διάφορα πειραματικά δεδομένα (32). (Σχήμα 2.2)

**Σχήμα 2.2 Σχέση μεταξύ έκθεσης σε διάφορες δόσεις ακτινοβολίας και κίνδυνος για καρκίνο**

(Πηγή: Βιολογικές Επιδράσεις Χαμηλών Δόσεων Ιοντιζουσών Ακτινοβολιών. Δρ. Γ. Παντελιάς, Δρ. Γ. Τερζούδη, Παρουσίαση, Εργαστήριο Υγειοφυσικής, Ραδιοβιολογίας και Κυτταρογενετικής, Ινστιτούτο Πυρηνικών και Ραδιολογικών Επιστημών και Τεχνολογίας, Ενέργειας και Ασφάλειας, ΕΚΕΦΕ, Δημόκριτος).



Οι μελέτες ακτινοβόλησης κυττάρων και κυτταρικών σειρών είναι απαραίτητες για την κατανόηση των κινδύνων από την έκθεση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία. Οι γενετικές επιδράσεις που προκαλεί η ιοντίζουσα ακτινοβολία περιλαμβάνει μονόκλωνες, δίκλωνες θραύσεις στο μόριο του DNA, αλλοίωση μίας βάσης και εγκάρσιες συνδέσεις μεταξύ των ελίκων. Μεταξύ των ακτινο-επαγόμενων επιδράσεων, οι δίκλωνες θραύσεις στο DNA (DSBs) είναι περισσότερο κυτταροτοξικές και καρκινογενείς. Οι δίκλωνες θραύσεις μπορούν να επιδιορθωθούν και ύστερα να αποδώσουν φυσιολογικά χρωμοσώματα και θυγατρικά κύτταρα. Ωστόσο, η μη επιτυχής επιδιόρθωση μπορεί να προκαλέσει γενωμική αστάθεια: κύρια αιτία έναρξης της καρκινογένεσης (33 - 35). Συνεπώς αρκετές είναι οι μελέτες που έχουν γίνει βάσει των οποίων κυτταρικές σειρές είχαν ακτινοβοληθεί με χαμηλές δόσεις ακτινοβολίας έτσι ώστε να μελετηθεί όχι μόνο οι ακτινο-επαγόμενες βλάβες αλλά και η επιδιόρθωση αυτών μετά από κάποιες ώρες. Κάποιες από αυτές τις μελέτες υποστηρίζουν πως γίνεται πλήρης επιδιόρθωση των βλαβών αυτών, ωστόσο υπάρχουν μελέτες που ισχυρίζονται το αντίθετο (36, 37).

## **2.8 Επιπρόσθετος κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου (LAR)**

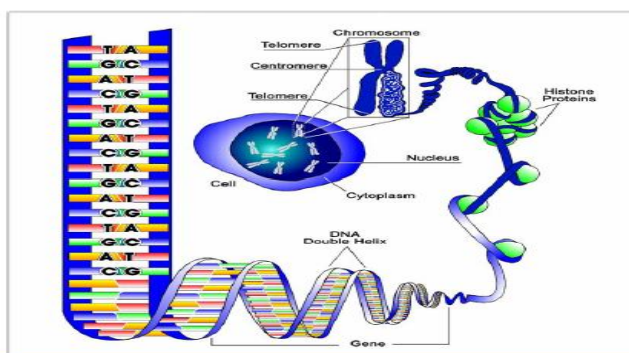
Στην εκτίμηση της διακινδύνευσης από έκθεση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία χρησιμοποιείται συχνά η δια βίου πιθανότητα εμφάνισης ακτινο-επαγόμενου καρκίνου ή Lifetime Attributable Risk (LAR). Η έκθεση BEIR VII (28) παρέχει εκτίμηση του LAR ανά 100.000 ανθρώπους που εκτέθηκαν σε 0.1 Gy. Η εκτίμηση αυτή αναφέρεται στην πιθανότητα πρόωρης εμφάνισης καρκίνου λόγω ακτινοβολίας ή θανάτου λόγω αυτού σε όλη την υπόλοιπη διάρκεια της ζωής. Πέραν της δόσης, το δείκτης LAR είναι φυσικά συνάρτηση του φύλου και της ηλικίας τη στιγμή της έκθεσης στην ακτινοβολία. Βάσει των πινάκων με την εκτίμηση του δείκτη LAR μπορεί να γίνει εκτίμηση του αντίστοιχου κινδύνου για άτομα που εκτέθηκαν σε χαμηλές δόσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας με προϋπόθεση να είναι γνωστή η ενεργός δόση τους. Ωστόσο, υπάρχουν παράγοντες που επηρεάζουν την εκτίμηση κινδύνου για καρκινογένεση στις χαμηλές δόσεις όπως είναι οι γενετικοί παράγοντες. Συγκεκριμένα, η ύπαρξη ατομικής ακτινοευαισθησίας, η υπερευαισθητοποίηση στις χαμηλές δόσεις, η γενωμική αστάθεια και τα bystander effects (28).

## 2.9 Κυτταρογενετικές προσεγγίσεις για την εκτίμηση της απορροφούμενης δόσης

Με τη βοήθεια κυτταρογενετικών μεθόδων έχουν βρεθεί μεθοδολογίες βάσει των οποίων μπορούν να μετρηθούν οι μεταλλάξεις και γενικότερα οι βλάβες που επάγονται στο ανθρώπινο γονιδίωμα, υπολογίζοντας έτσι την απορροφούμενη δόση η οποία συμβάλλει στην εκτίμηση της επικινδυνότητας. Οι κυριότερες κυτταρογενετικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι η καταμέτρηση δικεντρικών χρωμοσωμάτων ανθρώπινων λεμφοκυττάρων στη μετάφαση, η καταμέτρηση μικροπυρήνων για ταχεία εκτίμηση της απορροφούμενης δόσης, η κινητική επιδιόρθωσης δίκλωνων θράυσεων DNA (DSBs) χρησιμοποιώντας την τεχνική του ανοσοφθορισμού, όπου χρησιμοποιείται αντίσωμα έναντι της φωσφορυλιωμένης μορφής της ιστόνης H2AX ( $\gamma$ -H2AX), GTG-ζωνοποίηση και καρυοτυπική ανάλυση για τον εντοπισμό κλώνων αμοιβαίων χρωμοσωματικών μετατοπίσεων, ανάλυση FISH (Fluorescence in Situ Hybridization) για την ανίχνευση αμοιβαίων μετατοπίσεων μετά από παρατεταμένη έκθεση σε ακτινοβολίες και ανάλυση πρόωρα συμπυκνωμένων χρωμοσωμάτων που επιτρέπει εκτίμηση της απορροφούμενης δόσης σε διάστημα δύο ωρών μετά την έκθεση στην ακτινοβολία (17, 22, 27, 38) .

### 2.9.1 Ανάλυση δικεντρικών χρωμοσωμάτων στη μετάφαση

Ξεκινώντας από μικρή κλίμακα και πηγαίνοντας σε μεγαλύτερη, το DNA αποτελείται από διπλή έλικα αλυσίδας αμινοξέων η οποία δομεί το γονίδιο. Η αλυσίδα των γονιδίων τακτοποιείται γύρω από τις ιστόνες και τελικά δομείται το χρωμόσωμα.(**εικόνα 2.2**)

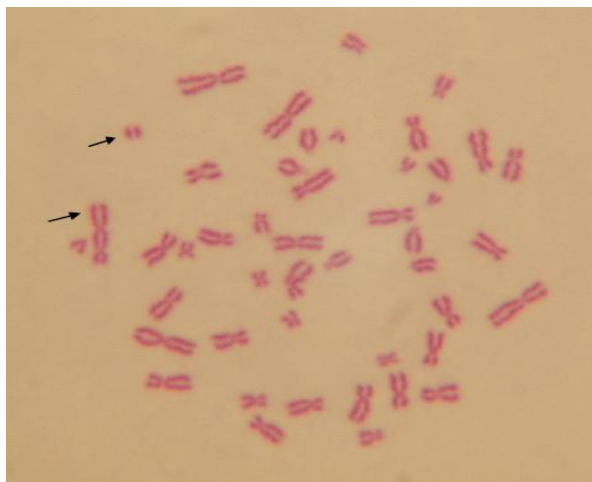


**Εικόνα 2.2:** Αναπαράσταση της δομής και τακτοποίησης του χρωμοσώματος.

(Πηγή: Βιβλιογραφική αναφορά Νο 38)

Η ιοντίζουσα ακτινοβολία μπορεί να προκαλέσει ένα μεγάλο εύρος βλαβών στο DNA όπως προαναφέρθηκε. Οι δίκλωνες θραύσεις είναι πολύ κρίσιμες και η μη επιδιόρθωση, ή η ελλιπής επιδιόρθωσή τους σχετίζονται με το σχηματισμό χρωμοσωματικών ανωμαλιών.

Οι αλλοιώσεις που επάγονται στα χρωμοσώματα από την επίδραση ιοντίζουσας ακτινοβολίας κατά την  $G_0$  φάση του κυτταρικού κύκλου όπου δεν έχει διπλασιαστεί το γενετικό υλικό, χαρακτηρίζονται ως αλλοιώσεις χρωμοσωματικού τύπου. Στην περίπτωση αυτή τα χρωμοσώματα συμπεριφέρονται ως ενιαία κατά τη διάσπασή τους, με αποτέλεσμα η βλάβη να είναι ορατή και στις δύο χρωματίδες. Τέτοιες βλάβες περιγράφονται εν συντομία ακολούθως:



**Εικόνα 2.3:** Δικεντρικό χρωμόσωμα (κάτω βέλος) μαζί με το ακεντρικό θραύσμα που το συνοδεύει (άνω βέλος).

(Πηγή: Βιβλιογραφική αναφορά Νο 38)

Τα **δικεντρικά χρωμοσώματα** είναι οι κύριες βλάβες που χρησιμοποιούνται στη βιολογική δοσιμετρία. Είναι μια ανταλλαγή κεντρομερών κομματιών μεταξύ δύο χρωμοσωμάτων που έχουν υποστεί δίκλωνη θραύση, η οποία στην πλήρη μορφή της συνοδεύεται από ένα τουλάχιστον ακεντρικό θραύσμα που συντίθεται από ακεντρικά κομμάτια από αυτά τα χρωμοσώματα. Ιδιαίτερα μετά από υψηλές δόσεις, μπορεί να εμφανιστούν πολυ-κεντρικές διαμορφώσεις. Τα τρικεντρικά συνοδεύονται από δύο ακεντρικά θραύσματα, τα τετρακεντρικά από τρία κλπ.

Ένα **δακτυλοειδές χρωμόσωμα** (centric ring) σχηματίζεται από μια ανταλλαγή ανάμεσα σε δύο σπασίματα σε διαφορετικά τμήματα του ίδιου χρωμοσώματος, φέρει

κεντρομερίδιο και συνοδεύεται επίσης από ένα ακεντρικό θραύσμα. Στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα, οι κεντρικοί δακτύλιοι είναι πολύ πιο σπάνιοι από τα δικεντρικά. Κάποιοι ερευνητές τα συνδυάζουν με τα δικεντρικά ενώ άλλοι τα αγνοούν στην εκτίμηση της δόσης.

Σε αντιδιαστολή με τους κεντρικούς δακτύλιους που χαρακτηρίζονται ως ασύμμετρες εσωτερικές ανταλλαγές σε ένα χρωμόσωμα, μπορεί να παρατηρηθούν και βλάβες λόγω συμμετρικών εσωτερικών ανταλλαγών που οφείλονται στη διαγραφή των δύο άκρων του ίδιου χρωμοσώματος και τη μεταξύ τους αλληλεπίδραση. Διακρίνονται σε περικεντρικές και παρακεντρικές αναστροφές:

**Περικεντρική αναστροφή:** Πρόκειται για αναστροφή κατά την οποία στο ανεστραμμένο τμήμα περιλαμβάνεται το κεντρομερίδιο, συνεπώς οδηγεί σε αλλαγή της θέσης του κεντρομεριδίου και πιθανόν του τύπου του χρωμοσώματος (μετατροπή υπομετακεντρικού σε ακροκεντρικό).

**Παρακεντρική αναστροφή:** Η συγκεκριμένη αναστροφή συμβαίνει εκτός της περιοχής του κεντρομεριδίου και το χρωμόσωμα αναγνωρίζεται μόνο με τη χρήση των τεχνικών ζωνοποίησης, όπου παρατηρείται αλλαγή των φυσιολογικών ζωνών.

Οι **ακεντρικές ανωμαλίες** σχηματίζονται ανεξάρτητα από τις παραπάνω ανταλλαγές. Μπορεί να είναι τελικές ή ενδιάμεσες διαγραφές, διαφόρων μεγεθών, ενώ δεν είναι πάντα δυνατό να καθοριστεί η προέλευση τους και έτσι συνδυάζονται. Οι ακεντρικοί δακτύλιοι μοιάζουν με κουκκίδες με ξεκάθαρα διακριτό κενό μέσα σε αυτές και θεωρούνται συνήθως ενδιάμεσες διαγραφές, ενώ όταν εμφανίζονται σε διπλές τελείες (doubleminutes) είναι κυρίως τελικές διαγραφές.

ΤΥΠΟΙ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΑΛΛΟΙΩΣΕΩΝ						
ΣΕ ΕΝΑ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ	ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ	ΤΕΛΙΚΟ ΤΜΗΜΑ	ΕΝΔΙΑΜΕΣΟ ΤΜΗΜΑ	ΔΑΚΤΥΛΙΟΣ ΜΕ ΚΕΝΤΡΟΜΕΡΙΔΙΟ	ΔΑΚΤΥΛΙΟΣ ΧΩΡΙΣ ΚΕΝΤΡΟΜΕΡΙΔΙΟ	ΑΝΑΣΤΡΟΦΗ ΕΠΙΚΟΛΛΗΣΗ
						
ΜΕΤΑΞΥ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΩΝ	ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ		ΔΙΚΕΝΤΡΙΚΟ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ + ΑΚΕΝΤΡΙΚΟ ΤΜΗΜΑ			ΣΥΜΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΤΑΛΛΑΓΗ
						

## **Εικόνα 2.4:** Τύποι χρωμοσωμικών αλλοιώσεων

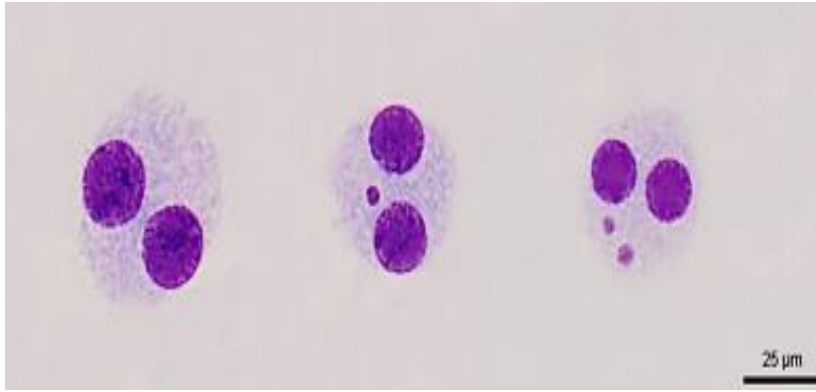
(Πηγή: Βιολογική Δοσιμετρία. Παρουσίαση από Δρ. Γ. Τερζούδη.

Εργαστήριο Υγειοφυσικής, Ραδιοβιολογίας και Κυτταρογενετικής, ΙΠΡΕΤΕΑ «Δημόκριτος»)

Η κλασική κυτταρογενετική μεθοδολογία δοσιμετρίας βασίζεται στην καλλιέργεια των λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος με παρουσία μιτογόνων παραγόντων και κατά αυτόν τον τρόπο τα κύτταρα εισέρχονται στον κυτταρικό τους κύκλο για να γίνει ανάλυση χρωμοσωματικών αλλοιώσεων στη μετάφαση (17, 27, 38, 39, 40).

### **2.9.2 Μέθοδος αναστολής της κυτταροκίνησης**

Η ανίχνευση χρωμοσωματικών αλλοιώσεων επιτυγχάνεται μετά από έναν κυτταρικό κύκλο μετά τη δημιουργία τους, δηλαδή κύτταρα που έχουν διαιρεθεί μία μόνο φορά. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω για ανίχνευση αυτών των αλλοιώσεων χρησιμοποιείται ευρέως η μέθοδος της κλασικής βιοδοσιμετρίας. Εντούτοις τέτοιες αλλοιώσεις μπορούν να εντοπιστούν και με τη μέθοδο αναστολής της κυτταροκίνησης, ανιχνεύοντας μικροπυρήνες. Οι μικροπυρήνες αποτελούν πυρηνικό υλικό που διακρίνεται έξω από τον κύριο πυρήνα και μέσα στο κυτταρόπλασμα και βρίσκονται σε κύτταρα που είναι στη διάμεση φάση αμέσως μετά τη διαίρεση. Οι μικροπυρήνες μπορεί να είναι αποτέλεσμα χρωμοσωματικών θραυσμάτων δηλαδή άκεντρων χρωμοσωματικών τμημάτων ή ολόκληρων χρωμοσωμάτων κατά την ανάφαση της μίτωσης τα οποία δεν κατάφεραν να αλληλεπιδράσουν με την άτρακτο κατά τη μίτωση με αποτέλεσμα να περιέχουν το κεντρόμερο στους μικροπυρήνες οπότε να μεταβάλλεται ο αριθμός των χρωμοσωμάτων στον κύριο πυρήνα. Εφόσον η ανίχνευση χρωμοσωματικών αλλοιώσεων γίνεται στην πρώτη κυτταρική διαίρεση, γίνεται χρήση ενός αναστολέα, της κυτταροχαλασίνης Β, που πρώτα έγινε από τους Morely και Fenech, για να εξασφαλίσει την αναστολή της κυτταροκίνησης χωρίς να εμποδίζει την πυρηνική διαίρεση. Επομένως κύτταρα που έχουν διαιρεθεί μία μόνο φορά εκδηλώνονται ως διπύρηνα κύτταρα, ενώ κύτταρα που έχουν διαιρεθεί περισσότερο από μία φορά εμφανίζονται ως τριπύρηνα, τετραπύρηνα και γενικώς πολυπύρηνα. Η καταγραφή των διπύρηνων κυττάρων καθώς και των υπάρχοντων μικροπυρήνων γίνεται με βάση τα κριτήρια μέτρησης και καταγραφής του δημοσιευμένου πρωτόκολλου του Fenech (41 - 44).

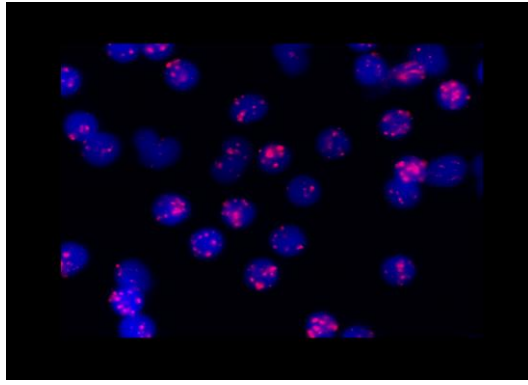


**Εικόνα 2.5:** Μικροκυρήνες

(Πηγή: Βιβλιογραφική αναφορά Νο 38)

### 2.9.3 Φωσφορυλιωμένη ιστονική πρωτεΐνη H2A ( $\gamma$ -H2AX)

Το μήκος του DNA έχει μήκος περίπου 2m και οργανώνεται σε χρωματίνη με τέτοιο τρόπο ώστε να φιλοξενείται σε πυρήνα ανθρώπινου κυττάρου με διάμετρο περίπου 10 $\mu$ m. Η βασική δομική μονάδα της χρωματίνης, το νουκλεόσωμα, αποτελείται από 147 ζεύγη βάσεων DNA, τυλιγμένο σε δύο έλικες που περιστρέφονται από οχταμερές ιστονικής πρωτεΐνης. Τέσσερις μικρές ιστόνες πρωτεϊνικής φύσεως, H2A, H2B, H3 και H4 που παρουσιάζονται σε δύο αντίγραφα, σχηματίζουν το οχταμερές της ιστόνης που συμπυκνώνονται στο DNA. Η ιστόνη H2AX ανήκει στην οικογένεια των H2A ιστονών, η οποία στα θηλαστικά αντιπροσωπεύει το 10% της H2A. Μετά την πρόκληση δίκλωνων θραύσεων στο DNA λόγω ιοντίζουσας ακτινοβολίας, η H2AX φωσφορυλιώνεται στη σερίνη 139 στο τελικό άκρο της πρωτεΐνης. Αυτή η φωσφορυλιωμένη μορφή της H2AX ονομάζεται  $\gamma$ -H2AX. Η φωσφορυλίωση της ιστόνης είναι από τα πρώτα στάδια που συμβαίνουν για αναγνώριση δίκλωνων θραύσεων DNA και γίνεται από κινάσες όπως ATM και ATR. Το χρονικό διάστημα για τη φωσφορυλίωση είναι 1-10 min μετά τη βλάβη και εκτείνεται σε χιλιάδες βάσεις εκατέρωθεν του σπασίματος. Έχοντας δημιουργηθεί οι δίκλωνες θραύσεις του DNA, ξεκινούν οι ενζυμικοί μηχανισμοί επιδιόρθωσης των βλαβών. Οι δίκλωνες θραύσεις θεωρούνται η πιο επικίνδυνη μορφή βλαβών του DNA και κρίσιμη για την επιβίωση του κυττάρου. Αδυναμία επιδιόρθωσης οδηγεί σε χρωμοσωμικές αλλοιώσεις και κατά συνέπεια σε αστάθεια του γονιδιώματος, η οποία συνδέεται με την καρκινογένεση (45, 46).

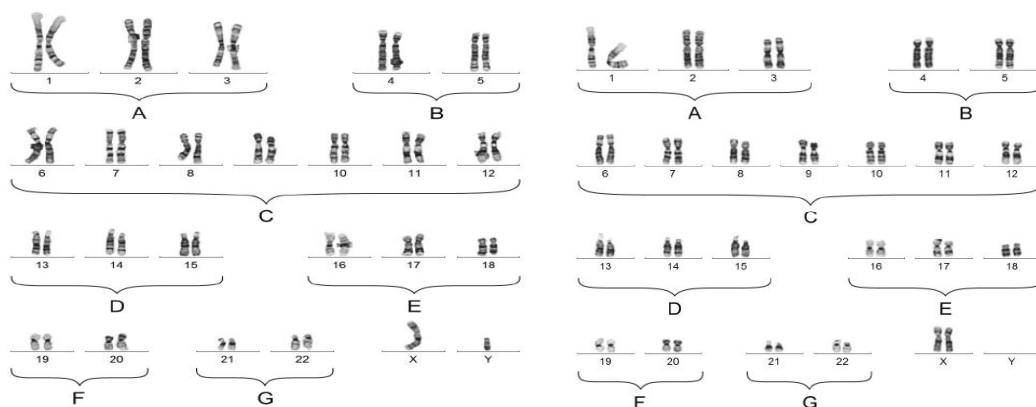


**Εικόνα 2.6:** Εστίες της φωσφορυλιωμένης ιστόνης  $\gamma$ -H2AX

(Πηγή: Φωτογραφία από το Εργαστήριο Υγειοφυσικής, Ραδιοβιολογίας και Κυτταρογενετικής, Εθνικού Κέντρου Έρευνας των Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος»).

#### 2.9.4 GTG ζώνωση και καρυοτυπική ανάλυση

Ο καρυότυπος του ανθρώπου αποτελείται από 23 ζεύγη γραμμικών χρωμοσωμάτων και προκύπτουν έτσι 46 χρωμοσώματα σε κάθε κύτταρο. Τα χρωμοσώματα αυτά χωρίζονται σε 7 ομάδες, από Α έως Γ, συν ένα ζευγάρι χρωμοσωμάτων φύλου, τα Χ και Υ. Για την ανίχνευση δομικών ατυπιών που αφορούν δύο ή περισσότερα χρωμοσώματα όπως σταθερές χρωμοσωματικές αντιμεταθέσεις, μετατοπίσεις και γενικότερα ανταλλαγές χρωμοσωματικού υλικού χρησιμοποιήθηκε η GTG-ζώνωση χρωμοσωμάτων με τη βοήθεια ενός ενζύμου τη τρυψίνης και της χρώσης Giemsa (40).



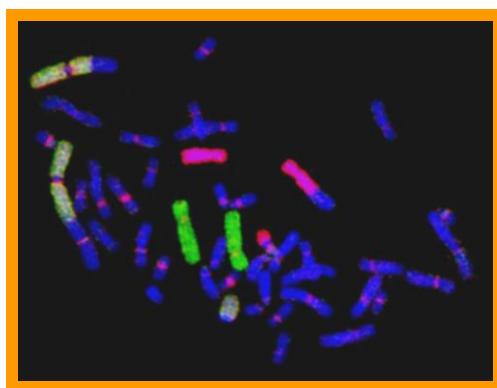
**Εικόνα 2.7 :** Αρσενικός Καρυότυπος και Θηλυκός Καρυότυπος

(Πηγή: Βιβλιογραφική αναφορά Νο 38)



### 2.9.5 Τεχνική φθορισμού με υβριδισμό FISH (Fluorescence in Situ Hybridization)

Για την ταχεία ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των σταθερών χρωμοσωματικών αλλοιώσεων σε δείγματα περιφερικού αίματος μετά από μία υπερέκθεση, ως εναλλακτικές της μεθόδου GTG-ζώνωσης χρωμοσωμάτων, χρησιμοποιήθηκαν κυτταρογενετικές μέθοδοι σε συνδυασμό με τεχνικές μοριακής γενετικής νέας τεχνολογίας όπως η τεχνική FISH (εικόνα 2.7). Η μεθοδολογία αυτή επιτρέπει την ομοιόμορφη χρώση προεπιλεγμένων χρωμοσωμάτων με την χρήση μοριακών ιχνηθευτών (DNA probes) σημασμένων με φθορισμοφόρες ουσίες. Ο υβριδισμός βασίζεται στην συμπληρωματικότητα των βάσεων (A-T, C-G) του δίκλωνου μορίου του DNA. Ανάλογα με τον μοριακό ιχνηθέτη, είναι δυνατή η ομοιόμορφη χρώση ολόκληρου του χρωμοσώματος ή ενός τμήματός του. Έτσι σε συνδυασμό με άλλες κυτταρογενετικές τεχνικές (όπως συνδυασμός τεχνικών FISH-μικροπυρήνων) γίνεται δυνατή η ανίχνευση μετατοπίσεων τμημάτων των επιλεγμένων χρωμοσωμάτων από τη διχρωμία που παρουσιάζουν καθώς και η μελέτη πιθανών ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων όπου τα χρωμοσώματα δε διαχωρίζονται φυσιολογικά με αποτέλεσμα τα θυγατρικά κύτταρα να διαθέτουν περισσότερα ή λιγότερα από 46 χρωμοσώματα (43).



**Εικόνα 2.8:** Τεχνική φθορισμού με υβριδισμό FISH

(Πηγή: Φωτογραφία από το Εργαστήριο Υγειοφυσικής, Ραδιοβιολογίας και Κυτταρογενετικής, Εθνικού Κέντρου Έρευνας των Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος»).

### 2.10 Γενωμική αστάθεια και ανευπλοειδία

Η ανευπλοειδία είναι μία αριθμητική χρωμοσωμική ανωμαλία στην οποία υπάρχει ένα επιπλέον ή ένα λιγότερο χρωμόσωμα. Ο πιο συνηθισμένος μηχανισμός είναι ο

λανθασμένος διαχωρισμός των ομόλογων χρωμοσωμάτων ή των αδελφών χρωματίδων κατά την διάρκεια της μείωσης. Η διάγνωση γίνεται είτε μέσω της καρυοτυπικής ανάλυσης, είτε με την μέθοδο FISH. Η έκθεση ενός οργανισμού στην ιοντίζουσα ακτινοβολία αποτελεί σημαντικό παράγοντα επαγωγής γενωμικής αστάθειας. Οι αλλοιώσεις του γονιδιώματος περιλαμβάνουν συσσώρευση μεταλλάξεων οι οποίες οφείλονται σε αλλαγές στην αλληλουχία βάσεων του DNA ή σε διάφορες μορφές χρωμοσωμικών ανωμαλιών. Βιολογική σημασία έχει η γενετική αστάθεια που παρουσιάζουν τα κύτταρα που δεν έχουν ακτινοβοληθεί άμεσα αλλά είναι απόγονοι ακτινοβολημένων κυττάρων. Η γενωμική αστάθεια διακρίνεται σε μικροδορυφορική αστάθεια και σε χρωμοσωμική αστάθεια. Η χρωμοσωμική αστάθεια χαρακτηρίζεται από ανώμαλη κατανομή των χρωμοσωμάτων στα θυγατρικά κύτταρα που αποκλίνουν από το φυσιολογικό αριθμό (αριθμητική χρωμοσωμική αστάθεια-ανευπλοειδία ή πολυπλοειδία) ή από αυξημένη συχνότητα δομικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών (δομική χρωμοσωμική αστάθεια). Η αριθμητική χρωμοσωμική αστάθεια προκύπτει όταν συμβαίνουν λάθη κατά τον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων στη μιτωτική διαίρεση του κυττάρου. Το αποτέλεσμα των λαθών αυτών είναι η δημιουργία κυττάρων που φέρουν είτε λιγότερα (π.χ μονοσωμίες), είτε περισσότερα (π.χ τρισωμίες) χρωμοσώματα και καλούνται ανευπλοειδικά κύτταρα ή φέρουν ολόκληρες χρωμοσωμικές σειρές (3<sup>η</sup>, 4<sup>η</sup>, 5<sup>η</sup>) και καλούνται πολυπλοειδικά κύτταρα. Η δομική χρωμοσωμική αστάθεια από την άλλη πλευρά, προκύπτει από ανώμαλες δομικές μεταβολές στα χρωμοσώματα, όπως αμοιβαίες μετατοπίσεις, ενίσχυση γονιδίων, απώλεια χρωμοσωμικού υλικού, λόγω χρωμοθραύσης, δικεντρικά χρωμοσώματα κλπ. Οι αλλαγές αυτές έχουν σαν αποτέλεσμα την προσθήκη ή την απώλεια χρωμοσωματικών περιοχών, που πολλές φορές μπορεί να περιλαμβάνουν ενίσχυση πρωτο-ογκογονιδίων ή απώλεια ογκοκατασταλτικών γονιδίων, με συνέπεια την δημιουργία καρκίνου. Τόσο, οι δομικές, όσο και οι αριθμητικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες αποτελούν βασικό χαρακτηριστικό των περισσότερων νεοπλασιών και οι οποίες συνοδεύονται από υψηλή συχνότητα μικροπυρήνων. Η συχνότητα μικροπυρήνων λοιπόν θεωρείται ένας καλός βιοδείκτης χρωμοσωμικής αστάθειας η οποία οδηγεί σε ανευπλοειδία (47 - 50).

Επιπλέον, μετά από ακτινοβόληση, είναι πιθανή η εμφάνιση των «bystander effects» όπου ακτινοβολημένα κύτταρα αλληλεπιδρούν με μη ακτινοβολημένα. Γενετικοί παράγοντες, φλεγμονώδης απόκριση σε κυτταρικό επίπεδο μετά την έκθεση σε

ιοντίζουσα ακτινοβολία είναι παράγοντες που φαίνεται να ευοδώνουν το φαινόμενο bystander effects (51, 52). Κατά την διαδικασία που συμβαίνει ένα τέτοιο γεγονός, έχει παρατηρηθεί η μείωση της πρωτεΐνης TP53 και αύξηση των προϊόντων από τον μεταβολισμό του οξυγόνου (ROS) μέσω ενδοκυτταρικής επικοινωνίας. Τέτοιες αλληλεπιδράσεις οδηγούν σε βλάβες στο DNA, χρωμοσωματική αστάθεια, μεταλλάξεις και απόπτωση κυττάρων (51, 53). Επίσης έχει αναφερθεί πως στην περίπτωση των bystander effects σε ένα κυτταρικό πληθυσμό, ενδεχομένως να έχει επίδραση στην εκτίμηση του κινδύνου μετά από μία έκθεση, αφού συμπεριλαμβάνει όχι μόνο τα ακτινοβολημένα κύτταρα αλλά και τα μη ακτινοβολημένα που έχουν υποστεί bystander effects (51, 52, 54).

## 2.11 Χρωμοθρύψη

Η χρωμοθρύψη έχει προταθεί ως εναλλακτικός μηχανισμός καρκινογένεσης σε σχέση με την γενικά αποδεκτή πολυσταδιακή διαδικασία μέσω μεταλλάξεων. Σύμφωνα με τον μηχανισμό αυτό χρωμοσωματικές περιοχές θρυμματίζονται μέσω ενός καταστροφικού γεγονότος και επανενώνονται τυχαία. Σαν αποτέλεσμα το γενετικό υλικό ενός ή περισσοτέρων χρωμοσωμάτων υφίσταται μαζικές ανακατατάξεις. Υπάρχουν πιθανοί μηχανισμοί που ενδεχομένως ενεργοποιούν την χρωμοθρύψη και παραμένουν αδιευκρίνιστοι. Ένας αριθμός υποθέσεων έχει προταθεί για να εξηγήσουν την ενεργοποίηση της χρωμοθρύψης όπως οι ιοντίζουσες ακτινοβολίες, stress κατά την διάρκεια της αντιγραφής του DNA, ο σχηματισμός των μικροπυρήνων και πρόωρη πύκνωση της χρωματίνης.

Όπως αναφέρθηκε, μικροπυρήνες και χρωμοσωματικές αλλοιώσεις θεωρούνται βιοδείκτες αυξημένου κινδύνου εμφάνισης καρκίνου. Πράγματι, ακτινοεπαγόμενες βλάβες όπως είναι οι μικροπυρήνες μπορεί να συμβάλλουν στην δημιουργία γενωμικής αστάθειας μέσα από τον μηχανισμό της χρωμοθρύψης. Η εμφάνιση μικροπυρήνων θεωρείται αποτέλεσμα διαφορετικών ειδών βλαβών στο DNA και ως βιοδείκτης χρωμοσωμικής αστάθειας εμφανίζεται σε προ-καρκινικά κύτταρα. Ο μηχανισμός της αντιγραφής και οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί εξασθενούν στους μικροπυρήνες, γεγονός που σε λίγο χρόνο οδηγεί σε εκτεταμένη βλάβη του DNA. Έπειτα, αν ο μικροπυρήνας εισέλθει στον κυτταρικό πυρήνα ξανά, υφίσταται χρωμοσωματική αναδιάταξη, που στις περισσότερες περιπτώσεις είναι απόρροια από ένα χρωμόσωμα και έτσι το φαινόμενο της χρωμοθρύψης μπορεί να ξεκινήσει. (50, 55 - 58).

## Κεφάλαιο 3: Εφαρμογές Ιοντίζουσας Ακτινοβολίας στο Αιμοδυναμικό Εργαστήριο

### 3.1 Εισαγωγή

Όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, δεδομένα επαρκούς στατιστικής ισχύος καταδεικνύουν γραμμική συσχέτιση της δόσης από έκθεση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία με την αύξηση του κινδύνου καρκινογένεσης σε δόσεις  $\geq 100\text{mSv}$  (5, 8). Για χαμηλές δόσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας, δηλαδή δόσεις  $\leq 100\text{mSv}$ , η στατιστική αβεβαιότητα είναι αυξημένη (28).

Η πιο συχνή αιτία έκθεσης σε χαμηλές δόσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας ( $\leq 100\text{mSv}$ ) είναι η προγραμματισμένη έκθεση για ιατρικούς λόγους που αφορά ένα πολύ μεγάλο μέρος του πληθυσμού (2). Συγκεκριμένα, σχετικά με τους επαγγελματικά εκτιθέμενους έχει καταγραφεί πως το μεγαλύτερο ποσοστό μέσης ετήσιας δόσης προσλαμβάνεται από την επεμβατική καρδιολογία (16). Στους **πίνακες 3.1** και **3.2** παρουσιάζονται τα ποσοστά της μέσης ετήσιας δόσης και μέσης ενεργού δόσης ανά χώρο εργασίας και επαγγελματική κατηγορία για το 2020 (29) ενώ η μέση ετήσια ενεργός δόση ανά άτομο του πληθυσμού από τις ιατρικές διαγνωστικές πρακτικές δίνεται στον **πίνακα 3.3** (28).

**Πίνακας 3.1 Κατανομή της καταγραφόμενης μέσης ετήσιας δόσης ανά χώρο εργασίας**

Χώρος Εργασίας	Ποσοστά
Επεμβατική Καρδιολογία	52.6%
Επεμβατική Ακτινολογία	25.7%
Λοιπές Ακτινοσκοπικά Καθοδηγούμενες Ιατρικές Πράξεις	6.7%
Πυρηνική Ιατρική	5.8%
Ακτινοδιάγνωση	4.5%
Άλλα	2.1%

Βιομηχανία	2.0%
Ακτινοθεραπεία	0.4%

**Πίνακας 3.2 Κατανομή της καταγραφόμενης μέσης ενεργού δόσης ανά χώρο εργασίας**

Χώρος Εργασίας	Ποσοστά
Επεμβατική Καρδιολογία	18.2%
Επεμβατική Ακτινολογία	9.9%
Λοιπές Ακτινοσκοπικά Καθοδηγούμενες Ιατρικές Πράξεις	1.6%
Πυρηνική Ιατρική	27.6%
Ακτινοδιάγνωση	21.4%
Άλλα	8.9%
Βιομηχανία	9.6%
Ακτινοθεραπεία	1.9%

**Πίνακας 3.3 Μέση ετήσια ενεργός δόση ανά άτομο του πληθυσμού από τις ιατρικές διαγνωστικές πρακτικές**

Ακτινοδιαγνωστική πράξη	Μέση ετήσια ενεργός δόση (mSv)
Αξονική τομογραφία	1.47
Επεμβατικές πρακτικές	0.13
Πυρηνική Ιατρική	0.11
Ακτινογραφίες	0.08
Μαστογραφίες	0.04
Ακτινοσκοπήσεις	0.01

### 3.1 Αιμοδυναμικό Εργαστήριο

Το Αιμοδυναμικό Εργαστήριο είναι ο χώρος στον οποίο διενεργούνται οι καρδιακοί καθετηριασμοί (αριστερός ή/και δεξιός), κατάλυση (ablation) καθώς και αγγειογραφίες όπως στεφανιογραφίες, αορτογραφίες, αγγειοπλαστικές των στεφανιαίων αρτηριών και αγγειοπλαστικές των πνευμονικών αρτηριών για διαγνωστικούς αλλά και θεραπευτικούς σκοπούς. Η αγγειογραφία είναι μια απεικονιστική τεχνική των αιμοφόρων αγγείων που γίνεται σε πραγματικό χρόνο. Χρησιμοποιείται ιδιαιτέρως σε φλέβες, αρτηρίες και στην καρδιά. Παραδοσιακά εφαρμόζεται με την παροχή μιας αδιαφανούς στην ακτινοβολία ουσίας (contrast agent) στο αιμοφόρο αγγείο και η απεικόνιση γίνεται με μια από τις τεχνικές απεικόνισης των ακτίνων-Χ.

Στο βασικό εξοπλισμό ενός τέτοιου εργαστηρίου περιλαμβάνονται: ο ψηφιακός αγγειογράφος, ένα ειδικό κρεβάτι-τραπέζι με δυνατότητα μετακίνησης κατά τον οριζόντιο, κάθετο και κατακόρυφο άξονα, οθόνες απεικόνισης, οθόνη και σύστημα καταγραφής των αιμοδυναμικών παραμέτρων του ασθενούς (αρτηριακή πίεση, καρδιακή συχνότητα, ηλεκτροκαρδιογράφημα) (59).

Η εξέταση γίνεται με παρακέντηση αρτηρίας με βελόνα, ή από τη μηριαία αρτηρία ή από την κερκιδική ή την ωλένια ή τη βραχιόνια αρτηρία. Πριν την παρακέντηση γίνεται τοπική αναισθησία με ξυλοκαΐνη. Μέσα από τη βελόνα, ένα σύρμα περνάει στην αρτηρία και στη συνέχεια αφαιρείται η βελόνα. Πάνω από το σύρμα (οδηγός) τοποθετείται ένας εισαγωγέας (θηκάρι 5-7 F, με διάμετρο 1F~0.33mm). Μετά την τοποθέτηση του θηκαριού αφαιρείται το σύρμα-οδηγός. Στη συνέχεια μέσα από το θηκάρι περνά ο διαγνωστικός καθετήρας για τη δεξιά ή την αριστερή στεφανιαία αρτηρία πάνω από ένα οδηγό-σύρμα σχήματος J, διαμέτρου συνήθως 0.032 in.

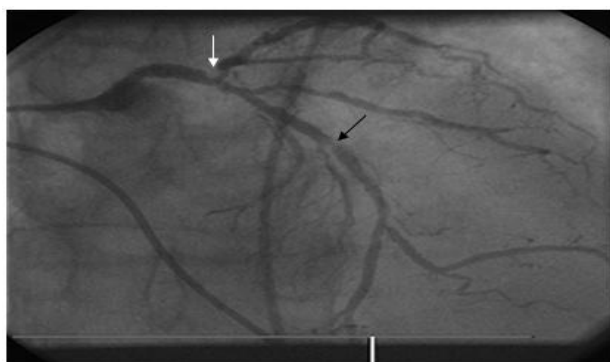
Ο καθετήρας συνδέεται με μια ειδικά σχεδιασμένη συσκευή πολλαπλών απολήξεων, η οποία επιτρέπει τη διατήρηση ενός “κλειστού συστήματος” όπου καταγράφεται η αρτηριακή πίεση του ασθενούς, γίνεται έκπλυση του καθετήρα και έγχυση σκιαγραφικού στις αρτηρίες. Οι πιο δημοφιλείς οδοί προσπέλασης για τη διενέργεια ενός καρδιακού καθετηριασμού είναι η μηριαία και η κερκιδική αρτηρία. Πέρα από την ικανότητα και την εξειδίκευση του καθετηριαστή, η προσπέλαση από την κερκιδική αρτηρία συχνά απαιτεί πολλαπλούς χειρισμούς, αφενός μεν γιατί πρόκειται για λεπτότερο αγγείο που όχι σπάνια εμφανίζει σημαντικό αγγειόσπασμο και

αφετέρου λόγω ανατομικών παραμέτρων (ελικώσεις και γωνίες) που δυσκολεύουν τον εκλεκτικό καθετηριασμό των στεφανιαίων αγγείων (59).



**Εικόνα 3.1:** Χώρος εξέτασης- Αιμοδυναμικό Εργαστήριο

(Πηγή: Αιμοδυναμικό Εργαστήριο, Ωνάσειο Καρδιοχειρουργικό Κέντρο)



**Εικόνα 3.2:** Αριστερή Στεφανιαία Αρτηρία.

(Πηγή: Αιμοδυναμικό Εργαστήριο, Ωνάσειο Καρδιοχειρουργικό Κέντρο)

Η στεφανιογραφία ανέδειξε βλάβη διχασμού στο κύριο στέλεχος περίπου 70% και στένωση > 80% στο στόμιο της περισπωμένης αρτηρίας (λευκό βέλος) και 60% στένωση στη μεσότητα του προσθίου κατιόντα (μαύρο βέλος).

### 3.2 Ψηφιακή αγγειογραφία

Ο ψηφιακός αγγειογράφος βασίζεται σε μια λυχνία ακτίνων-X. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε για απλή ακτινοσκόπηση είτε για ψηφιακή αγγειογραφία. Η λυχνία ακτίνων-X σε συνδυασμό με ενισχυτή εικόνα ή ψηφιακό ανιχνευτή υψηλής

απόδοσης σε διάταξη βραχίονα C (C-arm) παράγουν εικόνα σε σχεδόν πραγματικό χρόνο, η οποία παρακολουθείται σε οθόνη.

Ένας ψηφιακός αγγειογράφος περιλαμβάνει γεννήτρια χαμηλής κυμάτωσης της τάσης, ακτινολογική λυχνία, αγγειογραφικό στατώ με ψηφιακό ανιχνευτή, σύστημα ψηφιακής λήψης και απεικόνισης, υπολογιστικό ψηφιακό σύστημα αγγειογραφίας, εξεταστική τράπεζα και σταθμό ψηφιακής εικόνας και διάγνωσης.

Τα ψηφιακά συστήματα παρέχουν ψηφιακή καταγραφή των δεδομένων. Αυτό κάνει τη διαδικασία απλή και γρήγορη, ενώ η ποιότητα της εικόνας μπορεί να βελτιωθεί εκ των υστέρων μέσω κατάλληλης επεξεργασίας (20, 59).

Για τις ανάγκες της Ακτινοπροστασίας έχουν εισαχθεί διάφορα δοσιμετρικά στοιχεία για την εκτίμηση της απορροφούμενης δόσης αλλά και του κινδύνου από μία ακτινοδιαγνωστική πράξη. Ο χρόνος ακτινοσκόπησης και ο αριθμός των ακτινοκαταγραφικών εικόνων (frames) που καταγράφονται κατά τη διάρκεια μιας εξέτασης δίνουν μια ένδειξη της δόσης που χορηγείται κατά την ακτινοσκόπηση ή ακτινοκαταγραφή. Επίσης, είναι δυνατή η μετατροπή του DAP σε ένδειξη της ενεργού δόσης μέσω κατάλληλου συντελεστή (60). Κατά την ακτινοσκόπηση απεικονίζεται η ακτινοβολούμενη περιοχή σε πραγματικό χρόνο και χρησιμοποιείται κατά την καθοδήγηση των καθετήρων στην περιοχή ενδιαφέροντος. Ο χειριστής μπορεί να επιλέξει μεταξύ δύο ή τριών μεθόδων (mode) ακτινοσκόπησης που εξαρτάται από τον ρυθμό δόσης, την ποιότητα της εικόνας και τις απαιτήσεις της εξέτασης. Κατά την ακτινοκαταγραφή, παράγονται εικόνες υψηλότερης ποιότητας οι οποίες είναι χρήσιμες και αποθηκεύονται, όμως οι ρυθμοί δόσης είναι υψηλότεροι. Για παράδειγμα, η δόση ανά frame ακτινοκαταγραφής είναι περίπου 10 φορές μεγαλύτερη από την αντίστοιχη της ακτινοσκόπησης (20).

### **3.3 Ακτινοπροστασία σε ένα Αιμοδυναμικό Εργαστήριο**

Η εκτίμηση του κινδύνου κατά τις αιμοδυναμικές πράξεις είναι το κλειδί για την βελτιστοποίηση της προστασίας. Η αλληλεπίδραση μεταξύ του ίδιου του ασθενούς, του επεμβατικού ιατρού και της πολυπλοκότητας της πάθησης, αποτελούν τρεις παράγοντες που συμβάλλουν στην πιθανότητα να υπάρξει κίνδυνος κατά τις επεμβατικές αυτές πράξεις (59).



Όσον αφορά, τον ίδιο τον ασθενή, σημαντικό ρόλο παίζει ο οργανισμός του και η κλινική του κατάσταση. Επί παραδείγματι, ασθένειες όπως ο διαβήτης, η κατανάλωση, η παχυσαρκία, το κάπνισμα, είναι παράγοντες που δυσχεραίνουν την κλινική κατάσταση του ασθενούς και έτσι ενδεχομένως να αυξάνεται ο χρόνος ακτινοσκόπησης, άρα και η δόση που λαμβάνει ο ασθενής (59).

Σχετικά με την πάθηση, η πολυπλοκότητα της βλάβης στο αγγείο, ο αριθμός των αποφραγμένων αγγείων, η ανατομία του αγγείου (ελικώσεις) αλλά και οι σπασμοί που ενίοτε δημιουργούνται αποτελούν παράγοντες που αυξάνουν την δόση στον ασθενή και κατα συνέπεια το ρίσκο (59).

Αναφορικά με τον ιατρό, η καμπύλη εκμάθησης και κατά συνέπεια η εμπειρία του ιατρού οδηγεί στην σκόπιμη χρήση της ακτινοσκόπησης με χαμηλό ρυθμό δόσης στην χρήση του χρόνου ακτινοσκόπησης με φειδώ αλλά και στην επιλεκτική λήψη των απαιτούμενων προβολών. Ακόμη, ο κίνδυνος δικαιολογείται όταν οι επεμβατικές πράξεις που πραγματοποιούνται είναι ευεργετικές και αναγκαίες ως προς τους ασθενείς. Επίσης σημαντική είναι η τήρηση των καθορισμένων μέτρων και κανόνων ακτινοπροστασίας και για το ίδιο το προσωπικό, όπως ο χρόνος, η απόσταση και η θωράκιση καθώς και η προστασία του προσωπικού με ειδικό κολλάρο θυρεοειδούς, γυαλιά και ακτινοπροστατευτική ποδιά (59).

Τέλος, ο κίνδυνος σε ένα αιμοδυναμικό εργαστήριο εξαρτάται από την ένταση της ακτινοβολίας, τη μεγέθυνση, αλλά και το επίπεδο αντίθεσης που χρησιμοποιείται. Συνήθως χρησιμοποιείται χαμηλό (low) επίπεδο αντίθεσης από τους ιατρούς, που ανάλογα με τη μεγέθυνση αντιστοιχεί σε συγκεκριμένο ρυθμό ακτινοβολίας. Για παράδειγμα, ασθενείς με φυσιολογικό δείκτη μάζα σώματος και μέτριο επίπεδο αντίθεσης, ο ρυθμός δόσης είναι 15-45 mGy/min, ενώ για υψηλό επίπεδο αντίθεσης ο ρυθμός δόσης είναι 50-150 mGy/min (20).

### **3.4 Εύρος δόσεων σε ένα αιμοδυναμικό εργαστήριο και όρια δόσεων**

Στο πλαίσιο της βελτιστοποίησης της ακτινοπροστασίας του ασθενούς εφαρμόζονται διαγνωστικά επίπεδα αναφοράς (ΔΕΑ) που έχουν συμβουλευτικό ρόλο. Τα επίπεδα αυτά δε θα πρέπει να υπερβαίνονται όταν εφαρμόζεται μια ορθή και κανονική πρακτική κατά τις τυποποιημένες εξετάσεις. Τα επίπεδα αυτά αναφοράς καθορίζονται σε εθνικό επίπεδο με βάση τις υπάρχουσες εφαρμοζόμενες πρακτικές για κάθε εξέταση. Για τις ακτινοσκοπικά καθοδηγούμενες επεμβάσεις, τα ΔΕΑ θα μπορούσαν

να χρησιμεύσουν για τη βελτιστοποίηση των δόσεων της ακτινοβολίας του ασθενούς με απώτερο σκοπό την αποφυγή των στοχαστικών κινδύνων της ακτινοβολίας (61). Τα μεγέθη που έχουν χρησιμοποιηθεί για την θέσπιση για την επεμβατική καρδιολογία είναι η τιμή του DAP και η τιμή του χρόνου ακτινοσκόπησης. Στον **πίνακα 3.4** παρατίθενται τα εθνικά ΔΕΑ για τις επεμβατικές καρδιολογικές πράξεις (20) ενώ στον **πίνακα 3.5** παρουσιάζεται το εκτιμώμενο εύρος ενεργών δόσεων από αιμοδυναμικές πράξεις (28).

**Πίνακας 3.5 Εθνικά ΔΕΑ για τις επεμβατικές καρδιολογικές πράξεις**

Διαδικασία	Χρόνος ακτινοσκόπησης	DAP (Gy·cm <sup>2</sup> )
Στεφανιογραφία	6	53
Αγγειοπλαστική	18	129
Εμφύτευση βηματοδότη	7	36
Κατάλυση με RF	40	146

**Πίνακας 3.5 Εκτιμώμενο εύρος ενεργών δόσεων από αιμοδυναμικές πράξεις**

ΙΑτρική Πράξη	Είδος εξέτασης	Εύρος Ενεργών Δόσεων (mSv)
Επεμβατικές πράξεις	Στεφανιογραφίες, αγγειοπλαστικές κ.α	10-200

Με σκοπό την αποφυγή καθορισμένων αποτελεσμάτων και την βελτιστοποίηση της ακτινοπροστασίας ασθενών και επαγγελματικά εκτιθέμενων για το σύνολο των εφαρμοζομένων πρακτικών, έχουν θεσπιστεί όρια δόσεων που είναι διαφορετικά για τις δύο αυτές ομάδες. Τα όρια ετήσιας ενεργού δόσης και ισοδύναμης δόσης για συγκεκριμένα όργανα παρουσιάζονται στον **πίνακα 3.6** για τους επαγγελματικά εκτιθέμενους και το κοινό (28, 62).

**Πίνακας 3.6 Ετήσια όρια δόσεων για τους επαγγελματικά εκτιθέμενους και το κοινό στην επεμβατική καρδιολογία**

Ετήσια Ενεργός Δόση	20 mSv/έτος	1 mSv/έτος
Περιοχή	Μέγιστη ετήσια δόση (mSv) για επαγγελματικά εκτιθέμενους	Μέγιστη ετήσια δόση (mSv) για το κοινό
Φακοί ματιών	20	15
Δέρμα	500	50

### 3.5 Επιδημιολογικά δεδομένα

Σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία, έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες οι οποίες συμπεριλαμβάνουν ασθενείς που δεν είχαν διαγνωστεί με καρκίνο και οι οποίοι υποβλήθηκαν σε διάφορες ακτινοδιαγνωστικές εξετάσεις (όπως αξονική τομογραφία κλπ). Στις μελέτες αυτές γινόταν υπολογισμός της απορροφούμενης δόσης στην περιοχή ακτινοβολήσης ενώ παράλληλα γίνονταν υπολογισμός του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου από την πράξη αυτή (5, 7, 11).

Οι επιδημιολογικές μελέτες τονίζουν ότι υπάρχει αυξημένος κίνδυνος καρκινογένεσης μετά από έκθεση του πληθυσμού σε φάσμα δόσεων από 10 έως 100 mSv όπως αυτές που λαμβάνουν ασθενείς κατά τις αιμοδυναμικές πράξεις ή ασθενείς που υποβάλλονται σε υπολογιστικές τομογραφίες (1-10). Περισσότερες πληροφορίες χρειάζονται ειδικότερα σε χαμηλές δόσεις (<100mSv). Θεωρητικά, τέτοιου είδους μελέτες είναι αναγκαίες και αποτελούν πρόκληση στην επιστημονική κοινότητα, αφού ο κίνδυνος θανάτου από έκθεση σε μία αξονική στεφανιογραφία εκτιμάται να είναι 1 στα 1000 ενώ περίπου το 40% του πληθυσμού θα εμφάνιζε κάποια μορφή καρκίνου και το 20% αυτού του πληθυσμού θα πέθαινε από τον καρκίνο αυτό (12).

Βασιζόμενοι, στην επίδραση που παρατηρήθηκε μετά από υψηλές δόσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας, εκτιμήθηκε ότι η αύξηση του ποσοστού εμφάνισης καρκίνου ανέρχεται στα 0,005%/ mSv (63). Ο Mark J. Eisenberg και οι συνεργάτες του μελέτησαν από το 1996 έως το 2006, 82.861 ασθενείς που δεν είχαν ιστορικό καρκίνου, οι οποίοι

έπαθαν οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και υποβλήθηκαν τουλάχιστον μία φορά σε απεικόνιση καρδιάς ή σε θεραπευτική διαδικασία λαμβάνοντας χαμηλές δόσεις ακτινοβολίας. Το αποτέλεσμα της μελέτης αυτής ήταν 12.020 περιστατικά να διαγνωστούν με καρκίνο κατά την διάρκεια της παρακολούθησης του δείγματος. Υπήρχε μία δοδο-εξαρτώμενη σχέση ανάμεσα στην έκθεση από ακτινοβολία λόγω καρδιολογικών εξετάσεων και τον μεταγενέστερο κίνδυνο για καρκίνο. Για κάθε 10 mSv χαμηλής δόσης ιοντίζουσας ακτινοβολίας, υπήρχε 3% αύξηση κινδύνου για καρκίνο για το χρονικό διάστημα 5 ετών παρακολούθησης του δείγματος (64).

Έως τώρα λαμβάνεται υπόψη η ενεργός δόση, το φύλο και η ηλικία των ασθενών κατά την διάρκεια της έκθεσης, αλλά σύμφωνα με την αναφορά BEIR VII (28) για το γραμμικό χωρίς κατώφλι μοντέλο, έχουν γίνει οι απαραίτητοι υπολογισμοί για την εκτίμηση του κινδύνου για εμφάνιση καρκίνου καθώς και για θνησιμότητα από καρκίνο σε ασθενείς που υποβάλλονταν σε αιμοδυναμικές πράξεις. Κατά αυτό τον τρόπο συσχετίστηκε ο αυξημένος κίνδυνος καρκίνου και η θνησιμότητα από αυτόν σε συνάρτηση με την δόση. Ωστόσο, σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες, η μελέτη της επίδρασης των χαμηλών δόσεων εμποδίζεται από την περιορισμένη στατιστική δύναμη που έχει στα επίπεδα κάτω από τα 100 mSv (12, 28, 32) και έτσι δεν είναι ακριβής η συσχέτιση της πιθανότητας εμφάνισης καρκίνου μετά από έκθεση σε χαμηλές δόσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας.

Εναλλακτικά, η συσχέτιση αυτή θα μπορούσε να υποστηριχθεί βάσει κατανόησης του μηχανισμού καρκινογένεσης με ραδιοβιολογικά πειραματικά δεδομένα, διερευνώντας κατά πόσο οι χαμηλές δόσεις μπορούν να ενεργοποιήσουν το μηχανισμό αυτό. Ωστόσο, η επίδραση των χαμηλών δόσεων και συγκεκριμένα ο κίνδυνος καρκινογένεσης σε ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοδυναμικές πράξεις (στεφανιογραφία, αγγειοπλαστική των στεφανιαίων και των πνευμονικών αρτηριών καθώς και διαδερμική αντικατάσταση αορτικής βαλβίδας), καθώς και σε επεμβατικούς καρδιολόγους δεν είναι απόλυτα γνωστή (65 - 67).

### **3.6 Ραδιοβιολογικά δεδομένα**

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι με την βοήθεια διαφόρων κυτταρογενετικών αλλά και ευαίσθητων μοριακών τεχνικών έχει επιτευχθεί η ανίχνευση δίκλωνων θραύσεων στο DNA και χρωμοσωματικές αλλοιώσεις μετά από έκθεση των ασθενών σε ακτινοδιαγνωστικές εξετάσεις και γενικότερα σε χαμηλές δόσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι ερευνητικές μελέτες οι οποίες

συμπεριλαμβάνουν ασθενείς που υποβάλλονται είτε σε αξονική τομογραφία, είτε σε διάφορες αιμοδυναμικές πράξεις (στεφανιογραφία, αγγειοπλαστική κλπ) καταδεικνύοντας πως μετά την έκθεση αυτών σε χαμηλές δόσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας, ανευρέθησαν χρωμοσωματικές αλλοιώσεις και βλάβες στο DNA (68-77). Όπως αναφέρθηκε ήδη, δεν έχει αποσαφηνιστεί αν οι βλάβες αυτές τελικά είναι δυνατόν να προκαλέσουν εμφάνιση καρκίνου. Σύμφωνα με την έκθεση BEIR VII και τη διεθνή βιβλιογραφία, έχει γίνει υπολογισμός του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου αλλά και της θνησιμότητας από καρκίνο ύστερα από έκθεση παιδιατρικών περιστατικών σε αιμοδυναμικές πράξεις, βάσει και πάλι της ηλικίας των ασθενών, του φύλου και των ευρημάτων από την μέθοδο της φωσφορυλιωμένης ιστόνης. Σημαντικό ακόμη είναι να σημειωθεί πως μελέτες δείχνουν ότι οι μη επιδιορθωμένες βλάβες στο DNA είναι δυνατόν να επάγουν ασύμμετρες κυτταρικές διαιρέσεις, ανευπλοειδία και γενωμική αστάθεια που αποτελεί έναν τους κύριους μηχανισμούς έναρξης καρκινογένεσης κάτι που μπορεί να ανιχνευτεί χρησιμοποιώντας την πρόσφατα δημοσιευμένη μεθοδολογία της cytochalasin-B mediated iFISH (78): Η CB-iFISH συνδυάζει την μέθοδο της αναστολής της κυτταροκίνησης με την χρήση φθορίζοντων ιχνηθετών που προσδέονται αποκλειστικά στο κεντρομερίδιο που περιέχεται στον μικροπυρήνα. Αυτή η τεχνική, με την απεικόνιση των κεντρομεριδιακών περιοχών στους μικροπυρήνες, επιτρέπει την ανίχνευση ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων. Η ύπαρξη του κινδύνου καρκινογένεσης στην περιοχή των χαμηλών δόσεων, στην περιοχή δηλαδή των επεμβατικών καρδιολογικών πράξεων, δεν μπορεί να επιβεβαιωθεί με επιδημιολογικά δεδομένα, παρά μόνο με ραδιοβιολογικά δεδομένα και πειραματικά αποτελέσματα τα οποία μπορούν να προσφέρουν πολύτιμες πληροφορίες για τις σχέσεις δόσης ακτινοβολίας βιολογικού αποτελέσματος (3, 28, 32).

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

### 1.1 Καθορισμός ερευνητικού έργου βάσει των κυτταρογενετικών τεχνικών

Έως σήμερα, δεν είναι πλήρως διευκρινισμένη η επίδραση των χαμηλών δόσεων ακτινοβολίας που πολύ συχνά λαμβάνουν ασθενείς για ιατρικούς σκοπούς, όπως στον τομέα της επεμβατικής καρδιολογίας. Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η διερεύνηση της επίδρασης των χαμηλών δόσεων ιοντίζουσας ακτινοβολίας σε μοριακό, χρωμοσωματικό και κυτταρικό επίπεδο, σε σχέση με την πιθανότητα ενεργοποίησης του μηχανισμού καρκινογένεσης. Ο πειραματικός σχεδιασμός επικεντρώνεται στη μελέτη επαγωγής και επιδιόρθωσης βλαβών στο DNA μέσω της φωσφορυλίωσης της ιστόνης  $\gamma$ -H2AX και τη δημιουργία χρωμοσωματικών αλλοιώσεων, μικροπυρήνων και ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων με πιθανό επακόλουθο τη «χρωμοθρύψη» και την τυχαία αναδιάταξη του γενετικού υλικού. Συγκεκριμένα, διερευνάται η υπόθεση κατά πόσο η έκθεση σε χαμηλές δόσεις είναι δυνατόν να επάγει ασύμμετρες κυτταρικές διαιρέσεις και να ενεργοποιήσει το μηχανισμό «χρωμοθρύψης», ανευπλοειδίας και γενικά γενωμικής αστάθειας. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με δείγματα περιφερικού αίματος από εκτιθέμενους όπως είναι οι ασθενείς σε χαμηλές δόσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας από προγραμματισμένες ιατρικές πράξεις στο Αιμοδυναμικό Εργαστήριο του Ωνασείου Καρδιοχειρουργικού Κέντρου (ΩΚΚ) τα οποία στη συνέχεια μεταφέρθηκαν, επεξεργάστηκαν και αναλύθηκαν στο Εργαστήριο Υγειοφυσικής, Ραδιοβιολογίας και Κυτταρογενετικής του Εθνικού Κέντρου Έρευνας των Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος».

### 1.2 Ανάπτυξη της πρότασης και Μεθοδολογία

#### Ασθενείς:

Σε αυτή τη μελέτη συμπεριλήφθηκαν 30 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε επεμβατική ή διαγνωστική πράξη στο Αιμοδυναμικό Εργαστήριο (στεφανιογραφία, αγγειοπλαστική, ablation) με την γραπτή συγκατάθεσή τους αφού ελήφθη δείγμα αίματος πριν και μετά την επεμβατική πράξη. Καταγράφησαν όλα τα σωματομετρικά χαρακτηριστικά, οι συνήθειες (κάπνισμα, αλκοόλ), το ιστορικό έκθεσης σε ακτινοβολία στο πρόσφατο παρελθόν. Μελετήθηκαν και καταγράφηκαν επίσης οι διάφορες ακτινολογικές παράμετροι που διέπουν τις διαγνωστικές ή και επεμβατικές

πράξεις στο Αιμοδυναμικό Εργαστήριο, όπως τα DAP, ο χρόνος ακτινοσκόπησης (fluoroscopy time) και στη συνέχεια υπολογίστηκε η ενεργός δόση.

Το πρωτόκολλο έλαβε έγκριση το 2018 από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Ιατρική Σχολή, Εργαστήριο Ιατρικής Φυσικής.

Το πειραματικό μέρος του έργου υλοποιήθηκε στο Εργαστήριο Υγειοφυσικής, Ραδιοβιολογίας & Κυτταρογενετικής (ΕΥΡΚ) του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος».

### **Κριτήρια καταλληλότητας των ασθενών για ένταξη στη μελέτη**

#### **Κριτήρια εισαγωγής**

- Ασθενείς που πρόκειται να υποβληθούν σε διαγνωστική ή επεμβατική πράξη στο Αιμοδυναμικό Εργαστήριο.
- Ενήλικοι ασθενείς (ηλικία > 18 ετών), ανεξαρτήτως φύλου.
- Άτομα που μπορούν να διαβάσουν και να κατανοήσουν το Έντυπο Πληροφόρησης Ασθενούς.
- Άτομα που έχουν υπογράψει το Έντυπο Συγκατάθεσης Ασθενούς μετά από ενδελεχή πληροφόρηση.

#### **Κριτήρια αποκλεισμού**

- Άτομα που δεν επιθυμούν να υπογράψουν το έντυπο συγκατάθεσης.
- Άτομα που πρόκειται να υποβληθούν σε πρωτογενή αγγειοπλαστική για τη θεραπεία οξέως εμφράγματος του μυοκαρδίου.
- Καρκινοπαθείς που έχουν υποβληθεί σε ακτινοβολίες ή λαμβάνουν χημειοθεραπεία.
- Ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε σπινθηρογράφημα τον τελευταίο μήνα.
- Ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε αξονική τομογραφία τον τελευταίο μήνα.



- Ασθενείς που έχουν υποβληθεί ξανά σε αιμοδυναμική πράξη τον τελευταίο μήνα.
- Ασθενείς με ιστορικό λευχαιμίας ή λεμφώματος.

### 1.3 Περιγραφή της μελέτης

Δείγμα αίματος λήφθηκε από τους ασθενείς πριν και αμέσως μετά την επέμβαση-εξέταση και μοιράστηκε σε 4 σωληνάρια με ηπαρίνη (όγκου ~4 ml). Δυο από αυτά τα σωληνάρια (1 πριν και 1 μετά την επέμβαση) φυλάχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για την ανάλυση των χρωμοσωματικών αλλοιώσεων αλλά και μικροπυρήνων. Τα άλλα δύο (ένα πριν και ένα μετά) μετά από 30 min φυλάχθηκαν σε θερμοκρασία 0 °C καθώς έχει αποδειχθεί ότι αυτό μπορεί να εμποδίσει τη δράση των επιδιορθωτικών μηχανισμών (75). Έτσι τα δύο αυτά σωληνάρια χρησιμοποιήθηκαν για ανάλυση και εκτίμηση των δίκλωνων θραύσεων του DNA μέσω των εστιών γ-H2AX, καθώς επίσης και για την μελέτη επιδιόρθωσης των πιθανών δίκλωνων θραύσεων μετά από 24 ώρες από την in vivo έκθεση των ασθενών. Ακολούθησε άμεση μεταφορά των δειγμάτων περιφερικού αίματος στο Εργαστήριο του ΕΚΕΦΕ «Δ», έγινε κατ' αρχάς η καλλιέργεια των δειγμάτων, αυτών σε θερμοκρασία δωματίου για 48 ώρες ώστε να αναλυθούν οι χρωμοσωματικές αλλοιώσεις στη μετάφαση. Στα άλλα δείγματα απομονώθηκαν τα λεμφοκύτταρα από το περιφερικό αίμα για να ακολουθήσει η επεξεργασία τους με τη μέθοδο ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση των εστιών γ-H2AX. Επιπλέον, το ένα από τα φιαλίδια με δείγμα αίματος πριν την έκθεση του κάθε ασθενούς ακτινοβολήθηκε στο εργαστήριο με δόση 1Gy γ ακτινοβολίας (Co-60 Gamma Cell 220 irradiator, Atomic Energy of Canada Ltd, Ottawa, Canada) στο ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» έτσι ώστε να μπορέσει να γίνει σύγκριση αναφορικά με το πλήθος των εστιών γ-H2AX που ανιχνεύθηκαν πριν και μετά την έκθεση ασθενούς καθώς και με την in-vitro ακτινοβόληση. Παρόμοιο πρωτόκολλο πραγματοποιήθηκε για τη διαδικασία της αναστολής της κυτταροκίνησης με 72 ώρες καλλιέργειας των κυττάρων και σύγκριση των ανιχνευθέντων μικροπυρήνων πριν την έκθεση του κάθε ασθενή στην ακτινοβολία, μετά την έκθεση του και μετά από in vitro ακτινοβόληση του κάθε δείγματος με 1 Gy.

Παράλληλα, στο εργαστήριο ακτινοβολήθηκε με χαμηλή (~50mSv) και υψηλή δόση ιοντίζουσας ακτινοβολίας (~1Gy) δείγμα αίματος από 5 τυχαίους δότες για την ανίχνευση ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων με την χρήση αναστολής της

κυτταροκίνησης σε συνδυασμό με την τεχνική μοριακής γενετικής νέας τεχνολογίας όπως η τεχνική FISH. Μελετήθηκε και αναλύθηκε το δείγμα αίματος με αυτή την τεχνική σε δύο διαφορετικά χρονικά σημεία: 44 και 72 ώρες μετά την ακτινοβολήση όπου προστέθηκε η κυτταροχλασίνη-B ενώ διακόπηκαν οι καλλιέργειες στις 72 και 96 ώρες. Επιπλέον δείγμα ακτινοβολήθηκε στο εργαστήριο στις ίδιες δόσεις για την πιθανή ανίχνευση χρωμοθρύψης 96 και 120 ώρες μετά από την έναρξη της κυτταροκαλλιέργειας.

#### **1.4 Κυτταρογενετική ανάλυση**

Η κυτταρογενετική ανάλυση περιλαμβάνει την καλλιέργεια του περιφερικού αίματος, τη μονιμοποίηση, τη χρώση, την ανάλυση στο οπτικό μικροσκόπιο και την καταγραφή των δεδομένων ανάλυσης.

Αρχικά επιλέχθηκε το μέσο στο οποίο έγινε η καλλιέργεια. Πρέπει να είναι ορός εμβρύου μόσχου (FBS) ή ανθρώπου AB. Η καλλιέργεια για χρωμοσωματική ανάλυση έγινε για 48 ώρες σε αποστειρωμένα πλαστικά ή γυάλινα δοχεία σε θερμοκρασία  $37.0 \pm 0.5$  °C.

Το δείγμα αίματος τοποθετήθηκε σε θρεπτικό υλικό RPMI 1640. Αυτό εμπλουτίζεται με 10% ορό FBS, 1% γλουταμίνη και 1% P.S. (πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη και αντιβιοτικά). Το PHA (2% φυτοαιμογλουτινίνη) που προστέθηκε στο δείγμα αίματος ωθεί τα κύτταρα να εισέλθουν στον κύκλο τους, ενώ χωρίς αυτό παραμένουν στάσιμα. Η καλλιέργεια έγινε σε κλίβανο, σε θερμοκρασία 37 °C με 5% CO<sub>2</sub>. Ο κύκλος ξεκίνησε σε 24 ώρες, ενώ ολοκληρώθηκε η πρώτη μετάφαση. Μετά από τις πρώτες 48 ώρες, προστέθηκε 50 μl colcemid και τα δείγματα μπήκαν στον κλίβανο για 3 ώρες (37, 41).

Το colcemid αποδιοργανώνει την άτρακτο του πυρήνα και έτσι τα κύτταρα σταματούν στη φάση της μετάφασης, όπου τα χρωμοσώματα έχουν το μεγαλύτερο βαθμό συσπείρωσης και γίνονται διακριτά στο οπτικό μικροσκόπιο.

#### **Μονιμοποίηση**

Στη συνέχεια, έγινε φυγοκέντρηση 1300 στροφές για 10 min. Στα φιαλίδια προστέθηκε KCl (υπότονο διάλυμα 75mM) ώστε να προκληθεί διόγκωση και διαρραγή των κυττάρων. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα φιαλίδια, στις 1300 στροφές για 10 min. Στη συνέχεια προστέθηκε μονιμοποιητικό (fixative) μεθανόλη

και οξικό οξύ σε αναλογία 3:1 και ακολούθησε νέα φυγοκέντρωση. Η διαδικασία επαναλήφθηκε μέχρι να δημιουργηθεί καλή συγκέντρωση μεταφάσεων. Στα αντικειμενοφόρα πλακίδια επιστρώθηκε το δείγμα σε ποσότητα περίπου 15 ml (2 σταγόνες) (38, 79).

### **Χρώση**

Χρησιμοποιήθηκε χρώση φωσφορισμού και 2% Giemsa καθώς αυτό επιτρέπει την ανάλυση στο πρώτο στάδιο κυτταρικής διαίρεσης. Τα αντικειμενοφόρα πλακίδια μπήκαν στο δοχείο που περιέχει τη χρωστική ουσία για 10 min. Για αυτή τη διαδικασία προστέθηκε SORENSEN μέχρι την οριακή γραμμή ενώ εγχύθηκαν 2.5 ml χρωστικής ουσίας. Τα αντικειμενοφόρα πλακίδια στέγνωσαν και καλύφθηκαν με κόλλα και στο τέλος τοποθετήθηκαν οι καλυπτρίδες πριν την παρατήρηση στο μικροσκόπιο (28, 79).

### **Ανάλυση στο μικροσκόπιο**

Η ανάλυση των χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων στο εργαστήριο έγινε σε μικροσκόπιο (AxioPlan 2, Carl Zeiss Microscope GmbH, Hamburg, Germany) αρχικά σε μεγέθυνση x100 ή x200, ενώ η ακριβής ανάλυση με μεγέθυνση x1000 ή x2000. Η εύρεση και εκτίμηση των χρωμοσωμικών αλλοιώσεων έγινε με τη βοήθεια του υπολογιστικού συστήματος επεξεργασίας εικόνας IKAROS (Metasystems). Το σύστημα αυτό επιτρέπει την πλήρη ανάλυση καρυότυπου στην οθόνη υπολογιστή. Με τον τρόπο αυτό, αποφεύγεται η εξαιρετικά χρονοβόρα διαδικασία φωτογράφισης καθώς και το κόψιμο και κόλλημα χρωμοσωμάτων και έτσι, η καρυοτυπική ανάλυση γίνεται σε πολύ μικρότερο χρόνο. Επίσης, με την ψηφιοποίηση της εικόνας που λήφθηκε από το μικροσκόπιο είναι δυνατή η επεξεργασία της και η βελτίωση της ποιότητάς της. Συγκεκριμένα, η σαφήνεια και η αντίθεση στην εικόνα (κυρίως η ζώνωση των χρωμοσωμάτων) ρυθμίστηκαν κάθε φορά από κατάλληλες παραμέτρους (filtering power image capture, contrast enhancement after capture, individual contrast enhancement, κ.ά.) μέσω ψηφιακού φίλτρου ή ψηφιακού επεξεργαστή εικόνας. Στην παρούσα μελέτη αναλύθηκαν στο μικροσκόπιο 1000 μεταφάσεις για κάθε χρονικό σημείο του ασθενούς, δηλαδή πριν την έκθεση και μετά την έκθεση του ασθενούς κατά την αιμοδυναμική πράξη.

## 1.5 Ανάλυση βλαβών DNA

Περιλαμβάνει απομόνωση λεμφοκυττάρων, μονιμοποίηση, χρήση ειδικών αντισωμάτων, εναπόθεση ανοσοφθορίζουσών ουσιών και ανίχνευση  $\gamma$ -H2AX εστιών στο μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού. Τα δείγματα που μεταφέρθηκαν στον πάγο, τοποθετήθηκαν στο εργαστήριο σε επωαστικό κλίβανο για 30 min. Ωστόσο όγκος μερικών ml αίματος του ασθενή που λήφθηκαν πριν την έκθεσή του ακτινοβολήθηκαν με δόση 1Gy στο εργαστήριο. Από το περιφερικό αίμα απομονώθηκαν τα λεμφοκύτταρα τα οποία υπέστην την κατάλληλη επεξεργασία ανοσοφθορισμού. Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα για την φωσφοριλιωμένη  $\gamma$ -H2AX ιστόνη και οι εστίες  $\gamma$ -H2AX ( $\gamma$ -H2AX foci) ανιχνεύθηκαν και καταμετρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού. Συγκεκριμένα έγινε απομόνωση λεμφοκυττάρων με τη βοήθεια της φικόλης (Biocoll Separating Solution) σε αναλογία 1:1. Σε 4 ml φικόλης προστέθηκαν 4 ml περιφερικό αίμα και έπειτα έγινε η 1<sup>η</sup> φυγοκέντρηση στις 1850 στροφές για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια πιπέτας, έγινε απομόνωση των λεμφοκυττάρων και έκπλυση αυτών με τη βοήθεια θρεπτικού υλικού RPMI. Ακολούθησε 2<sup>η</sup> φυγοκέντρηση στις 1500 στροφές για 15 λεπτά ενώ μετά προστέθηκε KCL (υπότονο διάλυμα) και ξανά πραγματοποιήθηκε 3<sup>η</sup> φυγοκέντρηση στις 1500 στροφές για 15 λεπτά. Ύστερα έγινε στρώση των κυττάρων σε αντικειμενοφόρες πλάκες οι οποίες τοποθετήθηκαν στα cytospin, δηλαδή σε ειδικούς υποδοχείς για 4<sup>η</sup> φυγοκέντρηση με 800 στροφές για 4 λεπτά. Σε φορμαλδεΰδη 4% τοποθετήθηκαν οι αντικειμενοφόρες πλάκες για 20 λεπτά ενώ έπειτα έγινε ξέπλυμα με αλατούχα διαλύματα όπως το PBS και TritonX 0,25%. Για την παρασκευή 200 ml διαλύματος TritonX 0.25%, λήφθηκε 50 ml διαλύματος TritonX 1% και προστέθηκε 150 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών PBS. Μετά το ξέπλυμα, ακολούθησε το λεγόμενο blocking solution για 1 ώρα, ένα διάλυμα φτιαγμένο από 10% BSA, 6% FBS και 0,02% TritonX. Για την παρασκευή 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών PBS προστέθηκε 6 ml διαλύματος FBS και 2 ml διαλύματος TritonX 1%. Έπειτα, στις αντικειμενοφόρες πλάκες χρησιμοποιήθηκε 1 μl από το πρωτεύον αντίσωμα κουνελιού  $\gamma$ -H2AX αραιωμένο σε 1 ml διαλύματος blocking (rabbit 1:1000, Cat: NB100-79967, Novus Biologicals, Abingdon, UK) και παρέμειναν σε αυτό για τουλάχιστον 1 ώρα. Έπειτα χρησιμοποιήθηκε 1 μl από το δευτερεύον αντίσωμα ροδαμίνης αραιωμένο σε 4 ml διαλύματος blocking (Rhodamine Red-X anti-rabbit, 1:4000, Cat: R6394, Life Technologies) και παρέμειναν οι αντικειμενοφόρες πλάκες σε αυτό για μισή ώρα. Τέλος, τοποθετήθηκαν οι

αντικειμενοφόρες πλάκες σε εθανόλη 100% και αφού στέγνωσαν προστέθηκαν DAPI (φθορίζουσα ουσία) και καλυπτρίδες. Στην μελέτη αυτή αναλύθηκαν 200 κύτταρα για κάθε χρονικό σημείο, δηλαδή πριν την έκθεση του ασθενούς, μετά την έκθεση του ασθενούς, μετά από ακτινοβολία στο εργαστήριο με 1 Gy και 24 ώρες μετά την έκθεση για έλεγχο επιδιόρθωσης το οποίο αφορούσε μετά από την αιμοδυναμική πράξη αλλά και μετά από την in vitro ακτινοβολία (79).

### **1.6 Μέθοδος αναστολής της κυτταροκίνησης**

Περιλαμβάνει τη καλλιέργεια του αίματος, την μονιμοποίηση, χρώση με Giemsa, την ανάλυση στο μικροσκόπιο και την καταγραφή των δεδομένων. Η καλλιέργεια του αίματος ξεκίνησε με εναπόθεση κατάλληλου θρεπτικού υλικού καθώς και PHA (2% φυτοαιμαγλουτινίνη) έτσι ώστε τα κύτταρα να εισέλθουν στο κύκλο. Ο κύκλος ξεκίνησε σε 24 ώρες και έτσι στις 28 ώρες περίπου προστέθηκε ένας αναστολέας, κυτταροχλασίνη B (15μl), η οποία αναστέλει την κυτταροκίνηση χωρίς να εμποδίζει την διαίρεση του πυρήνα. Η καλλιέργεια ολοκληρώθηκε εντός 72 ωρών όπου έγινε η 1<sup>η</sup> φυγοκέντρηση με 900 στροφές για 10 λεπτά και εναπόθεση KCL (0.14M). Εν συνεχεία, έγινε η 2<sup>η</sup> φυγοκέντρηση με τις ίδιες στροφές για το ίδιο χρονικό διάστημα και έγινε η 1<sup>η</sup> μονιμοποίηση (μεθανόλη, NaCl και οξικό οξύ). Έπειτα, ακολούθησε η 3<sup>η</sup> φυγοκέντρηση, η 2<sup>η</sup> μονιμοποίηση (μεθανόλη, οξικό-οξύ σε αναλογία 4:1). Τέλος, πραγματοποιήθηκε 4<sup>η</sup> φυγοκέντρηση, στρώσιμο των κυττάρων σε αντικειμενοφόρες πλάκες και χρώση με Giemsa για 12 λεπτά. Στην μελέτη αναλύθηκαν στο μικροσκόπιο 1000 κύτταρα για κάθε χρονικό σημείο δηλαδή πριν την έκθεση του ασθενούς, μετά την έκθεση του ασθενούς και μετά από ακτινοβολία στο εργαστήριο με 1 Gy (81).

### **1.7 Ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση με την μέθοδο αναστολής της κυτταροκίνησης και την FISH**

Για την μελέτη ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων σε λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος πραγματοποιήθηκε συνδυασμός της μεθόδου μικροπυρήνων με FISH. Στη παρούσα μελέτη ελήφθη δείγμα περιφερικού αίματος από 5 διαφορετικούς δότες όπου μέρος από αυτό δεν ακτινοβολήθηκε ώστε να χρησιμοποιηθεί ως μάρτυρας (control), άλλο μέρος ακτινοβολήθηκε στο εργαστήριο με χαμηλή δόση περί τα 50 mGy και ένα άλλο μέρος ακτινοβολήθηκε με υψηλή δόση με 2 Gy ως θετικό control.

Ακολούθησε το πρωτόκολλο των μικροπυρήνων με δύο διαφορετικά χρονικά σημεία εναπόθεσης του αναστολέα της κυτταροχλασίνης B στις 44 και 72 ώρες από την έναρξη της καλλιέργειας. Στη συνέχεια, ολοκληρώθηκε η διαδικασία με την 1<sup>η</sup> φυγοκέντρωση στις 72 ώρες (πρώτο χρονικό σημείο) και στις 96 ώρες (για το τελευταίο χρονικό σημείο) από την έναρξη της καλλιέργειας ώστε τα κύτταρα να έχουν ολοκληρώσει τον 2<sup>ο</sup> και 3<sup>ο</sup> κύκλο. Μετά την ολοκλήρωση της μεθόδου των μικροπυρήνων, έγινε επίστρωση του υλικού σε αντικειμενοφόρες πλάκες αλλά και του κατάλληλου ιχνηθέτη. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε 5 μl από το διάλυμα του ιχνηθέτη (probe) ο οποίος περιελάμβανε ήδη το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) για κάθε πλακίδιο και από πάνω τοποθετήθηκε καλυπτρίδα διαστάσεων 22x22 mm. Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν 2 είδη ιχνηθετών της εταιρείας Vysis: CEP 15 και CEP 6 για περιοχή σύνδεσης του ιχνηθέτη με το κεντρομερίδιο χρωμοσώματος 15 και 6 και χρώμα του σήματος πράσινο. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες στεγανοποιήθηκαν με προσθήκη ειδικής κόλλας (cement glue) περιφερικά κάθε καλυπτρίδας. Ακολούθησε θέρμανση των πλακιδίων σε συσκευή επώασης thermobrite για 2 λεπτά στους 75 °C . Επιτεύχθηκε ταυτόχρονη αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων του γενωμικού DNA και των μοριακών ιχνηθετών, ενώ έπειτα έπεσε η θερμοκρασία στους 37 °C όπου τελικά παρέμειναν εκεί όλο το βράδυ έτσι ώστε να γίνει υβριδισμός των συμπληρωματικών μορίων DNA (ιχνηθέτη και DNA στόχου). Κατά το στάδιο της αποδιάταξης πραγματοποιήθηκε ο πλήρης αποχωρισμός των δύο αλυσιδών του DNA και καθίσταντο έτσι ελεύθερη η πρόσβαση των μοριακών ανιχνευτών στο συμπληρωματικό τμήμα του DNA. Παρασκευάστηκε στη συνέχεια 0.4xSSC, όπου αραιώθηκε 1ml 20xSSC με 49ml απεσταγμένο νερό. Έπειτα οι αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετήθηκαν σε διάλυμα 0.4xSSC μέσα σε υδατόλουτρο στους 72 °C για 2 λεπτά. Στη συνέχεια παρασκευάστηκε διάλυμα 2xSSC 0.05% κατά το οποίο 5 ml 20xSSC αραιώθηκε σε 45ml απεσταγμένο νερό και προστέθηκε 25 μl Tween 20. Τοποθετήθηκαν τα πλακίδια σε αυτό το διάλυμα για 30 δευτερόλεπτα. Οι πλύσεις αυτές βοήθησαν την αποφυγή λήψης μη ειδικών σημάτων. Στη συνέχεια τα πλακίδια στέγνωσαν σε σκοτεινό περιβάλλον, προστέθηκε 30 μl DAPI σε κάθε πλακάκι και τέλος τοποθετήθηκε μεγάλη καλυπτρίδα διαστάσεων 24x50 mm. Κατά την ανάλυση στο μικροσκόπιο ανασοφθορισμού, μελετήθηκαν 1000 κύτταρα για κάθε χρονικό σημείο και κάθε δόση ακτινοβολίας. Συγκεκριμένα, λήθηκε δείγμα περιφερικού αίματος από 5 διαφορετικούς δότες όπου μέρος από αυτό δεν ακτινοβολήθηκε ώστε να χρησιμοποιηθεί ως control, άλλο μέρος ακτινοβολήθηκε

στο εργαστήριο με χαμηλή δόση περί τα 50 mGy και ένα άλλο μέρος ακτινοβολήθηκε με υψηλή δόση με 2 Gy. Αφού ακολούθησε η παραπάνω διαδικασία, έγινε ανάλυση στις 72 και 96 ώρες μετά την ακτινοβολήση όπου 1000 κύτταρα μελετήθηκαν για κάθε χρονικό σημείο και κάθε δόση ακτινοβολίας, καταγράφηκε η περίσσεια ή απώλεια σήματος του ιχνηθέτη σε κάποιο πυρήνα υποδεικνύοντας την προσθήκη ή την απώλεια της αντίστοιχης χρωμοσωματικής περιοχής για την οποία είναι ειδικός ο συγκεκριμένος ιχνηθέτης (48).

## 1.8 Χρωμοθρύψη

Για την μελέτη ενεργοποίησης του μηχανισμού της χρωμοθρύψης ελήφθη δείγμα περιφερικού αίματος από 3 διαφορετικούς δότες, μέρος από αυτό δεν ακτινοβολήθηκε ώστε να χρησιμοποιηθεί ως control, άλλο μέρος ακτινοβολήθηκε στο εργαστήριο με χαμηλή δόση περί τα 50 mGy. Ακολούθησε το πρωτόκολλο της κλασικής βιοδοσιμετρίας μόνο που είχαμε 2 διαφορετικά χρονικά σημεία που διακόπηκαν οι καλλιέργειες στις 96 και 120 ώρες από την έναρξη της καλλιέργειας. Μετά την ολοκλήρωση της μεθόδου της βιοδοσιμετρίας, έγινε επίστρωση του υλικού σε αντικειμενοφόρες πλάκες, χρώση Giemsa και ανάλυση στο οπτικό μικροσκόπιο. Αναλύθηκαν 5000 μεταφάσεις για κάθε χρονικό σημείο και κάθε δόση (82).

## 1.9 Στατιστική μεθοδολογία

### Στατιστική ανάλυση

Για τις συνεχείς μεταβλητές, προσδιορίστηκαν η μέση τιμή, η τυπική απόκλιση, η διάμεσος και το ενδοτεταρτημοριακό εύρος. Για τις κατηγορικές μεταβλητές, υπολογίστηκαν οι κατανομές συχνοτήτων των κατηγοριών και η εκατοστιαία αναλογία τους επί του συνολικού πληθυσμού της μελέτης.

### Στατιστικές δοκιμασίες

Οι ποσοτικές μεταβλητές εκφράστηκαν ως μέση τιμή  $\pm$  τυπική απόκλιση ενώ παράλληλα παρατέθηκε και η διάμεση τιμή. Η μεταβολή στις συνεχείς μεταβλητές αξιολογήθηκε με τη δοκιμασία Student's t-test για παρατηρήσεις κατά ζεύγη. Η επίδραση ανεξάρτητων μεταβλητών στην τελική έκβαση αξιολογήθηκε με τη χρήση

μοντέλων γραμμικής παλινδρόμησης (linear regression) για τις συνεχείς μεταβλητές έκβασης. Όλοι οι στατιστικοί έλεγχοι ήταν δίπλευροι και τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικά εφόσον η εκτιμώμενη τιμή  $p$  ήταν μικρότερη του 0,05.

### **1.10 Εκτίμηση του δείκτη LAR**

Η εκτίμηση του δείκτη LAR έγινε με τη βοήθεια του μοντέλου BEIR VII (28) και των πινάκων για την εκτίμηση εμφάνισης καρκίνου και για την εκτίμηση θνησιμότητας από τον καρκίνο λόγω της έκθεσης των ασθενών στις χαμηλές δόσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας κατά τις αιμοδυναμικές πράξεις. Συνδυάστηκε η εκτιμώμενη ενεργός δόση των ασθενών με το φύλο, την ηλικία τη στιγμή της έκθεσης και οι δείκτες LAR ανά μονάδα δόσης από τους πίνακες σύμφωνα με την αναφορά του BEIR VII (28) λαμβάνοντας υπόψιν την υπόθεση του γραμμικού χωρίς κατώφλι μοντέλο (LNT). Επιπρόσθετα, αντίστοιχες εκτιμήσεις του δείκτη LAR έγιναν λαμβάνοντας υπόψιν τις παραπάνω παραμέτρους καθώς επίσης τον αριθμό των ακτινοεπαγόμενων  $\gamma$ -H2AX foci ανά κύτταρο που ανιχνεύθηκαν τόσο μετά από τις αιμοδυναμικές πράξεις όσο και μετά την *in vitro* ακτινοβολήση για κάθε δείγμα των ασθενών.



## Κεφάλαιο 2: Αποτελέσματα

### 2.1 Χαρακτηριστικά ασθενών

Μελετήθηκαν 30 ασθενείς στους οποίους καταγράφηκαν τα σωματομετρικά τους χαρακτηριστικά, η ηλικία, οι καθημερινές τους συνήθειες καθώς και η ενεργός δόση που εκτιμήθηκε ότι δόθηκε κατά τη διάρκεια της αιμοδυναμικής τους πράξης. Έχοντας καταγράψει τις παραμέτρους έκθεσης για κάθε αιμοδυναμική εξέταση των ασθενών, το γινόμενο δόσης επι επιφάνεια (DAP) μετατράπηκε σε ενεργό δόση η οποία ποσοτικοποιεί τον συνολικό κίνδυνο από την ιατρική έκθεση. Ο συντελεστής μετατροπής είχε τιμή 0,26 (60). Το εύρος των ενεργών δόσεων για το δείγμα ασθενών βρέθηκε 1.74 mSv έως 52.52 mSv.

Στους 29 ασθενείς εφαρμόστηκε η κλασική μέθοδος της βιοδοσιμετρίας, στους 22 από τους ασθενείς εφαρμόστηκε η μέθοδος της φωσφορυλιωμένης ιστόνης  $\gamma$ -H2AX για τις βλάβες του DNA, ενώ σε 25 ασθενείς εφαρμόστηκε η μέθοδος της αναστολής της κυτταροκίνησης. Στον **πίνακα 2.1** συνοψίζονται τα χαρακτηριστικά του δείγματος ασθενών καθώς και η κυτταρογενετική μεθοδολογία που εφαρμόστηκε για τον καθένα.

**Πίνακας 2.1** Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών (CA: Στεφανιογραφία, PTCA: Αγγειοπλαστική, BPA: Πνευμονική Αγγειοπλαστική αρτηριών με μπαλόνι)

Ασθενείς	Φύλο	Ηλικία	BMI	Εξέταση	DAP (Gy·cm <sup>2</sup> )	Ενεργός Δόση (mSv)	Χρόνος Ακτινοσκόπησης (min)	Δικεντρική Ανάλυση	Ανάλυση Μικροπυρήνων	$\gamma$ -H2AX Foci
1	Θ	66	22.3	CA+PTC A	21.88	5.688	11	✓	✓	-
2	A	44	32.3	Ablation	91.38	23.75	11.5	✓	✓	✓
3	A	66	29.7	Ablation	202.00	52.52	59.9	✓	✓	✓
4	A	62	30.1	CA+PTC A	20.60	5.36	6	✓	✓	✓
5	A	52	37.7	CA	38.00	9.88	6	✓	✓	✓
6	A	75	29.4	CA	6.71	1.74	0.6	✓	✓	✓
7	A	80	24.5	CA+PTC A	52.30	13.59	16.4	✓	✓	✓
8	A	56	31.0	CA	37.40	9.72	7.4	✓	✓	✓
9	Θ	77	27.3	CA+PTC A	67.00	17.42	10.6	✓	-	✓
10	A	36	29.1	Ablation	43.90	11.41	5.1	✓	-	✓
11	A	69	26.8	Ablation	43.90	11.41	30	✓	-	✓

12	A	29	30.5	CA+PTC A	59.00	15.34	10.1	✓	-	✓
13	A	78	23.5	CA+PTC A	57.04	14.83	15.4	-	-	✓
14	A	71	23.8	CA	12.26	3.19	2.6	✓	✓	✓
15	A	72	35.0	PTCA	52.54	13.66	9.3	✓	✓	✓
16	A	52	34.3	CA+PTC A	195.00	50.70	38.7	✓	✓	✓
17	A	74	32.4	CA+PTC A	64.43	16.75	7.9	✓	✓	✓
18	Θ	56	35.5	CA	14.24	3.70	3.2	✓	✓	✓
19	A	64	26.4	CA+PTC A	55.91	14.54	9.7	✓	✓	✓
20	A	52	26.3	CA+PTC A	77.78	20.22	6	✓	✓	✓
21	A	61	24.2	CA	9.50	2.47	2.6	✓	✓	-
22	A	67	34.7	CA	13.53	3.52	4.7	✓	✓	✓
23	A	82	20.6	CA	22.43	5.83	2.9	✓	✓	✓
24	A	77	26.8	CA+PTC A	81.91	21.29	12.1	✓	✓	✓
25	A	61	36.4	CA	39.45	10.26	14.6	✓	✓	-
26	Θ	51	23.1	BPA	104.54	27.18	49.7	✓	✓	-
27	A	73	28.7	BPA	8.92	2.32	3.9	✓	✓	-
28	Θ	51	23.1	BPA	82.75	21.5	52.6	✓	✓	-
29	Θ	79	27.3	BPA	240.40	62.5	53	✓	✓	-
30	Θ	70	26.4	BPA	174.05	45.25	43.2	✓	✓	-

Η μέση ενεργός δόση για τους 30 ασθενείς ήταν  $17.23 \pm 15.8$  mSv, (διάμεση τιμή: 13.6 mSv, κυμαίνεται από 1,72 έως 62,5 mSv). Η μέση τιμή του BMI ήταν  $28,6 \pm 4,7$  kg/m<sup>2</sup> και η μέση τιμή της ηλικίας ήταν  $63 \pm 13$  έτη.

## 2.2 Αποτελέσματα δικεντρικής ανάλυσης

Σχετικά με την δικεντρική ανάλυση και έχοντας μελετήσει και αναλύσει 1000 μεταφάσεις για κάθε πειραματικό σημείο, παρατηρήθηκε υψηλότερη συχνότητα χρωμοσωματικών αλλοιώσεων (δικεντρικά χρωμοσώματα και δακτύλιοι) σε στατιστικά σημαντικό βαθμό για το σύνολο των ασθενών που εκτέθηκαν σε χαμηλές δόσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας ύστερα από τις αιμοδυναμικές πράξεις, σε σχέση με τη συχνότητα των χρωμοσωματικών αλλοιώσεων πριν από την έκθεσή τους. Συγκεκριμένα, η μέση τιμή των χρωμοσωματικών αλλοιώσεων πριν την έκθεση των ασθενών ήταν  $0.00038 \pm 0.000820$  ανά κύτταρο ενώ μετά την έκθεσή των ασθενών η μέση τιμή ανήλθε στο  $0.00162 \pm 0.00129$  ( $p < 0.001$ , Πίνακας 2.2). Ωστόσο, παρατηρήθηκε πως δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στην συχνότητα των χρωμοσωματικών αλλοιώσεων σε ατομικό επίπεδο ( $p > 0.05$ , Πίνακας 2.2). Εικόνες

από χρωμοσωματικές αλλοιώσεις που ανιχνεύθησαν παρουσιάζονται παρακάτω (Εικόνα 2.1).

**Εικόνα 2.1** Χρησιμοποιώντας χρώση Giemsa, δικεντρικά χρωμοσώματα και δακτύλιοι μπορούν να διακριθούν με ακρίβεια και να καταγραφούν για τους ασθενείς που υπεβλήθησαν σε αιμοδυναμικές πράξεις. Τα τόξα δείχνουν τις χρωμοσωματικές αλλοιώσεις με τα ακεντρικά τους θραύσματα. Στα αριστερά, υπάρχει ένας δακτύλιος με το ακεντρικό του θραύσμα και στα δεξιά υπάρχει ένα δικεντρικό χρωμόσωμα με το ακεντρικό του θραύσμα.

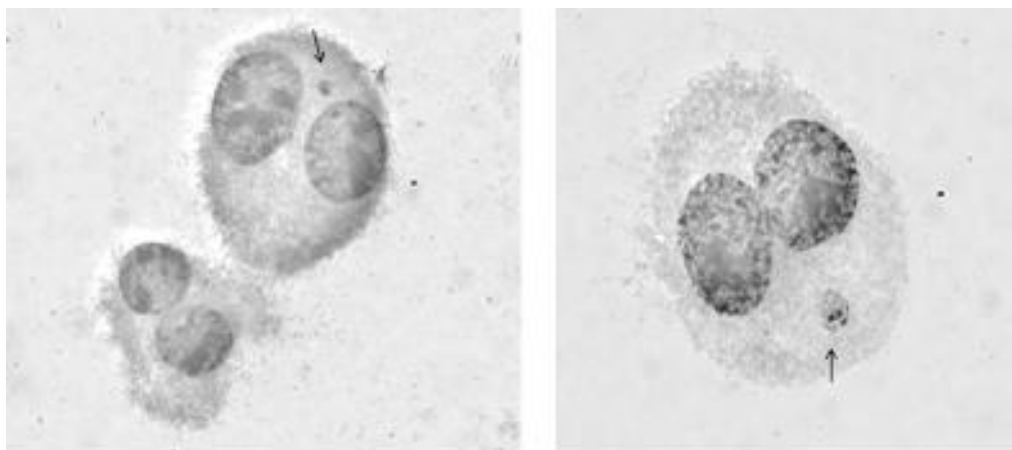


### 2.3 Αποτελέσματα από την μέθοδο αναστολής της κυτταροκίνησης

Οι μικροκυρήνες χρησιμοποιούνται ως δείκτης γονιδιωματικής αστάθειας και πρώιμης καρκινογένεσης αφού η αύξησή τους έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκινογένεσης. Στην παρούσα μελέτη αναλύθηκαν κύτταρα από 25 ασθενείς, εντοπίστηκαν και καταγράφηκαν μικροκυρήνες σύμφωνα με το επίσημο πρωτόκολλο του Fenech, πριν και μετά την έκθεση των ασθενών, καθώς και δείγματα ασθενών που ακτινοβολήθηκαν *in vitro* με 1 Gy. Για να υπολογιστεί η συχνότητα των μικροκυρήνων από 1000 διπύρηνα κύτταρα, καταγράφηκε ο αριθμός των διπύρηνων

κυττάρων που περιείχαν 0, 1, 2, 3, 4+ μικροπυρήνες. Ο αριθμός των μικροπυρήνων σε 1000 διπύρηνα κύτταρα μετά την έκθεση των ασθενών ήταν αυξημένος σε στατιστικά σημαντικό βαθμό για το σύνολο των ασθενών ( $0.020 \pm 0.013$ ), σε σύγκριση με τον αριθμό των μικροπυρήνων που αναλύθηκαν πριν την έκθεσή τους ( $0.008 \pm 0.0033$ ) ( $p < 0.001$ , Πίνακας 2.2, Γράφημα 2.1). Παρατηρήθηκε ακόμη πως μόνο στο 25% των ασθενών υπήρξε στατιστικά σημαντική αύξηση στον αριθμό των μικροπυρήνων μετά την αιμοδυναμική πράξη των ασθενών σε ατομικό επίπεδο ( $p < 0.001$ , Πίνακας 2.2). Εικόνες από τους μικροπυρήνες που ανιχνεύθηκαν μετά από αιμοδυναμικές πράξεις παρουσιάζονται παρακάτω (Εικόνα 2.2).

**Εικόνα 2.2** Με την χρώση Giemsa, μικροπυρήνες ανιχνεύθηκαν και φαίνονται παρακάτω. Τα τόξα δείχνουν τους μικροπυρήνες.

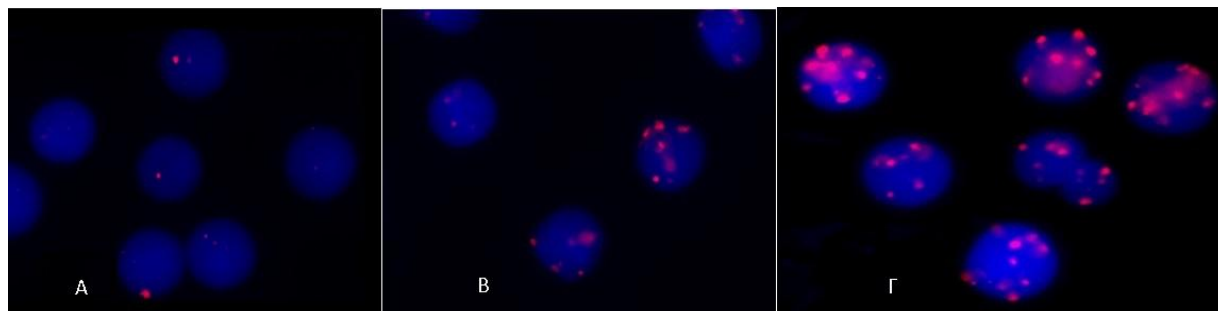


## 2.4 Αποτελέσματα από την μέθοδο της φωσφορυλιωμένης ιστόνης $\gamma$ -H2AX

Εφαρμόστηκε η μέθοδος αυτή σε 22 ασθενείς και στον Πίνακα 2.1 και 2.2 καθώς και στα Γράφημα 2.2 και 2.3 φαίνονται τα αποτελέσματα έχοντας υπολογίσει τη μέση τιμή των foci ανα κύτταρο πριν και μετά την αιμοδυναμική πράξη των ασθενών. Επίσης μελετήθηκε η μέση τιμή των foci των δειγμάτων των ασθενών τα οποία ακτινοβολήθηκαν in vitro με 1 Gy στο εργαστήριο σαν θετικό control. Επιπλέον, κάποια από τα δείγματα των ασθενών μετά την ακτινοδιαγνωστική πράξη καθώς και δείγμα μετά την in vitro ακτινοβολήση, για 24 ώρες παρέμειναν στον κλίβανο μέσα σε ηπαρίνη ώστε να ελεγχθεί η επιδιόρθωση των δίκλωνων θραύσεων στο DNA.

Μελετήθηκαν 200 κύτταρα για κάθε ασθενή σε κάθε περίπτωση. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε και καταγράφηκε ο αριθμός των foci ανά κύτταρο και τα νούμερα αυτά διαιρέθηκαν με τον συνολικό αριθμό των foci (στη προκειμένη περίπτωση 200). Σύμφωνα με τις στατιστικές αναλύσεις, η μέση τιμή των foci πριν την αιμοδυναμική επέμβαση αυξήθηκε από  $0.64 \pm 0.43$  (διάμεση τιμή 0.54, 95% CI: 0.44 έως 0.83) σε  $1.66 \pm 1.03$  (διάμεση τιμή 1.59, 95% CI: 1.20 έως 2.12) μετά την επέμβαση και μάλιστα η διαφορά αυτή ήταν στατιστικά σημαντική ( $p < 0,001$ , **Πίνακας 2.2, Γράφημα 2.2**), ενώ η μέση τιμή των foci μετά την in vitro ακτινοβόληση με 1 Gy στο εργαστήριο ήταν  $11.59 \pm 0.89$  (διάμεση τιμή 11.35, 95% CI: 11.19 έως 11.98, **Πίνακας 2.3, Γράφημα 2.2**). Για το σύνολο των ασθενών 24 ώρες μετά την in vivo έκθεση η μέση τιμή των foci ήταν  $0.91 \pm 0.52$  (διάμεση τιμή 0.85, 95% CI: 0.68 έως 1.14) που αντιστοιχεί σε συνολικό ποσοστό επιδιόρθωσης περί το 66.5% (**Πίνακας 2.2, Γράφημα 2.2**). Παρά την δράση των επιδιορθωτικών μηχανισμών, η παρουσία των foci 24 ώρες μετά την in vivo έκθεση παρέμεινε σε αυξημένα επίπεδα σε στατιστικά σημαντικό βαθμό σε σχέση με την τιμή αναφοράς ( $p < 0,001$ ). Παρομοίως, τα επίπεδα των foci 24 ώρες μετά την in vitro ακτινοβόληση παρέμειναν σε αυξημένα επίπεδα ( $2.15 \pm 1.10$ , διάμεση τιμή 2.23, 95% CI: 1.77 έως 2.53) σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ( $p < 0,001$ ) σε σχέση με την τιμή αναφοράς που αντιστοιχεί σε συνολικό ποσοστό επιδιόρθωσης περί το 86.3% (**Πίνακας 2.3, Γράφημα 2.2**). Όλοι οι ασθενείς παρουσίασαν αυξημένη συχνότητα των  $\gamma$ -H2AX foci μετά τις επεμβατικές πράξεις και στο 91% αυτών η αύξηση αυτή ήταν στατιστικά σημαντική σε σύγκριση με την συχνότητα των  $\gamma$ -H2AX foci πριν την επεμβατική πράξη ( $p < 0,001$ , **Πίνακας 2.2, Γράφημα 2.3**). Επιπροσθέτως, βρέθηκε ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της συχνότητας των  $\gamma$ -H2AX foci και του χρόνου ακτινοσκόπησης ( $r = 0.519$ ,  $p = 0.013$ ) όπως επίσης θετική συσχέτιση υπάρχει μεταξύ της συχνότητας των  $\gamma$ -H2AX foci και της ενεργού δόσεως που κατανέμεται στους ασθενείς ( $r = 0.517$ ,  $p = 0.014$ ) σύμφωνα με το μοντέλο της γραμμικής παλινδρόμησης. Εικόνες από τα foci που ανιχνεύθηκαν μετά από αιμοδυναμικές πράξεις παρουσιάζονται στην **Εικόνα 2.3**).

**Εικόνα 2.3** Τα  $\gamma$ -H2AX foci με την βοήθεια του ανοσοφθορισμού φαίνονται παρακάτω. Α: πριν από την έκθεση, Β: μετά την έκθεση κατά την διάρκεια των αιμοδυναμικών πράξεων, Γ: μετά την ακτινοβολήση με 1Gy



## 2.5 Αποτελέσματα από τον υπολογισμό του επιπρόσθετου κινδύνου για καρκίνο (LAR)

Τέλος, με τη βοήθεια του πίνακα από τον BEIR VII (28) όπου αναγράφεται ο δείκτης LAR, την ενεργό δόση, το φύλο και την ηλικία, υπολογίστηκε η διακινδύνευση για κάθε ασθενή ξεχωριστά. Η διάμεση τιμή LAR για τον συνολικό κίνδυνο επίπτωσης στην υγεία από καρκίνο και θνησιμότητας από καρκίνο βρέθηκε ίση με 0.046% (διακύμανση: 0.005-0.291) και 0.032% (διακύμανση: 0.004-0.179), αντιστοίχως. Αντίστοιχα αποτελέσματα βασισμένα στις μετρήσεις των  $\gamma$ -H2AX foci έδειξαν πως η διάμεση τιμή ήταν 0.625% (διακύμανση: 0.051-1.999) και 0.423% (διακύμανση: 0.036-1.354). Τα αποτελέσματα αυτά προέρχονται από την διαίρεση του δείκτη LAR με τον αριθμό των  $\gamma$ -H2AX foci που καταγράφηκε στα κύτταρα μετά απο 1Gy ακτινοβολήση και στη συνέχεια πολλαπλασιάζοντας το αποτέλεσμα αυτό με τον αριθμό των  $\gamma$ -H2AX foci που καταγράφηκε μετά τις αιμοδυναμικές πράξεις για κάθε ασθενή ξεχωριστά.

**Πίνακας 2.2** Μέση τιμή των χρωμοσωματικών αλλοιώσεων, μικροπυρήνων και  $\gamma$ -H2AX foci ανά κύτταρο πριν την έκθεση, αμέσως μετά την έκθεση των ασθενών κατά τις αιμοδυναμικές πράξεις, 24 ώρες μετά την έκθεση των ασθενών καθώς και το ποσοστό των  $\gamma$ -H2AX foci που επιδιορθώθηκαν μετά από 24 ώρες.

Ασθενείς	Χρωμ. αλλοιώσεις πριν την έκθεση	Χρωμ. αλλοιώσεις μετά την έκθεση	Συχνότητα μικροπυρήνων πριν την έκθεση	Συχνότητα μικροπυρήνων μετά την έκθεση	γ-H2AX foci πριν την έκθεση	γ-H2AX foci μετά την έκθεση	γ-H2AX foci 24 h μετά την έκθεση	Ποσοστό γ-H2AX foci που επιδιορθώθηκαν σε 24 h
1	0.001	0.002	0.018±0.147	0.024±0.153	-	-	-	-
2	0	0.003	0.007±0.083	0.016±0.09	0.39±0.76	2.53±2.12	0.54±0.83	92.9%
3	0.003	0.003	0.005±0.070	0.007±0.083	1.19±1.69	4.7± 2.21	1.94±2.29	78.6%
4	0.003	0.004	0.006±0.077	0.012±0.108	0.50±1.09	1.25±1.75	0.83±1.34	56%
5	0	0.003	0.01±0.099	0.013±0.11	0.62±1.16	1.5± 2.19	0.98±1.31	59.09%
6	0	0	0.005±0.07	0.010±0.09	0.23±0.54	0.9±1.21	0.41±0.69	73.1%
7	0.001	0.004	0.009±0.09	0.016±0.125	0.85±1.41	1.26±1.51	1.03±1.42	62.04%
8	0	0	0.003±0.05	0.007±0.08	0.63±0.81	1.78±1.47	0.68±1.01	95.6%
9	0	0	-	-	0.52±1.16	2.1±2.03	0.74±1.02	86%
10	0	0	-	-	0.03±0.23	0.12±0.483	0.07±0.25	55.5%
11	0	0.003	-	-	0.01±0.16	0.12±0.4	0.08±0.27	36.3%
12	0	0.002	-	-	0.07±0.38	0.15±0.39	0.13±0.33	25%
13	-	-	-	-	0.44±0.83	1.42±1.81	0.87±1.09	56.1 %
14	0	0.001	0.007±0.083	0.014±0.117	0.78±1.26	1.29±1.78	0.82±1.09	92.1%
15	0.001	0.001	0.005±0.07	0.04±0.20	1.59±1.48	1.69±2.03	1.63±1.78	60%
16	0	0	0.007±0.08	0.066±0.24	1.02±1.48	2.18±2.16	1.2±1.8	84.4%
17	0	0.001	0.006±0.077	0.019±0.136	0.38±0.70	1.3±1.35	0.65±0.96	70.6%
18	0	0.001	0.009±0.094	0.011±0.104	0.35±0.57	0.88±1.46	0.64±1.02	45.2%
19	0	0.002	0.003±0.054	0.028±0.165	-	-	-	-
20	0	0.002	0.009±0.09	0.017±0.129	0.79±1.62	1.16±1.92	1.03±1.31	35.1%
21	0	0.002	0.009±0.094	0.013±0.113	0.58±0.73	0.95±1.45	1.46±1.78	63.4%
22	0	0.001	0.007±0.083	0.016±0.125	0.98±1.66	1.89±2.1	1.32±1.7	62.6%
23	0	0.002	0.008±0.089	0.023±0.15	1.59±2.04	1.85±2.55	1.66±1.75	73%
24	0	0.002	0.005±0.070	0.013±0.113	0.49±0.88	2.31±2.51	0.94±1.23	75.2%
25	0	0.001	0.008±0.089	0.042±0.20	-	-	-	-
26	0.001	0.002	0.012±0.10	0.027±0.17	-	-	-	-
27	0	0	0.007±0.08	0.012±0.11	-	-	-	-
28	0.001	0.004	0.012±0.10	0.018±0.14	-	-	-	-
29	0	0.001	0.013±0.11	0.016±0.13	-	-	-	-
30	0	0	0.011±0.10	0.024±0.16	-	-	-	-
<b>Μέση τιμή</b>	<b>0.00038±0.000820</b>	<b>0.00162±0.00129</b>	<b>0.008±0.0033</b>	<b>0.020±0.013</b>	<b>0.64±0.43</b>	<b>1.66±1.03</b>	<b>0.91±0.52</b>	

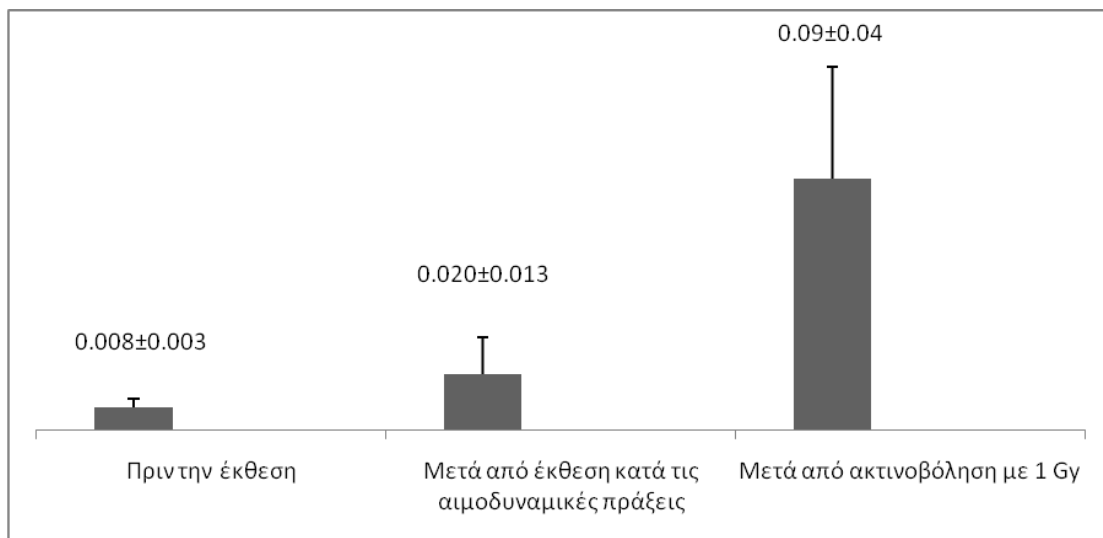
**Πίνακας 2.3** Μέση τιμή των  $\gamma$ -H2AX foci και της συχνότητας των μικροπυρήνων ανά κύτταρο μετά από αιμοδυναμικές πράξεις και μετά από ακτινοβολήση με 1Gy μέσα στο εργαστήριο

<b>Patients</b>	<b>Frequency of MN after the procedure</b>	<b>Frequency of MN after irradiation with 1 Gy</b>	<b><math>\gamma</math>-H2AX foci after the procedure</b>	<b><math>\gamma</math>-H2AX foci after irradiation with 1 Gy</b>
1	0.024±0.153	-	-	-
2	0.016±0.09	0.03±0.19	2.53±2.09	12.6±3.11
3	0.007±0.083	0.052±0.23	4.7± 2.21	13.4±2.38
4	0.012±0.108	0.08±0.28	2.65±2.31	12.9± 2.41
5	0.013±0.11	0.065±0.26	1.5± 2.19	10.9±2.48
6	0.010±0.09	0.060±0.237	2.01± 3.18	10.9±2.48
7	0.016±0.125	0.064±0.248	2.51±2.08	10.9±2.39
8	0.007±0.08	0.057±0.25	1.78±1.47	11.9±2.45
9	-	-	1.28±1.6	12.6±2.39
10	-	-	0.12±0.483	10.6±2.31
11	-	-	0.12±0.4	11.7±2.5
12	-	-	0.15±0.39	10.6±2.3
13	-	-	1.42±1.81	11.01 ±2.1
14	0.014±0.117	-	1.29±1.78	11.03±2.17
15	0.04±0.20	0.23±0.54	1.69±2.03	11.4±3.23
16	0.066±0.24	0.18±0.38	2.18±2.16	10.7±2.48
17	0.019±0.136	0.114±0.33	0.86±1.13	10.6±4.43
18	0.011±0.104	0.058±0.233	1.38±1.84	12.7±2.42
19	0.028±0.165	0.114±0.317	-	-
20	0.017±0.129	0.064±0.244	1.16±1.92	11.3±2.44
21	0.013±0.113	0.066±0.248	2.99±3.04	13.02±2.33
22	0.016±0.125	0.12±0.325	1.89±2.1	10.9±2.31
23	0.023±0.15	0.061±0.239	1.85±2.55	11.8±2.49

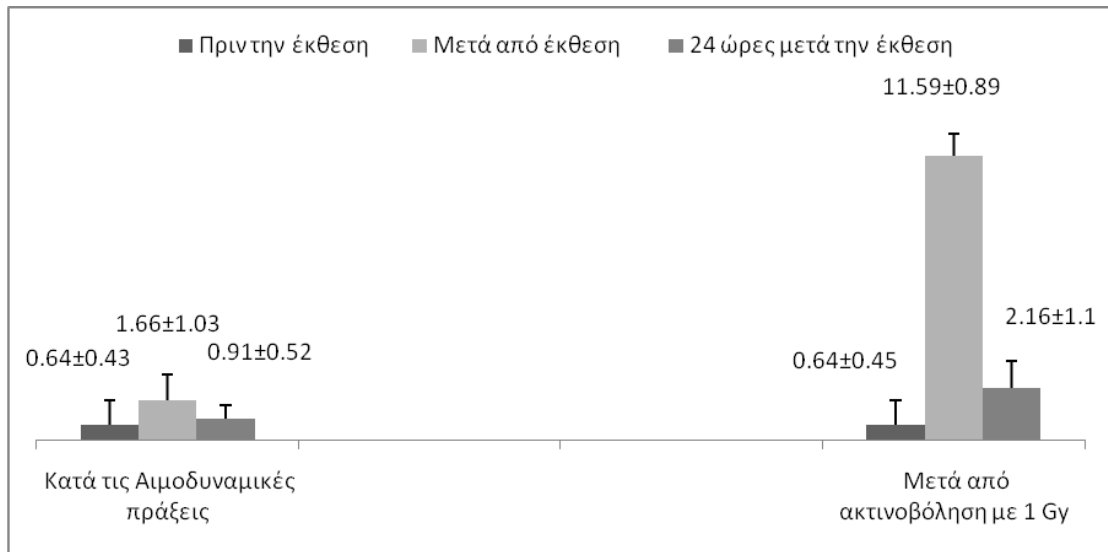


24	0.013±0.113	0.1±0.31	2.31±2.51	11.6±2.58
25	0.042±0.20	0.085±0.279	-	-
26	0.027±0.17	0.099±0.33	-	-
27	0.012±0.11	0.12±0.39	-	-
28	0.018±0.14	0.094±0.36	-	-
29	0.016±0.13	0.12±0.40	-	-
30	0.024±0.16	0.102±0.36	-	-
<b>Μέση Τιμή</b>	<b>0.020±0.013</b>	<b>0.09±0.04</b>	<b>1.66±1.03</b>	<b>11.59±0.89</b>

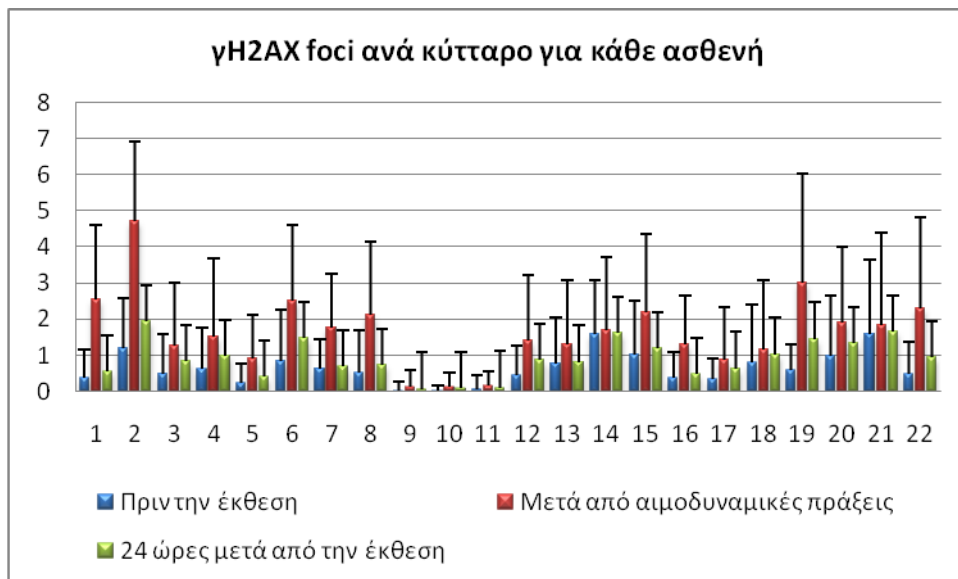
**Γράφημα 2.1** Μέση τιμή των μικροκυρήνων για το σύνολο των ασθενών πριν την έκθεση, μετά από τις αιμοδυναμικές πράξεις και μετά από ακτινοβόληση των δειγμάτων στο εργαστήριο με 1 Gy



**Γράφημα 2.2** Μέση τιμή των γ-H2AX foci για το σύνολο των ασθενών πριν την έκθεση, μετά από τις αιμοδυναμικές πράξεις και 24 ώρες μετά από την έκθεσή τους κατά τις αιμοδυναμικές πράξεις καθώς και μετά από ακτινοβόληση των δειγμάτων στο εργαστήριο με 1 Gy και 24 ώρες μετά την ακτινοβόληση αυτών



**Γράφημα 2.3**  $\gamma$ -H2AX foci για 22 ασθενείς πριν την έκθεση, μετά από τις αιμοδυναμικές πράξεις και 24 ώρες μετά από την έκθεσή τους κατά τις αιμοδυναμικές πράξεις



## 2.6 Αποτελέσματα από τα πειράματα CBMN i-FISH και χρωμοθρύψης

Όπως ήδη αναφέρθηκε, οι μη επιδιορθωμένες βλάβες στο DNA είναι δυνατόν να επάγουν ασύμμετρες κυτταρικές διαιρέσεις, ανευπλοειδία και γενωμική αστάθεια που αποτελεί έναν από τους κύριους μηχανισμούς έναρξης καρκινογένεσης. Αυτό μπορεί

να ανιχνευτεί χρησιμοποιώντας την μεθοδολογία της cytochalasin-B mediated i-fish (CB-iFISH). Η CB-iFISH που συνδυάζει την μέθοδο της αναστολής της κυτταροκίνησης με την χρήση φθορίζοντων ιχνηθετών που προσδένονται αποκλειστικά στο κεντρομερίδιο που περιέχεται στον μικροπυρήνα επιτρέπει την ανίχνευση ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων (78).

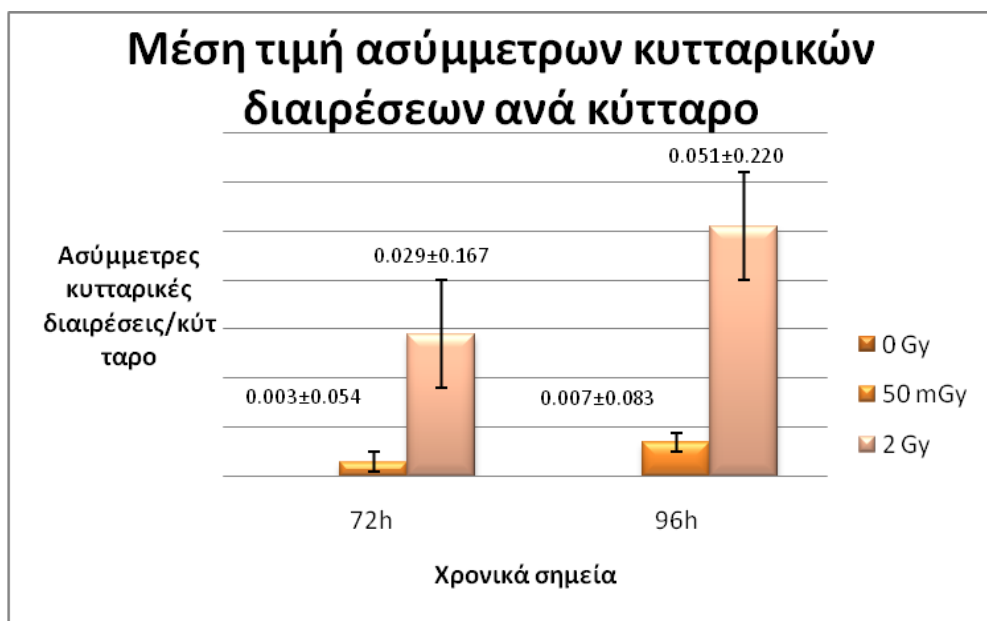
Η μελέτη μας λοιπόν βασίζεται αφενός στην ανίχνευση αλλοιώσεων σε κυτταρικό και χρωμοσωματικό επίπεδο, μετά από έκθεση ασθενών σε χαμηλές δόσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας κατά τις αιμοδυναμικές πράξεις και αφετέρου αν αυτές οι ακτινοεπαγόμενες βλάβες επιδιορθώνονται καθώς και φυσικά το ποσοστό επιδιόρθωσης. Το επόμενο βήμα ήταν η μελέτη των μη επιδιορθωμένων βλαβών του DNA. Για να γίνει η μελέτη αυτή, λάβαμε περιφερικό αίμα από πέντε διαφορετικούς δότες όπου ένα μέρος του δεν ακτινοβολήθηκε (control), ένα άλλο μέρος του ακτινοβολήθηκε με χαμηλή δόση (50 mGy), και ένα άλλο μέρος ακτινοβολήθηκε με υψηλή δόση (2 Gy) ως θετικό control. Ο αναστολέας της κυτταροκίνησης, κυτταροχαλασίνη B εναποτέθηκε στις 44 και 72 ώρες μετά την ακτινοβολήση ενώ τα αποτελέσματα της μεθόδου αυτής αναλύθηκαν και καταγράφηκαν για δύο διαφορετικά χρονικά σημεία, σε 72 και 96 ώρες μετά την στιγμή της ακτινοβολήσης αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως στις 72 και 96 ώρες η μέση τιμή των ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων μετά από έκθεση σε χαμηλή δόση ακτινοβολίας ήταν  $0.003 \pm 0.054$  και  $0.007 \pm 0.083$  αντιστοίχως ( $p < 0.001$ ). Στις 72 και 96 ώρες η μέση τιμή των ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων μετά από έκθεση σε υψηλή δόση ακτινοβολίας ήταν  $0.029 \pm 0.167$  και  $0.051 \pm 0.220$  αντιστοίχως ( $p < 0.001$ ). Στον **πίνακα 2.4** παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα για τον κάθε δότη ξεχωριστά, ενώ στο **γράφημα 2.4** παρουσιάζονται οι μέσες τιμές και στην **εικόνα 2.4** ενδεικτικά αποτελέσματα με παρουσία ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων.

Αναφορικά με τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο για την πιθανή ανίχνευση χρωμοθρύψης αναλύθηκαν 5000 μεταφάσεις για κάθε χρονικό σημείο. Συγκεκριμένα, μετά από έκθεση σε χαμηλή δόση, για κάθε χρονικό σημείο δεν ανιχνεύθηκαν χρωμοσωματικές περιοχές θρυμματισμένες άρα δεν παρατηρήθηκε το φαινόμενο της χρωμοθρύψης.

**Πίνακας 2.4:** Ασύμμετρες κυτταρικές διαιρέσεις ανά κύτταρο για κάθε χρονικό σημείο σε σχέση με την δόση

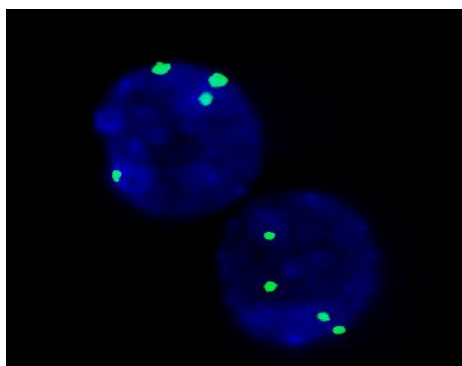
Δότες	Δόση ακτινοβολίας	72 ώρες	96 ώρες
	<b>0 Gy</b>	0	0
<b>1</b>	<b>50 mGy</b>	0.001±0.031	0.003±0.054
	<b>2 Gy</b>	0.016±0.125	0.041±0.198
	<b>0 Gy</b>	0	0
<b>2</b>	<b>50 mGy</b>	0.002±0.044	0.006±0.077
	<b>2 Gy</b>	0.025±0.156	0.049±0.215
	<b>0 Gy</b>	0	0
<b>3</b>	<b>50 mGy</b>	0.002±0.044	0.007±0.083
	<b>2 Gy</b>	0.028±0.165	0.051±0.220
	<b>0 Gy</b>	0	0
<b>4</b>	<b>50 mGy</b>	0.003±0.054	0.008±0.089
	<b>2 Gy</b>	0.033±0.178	0.053±0.224
	<b>0 Gy</b>	0	0
<b>5</b>	<b>50 mGy</b>	0.003±0.054	0.007±0.083
	<b>2 Gy</b>	0.031±0.173	0.052±0.223

**Γράφημα 2.4** Μέση τιμή ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων ανά κύτταρο για κάθε χρονικό σημείο σε σχέση με την δόση

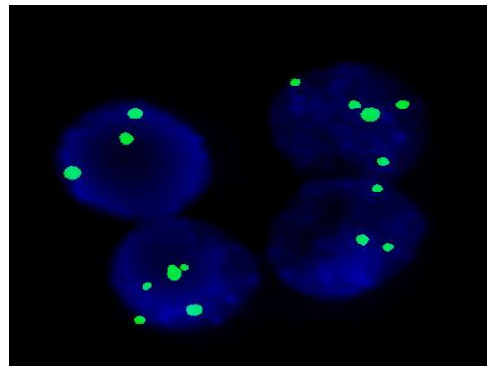


**Εικόνα 2.4** Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται φυσιολογική κυτταρική διαίρεση (**A**) αλλά και ασύμμετρες κυτταρικές διαιρέσεις (**B**) ύστερα από *in vitro* ακτινοβόληση με 50 mGy και με 2 Gy.

**A.** Φυσιολογικές κυτταρικές διαιρέσεις



**B.** Ασύμμετρες κυτταρικές διαιρέσεις



### Κεφάλαιο 3: Συζήτηση αποτελεσμάτων

Με την πρόοδο στον τομέα της τεχνολογίας αλλά και της ιατρικής, όλο και περισσότεροι άνθρωποι χρειάζεται να υποβληθούν σε κάποια εξέταση ή παρέμβαση που απαιτεί τη χρήση ιοντίζουσας ακτινοβολίας, της οποίας η επιβλαβής επίδραση στην έμβια ύλη είναι καλά τεκμηριωμένη. Παρά το ότι η ετήσια ενεργός δόση που λαμβάνει κάθε μέλος του πληθυσμού της χώρας μας είναι κατά μέσο όρο 4.5 mSv σύμφωνα με την Ελληνική Επιτροπή Ατομικής Ενέργειας, τα 1.8 mSv λαμβάνονται από διαγνωστικές και επεμβατικές ιατρικές πράξεις. Υποθέτοντας πως οι εξετάσεις με τη χρήση ακτίνων-χ είναι κλινικά αιτιολογημένες και βελτιστοποιημένες, τα αναμενόμενα κλινικά οφέλη από τη χρήση ακτινοβολίας ξεπερνούν τους κινδύνους που προέρχονται από αυτή (20).

Στην παρούσα διατριβή, μελετήθηκε η επίδραση πολύ χαμηλών δόσεων ιοντίζουσας ακτινοβολίας σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε διάφορες αιμοδυναμικές πράξεις με τρεις διαφορετικές κυτταρογενετικές τεχνικές: την κυτταρογενετική ανάλυση δικεντρικών χρωμοσωμάτων, την καταμέτρηση μικροπυρήνων μέσω της αναστολής της κυτταροκίνησης και την τεχνική εντοπισμού των εστιών της φωσφορυλιωμένης ιστονικής πρωτεΐνης H2A ( $\gamma$ -H2AX foci). Διαπιστώθηκε πως για το σύνολο των ασθενών, ανιχνεύονται βλάβες, τόσο σε χρωμοσωματικό, όσο και σε μοριακό επίπεδο (DNA) μετά την έκθεσή τους και μάλιστα σε στατιστικά σημαντικό βαθμό. Φαίνεται μάλιστα πως η μέθοδος της φωσφορυλιωμένης ιστόνης είναι η πιο ευαίσθητη μέθοδος για ανίχνευση χαμηλών δόσεων ακτινοβολίας, αφού ήταν ο μόνος βιοδείκτης μέσω του οποίου εξήχθησαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ( $p < 0.001$ ) σε ατομικό επίπεδο για το 91% των ασθενών.

Τα ευρήματα της παρούσας διατριβής βρίσκονται σε συμφωνία με άλλες επιστημονικές μελέτες στη βιβλιογραφία στις οποίες συμπεριλαμβάνονται ασθενείς που εκτίθενται σε χαμηλές δόσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Ειδικότερα, σύμφωνα με τον Shi L. κ.α (83) καθώς και άλλων ερευνητικών μελετών, μετά από κυτταρογενετική ανάλυση που διεξήχθη, ο αριθμός των δικεντρικών χρωμοσωμάτων και των δακτυλίων ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένος σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε αξονική τομογραφία (68 - 77, 84). Στην παρούσα διατριβή, μετά

από τις αιμοδυναμικές πράξεις στις οποίες η μέση τιμή ενεργού δόσης ήταν  $17.23 \pm 15.8$  mSv, μελετήθηκαν και αναλύθηκαν συνολικά 48.000 κύτταρα. Η μέση τιμή των χρωμοσωματικών αλλοιώσεων που προκλήθηκαν μετά από τις αιμοδυναμικές πράξεις είναι  $0.00162 \pm 0.00129$  ανά κύτταρο. Ωστόσο, παρά την στατιστικά σημαντική αύξηση της συχνότητας των χρωμοσωματικών αλλοιώσεων συγκριτικά με την αντίστοιχη συχνότητα πριν την έκθεση για το σύνολο των ασθενών, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά πριν και μετά την αιμοδυναμική πράξη σε ατομικό επίπεδο, για κάθε ασθενή ξεχωριστά.

Οι ακτινοεπαγόμενες χρωμοσωματικές αλλοιώσεις και οι μικροπυρήνες είναι το αποτέλεσμα των μη ή εσφαλμένα επιδιορθωμένων δίκλωνων βλαβών στο DNA. Στη διεθνή βιβλιογραφία (Shi L.(83) και Kanagaraj K. (84)) αναφέρεται επίσης στατιστικά σημαντική αύξηση μικροπυρήνων μετά από έκθεση σε χαμηλές δόσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Τα αποτελέσματά της παρούσας διατριβής είναι σε συμφωνία με αυτά τα ευρήματα, υποδηλώνοντας πως ακόμη και κάποια χαμηλή δόση ιοντίζουσας ακτινοβολίας μπορεί να επάγει αύξηση στον αριθμό των μικροπυρήνων, εάν χρησιμοποιήσουμε τη μέθοδο της αναστολής της κυτταροκίνησης. Συγκεκριμένα, οι τιμές της ενεργού δόσης που καταγράφηκαν για αιμοδυναμικές πράξεις είχαν εύρος 1.74-62.5 mSv και παρατηρήθηκε μία στατιστικά σημαντική αυξημένη συχνότητα μικροπυρήνων στο σύνολο των ασθενών που αναλύθηκαν, φτάνοντας έτσι τη μέση τιμή  $0.0204 \pm 0.0143$  ανά κύτταρο, σε σύγκριση με τη μέση τιμή πριν την έκθεση των ασθενών που ήταν  $0.0073 \pm 0.0032$  ανά κύτταρο. Σε ατομικό επίπεδο όμως η αύξηση των μικροπυρήνων ήταν στατιστικά σημαντική μόνο στο 25% αυτών. Τα ευρήματά αυτά είναι σε συμφωνία με διεθνείς μελέτες που αναφέρουν πως παρατηρήθηκε αυξημένος αριθμός μικροπυρήνων μετά από έκθεση κυττάρων σε χαμηλές δόσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας (84, 85). Η μέθοδος της αναστολής της κυτταροκίνησης σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα είναι από τις πιο συχνά εφαρμόσιμες μεθόδους για την μελέτη βλαβών στο DNA και τα χρωμοσώματα (86), αλλά θεωρείται πως έχει μικρότερη ευαισθησία συγκριτικά με την κυτταρογενετική μέθοδο ανάλυσης δικεντρικών χρωμοσωμάτων (87). Το μειονέκτημα της μεθόδου της αναστολής της κυτταροκίνησης είναι πως η διακύμανση της συχνότητας των μικροπυρήνων είναι πολύ μεγάλη σε δείγματα υποβάθρου, δηλαδή σε δείγματα που δεν έχουν ακτινοβοληθεί ή εκτεθεί σε χημικοτοξικές ουσίες και αυτό αποτελεί σημαντικό περιορισμό για τη μελέτη χαμηλών δόσεων ακτινοβολίας (88). Ωστόσο, οι

μικροπυρήνες και οι χρωμοσωματικές αλλοιώσεις θεωρούνται αξιόπιστοι βιοδείκτες για χρωμοσωματικές βλάβες καθώς είναι και προάγγελοι του αυξημένου κινδύνου για καρκινογένεση (68). Πράγματι, ακτινοεπαγόμενοι μικροπυρήνες μπορεί να συμβάλλουν στη δημιουργία γενωμικής αστάθειας μέσω της τυχαίας αναδιάταξης του γενετικού υλικού και πιθανού επακόλουθου της χρωμοθρύψης που προκαλείται από την πρόωρη συμπύκνωση της χρωματίνης (82). Επίσης, σύμφωνα με την δημοσίευση της A. Vral (88), η μέθοδος των μικροπυρήνων είναι μία αξιόπιστη προτυποποιημένη τεχνική στον τομέα της βιολογικής δοσιμετρίας, αφού μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να εκτιμηθεί η δόση ακτινοβολίας είτε σε επαγγελματικά εκτιθέμενους, είτε σε άτομα που έχουν εκτεθεί λόγω ατυχήματος. Επιπλέον, η αναστολή κυτταροκίνησης που χρησιμοποιείται στη μέθοδο, έχει την ικανότητα να ανιχνεύει ασύμμετρες κυτταρικές διαιρέσεις, που είναι προάγγελοι γενωμικής αστάθειας και πιθανή ένδειξη για καρκινογένεση.

Σε μοριακό επίπεδο, υπάρχουν μελέτες που αναφέρουν αύξηση των δίκλωνων θραύσεων στο DNA μετά από έκθεση σε χαμηλές δόσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Σύμφωνα με τις δημοσιεύσεις των Kuefner (89) και Alipoor (90), παρατηρήθηκε αύξηση στο ποσοστό των δίκλωνων θραύσεων μετά από έκθεση σε ακτινοβολία κατά τη διάρκεια αγγειογραφίας, συγκριτικά με τις αντίστοιχες βλάβες πριν την έκθεση. Αντίστοιχα, στην παρούσα διατριβή παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση όχι μόνο στην μέση τιμή των δίκλωνων θραύσεων στο DNA για το συνολικό αριθμό των ασθενών, αλλά και σε ατομικό επίπεδο, καθώς η αύξηση μετά από αιμοδυναμικές πράξεις ήταν στατιστικά σημαντική στο 91% αυτών.

Ανάμεσα στους 3 βιοδείκτες έκθεσης που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή, μόνο η μέθοδος ανίχνευσης εστιών (foci) φωσφορυλιωμένης ιστόνης  $\gamma$ -H2AX, έδειξε μία θετική συσχέτιση μεταξύ της συχνότητας των  $\gamma$ -H2AX foci και του χρόνου ακτινοσκόπησης ( $r=0.519$ ,  $p=0.013$ ) καθώς επίσης και μεταξύ της συχνότητας των  $\gamma$ -H2AX foci και της ενεργού δόσης ( $r=0.517$ ,  $p=0.014$ ). Τα αποτελέσματά είναι σε συμφωνία με προγενέστερες μελέτες που αναφέρουν την θετική συσχέτιση μεταξύ συχνότητας των  $\gamma$ -H2AX foci και της ενεργού δόσης (90, 91). Ο Geisel και οι συνεργάτες του (77) βρήκαν πως 24 ώρες μετά την ακτινοβόληση υπήρχε πλήρης επιδιόρθωση των δίκλωνων θραύσεων στο DNA φτάνοντας έτσι το υπόβαθρο. Ωστόσο, ο Grudzenski και οι συνεργάτες του (37) βρήκαν ότι δεν παρατηρήθηκε



απώλεια στις δίκλωνες θραύσεις του DNA μετά από 24 ώρες στα 10 mGy. Τα αποτελέσματα της διατριβής είναι σε συμφωνία με αυτά των παραπάνω βιβλιογραφικών αναφορών, αφού διαπιστώθηκε πως δίκλωνες θραύσεις στο DNA παρέμειναν σε αυξημένα επίπεδα σε στατιστικά σημαντικό βαθμό, 24 ώρες μετά την έκθεση των ασθενών συγκριτικά με τα επίπεδα προ έκθεσης (baseline) των ασθενών (30, 37). Εντούτοις, η απόκλιση στις τιμές των foci που παραμένουν 24 ώρες μετά την ακτινοβόληση ποικίλει σημαντικά μεταξύ των διαφορετικών ατόμων, έχοντας ένα εύρος από 25% έως 95.6% μείωσης των αρχικών foci. Αυτά τα ευρήματα καταδεικνύουν την μεγάλη διακύμανση στο ρυθμό της επιδιόρθωσης (κινητική) των  $\gamma$ -H2AX foci μετά από έκθεση σε χαμηλές δόσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Η κινητική επιδιόρθωσης των  $\gamma$ -H2AX foci είναι σύνθετη και εξαρτάται από διάφορους παράγοντες (91).

Ο ρυθμός της απώλειας των  $\gamma$ -H2AX foci και η παρουσία εναπομεινάντων foci έχει συσχετιστεί με την ακτινοευαισθησία (92). Τα τελευταία χρόνια, είναι διαπιστωμένη η διακύμανση της ακτινοευαισθησίας ανάμεσα στα διαφορετικά άτομα μέσα στο πληθυσμό (93) και η σχέση της ακτινοευαισθησίας με τον μηχανισμό της επιδιόρθωσης είναι υπό διερεύνηση έχοντας αφήσει ανοιχτά ερωτήματα στη ραδιοβιολογία που μπορεί να είναι πολύ κρίσιμα όσον αφορά το επίπεδο των χαμηλών δόσεων ακτινοβολίας. Οι ακτινοεπαγόμενες βλάβες στο DNA μετά από έκθεση σε χαμηλές δόσεις ακτινοβολίας σε συνδυασμό με πιθανά αυξημένη ενδογενή ακτινοευαισθησία, ενδεχομένως να προέρχεται από ελαττωματικούς επιδιορθωτικούς μηχανισμούς, γεγονός που οδηγεί σε αυξημένη συχνότητα των  $\gamma$ -H2AX foci στα άτομα μετά από 24 ώρες από την έκθεση τους (94). Έχει ακόμη αναφερθεί ότι η κινητική επιδιόρθωσης των  $\gamma$ -H2AX foci εξαρτάται από τη δόση (37). Συγκεκριμένα, κύτταρα που εκτέθηκαν στα 200 mGy ή και υψηλότερη δόση, φαίνεται να πραγματοποιούν πολύ γρηγορότερη επιδιόρθωση σε σχέση με κύτταρα που ακτινοβολούνται με μικρότερη δόση. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε πως ο ρυθμός της επιδιόρθωσης στις 24 ώρες μετά την ακτινοβόληση ήταν παρόμοιος για τα 40, 80 και 200 mGy, αλλά σημαντικά χαμηλότερος μετά από 2.5, 10 και 20 mGy. Έχει αναφερθεί ότι είναι πιθανό ότι το επίπεδο των δίκλωνων βλαβών στα γειτονικά κύτταρα επηρεάζει την ικανότητα επιδιόρθωσης (επί παραδείγματι, ένα κύτταρο μπορεί να μην επιδιορθώσει τις βλάβες του όταν τα γειτονικά κύτταρα δεν έχουν δίκλωνες θραύσεις, στην περίπτωση των 10 mGy και κάτω) αλλά δύναται να δείξει

ικανότητα επιδιόρθωσης στα 40 mSv και πάνω (37). Επιπλέον, ένα κύτταρο μπορεί να μην επιδιορθώνει μονόκλωνες θραύσεις μετά από πολύ χαμηλές δόσεις ακτινοβολίας, επειδή οι χαμηλές δόσεις ακτινοβολίας προκαλούν βλάβες που μπορεί να μην είναι αρκετές ώστε να ενεργοποιηθεί ο μηχανισμός της επιδιόρθωσης. Σύμφωνα με τα παραπάνω, μία ακόμη πιθανή εξήγηση για τη διακύμανση που παρουσιάζει η κινητική επιδιόρθωσης των  $\gamma$ -H2AX foci είναι η ενδοκυτταρική επικοινωνία ή ο μηχανισμός των επιδράσεων των γειτονικών/παρακείμενων κυττάρων στα μη ακτινοβολημένα κύτταρα (bystander effects) ή την μη επάρκεια των βλαβών στο DNA (37). Είναι ωστόσο απαραίτητο να αναφερθεί πως στην παρούσα διατριβή δεν λήφθηκε εκ νέου δείγμα αίματος από κάθε ασθενή 24 ώρες μετά την αιμοδυναμική πράξη στην οποία υποβλήθηκε ώστε να διερευνηθεί η *in vivo* κινητική της επιδιόρθωσης των  $\gamma$ -H2AX foci. Η *in vitro* επιδιόρθωση, δηλαδή σε ειδικούς σωλήνες στον επωαστικό κλίβανο όπου ο επιδιορθωτικός μηχανισμός μπορεί να είναι λιγότερο ικανός από ότι θα ήταν αν γινόταν η επιδιόρθωση μέσα στον ίδιο τον οργανισμό του εκτιθέμενου.

Σύμφωνα με τον Belyaev και τους συνεργάτες του (95), είναι πιο πιθανό τα εναπομείναντα foci να αναπαριστούν κάποιες αλλαγές κατά την διαμόρφωση της χρωματίνης, και έτσι κάποιες πιο σύνθετες δίκλωνες θραύσεις να απαιτούν μεγαλύτερο χρόνο για να επιδιορθωθούν. Κατά αυτό τον τρόπο, μπορεί να σχηματίζονται χρωμοσωματικές ανταλλαγές.

Είναι απαραίτητο να διευκρινιστεί επιπλέον, που οδηγούν οι ακτινοεπαγόμενες βλάβες που έχουν επιδιορθωθεί λανθασμένα καθώς και να ξεκαθαριστεί η πιθανή ικανότητα των χρωμοσωματικών αλλοιώσεων να επάγουν ασύμμετρες κυτταρικές διαιρέσεις, μικροπυρήνες και χρωμοσωματική αστάθεια σε σχέση και με την ενδογενή ατομική ακτινοευαισθησία. Όπως έχει αποσειχθεί, η αύξηση των χρωμοσωματικών αλλοιώσεων που συμβαίνει σε ασθενείς με σύνδρομο της αταξίας-τελαγγειεκτασίας, οδηγεί σε γενωμική αστάθεια και προδιάθεση σε καρκινογένεση (96).

Αν και υπάρχουν πολλές μελέτες που αναδεικνύουν τη σχέση μεταξύ της καρκινογένεσης και της έκθεσης σε ιοντίζουσα ακτινοβολία, ο ακριβής μηχανισμός δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί. Η επαγωγή γενωμικής αστάθειας φαίνεται να παίζει

κύριο ρόλο και ίσως να είναι υπεύθυνη για πιθανή εμφάνιση καρκίνου ακόμη και μετά από έκθεση σε χαμηλές δόσεις ακτινοβολίας (97).

Τα ακτινοεπαγόμενα  $\gamma$ -H2AX foci αποτελέσματα στην παρούσα διατριβή καταδεικνύουν σημαντικά μεγαλύτερο κίνδυνο για εμφάνιση καρκίνου από τις αιμοδυναμικές πράξεις στο δείγμα των ασθενών που χρησιμοποιήθηκε, συγκριτικά με τον αντίστοιχο που προκύπτει με βάση το γραμμικό χωρίς κατώφλι πρότυπο εκτίμησης επικινδυνότητας (LNT). Τα ευρήματά μας είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του Beels και των συνεργατών του, οι οποίοι αναφέρουν πως ο κίνδυνος για θνησιμότητα που υπολογίζεται βάσει των  $\gamma$ -H2AX foci είναι πολύ υψηλότερος από τον αντίστοιχο κίνδυνο βάσει του LNT προτύπου. Τα αποτελέσματα του Beels και των συνεργατών του (98) προέκυψαν από παιδιατρικά περιστατικά που υποβλήθηκαν σε καθετηριασμούς. Η αξιοσημείωτη διαφορά της αύξησης του εκτιμώμενου κινδύνου (περίπου 4% σύμφωνα με την μελέτη του Beels (98) και 13% στην δική μας μελέτη) εξηγείται εν μέρει από τη χρήση του  $^{60}\text{Co}$  ως πηγή *in vitro* ακτινοβολήσης στην παρούσα διατριβή, εφόσον ο κίνδυνος από την έκθεση σε ακτίνες-X θα μπορούσε να είναι μεγαλύτερος από τον κίνδυνο σε ακτίνες- $\gamma$  κατά έναν σημαντικό παράγοντα που σύμφωνα με κάποιες μελέτες εία έως και 2 ή 3 (46). Επίσης, σύμφωνα με τον Raani και τους συνεργάτες του (99), η μέτρηση των  $\gamma$ -H2AX foci είναι μία γρήγορη και ευαίσθητη μέθοδος που δεν απαιτεί την καλλιέργεια των κυττάρων και έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν ένας πιθανός δείκτης για την μελέτη του βαθμού των βλαβών στο DNA μετά από αζονικές τομογραφίες (99).

Η τελευταία σειρά πειραμάτων της διατριβής αφορούσε την πιθανή ανίχνευση ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων καθώς και χρωμοσωματικών αλλοιώσεων τύπου χρωμοθρύψης μετά από *in vitro* ακτινοβολήση με χαμηλές δόσεις. Έχει ήδη αναφερθεί πως η πρόκληση ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων οδηγεί στο σχηματισμό θυγατρικών κυττάρων με αριθμό χρωμοσωμάτων διάφορο του 46, δημιουργεί δηλαδή ανευπλοειδείς ή πολυπλοειδείς. Η εμφάνιση τέτοιων φαινομένων οδηγούν σε χρωμοσωματική αστάθεια κάτι που προαναγγέλει την εμφάνιση καρκίνου (100). Στην παρούσα διατριβή, για την πιθανή ανίχνευση ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων πραγματοποιήθηκαν *in vitro* πειράματα όπου στις 72 ώρες οι μέσες τιμές των ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων που βρέθηκαν ήταν  $0.003 \pm 0.054$  και

0.029±0.167 για τα 50 mGy και τα 2 Gy αντίστοιχα. Στις 96 ώρες μετά την έναρξη των καλλιιεργειών, οι μέσες τιμές των ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων που βρέθηκαν ήταν 0.007±0.083 και 0.051±0.220 για τα 50 mGy και τα 2 Gy αντίστοιχα. Προκύπτει λοιπόν πως υπάρχει στατιστικά σημαντική αύξηση των ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων στις 72 και 96 ώρες προαναγγέλοντας έτσι την παρουσία ανευπλοειδίας η οποία φυσικά αυξάνεται όσο αυξάνει η δόση. Επίσης, στατιστικά σημαντική διαφορά έχει η αύξηση των ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων από τις 72 ώρες στις 96 ώρες τόσο μετά από έκθεση σε χαμηλή δόση όσο και μετά από υψηλή δόση. Φαίνεται δηλαδή πως η βιολογική επίδραση αυξάνεται σημαντικά καθώς περνάνε οι κύκλοι των κυττάρων. Ωστόσο, μετά από έκθεση σε χαμηλή δόση ακτινοβολίας και για κάθε χρονικό σημείο αναλύθηκαν 5000 μεταφάσεις όπου δεν ανιχνεύθηκαν χρωμοσωματικές περιοχές θρυμματισμένες δηλαδή χρωμοσωματικές αλλοιώσεις τύπου χρωμοθρύψης. Τα αποτελέσματά μας αναφορικά με τις ασύμμετρες κυτταρικές διαιρέσεις είναι σε συμφωνία με προηγούμενα προκαταρκτικά αποτελέσματα (100) που έδειξαν μια στατιστικώς σημαντική δόσο-εξαρτώμενη αύξηση των ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων μετά από *in vitro* ακτινοβολία σε δόση από 60 mGy και πάνω (60 mGy και 100 mGy) όπως παρατηρήθηκε για τις 72 και 96 ώρες μετά την ακτινοβολία. Επιπροσθέτως, οι Yoon Hee Cho και συνεργάτες (101) χρησιμοποίησαν ανθρώπινα ινοβλαστώματα τα οποία ακτινοβόλησαν με ακτίνες-X στα 200 mGy, 500 mGy και 1 Gy και πρόσθεσαν κυτταροχλασίνη-B σε 28 ώρες πριν την λήξη κάθε καλλιέργειας. Έτσι η ολοκλήρωση των πειραμάτων έγινε σε τρία χρονικά σημεία στις 56, 88, και 240 ώρες. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν πως υπάρχει αύξηση των ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων και για τις 3 δόσεις ακτινοβολίας καθώς αυξάνεται ο χρόνος της καλλιέργειας των κυττάρων. Τα ευρήματα αυτά αν και είναι σε συμφωνία με τα ευρήματα της παρούσας διατριβής δεν χρησιμοποίησαν όμως χαμηλές δόσεις αλλά αρκετά μεγαλύτερες.

Συνοψίζοντας, η έκθεση ακόμη και σε χαμηλές δόσεις μετά από αιμοδυναμικές πράξεις σε επίπεδα έως και 50 mSv φαίνεται να έχει επιπτώσεις σε κυτταρικό και σε χρωμοσωματικό επίπεδο. Ο συνολικός αριθμός των χρωμοσωματικών αλλοιώσεων αλλά και των μικροπυρήνων για το σύνολο των ασθενών ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένος μετά την έκθεση. Ωστόσο, δεν υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά στις χρωμοσωματικές αλλοιώσεις πριν και μετά την έκθεση σε ατομικό επίπεδο.

Στους μικροπυρήνες υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά μόνο στο 25% των ασθενών πριν και μετά την έκθεση για κάθε ασθενή ξεχωριστά. Αύξηση παρατηρήθηκε στον αριθμό των  $\gamma$ H2AX foci για κάθε έναν ασθενή ξεχωριστά, τόσο στο 91% των ασθενών όσο και στο συνολικό αριθμό των foci όλων των ασθενών. Ωστόσο, 24 ώρες μετά έκθεση, ο αριθμός των foci μειώθηκε χωρίς όμως να επανέλθει σε τιμές υποβάθρου και επίσης παρουσίασε μία σημαντική διακύμανση από 25% έως 95.6%. Η μέθοδος χρήσης της φωσφορυλιωμένης ιστόνης (foci) ως βιοδείκτη, αποτελεί την πιο ευαίσθητη μέθοδο για την ανίχνευση χαμηλών δόσεων ιοντίζουσας ακτινοβολίας συγκριτικά με τις υπόλοιπες μεθόδους που εφαρμόστηκαν, αφού βρέθηκε θετική γραμμική συσχέτιση μεταξύ της ενεργού δόσης, αλλά και του χρόνου ακτινοσκόπησης με τον αριθμό των επαγόμενων  $\gamma$ H2AX foci. Επίσης, η εκτίμηση του κινδύνου για εμφάνιση καρκίνου (LAR) μετά από έκθεση σε χαμηλές δόσεις ακτινοβολίας ήταν πολύ μεγαλύτερη βάσει των ραδιοβιολογικών πειραμάτων με βάση τις εστίες  $\gamma$ H2AX σε σύγκριση με την αντίστοιχη εκτίμηση σύμφωνα με το γραμμικό χωρίς κατώφλι πρότυπο (LNT). Τέλος, η τελευταία σειρά πειραμάτων όπου έγινε *in vitro* ακτινοβόληση με 50 mGy για 2 χρονικά σημεία (72 κ 96 ώρες μετά την ακτινοβόληση) υποδεικνύουν πως υπάρχει στατιστικά σημαντική αύξηση των ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων 72 και 96 ώρες μετά την έκθεση, προαναγγέλοντας έτσι την δημιουργία ανευπλοειδίας η οποία αυξάνεται όσο αυξάνει η δόση. Επίσης στατιστικά σημαντική διαφορά έχει η αύξηση των ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων από τις 72 ώρες στις 96 ώρες τόσο μετά από έκθεση σε χαμηλή όσο και μετά από υψηλή δόση. Τέλος, ελέγχθηκε η υπόθεση ότι οι ασύμμετρες κυτταρικές διαιρέσεις και η παρουσία μικροπυρήνων μπορεί να επάγει χρωμοθρύψη μέσω πρόωρης χρωμοσωματικής συμπύκνωσης του χρωμοσωματικού υλικού που εσωκλείεται στους μικροπυρήνες. Με τα *in vitro* πειράματα για τον έλεγχο της υπόθεσης δεν ανιχνεύθηκαν χρωμοσωματικές αλλοιώσεις τύπου χρωμοθρύψης, θρυμματισμένες δηλαδή χρωμοσωματικές περιοχές για κάθε δόση ιοντίζουσας ακτινοβολίας και κάθε χρονικό σημείο που μελετήθηκε.

Τελικά, πέρα από τις επιδημιολογικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, φαίνεται πως τα ραδιοβιολογικά πειραματικά δεδομένα καταδεικνύουν συσχέτιση της έκθεσης σε χαμηλές δόσεις με ακτινοεπαγόμενες βλάβες σε μοριακό (DNA) και κυτταρογενετικό (χρωμοσωματικό) επίπεδο κατά την έκθεση ασθενών σε αιμοδυναμικές πράξεις. Σύμφωνα με τα *in vitro* πειραματικά δεδομένα της παρούσας

διατριβής, η επίδραση αυτή φαίνεται να σχετίζεται με ασύμμετρες κυτταρικές διαιρέσεις και δυνητικά οδηγεί σε ανευλοειδία που αποτελεί προάγγελο καρκινογένεσης.

## Βιβλιογραφία

1. Picano E, Andreassi MG, Piccaluga E, et al. Occupational Risks of Chronic Low Dose Radiation Exposure in Cardiac Catheterization Laboratory: The Italian Healthy Cath Lab Study. *EMJ Int Cardiol.* 2013;1:50-58
2. Ho TL, Shieh SH, Lin CL, et al. Risk of cancer among cardiologists who frequently perform percutaneous coronary interventions: a population-based study. *Eur J Clin Invest.* 2016;46:527-34.
3. UNSCEAR 2008. UNSCEAR Sources and Effects of Ionizing Radiation: Report to the General Assembly, with Scientific Annexes (United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, New York).
4. Picano E, Vañó E, Rehani MM, et al. The appropriate and justified use of medical radiation in cardiovascular imaging: a position document of the ESC Associations of cardiovascular imaging, percutaneous cardiovascular interventions and electrophysiology. *Eur Heart J.* 2014 ;35:665–672.
5. Chen J, Einstein AJ, Fazel R, et al. *J Am Coll Cardiol.* 2010;56:702–711.
6. Pearce MS, Salotti JA, Little MP, et al. 2012 *Lancet.* 380:499–505.
7. Mathews JD, Forsythe AV, Brady Z, et al. 2013 (1). *BMJ.* 346, f2360.
8. WHO 2016 Ionizing radiation, health effects and protective measures.
9. Doody MM, Freedman DM, Alexander BH, et al. Breast cancer incidence in U.S radiologic technologists. *Cancer.* 2006 106:2707-15
10. Abbott A. Researchers pin down risks of low-dose radiation. Large study of nuclear workers shows that even tiny doses slightly boost risk of leukaemia. *Nature.* 2015 523:7558
11. National Council on Radiation Protection and Measurements, NCRP Report No. 160. 2009:242–243.
12. Eugenio Picano, Eliseo Vano. The Radiation Issue in Cardiology: the time for action is now. *Cardiovasc. Ultrasound* 9, 35 2011 <https://doi.org/10.1186/1476-7120-9-35>
13. Radiation Oncology Physics: A Handbook for Teachers and Students. E.B Podgorsak. Sponsored by IAEA, Vienna 2005

14. Ε. Γαζής, Ιοντίζουσες Ακτινοβολίες, Φυσική-Εφαρμογές στη Βιολογία και Ιατρική, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Τμήμα Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών, Τομέας Φυσικής, 1999
15. Handbook for X-ray Imaging: Physics and Technology. Edited by Paolo Russo, CRC Press, International Standard Book Number-13: 978-1-4987-4152-1 Italy 2018
16. X-ray sources: 125 years of developments of this intriguing technology. Rolf Behling, Germany, Physica Medica 79 (2020) 162–187
17. Ε. Καρίνου, Ελληνική Επιτροπή Ατομικής Ενέργειας, Δοσιμετρία Προσωπικού, Αθήνα 2018
18. Radiobiology for the Radiologist. Eric J. Hall., Amato J. Giaccia. 6th Edition 2006 by Lippincott Williams & Wilkins, ISBN: 0-7817-4151-3
19. ICRP Publication 103, The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection, Vol 37 Nos. 2-4 2007 ISSN 0146-6453, ISBN 978-0-7020-3048-2
20. Ελληνική Επιτροπή Ατομικής Ενέργειας, Μαθήματα Ακτινοπροστασίας για Χειριστές Ιατρικών Μηχανημάτων Ιοντιζουσών Ακτινοβολιών, Αθήνα 2011.
21. ICRP 2013 publication 120. Radiological Protection in Cardiology. Authors: C. Cousins et al. Published for ICRP by ELSEVIER. Ann. ICRP 42(1).
22. Ευάγγελος Γεωργίου, Ιατρική Φυσική. Διαγνωστικές και Θεραπευτικές Εφαρμογές των Ακτινοβολιών. Εκδόσεις Πασχαλίδης, ISBN:978-960-489-274-7.
23. Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας. Εισαγωγή στη Μοριακή Βιολογία του Κυττάρου. Τόμος 2 Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης ISBN-set: 960-399-390-5
24. Stewart RD., Yu VK., Georgakilas AG., et al. Effects of radiation quality and oxygen on clustered DNA lesions and cell death. Radiat Res. 2011 Nov; 176(5):587-602. Doi: 10.1667/rr2663.1
25. Nikitaki Z., Nikolov V., Mavragani IV., et al. Measurement of complex DNA damage induction and repair in human cellular systems after exposure to ionizing radiations of varying linear energy transfer (LET). Free Radic Res. 2016 doi: 10.1080/10715762.2016.1232484



26. Markus Lobrich et al.  $\gamma$ -H2AX foci analysis for monitoring DNA Double strand break repair. *Cell Cycle* 9:4, 662-669; February 15, 2010; 2010 Landes Bioscience
27. IAEA, Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment. A Manual. Technical Reports Series No. 405, International Atomic Energy Agency, Vienna. (2001).
28. BEIR 2006. Health Risks from exposure to low levels of ionizing radiation: BEIR VII. Washington DC: National Academic Press; 2006.
29. Ετήσια Στατιστικά Στοιχεία από ΕΕΑΕ 2020
30. Nair R. R., Rajan B., Akiba S. et al. Background radiation and cancer incidence in Kerala, India-Karanagappally cohort study. *Health. Phys.* 2009 Jan;96(1):55–66 doi: 10.1097/01.HP.0000327646.54923.11.
31. Tao Z., Akiba S., Zha Y., et al. . Cancer and non-cancer mortality among Inhabitants in the high background radiation area of Yangjiang, China (1979–1998). *Health. Phys.* 2012. 102(2):173–81 doi: 10.1097/HP.0b013e31822c7f1e.
32. Bethesda, MD. Uncertainties in the estimation of radiation risks and probability of disease causation. National Council on Radiation Protection and Measurements (NCRP). NCRP Report No. 171. 2012;418pp
33. Li L, McCormack AA, Nicholson JM, et al. Cancer-causing karyotypes: chromosomal equilibria between destabilizing aneuploidy and stabilizing selection for oncogenic function. *Cancer Genet Cytogenet* 2009. Jan 1;188(1):1-25 doi: 10.1016/j.cancergencyto.2008.08.016.
34. Rasnick D. The Chromosomal Imbalance Theory of Cancer: The Autocatalyzed Progression of Aneuploidy is Carcinogenesis. Science Publishers. (2011) CRC Press Taylor and Francis Group (ISBN: 9781578087372)
35. Duesberg P, Iacobuzio-Donahue C, Brosnan JA, et al. Origin of metastases: subspecies of cancers generated by intrinsic karyotypic variations. *Cell Cycle.* 2012 Mar 15;11(6):1151-66 doi:10.4161/cc.11.6.19580.
36. Asao Noda. Radiation-induced unrepairable DSBs: their role in the late effects of radiation and possible applications to biodosimetry. *J. Radiat. Res.* 2018 April; 59:ii114-ii120, doi:10.1093/jrr/rr074

37. Grudzinski S., Raths A., Conrad S., et al. Inducible response required for repair of low-dose radiation damage in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:14205–14210 doi: 10.1073/pnas.1002213107.
38. International Atomic Energy Agency. Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies 2011
39. Τερζούδη Γεωργία και Παντελιάς Γαβριήλ, Παρουσίαση, Βιοδοσιμετρία και εξατομίκευση επικινδυνότητας υπερέκθεσης σε ιοντίζουσες ακτινοβολίες με κυτταρογενετικές μεθόδους.
40. Παντελιάς Γ. και Τερζούδη Γ. Μέτρηση χρωμοσωματικών αλλοιώσεων μετά από έκθεση σε γενετοξικούς παράγοντες: νέες μέθοδοι για έγκυρες και αξιόπιστες εκτιμήσεις δόσεων και επιπτώσεων στην υγεία. 2008-2009.
41. M. Fenech, A.A. Morley, Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation (1986). *Mutat Res* 161;193-198.
42. Fenech, Morley, A.A., Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat.Res.* 147(1985) 29–36.
43. Fenech M., Holland N., Chang W.P., et al. The HUMN Project — An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans, *Mutat. Res.* 428(1999) 271–283
44. Thierens H., Vral A., Derrider L., Biological dosimetry using the micronucleus assay for lymphocytes: Interindividual differences in dose-response, *Health Phys.* 61(1991) 623–630
45. Βοργιάς Κ.Ε. Μοριακή Βιολογία. Δομή και ιδιότητες του DNA. Βακτηριακό χρωμόσωμα ευκαρυωτικό χρωμόσωμα και χρωματίνη. Κεφ.1
46. Mah L-J, Osta A El, Karagiannis TC.  $\gamma$ -H2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia* 2010 Apr;24(4):679-86 DOI: 10.1038/leu.2010.
47. Γοργούλης Β. Μηχανισμός απόκριση στις βλάβες του DNA στην καρκινογένεση. Εργαστήριο Ιστολογίας-Εμβρυολογίας.
48. Χαδλά Π. Διδακτορική Διατριβή: Μοριακοί Μηχανισμοί Γενετικής Αστάθειας στον Καρκίνο του Παχέος Εντέρου στον άνθρωπο: ο ρόλος της σηματοδότησης

από την Integrin-Linked-Kinase. Πανεπιστήμιο Πατρών, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, 2020

49. Thompson S., Bakhoun S., Compton D. Mechanisms of chromosomal instability. *Curr. Biol* 2010 Mar 23;20(6):R285-95, doi: 10.1016/j.cub.2010.01.034
50. Sommer S., Buraczewska I., Kruszewski M. Micronucleus assay: The State of Art and Future Directions. *Inter. Journal of Molecular Sciences*.Feb 2020 doi: 10.3390/ijms21041534
51. Marin A., Martin M., Linan O. et al. Bystander effects and radiotherapy. *Rep. Pract Oncol Radiother* 2015 Jan; 20(1): 12-21 doi: 10.1016/j.rpor.2014.08.004
52. Sprung CN., Ivashkevich A., Forrester HB., et al. Oxidative DNA damage caused by inflammation may link to stress induced non targeted effects. *Cancer Lett.* 2015 356(1):72-81 doi: 10.1016/j.canlet.2013.09.008
53. Nikitaki Z., Hellweg CE., Georgakilas AG., et al. Stress-induced DNA damage biomarkers: applications and limitations. *Front Chem* 2015 3:35 doi: 10.3389/fchem. 2015.00035
54. Nikitaki Z., Mavragani IV., Laskaratou DA., et al., Systemic mechanisms and effects of ionizing radiation: a new old paradigm of how the bystanders and distant can become the players. *Semin Cancer Biol.* 2016 doi: 10.1016/j.semcancer.2016.02.002
55. Terzoudi G. I., Karakosta M., Pantelias A, et al. Stress induced by premature chromatin condensation triggers chromosome shattering and chromothripsis at DNA sites still replicating in micronuclei or multinucleate cells when primary nuclei enter mitosis. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 2015 Nov; 793:185-98 doi: 10.1016/j.mrgentox.2015.07.014
56. Stephens P.J., Greenman C.D., Fu B. et al. Massive Genomic Rearrangement Acquired in a Single Catastrophic Event during Cancer Development. *Cell* 2011, 144, 27–40.
57. Forment J.V., Kaidi A., Jackson S.P. Chromothripsis and cancer: Causes and consequences of chromosome shattering. *Nature Reviews Cancer.* 2012, 12, 663–670.

58. Crasta K., Ganem N.J., Dagher R., et al. DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis. *Nature* 2012, 482, 53–58.
59. Catheter-Based Cardiovascular Interventions. A knowledge-based approach. Peter Lanzer Editor. Springer Germany. 2013. DOI 10.1007/978-3-642-27676-7
60. Simantirakis G, Koukorava C, Kalathaki M, et al. Reference levels and patient doses in interventional cardiology procedures in Greece. *Eur Radiol.* 2013;23:2324-32.doi: 10.1007/s00330-013-2813-2
61. Π.Δ. υπ’ αριθμ. 101, Θέσπιση κανονισμών ακτινοπροστασίας, ΦΕΚ 194(A) 20/11/2018.
62. Kumar G. Radiation safety for the interventional cardiologist – A practical approach to protecting ourselves from the dangers of ionizing radiation. Jan 2016 American College of Cardiology.
63. Παντελιάς Γ., Τερζούδη Γ., Παρουσίαση, Βιολογικές Επιδράσεις Χαμηλών Δόσεων Ιοντιζουσών Ακτινοβολιών. Εργαστήριο Υγειοφυσικής, Ραδιοβιολογίας και Κυτταρογενετικής. Ινστιτούτο Πυρηνικών και Ραδιολογικών Επιστημών και Τεχνολογίας, Ενέργειας και Ασφάλειας, ΕΚΕΦΕ, Δημόκριτος.
64. Eisenberg M. J., Afilalo J., Lawler P. R. et al. Cancer risk related to low-dose ionizing radiation from cardiac imaging in patients after acute myocardial infarction. *CMAJ* 2011 Mar 8; 183(4): 430–436. doi: 10.1503/cmaj.100463
65. Kumar G., Rab S.T. Radiation Safety for the Interventional Cardiology- A practical approach to protecting ourselves from the dangers of Ionizing radiation. American College of Cardiology. Jan 04, 2016.
66. Chambers C.E. Occupational health risks in Interventional Cardiology *JACC:Cardiovascular Interventions.* Volume 8, Issue 4, April 2015.
67. Gori T., Munzel T. Biological effects of low-dose radiation: of harm and hormesis *European Heart Journal* 2012 33, 292-5 doi: 10.1093/eurheartj/ehr288.
68. Andreassi MG, Cioppa A, Manfredi S, et al. Acute chromosomal DNA damage in human lymphocytes after radiation exposure in invasive cardiovascular procedures. *Eur Heart J.* 2007;28:2195-9 doi: 10.1093/eurheartj/ehm225

69. Andreassi MG, Botto N., Rizza A., et al. Deoxyribonucleic acid damage in human lymphocytes after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol.* 2002;40:862-8 doi: 10.1016/s0735-1097(02)042-9
70. Geisel D., Heverhagen J.T., Kalinowski M., et al. DNA Double-Strand Breaks after Percutaneous Transluminal Angioplasty. *Radiology*, 2008;248-852-9 doi: 10.1148/radiol.2483071686
71. Kuefner MA, Grudzenski S., Schwab S.A., et al. X-ray induced DNA double-strand breaks after angiographic examinations of different anatomic regions. *Rofo.* 2009;181:374-80 doi: 10.1055/s-0028-1109063
72. Kuefner MA., Grudzenski S., Schwab S.A., et al. DNA double-strand breaks and their repair in blood lymphocytes of patients undergoing angiographic procedures. *Invest Radiol.* 2009;44:440-6 doi:10.1097/RLI.0b013e3181a654a5
73. Adams FH, Norman A., Bass D., et al. Chromosome damage in infants and children after cardiac catheterization and angiocardiography. *Pediatrics*, 1978;62:312-6
74. Shafer DA., Raviele A.A., Dunbar V.G., et al. Increased chromosome damage in pediatric heart catheterization patients after diagnostic fluoroscopy and cineangiography. *Environ Mol Mutagen* 1987;10:387-95 doi: 10.1002/em.2850100408.
75. Stephan G. Schneider K., Panger W., et al. Enhanced yield of chromosome aberrations after CT examinations in pediatric patients. *Int J Radiat Biol.* 2007;83:281-7 doi: 10.1080/09553000701283816
76. Abe Y., Miura T., Yoshida M.A., et al. Analyses of chromosomal translocation after a single CT scan in adults *J. Radiat. Resist* 2016 Jun;57(3):220-6 doi 10.1093/jrr/rrv090
77. Geisel, D., Zimmermann, E., Rief, et al. DNA double-strand breaks as potential indicators for the biological effects of ionising radiation exposure from cardiac CT and conventional coronary angiography: a randomised, controlled study. *Eur Radiol.* 2012;22:1641–50 doi: 10.1007/s00330-012-2426-1.
78. Hatzi VI, Karakosta M, Barszczewska K, et al. Low concentrations of caffeine induce asymmetric cell division as observed in vitro by means of the CBMN-assay and iFISH. *Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 793:71-8 doi: 10.1016/j.mrgentox.2015.08.002.

79. Oestreicher U, Samaga D., Ainsbury E., et al. RENE Intercomparisons applying the conventional Dicentric Chromosome Assay (DCA). *Int J Radiat Biol* 2017 Jan; doi: 10.1080/09553002.2016.1233370
80. Rogakou EP, Papadakis V, Chrousos GP. Epigenetics, the Environment, and Children's Health Across Lifespan. Springer;2016. The Epigenetic Biomarker  $\gamma$ H2AX: From Bench to Clinical Trials. pp 93-115.
81. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*. (2007) 2:1084–104. doi: 10.1038/nprot.2007.77
82. Pantelias A., Karachristou I., Georgakilas A.G., et al. Interphase Cytogenetic Analysis of Micronucleated and Multinucleated Cells Supports the Premature Chromosome Condensation Hypothesis as the Mechanistic origin of Chromothripsis. *Cancers* 2019; doi: 10.3390/cancers1101123
83. Shi L, Fujioka K, Sakurai-Ozato N, et al. Chromosomal Abnormalities in Human Lymphocytes after Computed Tomography Scan Procedure. *Radiat Res*. 2018;190:424-432. Doi: 10.1667/RR14976.1
84. Kanagaraj K, Basheerudeen S, Tamizh S. G, et al. Assessment of dose and DNA damages in individuals exposed to low dose and low dose rate ionizing radiations during computed tomography imaging. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015;789–790:1–6 DOI: 10.1016/j.mrgentox.2015.05.008
85. Shi L, Tashiro S. Estimation of the effects of medical diagnostic radiation exposure based on DNA damage. *J Radiat. Res*. 2018; doi: 10.1093/jrr/rry006.
86. Fenech M. Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. *Toxicology* 2002; 181-182:411-416 doi: 10.1016/s0300/483x(02)00480-8
87. Hayashi M. The micronucleus test- most widely used in vivo genotoxicity test. *Genes. Environ*. 2016; Oct 1;38:18. doi: 10.1186/s41021-016-0044-x.
88. Vral A, Fenech M, Thierens H. The micronucleus assay as a biological dosimeter of in vivo ionising radiation exposure. *Mutagenesis*. 2011 Jan;26(1):11-7. doi: 10.1093/mutage/geq078.
89. Kuefner MA, Brand M, Engert C, et al. Radiation Induced DNA Double-Strand Breaks in Radiology. *Rofo*. 2015;doi: 10.1055/s-0035-1553209
90. Alipoor A, Fardid R, Sharifzadeh S. Evaluating Gamma-H2AX Expression as a Biomarker of DNA Damage after X-ray in Angiography Patients. *J Biomed Phys Eng*. 2018;8:393–402.

91. Halm BM, Franke AA, Lai JF, et al.  $\gamma$ -H2AX foci are increased in lymphocytes in vivo in young children 1 h after very low-dose X-irradiation: a pilot study. *Pediatr Radiol*. 2014;44:1310-7 doi: 10.1007/s00247-014-2983-3.
92. Sharma P.M, Ponnaiya B., Taveras M., et al. High throughput measurement of  $\gamma$ -H2AX DSB repair kinetics in a healthy human population. *PloS One*. 2015; 10(3): e0121083doi: 10.1371/journal.pone.0121083.
93. Bouffler SD. Evidence for variation in human radiosensitivity and its potential impact on radiological protection. *Ann ICRP*. 2016;45(1 Suppl):280-9
94. Younghyun Lee, Yang Qi, Shuryak I., et al. Development of a high-throughput  $\gamma$ H2AX assay based on imaging flow cytometry. *RadiationOncology* 14, Article Number: 150(2019) <https://doi.org/10.1186/s13014-019-1344-7>
95. Belyaev I.Y, Radiation-induced DNA repair foci: spatio-temporal aspects of formation, application for assessment of radiosensitivity and biological dosimetry. *Mutation Research* 2010; 704(1-3): 132-141 doi: 10.1016/j.mrrev.2010.01.011.
96. Alhmoud J. F, Woolley J.F, Moustafa A.E, Malki M. I. DNA Damage/Repair Management in Cancers. *Cancers (Basel)*. 2020April; 12(4):1050 doi: 10.3390/cancers12041050
97. Kulcenty K, Suchorska WM, Skrobała A, et al. Carcinogenesis Induced by Low-dose Radiation. *Radiol Oncol*. 2017;51:369–377 doi: 10.1515/raon-2017-0044. .
98. Beels L., Bacher K., Wolf D., et al.  $\gamma$ -H2AX Foci as a biomarker for patient x-ray exposure in pediatric cardiac catheterization. Are we underestimating radiation risks? *Circulation*. 2009; 120(19):1903-9 doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.880385
99. Raavi V., Perumal V., Paul F.D S. Potential application of  $\gamma$ -H2AX as a biodosimetry tool for radiation triage. *Mutat. Res*. 2021; 787:108350. doi: 10.1016/j.mrrev.2020.108350
100. Βασιλείου Κ. Μελέτη χαμηλών δόσεων ιοντιζουσών ακτινοβολιών σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος με κυτταρογενετικές και μοριακές μεθόδους. Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, 2016
101. Cho Y.H, Kim S.Y, Woo H.D., et al. Delayed Numerical Chromosome Aberrations in Human Fibroblasts by low dose of radiation. *Int J Environ Res Public Health* 2015; doi: 10.3390/ijerph121214979